

# **UCUENCA**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Carrera de Ingeniería Química**

**‘Determinación de la cinética de fermentación y propiedades  
organolépticas de hidromiel’**

Trabajo de titulación previo a la obtención  
del título de Ingeniero Químico.

**Autor:**

Gustavo Francisco García Zea

C.I.: 0302088398

Correo electrónico: [gargiag10484@gmail.com](mailto:gargiag10484@gmail.com)

**Director:**

Mgst. Jorge Washington Delgado Noboa

C.I.: 0103599411

**Cuenca - Ecuador**

**5 de diciembre de 2022**

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar la cinética de fermentación de hidromiel con levadura *Saccharomyces Cerevisiae* después de haber seleccionado el tipo de levadura que genera la bebida fermentada con mejores características organolépticas, la levadura se seleccionó tras la creación de tres lotes de hidromiel, empleando tres levaduras comerciales distintas: levadura comercial de panadería, levadura de fermentación de cerveza, y levadura específica para la producción de hidromiel, estos lotes se evaluaron y se seleccionó la bebida más aceptada por un grupo de catadores no entrenados, lo que permitió enfocar los esfuerzos de la investigación a la determinación de los parámetros cinéticos de la bebida con las mejores características organolépticas.

Para la determinación de los parámetros cinéticos, se realizaron cuatro fermentaciones manteniendo constante la cantidad inicial de biomasa a 1,5 g/l, la temperatura a 33 °C, el pH en 4 y con variaciones de la concentración de °Brix iniciales: con 10, 15, 20 y 25 °Brix, para posteriormente aplicar los modelos matemáticos como la ecuación de Monod, la cual permitió determinar el valor de la constante de saturación  $K_s$  y la velocidad máxima de reacción  $U_{max}$ ; también los datos se ajustaron al modelo Logístico Integrado para la determinación de la velocidad máxima de reacción  $U_{max}$ ; y finalmente se ajustaron los datos de generación de alcohol al modelo de “Gompertz” modificado para encontrar la tasa máxima de generación de alcohol rpm.

El estudio permitió determinar una constante de saturación de 336,6 g/l, un  $U_{max}$  de 0,059  $h^{-1}$  para el modelo cinético de Monod; además se obtuvo un valor de  $U_{max}$  global de 0,0815  $h^{-1}$  (después de ajustar los datos experimentales al modelo Logístico Integrado); y finalmente una taza de generación máxima de alcohol de 0,2621 g/l (después de ajustar los datos al modelo de “Gompertz modificado”).

**Palabras clave:** Hidromiel. Monod. Modelo logístico integrado. Modelo Gompertz Modificado.

## ABSTRACT

The objective of this research work is to determine the kinetics of fermentation of mead with *Saccharomyces cerevisiae* yeast after having selected the type of yeast that generates the fermented beverage with the best organoleptic characteristics, the yeast was selected after the creation of three batches of mead, Using three different commercial yeasts: commercial baker's yeast, beer fermentation yeast, and specific yeast for the production of mead, these batches were evaluated and the most accepted beverage was selected by a group of untrained tasters, which allowed focusing the research efforts to determine the kinetic parameters of the beverage with the best organoleptic characteristics.

To determine the kinetic parameters, four fermentations were carried out keeping the initial amount of biomass constant at 1.5 g/l, the temperature at 33 °C, the pH at 4 and with variations in the initial °Brix concentration: with 10, 15, 20 and 25 °Brix, to subsequently apply mathematical models such as the Monod equation, which allowed determining the value of the saturation constant  $K_s$  and the maximum reaction rate  $U_{max}$ ; the data was also adjusted to the Integrated Logistic model for the determination of the maximum reaction rate  $U_{max}$ ; and finally the alcohol generation data were fitted to the modified "Gompertz" model to find the maximum rate of alcohol generation rpm.

The study allowed to determine a saturation constant of 336.6 g/l, a  $U_{max}$  of 0.059 h^-1 for the Monod kinetic model; In addition, a global  $U_{max}$  value of 0.0815 h^-1 was obtained (after adjusting the experimental data to the Integrated Logistic model); and finally a maximum alcohol generation rate of 0.2621 g/l (after adjusting the data to the "modified Gompertz" model).

**Keywords:** Mead. Monod. Integrated logistics model. Modified Gompertz model.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<i>RESUMEN</i> .....	0
<i>ABSTRACT</i> .....	2
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i> .....	8
<i>ÍNDICE DE ECUACIONES</i> .....	10
<i>ÍNDICE DE ILUSTRACIONES</i> .....	11
<i>CLÁUSULAS</i> .....	13
<i>DEDICATORIA</i> .....	15
<i>AGRADECIMIENTOS</i> .....	16
<i>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</i> .....	17
1.1. <i>Objetivo general y específicos</i> .....	18
1.1.1. <i>Objetivo general</i> .....	18
1.1.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	18
<i>CAPÍTULO II: CONTENIDO TEÓRICO</i> .....	19
2.1. <i>Generalidades del hidromiel</i> .....	19
2.2. <i>Tipos de hidromiel</i> .....	20
2.3. <i>Miel</i> .....	21
2.3.1. <i>Composición de la miel</i> .....	22
2.4. <i>Levadura</i> .....	23
2.4.1. <i>Composición de la levadura</i> .....	25
2.4.2. <i>Levadura “Saccharomyces Cerevisiae”</i> .....	25
2.4.3. <i>Requerimientos nutricionales “Saccharomyces Cerevisiae”</i> .....	25
2.4.4. <i>Cinética de crecimiento de la levadura</i> .....	27
2.4.5. <i>Influencias del entorno</i> .....	28
2.5. <i>Fermentación</i> .....	30

2.5.1.	<i>Tipos de fermentación</i> .....	31
2.5.1.1.	<i>Fermentación discontinua</i> .....	31
2.5.1.2.	<i>Fermentación batch alimentado</i> .....	31
2.5.1.3.	<i>Fermentación continua</i> .....	32
2.5.2.	<i>Glucólisis para producción de etanol en medio anaerobio</i> .....	32
2.5.3.	<i>Factores que influyen en el proceso fermentativo continuo</i> .....	33
2.6.	<i>Condiciones de fermentación hidromiel</i> .....	35
2.7.	<i>Cinética de fermentación</i> .....	36
2.7.1.	<i>Consumo de sustrato</i> .....	37
2.7.2.	<i>Generación de biomasa</i> .....	37
2.7.3.	<i>Velocidades de producción de metabolitos</i> .....	37
2.7.4.	<i>Modelos cinéticos de fermentación</i> .....	38
2.7.4.1.	<i>Cinética de Monod</i> .....	38
2.7.4.1.1.	<i>Método de análisis cinéticos para la determinación de <math>K_s</math> y <math>\mu_{max}</math></i> .....	40
2.7.4.1.1.1.	<i>Modelos de análisis cinético por ajuste de regresión lineal</i> .....	40
2.7.4.1.1.2.	<i>Lineweaver-Burk</i> .....	40
2.7.4.2.	<i>Modelo Logístico Integrado</i> .....	41
2.7.4.3.	<i>Modelo Gompertz Modificado</i> .....	42
2.8.	<i>Cuantificación de biomasa, carbohidratos y etanol</i> .....	43
2.8.1.	<i>Cuantificación de biomasa (método peso Seco)</i> .....	43
2.8.2.	<i>Cuantificación carbohidratos espectrofotometría UV-Visible</i> .....	43
2.8.3.	<i>Cuantificación de etanol</i> .....	44
	<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b> .....	45
3.1.	<i>Materiales</i> .....	45
3.1.1.	<i>Miel de abeja</i> .....	45

3.1.2.	<i>Agua</i> .....	45
3.1.3.	<i>Microorganismo fermentativo</i> .....	45
3.2.	<i>Métodos</i> .....	46
3.2.1.	<i>Métodos parte 1</i> .....	46
3.2.1.1.	<i>Elaboración hidromieles</i> .....	46
3.2.1.2.	<i>Materiales</i> .....	46
3.2.1.3.	<i>Procedimiento para la elaboración de hidromiel</i> .....	46
3.2.1.4.	<i>Diagrama elaboración hidromiel</i> .....	48
3.2.2.	<i>Prueba de cata</i> .....	49
3.3.	<i>Métodos parte 2</i> .....	51
3.3.1.	<i>Fermentación discontinua</i> .....	51
3.3.1.1.	<i>Procedimiento para la fermentación discontinua de hidromiel</i> .....	52
3.3.1.1.1.	<i>Preparación materia prima</i> .....	52
3.3.1.1.2.	<i>Diagrama preparación materia prima</i> .....	53
3.3.1.2.	<i>Acondicionamiento y encendido del reactor</i> .....	53
3.3.1.2.1.	<i>Diagrama acondicionamiento reactor</i> .....	55
3.3.2.	<i>Métodos para cuantificación de biomasa</i> .....	55
3.3.2.1.	<i>Método analítico peso seco</i> .....	55
3.3.2.2.	<i>Procedimiento método analítico peso seco</i> .....	56
3.3.2.3.	<i>Diagrama método analítico peso seco</i> .....	57
3.3.3.	<i>Método analítico por liofilización</i> .....	57
3.3.3.1.	<i>Procedimiento de liofilización</i> .....	58
3.3.3.2.	<i>Diagrama procedimiento de liofilización</i> .....	59
3.3.4.	<i>Método fenol - ácido sulfúrico (método de DuBois)</i> .....	59
3.3.4.1.	<i>Procedimiento método fenol - ácido sulfúrico (método de DuBois)</i> .....	60

3.3.4.2. <i>Disoluciones para cuantificar azúcares</i> .....	60
3.3.4.3. <i>Diagrama método fenol - ácido sulfúrico (método de DuBois)</i> .....	62
3.3.5. <i>Cuantificación de etanol (método de microdifusión)</i> .....	62
3.3.5.1. <i>Procedimiento cuantificación de etanol (método de microdifusión)</i> .....	64
3.3.5.2. <i>Diagrama método de microdifusión</i> .....	65
3.3.6. <i>Análisis con cromatógrafo de gases</i> .....	65
<b>CAPÍTULO IV: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	66
4.1. <i>Análisis primera fermentación</i> .....	66
4.2. <i>Análisis encuestas</i> .....	67
4.2.1. <i>Análisis apartado visual</i> .....	68
4.2.2. <i>Análisis apartado olfativo</i> .....	69
4.3. <i>Análisis fermentación de laboratorio</i> .....	73
4.3.1. <i>Análisis cuantificación de biomasa</i> .....	78
4.3.3. <i>Análisis producción de etanol por método de microdifusión</i> .....	80
4.3.4. <i>Análisis consumo de sustrato</i> .....	82
4.4. <i>Análisis cinética de Monod</i> .....	82
4.4.1. <i>Análisis método de regresión lineal</i> .....	82
4.5. <i>Modelo Logístico Integrado</i> .....	86
4.6. <i>Modelo de Gompertz Modificado</i> .....	91
4.8. <i>Análisis cromatógrafo de gases</i> .....	97
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	98
5.1. <i>Conclusiones</i> .....	98
5.2. <i>Recomendaciones</i> .....	101
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	102
<b>ANEXOS 110</b>	

<i>Anexo 1. Modelo de encuesta.....</i>	110
<i>Anexo 2. Resultados análisis de laboratorio.....</i>	111
<i>Anexo 3. cuadro de requisitos que deben cumplir las bebidas alcohólicas. Cocteles o bebidas alcohólicas mixtas y los aperitivos, según la Norma INEN 2802: 2015</i>	
<i>BEBIDAS ALCOHÓLICAS MIXTAS Y LOS APERITIVOS. REQUISITOS.....</i>	114
<i>Anexo 4. Fotografías fermentación piloto.....</i>	114
<i>Anexo 5. Fotografías biorreactor.....</i>	117
<i>Anexo 6. Fotografías método microdifusión .....</i>	118
<i>Anexo 7. Fotografías método fenol ácido sulfúrico .....</i>	119
<i>Anexo 8. Fotografías liofilización .....</i>	120

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Tipos de hidromiel.....</i>	20
<i>Tabla 2. Composición de la miel, valores en g/100g.....</i>	22
<i>Tabla 3. Composición química de la levadura <i>S. Cerevisiae</i> .....</i>	24
<i>Tabla 4. Materiales y equipos utilizados en la formulación de las tres hidromieles... </i>	45
<i>Tabla 5. Características sensoriales evaluadas durante el análisis sensorial de hidromiel .....</i>	48
<i>Tabla 6. Descripción de los grados de calidad para la evaluación de algunas características sensoriales de los hidromieles.....</i>	49
<i>Tabla 7. Materiales, equipos, insumos y reactivos usados en la fermentación discontinua.....</i>	50
<i>Tabla 8. Parámetros de entrada del reactor Batch.....</i>	53
<i>Tabla 9. Materiales y equipos método analítico peso seco.....</i>	54
<i>Tabla 10. Materiales, equipos y reactivos para la cuantificación de biomasa por el método de liofilización.....</i>	57
<i>Tabla 11. Materiales, equipos y reactivos para método fenol - ácido sulfúrico (método de DuBois).....</i>	59
<i>Tabla 12. Materiales, equipos y reactivos para método microdifusión.....</i>	62
<i>Tabla 13. Tabulación encuestas aparatado visual.....</i>	68
<i>Tabla 14. Tabulación encuestas aparatado olfativo.....</i>	69
<i>Tabla 15. Tabulación encuestas aparatado gustativo.....</i>	70
<i>Tabla 16. Concentración inicial y final de levadura.....</i>	79

<i>Tabla 17. Concentración de sustrato inicial y final para los cuatro experimentos.....</i>	82
<i>Tabla 18. Datos necesarios para el método de Lineweaver-Burk.....</i>	83
<i>Tabla 19. Resumen datos <math>K_s</math> y <math>U_{max}</math> método Lineweaver-Burk.....</i>	84
<i>Tabla 20. Resumen datos <math>K_s</math> y <math>U_{max}</math> de la cinética de Monod para varios estudios, [modificación de (Rorke &amp; Kana, 2017).].....</i>	85
<i>Tabla 21. Resumen datos <math>U_{max}</math> para el modelo Logístico Integrado.....</i>	90
<i>Tabla 22. Resumen valores de rpm para el modelo de Gompertz Modificado.....</i>	95
<i>Tabla 23. Resumen datos rpm de la ecuación de Gompertz Modificado, [modificación de (Rorke &amp; Kana, 2017).].....</i>	96
<i>Tabla 24. Concentración de alcoholes superiores para cada levadura.....</i>	97

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1. Ecuación cinética de Monod</i> .....	38
<i>Ecuación 2. Ecuación para el cálculo de la velocidad de reacción en función de la generación de biomasa</i> .....	39
<i>Ecuación 3. Linealización de Lineweaver-Burk</i> .....	40
<i>Ecuación 4. Ecuación logística integrada</i> .....	41
<i>Ecuación 5. Ecuación modelo de Gompertz modificado</i> .....	42
<i>Ecuación 6. Fórmula para obtener el valor de concentración de biomasa</i> .....	55
<i>Ecuación 7. Fórmula para obtener el valor de concentración de azúcares</i> .....	59
<i>Ecuación 8. Cálculo de bioetanol en g/L</i> .....	64

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 1. Crecimiento típico de cultivo por lotes.....</i>	27
<i>Ilustración 2. Tensiones ambientales que presenta la levadura S. Cerevisiae durante la fermentación de etanol.....</i>	28
<i>Ilustración 3. Ruta metabólica de Embdene Meyerhof.....</i>	32
<i>Ilustración 4. Cinética de Monod para la velocidad de crecimiento celular sin inhibición (línea continua) y con inhibición por sustrato (línea discontinua) en una fermentación por lotes.....</i>	38
<i>Ilustración 5. Modelo de Lineweaver-Burk.....</i>	40
<i>Ilustración 6. Diagrama elaboración hidromiel.....</i>	47
<i>Ilustración 7. Diagrama preparación materia prima.....</i>	52
<i>Ilustración 8. Diagrama acondicionamiento de reactor.....</i>	54
<i>Ilustración 9. Diagrama método peso seco.....</i>	56
<i>Ilustración 10. Diagrama procedimiento liofilización.....</i>	58
<i>Ilustración 11. Diagrama método fenol ácido sulfúrico.....</i>	61
<i>Ilustración 12. Diagrama método de microdifusión.....</i>	64
<i>Ilustración 13. Gráfica evolución grados Brix fermentación inicial.....</i>	67
<i>Ilustración 14. Evolución de grados Brix a lo largo del tiempo para los 4 experimentos.....</i>	74
<i>Ilustración 15. Evolución de grados Brix a lo largo del tiempo para experimento con 25 °Brix iniciales.....</i>	74
<i>Ilustración 16. Evolución de grados Brix a lo largo del tiempo para experimento con 22 °Brix iniciales.....</i>	75

<i>Ilustración 17. Evolución de grados Brix a lo largo del tiempo para experimento con 15 °Brix iniciales.....</i>	76
<i>Ilustración 18. Evolución de grados Brix a lo largo del tiempo para experimento con 10 °Brix iniciales.....</i>	77
<i>Ilustración 19. Gráfica producción de alcohol a lo largo del tiempo.....</i>	80
<i>Ilustración 20. Gráfica método de linealización Lineweaver-Burk.....</i>	84
<i>Ilustración 21. Gráfica modelo Logístico integrado 25 °Brix.....</i>	87
<i>Ilustración 22. Gráfica modelo Logístico integrado 22 °Brix.....</i>	88
<i>Ilustración 23. Gráfica modelo Logístico integrado 16,4 °Brix.....</i>	89
<i>Ilustración 24. Gráfica modelo Logístico integrado 10 °Brix.....</i>	90
<i>Ilustración 25. Gráfica modelo Gompertz Modificado 25 °Brix.....</i>	92
<i>Ilustración 26. Gráfica modelo Gompertz Modificado 22 °Brix.....</i>	93
<i>Ilustración 27. Gráfica modelo Gompertz Modificado 16,4 °Brix.....</i>	94
<i>Ilustración 28. Gráfica modelo Gompertz Modificado 10 °Brix.....</i>	95

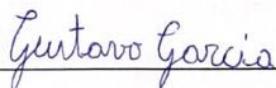
## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Gustavo Francisco García Zea en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “**Determinación de la cinética de fermentación y propiedades organolépticas de hidromiel**”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 5 de diciembre de 2022.

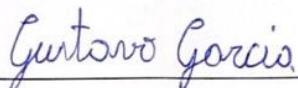


Gustavo Francisco García Zea  
C.I: 0302088398

## Cláusula de Propiedad Intelectual

Gustavo Francisco García Zea autor del trabajo de titulación "**Determinación de la cinética de fermentación y propiedades organolépticas de hidromiel**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 5 de diciembre de 2022.



Gustavo Francisco García Zea  
C.I: 0302088398

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por su apoyo constante y por brindarme una educación fundamentada en principios y valores, lo cual me ayuda a salir adelante, permitiéndome ser perseverante en alcanzar mis objetivos y metas, por tal motivo este trabajo se lo dedico a ellos que son el impulso para mi superación.

Gustavo Francisco García Zea

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Cuenca, a los docentes que me instruyeron a lo largo de la carrera y de manera especial al Mgt. Jorge Delgado “Tutor de tesis” quien con mística y gran conocimiento posibilitó la culminación de este trabajo.

Gustavo Francisco García Zea

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Dentro de los productos de la actividad apícola, la miel de abeja es uno de los productos más conocidos, de la cual en el Ecuador el 90 % de la miel producida es procesada en turrones y el 10 % sobrante es comercializada como miel de abeja (Líderes, 2018). La miel fue el edulcorante natural más consumido por el ser humano, hasta la producción del azúcar de caña, y ha servido como alimento y medicina a lo largo de todas las épocas y culturas de la humanidad tanto por sus propiedades nutritivas, antibacterianas y antioxidantes, por lo que ha sido empleada como remedio para la tos, dolor de garganta e indigestión (Cajas, 2019); además, la miel de abeja es la base para la producción de hidromiel, siendo ésta una bebida que contiene un volumen de alcohol entre el 8 % y el 18%, concentración que resulta de la fermentación anaerobia de levaduras de miel diluida en agua. El hidromiel es una bebida fermentada reconocida como la bebida alcohólica más antigua consumida por el ser humano, incluso antes que el vino y probablemente esta bebida sea la precursora de la cerveza. Esta bebida tiene una herencia de más de 5.000 años (Pereira et al., 2017); sin embargo, a pesar de su herencia, en el Ecuador no existe reseña histórica de que el hidromiel haya sido producido y esta afirmación se mantiene hasta la actualidad ya que esta bebida no es comercializada en el país; además de que no existen investigaciones o referencias bibliográficas que hablen sobre el presente tema en nuestro medio.

En lo que respecta a la apicultura no se conoce con exactitud cuando esta actividad se desarrolló en el Ecuador, pero se sabe que los indígenas se dedicaron al cuidado de abejas a pequeña escala y es a partir de la conquista española se registra la actividad apícola gracias a la introducción de nuevas especies de abejas de origen italiano, lo que implantó la práctica de la crianza y cuidado de abejas para adquirir productos derivados de esta actividad (Granda, 2017). En la actualidad la demanda de productos apícolas en Ecuador ha aumentado en los últimos años y para poder competir en el mercado se busca dar un valor agregado a los productos derivados de la apicultura (Cajas, 2019). El problema radica en que la apicultura en el Ecuador concluye únicamente en la producción de materias primas como la miel, ceras, polen y no se han generado productos derivados de estos.

En el caso de la miel de abeja, según la revista Líderes, en el Ecuador se produce en promedio 10,2 Kg de miel por colmena al año y de acuerdo con el Registro Apícola Nacional que el gobierno realizó en noviembre del año 2017, en el país existe un aproximado de 15.820 colmenas (Líderes, 2018). Por lo que el presente trabajo de investigación plantea resolver la problemática de que en el país no existe investigación ni un nicho de mercado en lo referente a la producción de bebidas fermentadas a base de miel. Esto se debe a que no se ha dado valor a la miel de abeja como un insumo para productos fermentados, por lo que la elaboración de hidromiel se presenta como una propuesta innovadora dentro del ámbito industrial y económico ecuatoriano al ofrecer un producto nuevo que puede ser comercializado como una bebida recreativa y competir en el mercado con las industrias cerveceras del país al presentar el hidromiel como una alternativa a la cerveza.

## **1.1. Objetivo general y específicos**

### **1.1.1. Objetivo general**

- Elaborar hidromiel empleando tres tipos de levadura y determinar la cinética de fermentación del producto que presente las mejores características organolépticas.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Elaborar hidromiel empleando tres tipos de levadura.
- Determinar por medio de catadores no especializados que hidromiel presenta las características organolépticas más aceptables.
- Determinar la cinética de fermentación del hidromiel seleccionado por los catadores no especializados usando el modelo cinético de Monod y Logístico Integrado.
- Determinar la tasa de producción máxima de alcohol por medio del modelo de Gompertz modificado.

## CAPÍTULO II: CONTENIDO TEÓRICO

### 2.1. Generalidades del hidromiel

El hidromiel es una bebida que contiene un volumen de alcohol entre el 8% y el 18%, concentración que resulta de la fermentación anaerobia de miel diluida en agua por acción de levaduras. El hidromiel es reconocido como la bebida alcohólica más antigua consumida por los humanos, incluso antes que el vino y probablemente esta bebida sea la precursora de la cerveza. Esta bebida tiene una herencia de más de 5000 años, e incluso existe evidencia arqueológica de que la producción de hidromiel data del año 7000 a. C. en regiones escandinavas. El primer lote de hidromiel probablemente se creó cuando lluvia cayó sobre un bote de miel abierto, la miel se diluyó y las levaduras salvajes fermentaron lo que ahora conocemos como hidromiel (Pereira et al., 2017). Con el transcurso del tiempo a medida que las civilizaciones se desarrollaron y los recursos agrícolas comenzaron a crecer, las bebidas como la cerveza y el vino reemplazaron progresivamente al hidromiel en varias partes del mundo; sin embargo, en las regiones de Europa del norte donde es difícil cultivar plantas necesarias para la creación de otras bebidas alcohólicas como las uvas, el hidromiel permaneció popular hasta que el vino comenzó a ser importado de las regiones de Europa del sur. (National HoneyBoard, 2001).

La tradición de consumir hidromiel conllevó a la aparición del término “Honey Moon” o “Luna de Miel” en español, este término surgió ya que las parejas recién casadas tradicionalmente consumían esta bebida a lo largo de un mes después de la ceremonia de bodas, con la creencia de que un hijo nacería nueve meses después (Walditch, 2012). El hidromiel ha sido elaborado considerablemente a lo largo de todo el continente europeo, especialmente en países como: Dinamarca, Noruega, Inglaterra, Francia, Finlandia, Polonia, Suecia, Suiza, entre otros; además existe una gran variedad de tipos de hidromiel, como por ejemplo el hidromiel de frutas (melomel), hidromiel especiado (metheglin), asimismo esta bebida recibe diferentes nombres a lo largo de las culturas europeas como por ejemplo *sima* (Finnish honey wine), *gvirc* (Croatian honey wine), y *tej* (Ethiopian honey wine) por nombrar algunos tipos (Walker & Brightmore, 2020). La raíz de las variaciones de los diferentes tipos de hidromiel que existen hoy radica en las

culturas y la agricultura de antaño. La práctica de agregar hierbas amargas (gruit) al hidromiel comenzó en la Edad Media. La mezcla de vinos de uva y otras frutas con hidromiel se remonta a la época romana, pero eventualmente los cultivos agrícolas como las uvas, granos y lúpulos, se convirtieron en los ingredientes preferidos para producir bebidas alcohólicas como el vino y las cervezas (National HoneyBoard, 2001).

## 2.2. Tipos de hidromiel

A la hora de producir hidromiel, es necesario considerar que el sabor y el color del producto final dependen principalmente del tipo de miel que se emplee como materia prima, de manera general, la miel de color más ligero o claro generan un hidromiel colorido y con sabores más ligeros; en cambio una miel oscura, produce hidromiel con coloraciones más oscuras y un sabor más robusto y fuerte. Tradicionalmente el hidromiel no es más que agua y miel; aunque existen variaciones que han aparecido a lo largo de los años, hidromieles que van desde mezclas tradicionales y simples hasta mezclas complejas que incluyen jugos de frutas y especies (National HoneyBoard, 2001).

El hidromiel es producido a partir de una solución diluida de miel, la cual se obtiene añadiendo la cantidad adecuada de agua o jugo. La miel puede diluirse en diferentes proporciones, como por ejemplo en relaciones de 1:0.5, 1:1, 1:2, y 1:3 (Miel/Agua), relaciones que producen diferentes tipos de hidromiel (Ramalhosa et al., 2011). Es importante mencionar que en el caso de la elaboración de hidromieles que contengan zumos de fruta y especias, estos elementos agregados no deban enmascarar el sabor y el aroma de la miel en la bebida (McConnell & Schramm, 1995).

De acuerdo al método de producción de hidromiel, esta puede ser clasificada de diferentes maneras, en la tabla 1 se muestran algunos de los diferentes tipos de hidromiel que pueden ser elaborados (Ramalhosa et al., 2011).

**Tabla 1.** Tipos de hidromiel.

<b>Hidromiel Tradicional</b>	Una bebida fermentada de miel que se obtiene de mezclar aproximadamente dos libras y media de miel diluida con un galón de agua, siendo estos sus únicos ingredientes.
<b>Hydromel</b>	Hidromiel débil o aguada
<b>Sack Mead</b>	Hidromiel que es más dulce por la adición de un 20% a un 25% más de miel, una bebida del tipo Sauternes.
<b>Metheglin</b>	Hidromiel especiado, originalmente especiada con una combinación de hierbas (gruit) pero posteriormente el lúpulo se volvió más popular para elaborar esta bebida.
<b>Sack Metheglin</b>	Hidromiel especiado dulce, tradicionalmente similar al Vermouth.
<b>Melomel, ó Mulsum</b>	Este es un hidromiel elaborado con jugo de frutas.
<b>Cyser</b>	Hidromiel elaborado con jugo de manzana o cidra, similar a un vino Jerez.
<b>Pyment, or Clarre</b>	Un hidromiel elaborado con jugo de uva, a esta bebida se la conoce como un vino de uva endulzado con miel.
<b>Hypocras</b>	Es un hidromiel Pyment especiado.

*Fuente:* (National HoneyBoard, 2001).

## 2.3. Miel

Durante un gran período en la historia de la humanidad, la miel fue una importante fuente de carbohidratos; además de haber sido el único endulzante natural ampliamente disponible y en adición a sus propiedades nutricionales, la miel es un producto que ha sido empleado en la medicina tradicional antigua, esto debido a su potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades respiratorias y gastrointestinales; además de ser empleada para tratar heridas y quemaduras; y ser empleada como un agente antimicrobiano, entre otras propiedades terapéuticas-biológicas (Pereira et al., 2017).

La miel es una sustancia dulce producida por las abejas melíferas ya sea a partir del néctar de las plantas para la producción de “*blossom honey*” (miel de flores o miel de néctar) o

a partir de las secreciones provenientes de plantas vivas o de las excreciones de insectos chupadores de plantas para la producción de “honeydew honey” (miel de mielada o rocío de miel) néctares que son recolectados por las abejas para su posterior transformación al ser combinadas con sustancias propias de las abejas, para finalmente ser depositadas, deshidratadas y almacenadas en el panal de abeja para su maduración (FAO/WHO, 2019).

La miel se genera debido a la hidrólisis de la sacarosa por acción de una enzima invertasa secretada por las abejas, la cual se encarga de reducir la sacarosa del néctar en fructosa y glucosa, posteriormente la glucosa oxidasa transforma la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El agua que se encuentra en el néctar también es reducido en el proceso generando así la miel, un producto fermentable con un pH aproximado de 3,9 y con un 17,2% de agua (National HoneyBoard, 2001).

### **2.3.1. Composición de la miel**

La miel se encuentra compuesta principalmente por carbohidratos, pequeñas cantidades de agua, y componentes que se encuentran en menor cantidad como: minerales, proteínas, lípidos, vitaminas, ácidos orgánicos, aminoácidos, compuestos fenólicos, enzimas y otros fitoquímicos; sin embargo, existe una variación en la composición de la miel y esta depende de las condiciones climáticas, de la fuente de néctar, de condiciones ambientales, estaciones del año y las prácticas de su procesamiento; así como también depende del néctar que las abejas recolectan ya que en él existe una pequeña variación con lo que respecta a la cantidad de azúcares, minerales y vitaminas que este posee (Bogdanov, 2011; National HoneyBoard, 2001; Pereira et al., 2017).

Los componentes que se encuentran en mayor cantidad en la miel son los azúcares, constituyendo cerca del 95% del peso seco de la miel. Los azúcares que se encuentran en mayor cantidad son hexosas, en específico la fructosa y la glucosa monosacáridos resultan de la hidrólisis de la sacarosa (disacárido), también se han identificado cerca de 25 tipos de azúcares diferentes; además, entre los principales oligosacáridos que se encuentran en la miel de tipo “*blossom honey*” son los disacáridos, sacarosa, maltosa, turanosa, erlosa, y en el caso de la miel “*honeydew honey*”; además de los disacáridos

anteriores este tipo de miel también contiene trisacáridos como la melecitosa y la rafinosa; también se han aislado trazas de tetra y pentasacáridos (Bogdanov, 2011).

**Tabla 2.** Composición de la miel, valores en g/100g.

	Miel de Flores		Miel de Mielada	
	Promedio	Min-Max	Promedio	Min-Max
<b>Agua</b>	17.2	15-20	16.3	15-20
<b>Fructosa</b>	38.2	30-45	31.8	28-40
<b>Glucosa</b>	31.3	24-40	26.1	19-32
<b>Sucrosa</b>	0.7	0.1-4.8	0.5	0.1-4.7
<b>Otros disacáridos</b>	5.0	28	4.0	16
<b>Melecitosa</b>	<0.1	-	4.0	0.3-22.0
<b>Erlosa</b>	0.8	0.56	1.0	0.16
<b>Otros oligosacáridos</b>	3.6	0.5-1	13.1	0.1-6
<b>Azúcares Totales</b>	79.7		80.5	
<b>Minerales</b>	0.2	0.1-0.5	0.9	0.6-2
<b>Aminoácidos y proteínas</b>	0.3	0.2-0.4	0.6	0.4-0.7
<b>Ácidos</b>	0.5	0.2-0.8	1.1	0.8-1.5
<b>pH</b>	3.9	3.5-4.5	5.2	4.5-6.5

Fuente: (Bogdanov, 2011).

## 2.4. Levadura

Las levaduras son organismos eucariotas uni o pluricelulares, los mismos que se reproducen asexualmente (duplicación rápida); aunque también pueden adoptar la reproducción sexual. De manera general se puede definir a las levaduras como aquellos hongos cuyo crecimiento asexual resulta predominantemente de la gemación o la fisión,

y que no forman sus estados sexuales dentro o sobre un cuerpo fructífero. (Coradello & Tirelli, 2021). Estos microorganismos son clasificados en base a las características de la célula, ascosporas y colonias; además de sus características fisiológicas que también son empleadas para identificar y clasificar a estas especies (Suárez-Machín et al., 2016). En un principio las levaduras son hongos del filo *Ascomycetes*, clase *Hemiascomycetes*, las mismas que se separan en un orden principal: *Saccharomycetales* (Breeden, 1989).

El término levadura engloba a una gran variedad de organismos, entre las que se incluyen especies patógenas, plantas y animales (Suárez-Machín et al., 2016). De manera general, las levaduras son más conocidas como hongos fermentativos y es importante señalar que también son organismos muy adaptativos y han desarrollado la capacidad de prosperar tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Coradello & Tirelli, 2021).

Las levaduras son hongos eucariotas predominantemente unicelulares con propiedades completamente diferentes a las de las bacterias, las que a diferencia son procariotas; por ejemplo, las levaduras tienen una resistencia a los antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacterianos, esta resistencia es genética y natural y no puede modificarse ni transmitirse a otros microbios; además, el tamaño de las partículas de levadura ( $5 \times 10\mu\text{m}$ ) también es significativamente mayor que el tamaño de las bacterias ( $0.5 \times 5\mu\text{m}$ ) (Montes de Oca et al., 2016). De todas las características de las levaduras y de alto valor productivo es la capacidad que tienen estos microrganismos de fermentar azúcares para la producción de etanol. Destacando principalmente que las levaduras más conocidas y comercialmente significativas son las especies y cepas relacionadas de *Saccharomyces Cerevisiae*. Estos organismos se han utilizado durante mucho tiempo para fermentar los azúcares del arroz, el trigo, la cebada y el maíz para producir bebidas alcohólicas; y en la industria de la panificación para expandir o elevar la masa. *Saccharomyces Cerevisiae* se usa comúnmente como levadura de panadería y para algunos tipos de fermentación. (Breeden, 1989).

## 2.4.1. Composición de la levadura

*Tabla 3. Composición química de la levadura *S. Cerevisiae*.*

Materia Seca	Cantidad (porcentaje)
Carbohidratos	18% - 44%
Proteína	36% - 60%
Ácidos nucleicos	4% - 8%
Lípidos	4% - 7%
Inorgánicos Totales	6% - 10%
Fósforo	1% - 3%
Potasio	1% - 3%
Azufre	0.4%
Vitaminas	Trazas

**Fuente:** (Yıldırım, 2021).

## 2.4.2. Levadura “*Saccharomyces Cerevisiae*”

Las levaduras de tipo *Saccharomyces* pertenecen a un género del reino fungí en donde se incluye una gran variedad de especies de levaduras. La célula de levadura es una célula de hongos unicelulares saprofitos, donde muchos miembros de este género se consideran muy importantes en la producción de alimentos especialmente la levadura de cerveza o la levadura de panadería (Montes de Oca et al., 2016). La levadura *S. Cerevisiae* es un organismo heterótrofo; es decir, este requiere de compuestos orgánicos preformados para su crecimiento. También es un organismo mesófilo, que se desarrolla mejor dentro de un rango de temperatura entre 25 a 40 °C. Al igual que otros organismos vivos, la levadura *S. Cerevisiae* tiene requisitos nutricionales básicos de fuentes de carbono, nitrógeno, minerales y vitaminas (Joseph & Bachhawat, 2014).

## 2.4.3. Requerimientos nutricionales de la “*Saccharomyces Cerevisiae*”

Cada cepa de levadura presenta sus propios requerimientos nutricionales y su metabolismo incide directamente en la composición química del producto fermentado. La mayoría de los nutrientes que requieren las levaduras durante la fermentación

proviene de la materia prima y dependen del estado de madurez de estas. La levadura *Saccharomyces Cerevisiae* requiere de suficientes sacáridos, nitrógeno utilizable, compuestos inorgánicos, sales inorgánicas de amonio, y vitaminas para su correcto crecimiento y reproducción (Yıldırım, 2021).

- **Carbono:** La levadura *S. Cerevisiae* emplea una gama limitada de azúcares como fuente de carbono. La glucosa y la fructosa son asimiladas fácilmente; y de los disacáridos se prefieren la sacarosa y la maltosa. También se pueden utilizar otros malto-oligosacáridos, pero con menos facilidad. En particular, *S. Cerevisiae* no puede utilizar pentosas, otras hexosas, los disacáridos lactosa o celobiosa o los polisacáridos (Joseph & Bachhawat, 2014).
- **Nitrógeno:** La levadura *S. Cerevisiae* puede asimilar compuestos nitrogenados inorgánicos, como sulfato de amonio, cloruro de amonio o incluso amoníaco (Joseph & Bachhawat, 2014). Este elemento es importante ya que incide directamente sobre la capacidad que tiene la levadura para generar biomasa mejorando el desarrollo de células durante la fase exponencial de crecimiento (Alvarado & Valdez, 2019).
- **Minerales:** Las levaduras requieren de una gran cantidad de minerales para su óptimo crecimiento y para llevar a cabo una correcta fermentación, estos requerimientos varían dependiendo del tipo de cepa de levadura empleada. Los minerales más importantes son: zinc, manganeso, magnesio, calcio, cobre, potasio y hierro (Jacques et al., 2010).
- **Vitaminas:** Diferentes especies y cepas de levadura tienen necesidades variables de vitaminas, las levaduras *S. Cerevisiae* pueden sintetizar muchas vitaminas; sin embargo, las vitaminas críticas para su correcto crecimiento son la tiamina (vitamina B1), la biotina (vitamina H), ácido pantoténico, e inositol para su correcto desarrollo. Todas estas vitaminas a excepción de la tiamina suelen encontrarse en melazas en cantidades apropiadas, pero para lograr el máximo

crecimiento de las levaduras es necesario que estas sean suplementadas con tiamina (Joseph & Bachhawat, 2014; Kampen, 2014).

- **Oxígeno:** La *S. Cerevisiae* posee la habilidad para adaptarse a medios con diferentes niveles de O<sup>2</sup> disponible. En medios en donde escasea el O<sup>2</sup> la levadura tiene la capacidad de inactivar sus enzimas respiratorias y de esta manera la levadura comienza una vida fermentativa, en la cual el azúcar es empleado parcialmente y mono-oxidativamente como fuente de energía generando como subproducto de desecho etanol; sin embargo, en condiciones anaerobias es importante mencionar que el desarrollo de la levadura es significativamente más lento que en condiciones aerobias (Joseph & Bachhawat, 2014).

#### 2.4.4. Cinética de crecimiento de la levadura

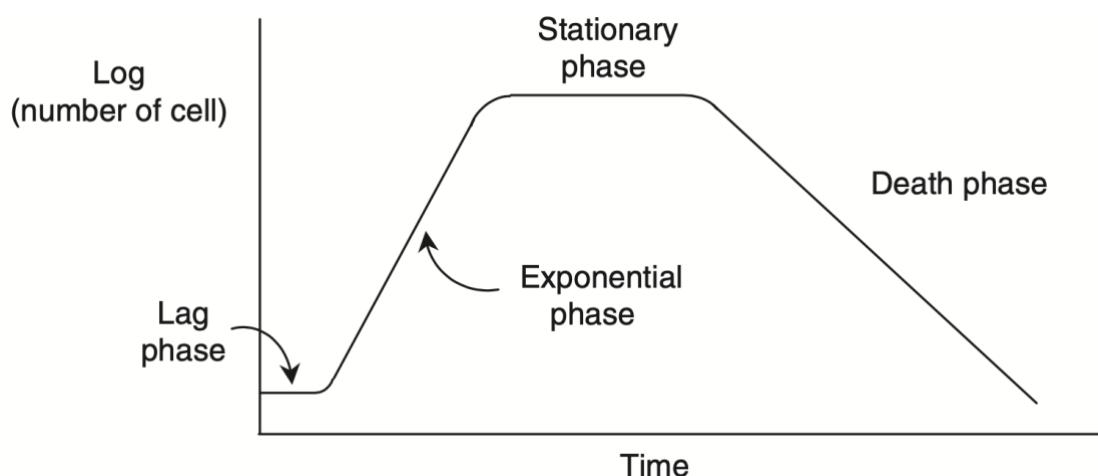
En el caso del cultivo por lotes, siendo este un sistema cerrado en el cual el cultivo posee una cantidad inicial limitada de nutrientes el desarrollo del cultivo se da a lo largo de varias fases como se muestra en la ilustración 1. Empezando por la inoculación del medio, después de realizada esta etapa existe un período durante el cual aparentemente no existe ningún tipo de actividad por parte de los microorganismos, período que puede ser considerado como una fase de retraso el cual consiste en un tiempo de adaptación de las levaduras, dicha fase recibe el nombre de fase lag o fase de latencia (Stanbury et al., 2017). Una vez que existe una cantidad apreciable de células y estas se encuentran adaptadas al medio se puede apreciar la existencia de un crecimiento rápido de las células y un aumento exponencial del número de células, esa fase recibe el nombre de “Fase Exponencial” en la cual la tasa de síntesis celular crece rápidamente, este aumento lineal se aprecia en el gráfico semilogarítmico, la pendiente es constante y representa una tasa constante de población celular. Es en esta etapa en donde las levaduras utilizan fuentes de carbono y forman los productos y subproductos (Uwaha, 2015).

Posteriormente el rápido consumo de sustrato y la acumulación de productos conduce a una fase estacionaria en la cual la densidad celular se mantiene constante, esta fase se conoce como fase estacionaria en la cual la densidad celular permanece constante (Uwaha, 2015). El cese del crecimiento puede deberse al agotamiento de algún nutriente

esencial en el medio, también se puede deber a la acumulación de algún producto auto-tóxico del organismo en el medio o una combinación de los dos (Stanbury et al., 2017). En esta fase la tasa de crecimiento celular equilibra la tasa de muerte, es decir la densidad celular permanece constante (Uwaha, 2015).

Finalmente, las células muertas y los metabolitos celulares en el medio de fermentación generan toxicidad, desactivando a las células restantes. Esta fase recibe el nombre de fase de muerte y es una etapa en la cual la densidad celular disminuye drásticamente; es decir, la fase de muerte muestra una disminución exponencial en la cantidad de células vivas en el medio mientras se agotan los nutrientes (Uwaha, 2015).

*Ilustración 1. Crecimiento típico de cultivo por lotes.*

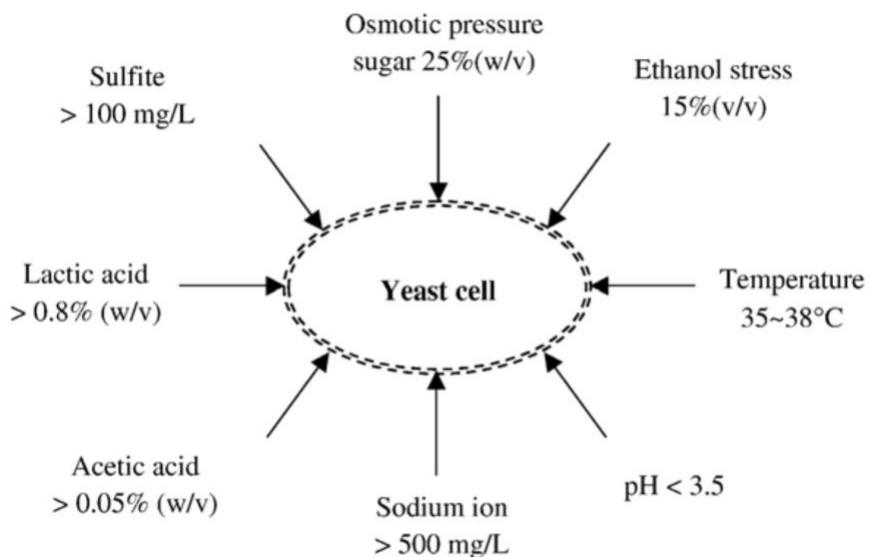


Fuente: (Uwaha, 2015).

#### 2.4.5. Influencias del entorno

Cuando las células de levadura se encuentran en un proceso fermentativo, estas sufren diversas tensiones que son generadas por ciertas condiciones ambientales (ilustración 2) como la temperatura, contaminación, condiciones generadas por el propio metabolismo de las levaduras como la acumulación de etanol que genera la inhibición sobre el desarrollo de las células de levadura y la producción de alcohol (Bai et al., 2008).

*Ilustración 2. Tensiones ambientales que presenta la levadura *S. Cerevisiae* durante la fermentación de etanol.*



**Fuente:** (Bai et al., 2008).

- **Presión osmótica:** El estrés generado por la presión osmótica puede ser definida como cualquier situación que genere un desequilibrio de las osmolaridades intracelulares y extracelulares, desequilibrio lo suficientemente fuerte como para provocar un daño en la fisiología de las células (Csonka, 1991). Este estrés osmótico ocurre cuando existe potencial osmótico externo bajo generando un influjo de agua en la célula resultando en estrés hipo-osmótico, y por el contrario, el estrés osmótico asimismo puede resultar de la exposición a entornos con altas concentraciones de solutos que conducen a un estrés hiper-osmótico caracterizado por la pérdida de agua celular dañando a la levadura (Gibson et al., 2007).

El desarrollo óptimo de la levadura dentro de un medio con altas concentraciones de soluto se da en un rango entre el 10 a un 18% de azúcares, cuando se emplean concentraciones superiores al 22% la velocidad de crecimiento de las levaduras disminuye por un alto esfuerzo osmótico que provoca deshidratación y problemas disfuncionales (Alvarado & Valdez, 2019).

- **pH:** Generalmente las levaduras se desarrollan mejor en un medio ligeramente ácido con un rango de pH entre 4,5 y 5,5, aunque se sabe que las levaduras presentan una notable resistencia a los valores de pH tolerando mejor las condiciones ácidas que las alcalinas (Perricone et al., 2017). En el caso de la *S. Cerevisiae* esta crece de forma óptima dentro de un rango de pH de 4,5 a 5,0; aunque es resiliente a un rango de pH de 3,6 a 6,0. Es importante mencionar que a valores elevados de pH su metabolismo cambia, generando glicerol en lugar de etanol en condiciones micro-aerofílicas (Joseph & Bachhawat, 2014).
- **Efecto de la temperatura:** La levadura *S. Cerevisiae* al ser un microorganismo mesófilo, se desarrolla óptimamente en un rango de temperatura entre 20 y 37 °C. Cuando se aumenta considerablemente la temperatura del medio, la tasa de muerte celular aumenta debido a factores como la desnaturización de proteínas y por el contrario cuando la levadura se encuentra a bajas temperaturas los mecanismos de transporte de las células se ven afectadas cuando el sustrato se moviliza hacia afuera y dentro de esta. El valor de temperatura con el cual se obtiene la máxima velocidad de reacción es de 30 °C; además, a esta temperatura la *S. Cerevisiae* tiene uno de los tiempos de generación más cortos entre las levaduras, 2,0-2,2 h a 30 °C (Alvarado & Valdez, 2019; Joseph & Bachhawat, 2014).
- **Inhibición por producto:** cuando existen concentraciones de etanol superiores al 20 %v/v, el metabolismo celular se ve afectado impidiendo el crecimiento de nuevas células (Alvarado & Valdez, 2019).

## 2.5. Fermentación

Dos factores importantes deben ser tomados en consideración en los procesos de fermentación: la configuración del fermentador y los modelos operacionales de este, ya que productivamente el fermentador representa más del 50 % del total de costo de inversión. La productividad, rendimiento, la conversión de sustrato, formación de

subproductos son factores importantes que deben ser analizados cuando se piensa en implementar un fermentador (Muniraj et al., 2019).

Existen tres modos de fermentación:

- Fermentación Batch.
- Fermentación Batch alimentado.
- Fermentación Continua.

## 2.5.1. Tipos de fermentación

### 2.5.1.1. Fermentación discontinua

La fermentación discontinua funciona como un sistema cerrado en el cual la concentración de nutrientes no cambia durante el proceso de fermentación. Como ventaja este sistema es simple de operar ya que el volumen del medio nutritivo no cambia durante el período de fermentación, la desventaja de este tipo de fermentación es que la producción de biomasa comienza a disminuir debido a la acumulación de subproductos tóxicos hacia el final de la fermentación. (Muniraj et al., 2019).

En la fermentación discontinua, las células vivas se propagan y su desarrollo se ve afectado por ciertos parámetros del medio como la concentración de nutrientes, la generación de productos deseables e indeseables, inhibición enzimática, pH, temperatura y concentración de sustrato, parámetros que deben ser supervisados a lo largo del proceso de fermentación por lotes (Uwaha, 2015).

### 2.5.1.2. Fermentación batch alimentado

La fermentación por batch alimentado, es una mejora del sistema de fermentación por lotes; ya que, a diferencia en este tipo de fermentación, el sustrato se añade en intervalos de tiempo regulares con incrementos de concentración a lo largo del tiempo de fermentación. En el caso de la adición de nutrientes, estos son añadidos en concentraciones pequeñas al inicio de la fermentación y en dosis críticas de manera continua a lo largo del proceso fermentativo. Es importante mencionar que al igual que

la fermentación por lotes en este tipo de fermentación no existe remoción de cultivo a lo largo del proceso (Muniraj et al., 2019).

### 2.5.1.3. Fermentación continua

En este modo de fermentación la limitación que existe en el proceso por discontinuo o por lotes en la cual las levaduras se ven afectadas por la acumulación de productos tóxicos puede eliminarse si el sistema es abierto y el cultivo en crecimiento se mantiene en un modo de funcionamiento continuo (Uwaha, 2015); es decir, la fermentación continua opera en sistema abierto en el cual la alimentación es añadida de manera continua en el fermentador y se da una extracción continua del producto terminado juntamente con la biomasa generada; además este tipo de fermentación presenta la ventaja de que ayuda a extender la fase logarítmica de crecimiento de las levaduras (Muniraj et al., 2019).

### 2.5.2. Glucólisis para producción de etanol en medio anaerobio

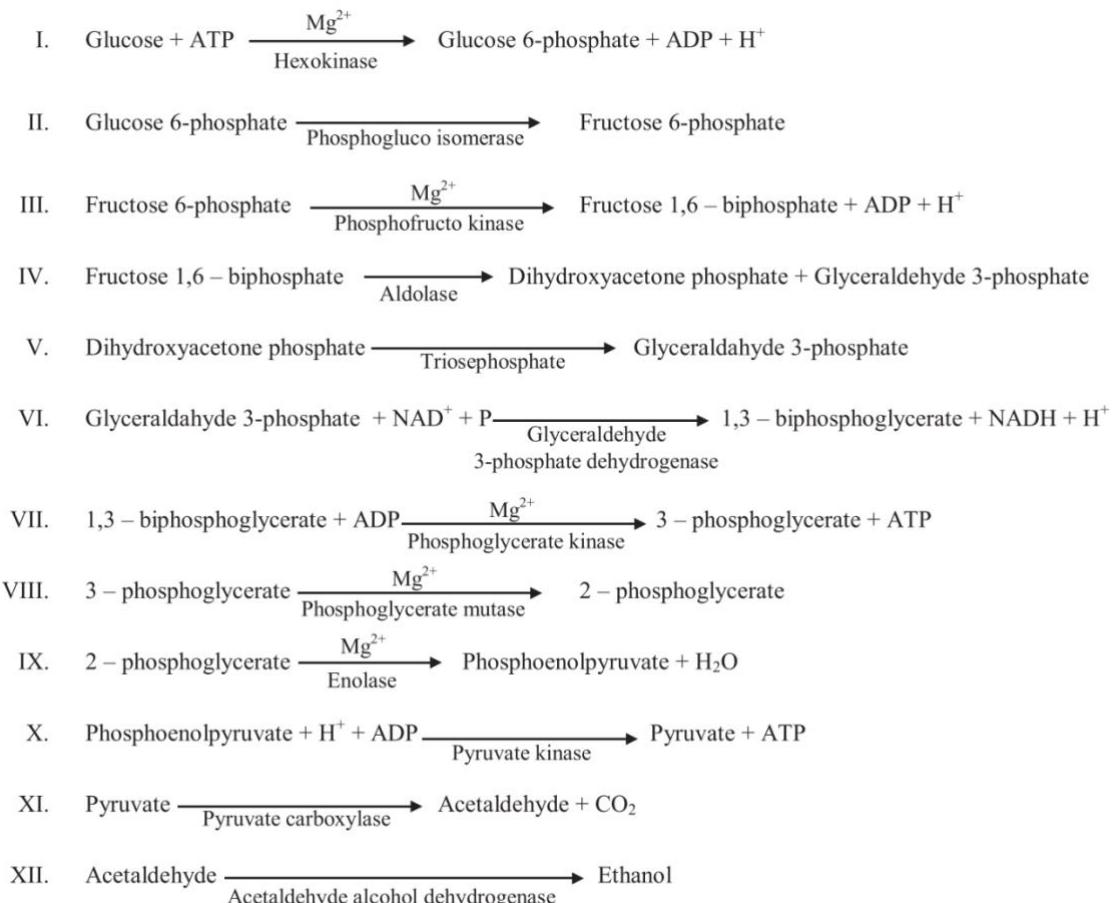
Como se mencionó anteriormente las levaduras son usadas para fabricar bebidas alcohólicas, desde hace muchos años. La mayoría de las especies de levaduras son capaces de fermentar azúcares y transformarlos en etanol (Joseph & Bachhawat, 2014).

El catabolismo de la glucosa ocurre debido a la respiración (disimilación respiratoria de azúcares) y por la fermentación alcohólica o una combinación de ambas rutas. Dichas rutas se encuentran influenciadas por factores como el tipo de microorganismo, tiempo y condiciones de cultivo entre otros. Durante la fermentación alcohólica la ruta metabólica de la levadura se caracteriza por una serie de reacciones bioquímicas que generan cientos de compuestos que aportan sabor simultáneamente a la generación de etanol (Yıldırım, 2021).

La levadura *S. Cerevisiae* metaboliza glucosa y fructosa por medio de la ruta de “Embdena Meyerhof” (ilustración 3) con la formación de 2 moles de piruvato por cada mol de hexosa. El piruvato es descarboxilado por la enzima piruvato descarboxilasa a acetaldehído, el cual posteriormente es reducido a etanol por la combinación oxidativa

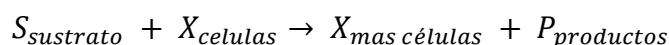
de NADH coenzima formada en la oxidación de gliceraldehido-3-fosfato a ácido 2,3-bisfosfoglicérico (Pereira et al., 2017).

**Ilustración 3. Ruta metabólica de Embden Meyerhof.**



**Fuente:** (Yildirim, 2021).

De manera simplificada, los procesos fermentativos se pueden representar con la siguiente reacción (Alvarado & Valdez, 2019).



### 2.5.3. Factores que influyen en el proceso fermentativo continuo

El rendimiento efectivo de etanol depende de la cepa de levadura que se emplee, así como de las condiciones de fermentación. Para que los procesos de fermentación se desarrollen de manera óptima es necesario que exista un equilibrio del crecimiento de la célula de

levadura con el metabolismo de la misma. Dicho equilibrio es afectado por factores como la cantidad de nutrientes existentes en el medio, procesos de inoculación, cantidad de oxígeno disuelto, temperatura, entre otros factores que inciden directamente en el crecimiento de la levadura (Alvarado & Valdez, 2019; Pereira et al., 2017).

- **Concentración de sustrato:** La velocidad específica de crecimiento de las células de levadura durante la fase log y la fase de desaceleración en los procesos de fermentación discontinua están relacionadas con la concentración inicial de nutrientes presentes en el medio. De manera general un único sustrato interviene sobre la tasa de crecimiento celular, componente que se conoce como sustrato limitante de la velocidad de crecimiento (Alvarado & Valdez, 2019; MORA, 2014).
- **Efecto del pH:** El pH influye en la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos, se observa en el caso de los hongos como estos necesitan de un pH cercano a 5 para un crecimiento óptimo, y en el caso de las bacterias estas necesitan de un pH cercano a 7 (Alvarado & Valdez, 2019).
- **Efecto de la temperatura:** Las reacciones químicas individuales que forman parte de las rutas metabólicas de los microorganismos se ven afectadas por la temperatura, por lo tanto un incremento en este factor se traduce en un aumento en la velocidad específica de crecimiento celular, pero es necesario mencionar que un aumento excesivo de la temperatura llega a perjudicar los procesos de fermentación ya que a altas temperaturas ocurren procesos de inhibición enzimática, lo cual limita las reacciones metabólicas de los microrganismos puesto que las enzimas catalizan dichas reacciones y por ende se genera una disminución en la tasa de crecimiento celular; es por ello que la temperatura se debe mantener dentro de un rango óptimo para el desarrollo de los microrganismos y para una fermentación apropiada (Alvarado & Valdez, 2019; MORA, 2014).

## 2.6. Condiciones de fermentación hidromiel

Además de las propiedades de la miel, la producción de hidromiel enfrenta dificultades entre las que destacan procesos de fermentación lentos o interrumpidos, falta de uniformidad en el producto final y la producción de sabores desagradables, factores que dependen de la variedad de la miel usada, composición del medio y condiciones de fermentación (temperatura y pH). Debido a la alta concentración de azúcares en la producción de hidromiel, la fermentación tiende a ser lenta y requiere de cepas de levadura, niveles de pH, temperatura, y condiciones de crecimiento que sean óptimos. Durante la fermentación de esta bebida se presentan diversos problemas, entre los cuales se menciona la concentración esperada de alcohol tal vez no pueda ser lograda en el tiempo deseado; además, podría existir una falencia en la uniformidad del producto final, esto debido a las diferencias en cuanto al contenido de agua de la miel empleada. También en algunas situaciones cuando se requiere elaborar hidromiel con altos contenidos de azúcar, es necesario que la miel sea añadida progresivamente para de esta manera evitar la terminación prematura de la fermentación, la probabilidad de que la fermentación se estanke aumenta, ya que la mayoría de los hidromieles son elaboradas sin realizar ningún tipo de ajuste y esto puede llevar a fermentaciones secundarias por bacterias ácido lácticas o acéticas, lo que genera un aumento en la acidez y la producción de esteres volátiles (Pereira et al., 2017; Ramalhosa et al., 2011).

Debido a que la miel es la única fuente de saborizantes orgánicos y azúcares, la composición atribuye límites a la calidad final del hidromiel, entre la miel de color más oscura y la miel más clara, está demostrado que la miel de colores más intensos producen hidromieles más apetecibles y esto ocurre independientemente de la cepa de levadura empleada, ya que la miel de color más ligero presenta una deficiencia en la cantidad de compuestos nitrogenados y contenido de minerales que deben ser supplementados para satisfacer los requerimientos nutricionales de las levaduras; además, actualmente las cepas de levadura aisladas de la miel no muestran ningún beneficio sobre las levaduras comerciales que son de fácil obtención (Pereira et al., 2017; Ramalhosa et al., 2011).

## 2.7. Cinética de fermentación

Con el creciente interés por la aplicación industrial de las fermentaciones discontinuas, varios modelos cinéticos se han propuesto en literatura para explicar el crecimiento microbiano, la generación de producto, y el consumo de sustrato (Song et al., 2008). El modelamiento cinético es un paso indispensable en el desarrollo de procesos de fermentación, ya que son empleados para determinar las condiciones óptimas de operación para la producción de un metabolito objetivo; además de ser útiles en el control de estos; así como en el incremento en la calidad de los productos (Song et al., 2008; Zajšek & Goršek, 2010). Por lo tanto, el control preciso de los procesos de fermentación requiere del modelamiento cinético, no solo para reducir los costos de producción y mejorar la calidad de los productos, sino también son de suma importancia para conocer las bases de los procesos bioquímicos de fermentación (Shopska et al., 2019).

Los modelos cinéticos proveen de información avanzada acerca del comportamiento del crecimiento microbiano empleando modelos matemáticos y experimentación detallada, precisa y repetible, por lo que estos son de gran utilidad para el diseño y control de procesos biotecnológicos (Üçok & Sert, 2020). Los enfoques para el análisis de los sistemas microbiológicos son clasificados de acuerdo con el número de componentes empleados para describir el comportamiento celular; así como la naturaleza del cultivo. Dependiendo del número de factores empleados los modelos son clasificados en dos tipos, los modelos multicomponente son denominados modelos estructurales mientras que los de un solo componente se conocen como modelos no estructurales (Shopska et al., 2019).

Tanto los modelos matemáticos estructurales como los no estructurales han sido empleados extensamente para describir la cinética microbiana; aunque los modelos estructurados son capaces de explicar los sistemas microbianos a niveles moleculares, pero debido a su complejidad, los modelos cinéticos no estructurales son ampliamente empleados para aplicaciones más prácticas (Song et al., 2008).

Para entender los procesos de fermentación alcohólica existen algunas variables que son de mayor interés, las cuales son: velocidad de consumo de sustrato, velocidad de producción de metabolitos, velocidad de generación de biomasa, así como también el rendimiento y la productividad. Por ejemplo, un modelo cinético puede ser la relación existente entre la velocidad de generación de alcohol por parte de la levadura a lo largo del tiempo de fermentación (Blanco, 2016).

### **2.7.1. Consumo de sustrato**

El consumo de sustrato es un factor que principalmente depende de la concentración inicial de nutrientes que se encuentren disponibles en el medio; así como de condiciones de fermentación como el pH y la temperatura. El consumo de sustrato inicia en la fase de latencia, etapa necesaria en la cual los microrganismos realizan proceso de mantenimiento, reparación celular, síntesis de proteínas y generación de energía para la supervivencia en el medio, para luego una vez terminada esta etapa las levaduras consuman el sustrato a mayor velocidad hasta que este se haya consumido casi en su totalidad (Alvarado & Valdez, 2019).

### **2.7.2. Generación de biomasa**

La tasa de producción de biomasa es una propiedad fundamental de todos los microrganismos que se encuentran en la naturaleza y es de particular interés cuando se trata de microrganismos que se desarrollan en medios acuáticos. La generación de biomasa se puede usar como un índice de la actividad microbiana y específicamente se emplea para calcular las tasas de crecimiento de los procesos microbianos. La generación de biomasa no es más que el aumento de biomasa por unidad de tiempo por unidad de volumen (Mitchell et al., 2004; Üçok & Sert, 2020).

### **2.7.3. Velocidades de producción de metabolitos**

La velocidad de producción de metabolitos no es más que la tasa de generación de productos a lo largo del tiempo de fermentación.

## 2.7.4. Modelos cinéticos de fermentación

Dentro del campo de la biotecnología existen dos ecuaciones que sirven para describir el crecimiento de poblaciones biológicas, la ecuación “Logística de Verhulst” (ecuación Logística Integrada) y la ecuación cinética de “Monod”. La ecuación Logística puede trazar la curva sigmoidea característica bien conocida del crecimiento de la población con el tiempo; en cambio la ecuación de Monod es una hipérbola con una asíntota superior, la cual expresa la tasa máxima de crecimiento específico. Las variables dependientes de ambas ecuaciones son las mismas; es decir, la tasa de crecimiento de una población, la variable independiente de la ecuación logística es solo el tamaño de la población; y de la ecuación cinética son el tamaño de la población y la disponibilidad de recursos (Sakanoue, 2013).

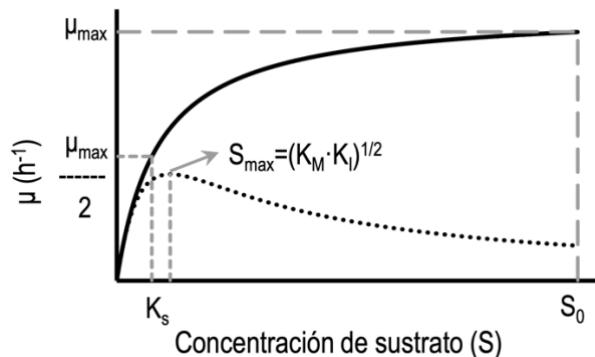
Para modelar la generación de etanol se emplea el modelo de Gompertz Modificado, una ecuación que nos permite describir el cambio en la concentración de etanol durante los procesos de fermentación, dicha ecuación se emplea cada vez más en muchos estudios de producción de hidrógeno y etanol ya que este modelo predice como se forman los metabolitos (Phukoetphim et al., 2017).

### 2.7.4.1. Cinética de Monod

Los procesos de fermentación alcohólica muestran que el crecimiento celular cuando es llevado a cabo con concentraciones de sustrato bajas es proporcional a la concentración de sustrato, pero a medida que aumenta la concentración de sustrato, la velocidad de crecimiento se acerca a un límite asintótico máximo (ilustración 4). Este comportamiento se puede describir con el modelo propuesto por Jacques Monod en 1942 (Blanco, 2016; Nielsen, 2014).

Este es el modelo más comúnmente empleado a la hora de describir la cinética de crecimiento de los microorganismos. La cinética de Monod enuncia que la tasa de crecimiento específica de la biomasa activa se encuentra en relación directa con la concentración de sustrato limitante (Kosuke, 2020).

**Ilustración 4.** Cinética de Monod para la velocidad de crecimiento celular sin inhibición (línea continua) y con inhibición por sustrato (línea discontinua) en una fermentación por lotes.



Fuente: (Blanco, 2016).

A pesar de que el modelo cinético de Monod es completamente empírico y surge de una interpretación no estructurada y no segregada de las células, logra explicar de manera adecuada cómo se comporta el crecimiento celular y bacteriano. Este modelo describe como la velocidad específica de crecimiento celular se encuentra en función de la concentración de sustrato, en una expresión bastante sencilla (Blanco, 2016; Nielsen, 2014).

#### Ecuación 1. Ecuación cinética de Monod.

$$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{K_s + S} \quad (1)$$

**En donde:**

**S:** Concentración de sustrato limitante [g/L]

**μmax.:** Velocidad específica máxima de crecimiento [ $\text{h}^{-1}$ ]

**μ:** Velocidad específica de crecimiento celular [ $\text{h}^{-1}$ ]

**K<sub>s</sub>:** Constante de crecimiento de Monod [g/L]

Este modelo sugiere que la velocidad específica de crecimiento celular ( $\mu$ ) es directamente proporcional a la velocidad específica máxima de crecimiento e inversamente proporcional a la constante de crecimiento de Monod ( $K_s$ ). Constante que especifica la concentración en la que la velocidad específica de crecimiento celular corresponde a la mitad de su valor máximo (Blanco, 2016).

La constante de Monod da una idea de la velocidad a la cual el sustrato es asimilado por los microrganismos; es decir la afinidad que tienen las levaduras sobre el sustrato que están consumiendo. Estos parámetros dependen de la composición del medio, condiciones de fermentación y es específico para la levadura empleada (Blanco, 2016).

#### 2.7.4.1.1. Método de análisis para la estimación de $K_s$ y $\mu_{max}$

##### 2.7.4.1.1.1. Modelos de análisis cinético por ajuste de regresión lineal

Los métodos de regresión lineal son ampliamente empleados para resolver problemas de cinética enzimática y microbiana, los métodos de regresión lineal representan gráficamente los resultados, en donde en el eje x se representa la variable independiente y en el eje y se representa la variable dependiente, dentro de los métodos de linealización empleados destaca el método de Lineweaver-Burk ( $1/u$  versus  $1/S$ ) (Lira Silva & Jasso Chávez, 2013).

Para determinar la velocidad de reacción ( $u$ ), es necesario calcular la diferencia que existe entre los logaritmos de las tasas de generación de biomasa inicial ( $X_o$ ) y final ( $X_L$ ), y luego dividir este valor para la diferencia existente entre el tiempo final ( $t_f$ ) e inicial ( $t_o$ ) de crecimiento de las levaduras (Ariyajaroenwong et al., 2016).

**Ecuación 2.** Ecuación para el cálculo de la velocidad de reacción en función de la generación de biomasa.

$$\mu = \frac{(\ln X_L - \ln X_o)}{t_f - t_o} \quad (2)$$

##### 2.7.4.1.1.2. Lineweaver-Burk

Las estimaciones de  $U_{max}$  y  $K_s$  se pueden obtener de curvas de saturación de sustrato no lineales; sin embargo, cuando se desean datos lineales, generalmente se emplean diagramas de doble recíproco (Lineweaver-Burk). La ecuación para estas construcciones lineales se obtiene tomando el recíproco de la ecuación de Monod (Cornish-Bowden, 1985).

**Ecuación 3. Linealización de Lineweaver – Burk.**

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (3)$$

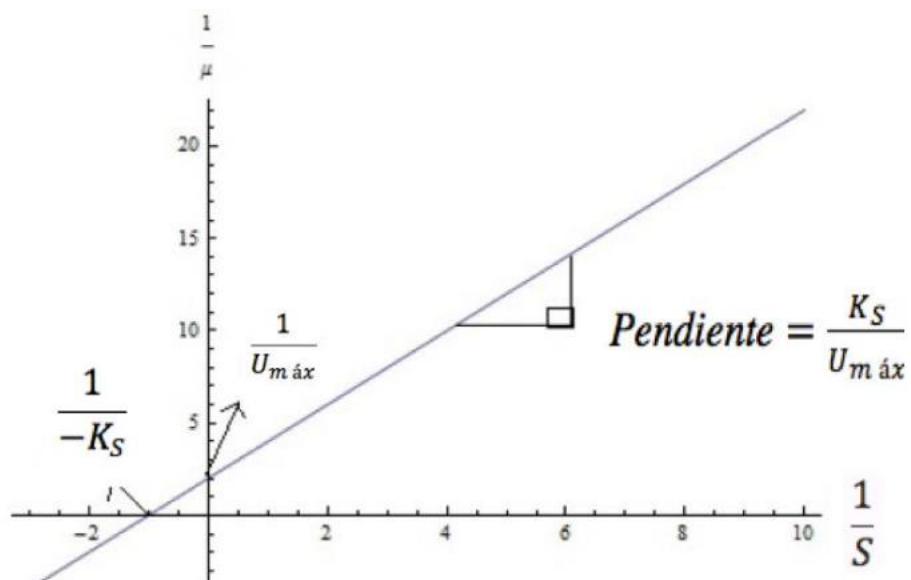
La pendiente de esta ecuación es  $K_s / U_{max}$ , el punto en el que la línea de regresión lineal se cruza con el eje y es numéricamente equivalente a  $1/U_{max}$  y el punto en el que se cruza con el eje x es  $-1/K_m$ ; por lo tanto, una gráfica de Lineweaver-Burk proporciona intersecciones x e y fácilmente identificables que a su vez definen las dos variables cinéticas,  $K_s$  y  $U_{max}$  (ilustración 5) (Cornish-Bowden, 1985).

En la ecuación 4 se puede observar como el método de Lineweaver-Burk no es más que una ecuación lineal ( $y = mx + b$ ) con los siguientes términos.

**Ecuación 4. Pendiente e intercepto de método de Lineweaver-Burk**

$$m = \frac{K_s}{\mu_{max}}, \quad b = \frac{1}{\mu_{max}} \quad (4)$$

**Ilustración 5. Modelo de Lineweaver – Burk.**



**Fuente:** (Trinidad Bello, 2014).

#### 2.7.4.2. Modelo Logístico Integrado

El modelo de función logística se utiliza para describir el crecimiento y la inhibición del crecimiento microbiano. Este modelo describe el crecimiento microbiano en función de

la densidad de población inicial, el tiempo, la tasa de crecimiento y la densidad de población final. (Wachenheim et al., 2003).

El modelo supone que la tasa de crecimiento de un organismo es proporcional a la población actual y los recursos no utilizados en un hábitat cerrado, el modelo describe el crecimiento cinético basándose únicamente en la concentración de biomasa (Muloiwa et al., 2020).

#### *Ecuación 5. Ecuación logística integrada.*

$$X = \frac{X_0 \cdot \exp(\mu_{max} \cdot t)}{1 - \left[ \left( \frac{X_0}{X_{max}} \right) \cdot (1 - \exp(\mu_{max} \cdot t)) \right]} \quad (5)$$

**En donde:**

**X:** Concentración de levadura en el tiempo t [g/L]

**X0:** Concentración inicial de levadura [g/L]

**Xmax:** Concentración máxima de levadura [g/L]

**μmax:** Tasa máxima de crecimiento específico [h<sup>-1</sup>]

**t:** Tiempo de fermentación [h]

#### **2.7.4.3. Modelo Gompertz Modificado**

El modelo de “Gompertz Modificado” es otro modelo que se usa ampliamente para predecir el crecimiento microbiano. La función de Gompertz fue usada originalmente para explicar cómo se daba la distribución de edades en poblaciones humanas, pero posteriormente se modificó para modelar el crecimiento microbiano. Este modelo explica cómo el crecimiento microbiano se encuentra en relación con la concentración máxima de biomasa, la productividad de la misma y el tiempo; además este puede ser empleado para describir el cambio en la concentración de etanol durante la fermentación (Phukoetphim et al., 2017).

#### *Ecuación 6. Ecuación modelo de Gompertz Modificado.*

$$P_E = P_{E\max} \cdot \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{r_{pm} \cdot \exp(1)}{P_{E\max}} \cdot (t_l - t) + 1 \right] \right\} \quad (6)$$

## En donde:

**rpm:** Tasa máxima de producción de etanol [g/(L.h)]

**PE:** Concentración de etanol en el tiempo t [g/L]

**PEmax:** Concentración máxima de etanol [g/L]

**t:** Tiempo de fermentación [h]

**tl:** Fase de retraso [h]

## 2.8. Cuantificación de biomasa, carbohidratos y etanol

### 2.8.1. Cuantificación de biomasa (método peso Seco)

La metodología de cuantificación de biomasa por peso seco no es más que la cuantificación del contenido de sólidos por unidad de volumen de las células de levadura que se encuentran en suspensión, este valor se determina por medio del secado de un volumen de muestra en estufa a una temperatura de 105 °C hasta la obtención de peso constante, la cantidad de levadura total que se encuentra presente en la muestra es calculada por medio de la diferencia que existe entre los pesos del tubo de ensayo con y sin la muestra dividido entre el volumen inicial tomado para el ensayo, procedimiento que se realiza por triplicado (Alvarado & Valdez, 2019).

### 2.8.2. Cuantificación carbohidratos espectrofotometría UV-Visible

Un método muy empleado en el análisis químico es la espectrofotometría UV-Visible, el cual se fundamenta en la capacidad que tienen las moléculas cuando se encuentran en solución de absorber la radiación incidente, ya sea en forma total o parcial, donde identificamos a la radiación incidente como la región del espectro electromagnético visible para el ojo del ser humano, la cual se encuentra en un rango de longitud de onda de 190 a 800nm; por medio de la absorbancia obtenida para una muestra a una longitud de onda determinada, se puede cuantificar la concentración de una sustancia de interés si se compara la absorbancia de la muestra con las absorbancias de soluciones patrón con concentraciones conocidas. La ley que rige este fenómeno es la ley de Lambert-Beer, ley que establece que la absorbancia de una especie química varía directamente con la concentración de la misma (Alvarado & Valdez, 2019).

### 2.8.3. Cuantificación de etanol

Para la cuantificación del bioetanol se utilizó el método de micro-difusión el cual emplea una cámara Conway que permite cuantificar las sustancias susceptibles de volatilización. La cámara debe estar sellada herméticamente y consta de dos compartimentos, el primero contiene el alcohol, que por su alta presión de vapor y la temperatura a la que se realiza el ensayo se volatiliza y migra hacia la segunda cámara, en la segunda cámara se da la oxidación del etanol a ácido acético por la presencia de dicromato de potasio disuelto en ácido sulfúrico; el exceso de dicromato que queda sin reaccionar se mide mediante la reacción con yoduro de potasio para formar yodo, que se titula con tiosulfato de sodio en presencia de almidón como indicador (Delgado-Noboa et al., 2021).

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Miel de abeja

Se usó miel de abeja de la marca “La Obrera” elaborada por la empresa Productos naturales “La Abeja Obrera” ubicada en la ciudad de Ambato, Tungurahua, Ecuador, esta miel presenta un tiempo máximo de consumo de 12 meses. se seleccionó esta miel por proceder de la sierra ecuatoriana, su bajo costo y ser comercializada al por mayor en los principales supermercados de la región.

#### 3.1.2. Agua

El agua que se usó en este experimento es agua filtrada y embotellada de la marca comercial “Pure Water”.

#### 3.1.3. Microorganismo fermentativo

La levadura empleada en esta experimentación fue *Saccharomyces Cerevisiae*, proveniente de tres marcas:

- La primera levadura provino de la marca Levapan, Ecuador, la cual es empleada en la panadería dentro del mercado ecuatoriano, se comercializa como levadura liofilizada en fundas de 500 g, esta levadura tiene una vida útil de 30 días en condiciones óptimas de almacenamiento.
- La segunda levadura proviene de la marca Fermentis y es la levadura Saf-ale T-58, esta levadura provino de Francia en presentaciones de 11,5 g; además esta levadura se caracteriza por fermentaciones con sabor pimentado y condimentado.
- La tercera levadura provino de la marca Mangroove Jacks, la levadura MEAD YEAST M05 la cual tiene la característica de producir esteres en gran proporción, generando un producto con aromas florales, esta levadura posee una alta tolerancia al alcohol dentro de un amplio rango de temperatura. Viene en presentación de 10 g, proviene de Inglaterra.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Métodos parte 1

##### 3.2.1.1. Elaboración hidromieles

##### 3.2.1.2. Materiales

Los materiales y equipos necesarios para la formulación de los tres hidromieles se presentan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Materiales y equipos utilizados en la formulación de los tres hidromieles.

Materias Primas	Equipos e Insumos
Agua	Recipiente con capacidad superior a 12 litros
Levadura	Cucharon de madera
Miel de abeja	Estufa
	Balanza
	Brixometro
	Densímetro
	Termómetro
	3 recipientes plásticos de 4 litros
	3 trampas de oxígeno
	Probeta 100ml

Fuente: Autor

##### 3.2.1.3. Procedimiento para la elaboración de hidromiel

Para la elaboración de los tres hidromieles iniciales usados en la prueba de cata cumplieron los siguientes parámetros que se mantuvieron constantes para las tres levaduras usadas 20 °Brix, 4 litros de agua, temperatura de pasteurización de miel fue 70 °C, como cultivo inicial: 1,5g de levadura por litro de agua, y la temperatura de fermentación promedio fue de 31.4 °C.

Pasos para la elaboración de los tres hidromieles:

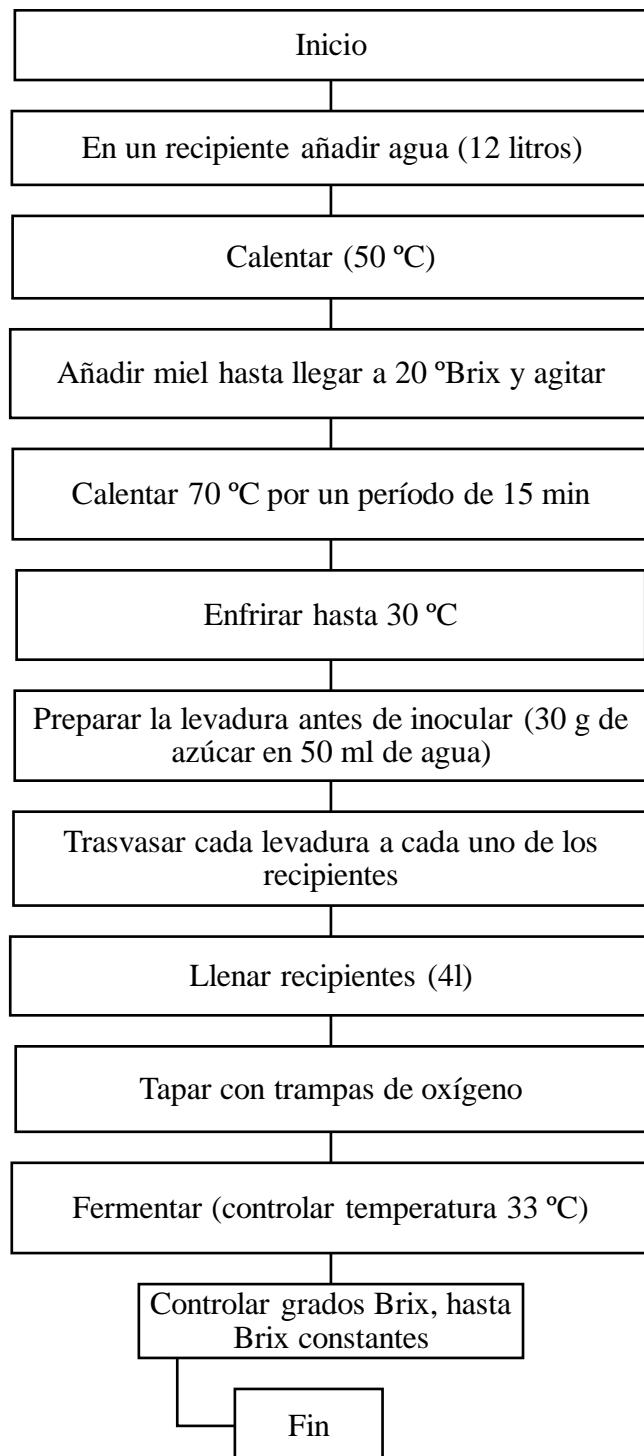
- En un recipiente se calentó 12 litros de agua en la estufa hasta que esta llegue a los 50 °C.
- Se adicionó la miel necesaria para obtener una solución de 20 °Brix. (por motivos de confidencialidad esta cantidad es censurada).
- Se agitó la mezcla hasta que la miel se disuelva en el agua.

- Se calentó la mezcla hasta que llegue a una temperatura de 70 °C y se dejó a dicha temperatura por un lapso de 15 min.
- Una vez pasteurizada la miel, esta se dejó enfriar hasta que su temperatura descienda a 30 °C.
- En tres recipientes se activaron las tres levaduras usando 50ml de agua con 30g de azúcar.
- Una vez que se observó que la levadura está fermentando por la aparición de un ligero burbujeo, se trasvaso cada levadura a cada uno de los recipientes plásticos de 4 litros.
- Se lleno los recipientes plásticos con 4 litros de la mezcla de miel y agua con una graduación de 20 °Brix.
- Se tapo los recipientes con las trampas de oxígeno.
- Se fermento la mezcla en un lugar oscuro y con temperatura controlada a 30 °C.
- Se midió los grados Brix a lo largo del tiempo.

### 3.2.1.4. Diagrama elaboración hidromiel

Los pasos para la elaboración de los tres hidromieles se presentan en la ilustración 6.

*Ilustración 6. Diagrama elaboración hidromiel.*



### 3.2.2. Prueba de cata

Para la catación de los hidromieles, la metodología se basó en el análisis sensorial y en las técnicas y consideraciones para la cata de vinos empleada y complementada con las instrucciones contempladas en la guía para el entrenamiento de jueces para la evaluación de hidromieles del “Programa de Certificación de Jueces Cerveceros” empleada por Blanco, 2016, para de esta manera determinar la evaluación de los parámetros visuales, olfativos y gustativos más importantes del hidromiel determinando así la levadura a emplear en la cineteca de fermentación. El modelo de encuesta se encuentra como Anexo 1. Las características sensoriales evaluadas durante la prueba de cata se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5. Características sensoriales evaluadas durante el análisis sensorial de hidromiel.**

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

Fuente: (Blanco, 2016).

La evaluación de la intensidad de olor y de aroma, la persistencia global, la intensidad de dulzor, acidez, alcohol, amargor, cuerpo y equilibrio fueron evaluadas utilizando una escala estructurada de siete puntos que representan los grados de calidad para vinos (Blanco, 2016) que se presenta en la Tabla 6.

**Tabla 6. Descripción de los grados de calidad para la evaluación de algunas características sensoriales de los hidromieles.**

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

*Fuente: (Blanco, 2016).*

### 3.3. Métodos parte 2

#### 3.3.1. Fermentación discontinua

Después de seleccionada la levadura más aceptada en la prueba de cata se pasó a la fermentación empleando un reactor discontinuo en condiciones anaerobias con una capacidad de 2 litros y a lo largo del proceso fermentativo no se añadió ningún tipo de nutriente, solo se añadieron ácidos o bases con la finalidad de mantener el pH del medio en un valor constante. Es en esta etapa en donde se apreció una variación en lo referente a la concentración de sustrato y la composición del medio debido a la actividad metabólica de las levaduras (Alvarado & Valdez, 2019). Este proceso de fermentación se realizó en el reactor Batch Biotron GS Single Vessel ubicado en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca dentro del laboratorio del Tecnológico.

La fermentación se realizó con una concentración de levadura inicial de 1,5 g/l; la toma de muestras se realizó cada dos horas donde se midieron los grados Brix hasta la obtención de tres valores repetidos y el experimento se pueda dar como terminado. Los materiales, equipos, insumos y reactivos se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 7. Materiales, equipos, insumos y reactivos usados en la fermentación discontinua.**

<b>Materia Prima y Reactivos</b>	<b>Equipos e Insumos</b>
Agua	<i>Reactor Batch Biotron GS Single Vessel</i>
Levadura marca Fermentis	<i>Recipiente con capacidad superior a 2 litros</i>
Miel	<i>Cucharon de madera</i>
HCl 1N	<i>Estufa</i>
NaOH 1N	<i>Balanza analítica</i>
Nitrógeno líquido	<i>Brixometro</i>
	<i>Densímetro</i>
	<i>Termómetro</i>
	<i>Probeta</i>

Fuente: (Alvarado & Valdez, 2019).

### **3.3.1.1. Procedimiento para la fermentación discontinua de hidromiel**

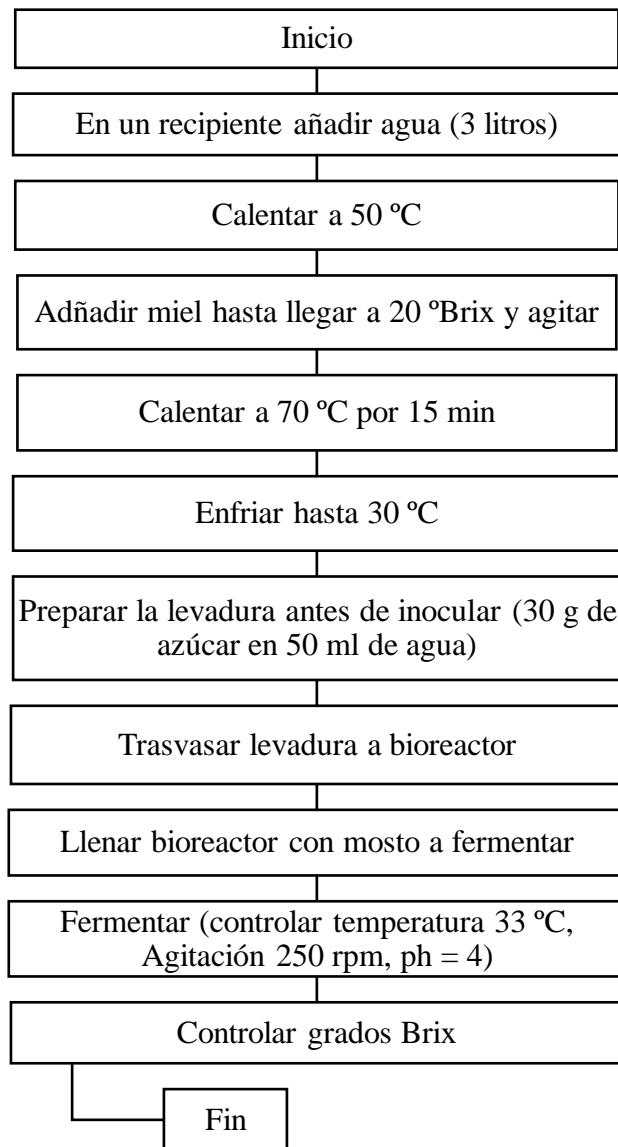
#### **3.3.1.1.1. Preparación materia prima**

Preparar la materia prima como se mostró en el punto 3.2.1.2. pero esta vez únicamente para la levadura de marca Fermentis Saf-ale T-58 y se elaboró una cantidad de 2 litros, misma cantidad que es aceptada por el reactor tipo Batch Biotron GS Single Vessel usado en la experimentación. En esta etapa el hidromiel fue formulado manteniendo constante los parámetros de pH y gramos de levadura, se varió los grados Brix en valores de 25 22 16,4 y 10 °Brix. Estos rangos de concentración de grados Brix fueron empleados para estudiar el comportamiento de la levadura en medios de fermentación con diferentes concentraciones de sustrato limitante.

### 3.3.1.1.2. Diagrama preparación materia prima

Los pasos necesarios para preparar el hidromiel para su fermentación en el biorreactor se muestran en la ilustración 7.

*Ilustración 7. Diagrama preparación materia prima.*



### 3.3.1.2. Acondicionamiento y encendido del reactor

- El reactor Batch Biotron GS Single Vessel se armó y preparó para el proceso el cual consta de mangueras que permiten el ingreso de reactivos y aseguran la hermeticidad del medio, un depósito donde se lleva a cabo la fermentación, un

motor para el movimiento a las aspas presentes en el reactor y sensores para medir el pH, temperatura y oxígeno disuelto (Alvarado & Valdez, 2019).

- Se dispuso los parámetros establecidos en la tesis de (Alvarado & Valdez, 2019), con una modificación en la temperatura la cual disminuye de 35 °C a de 30 °C los parámetros se describen en la Tabla 8.
- Se agregó 2 l de hidromiel.
- Los parámetros de temperatura y agitación se regulan automáticamente por el equipo a excepción del pH el cual se modifica añadiendo hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N dependiendo si el pH se debe disminuir o aumentar. (El pH varía ya que en el proceso de fermentación se producen sustancias como etanol, glicerol y ácido acético que disminuyen progresivamente el pH a lo largo del proceso de fermentación por lo que es necesario la corrección de pH con soda).
- Se Acciono el flujo de Nitrógeno.

**Tabla 8. Parámetros de entrada del reactor Batch.**

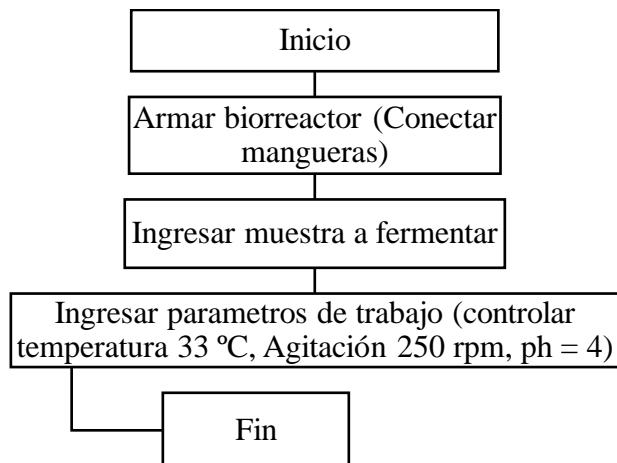
<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Temperatura (°C)	30
pH	4
Velocidad de agitación	250 rpm

Fuente: (Alvarado & Valdez, 2019)

### 3.3.1.2.1. Diagrama acondicionamiento reactor

Los pasos necesarios para armar y acondicionar el biorreactor se muestran en la ilustración 8.

*Ilustración 8. Diagrama acondicionamiento de reactor.*



### 3.3.2. Métodos para cuantificación de biomasa

#### 3.3.2.1. Método analítico peso seco

La cuantificación de biomasa se obtuvo por el método de peso seco, procedimiento que consistió en centrifugar 5ml de la muestra por 15 minutos a 4000 rpm, se descarta el sobrenadante y la biomasa restante se seca en estufa a 105 °C hasta la obtención de peso constante. La cantidad de levadura que se encuentra en la muestra se consigue por medio de la diferencia del peso del tubo de ensayo con y sin la muestra dividido para el volumen de la muestra, este procedimiento se realizó por triplicado (Rorke & Kana, 2017).

*Tabla 9. Materiales y equipos método analítico peso seco.*

Materiales	Equipos
Pipeta volumétrica 5ml	Centrifuga 80 - 30
Tubos de ensayo	Desecador Gander M.T.N
Vasos de precipitación 25ml	Estufa Memmet
Balanza analítica Mettler Toledo	
Fuente: Autor	

### 3.3.2.2. Procedimiento método analítico peso seco

- Se midió 5ml de muestra, (por triplicado con motivo de disminuir el error que se puede cometer en el método).
- Se colocó la muestra en un tubo de vidrio.
- Se centrifugó 80 - 30 por un período de 10 minutos a una velocidad de 4000 rpm.
- Se separó el sobrenadante.
- El contenido que permanece en el tubo se secó en estufa a temperatura de 105°C por un período de 72 horas.
- Una vez concluido este tiempo se colocaron en el desecador Gander M.T.N por un tiempo aproximado de 1h.
- Se pesó el tubo con la muestra seca.
- Realizar los cálculos correspondientes con la siguiente fórmula:

*Ecuación 6. Fórmula para obtener el valor de concentración de biomasa.*

$$\text{Concentración Biomasa} = \frac{P_f - P_i}{V_m}$$

**En donde:**

$P_i$ = Peso del tubo limpio y seco [g]

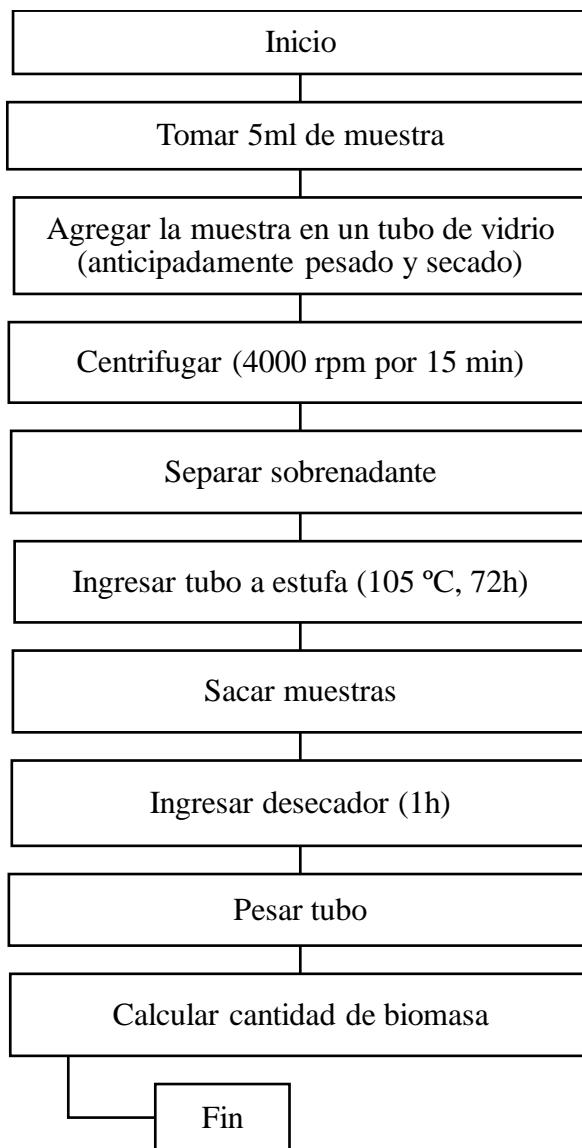
$P_f$ = Peso del tubo más muestra luego de permanecer 72h en estufa y 1h en desecador [g]

$V_m$ = Volumen de la muestra [ml]

### 3.3.2.3. Diagrama método analítico peso seco

Los pasos necesarios para desarrollar el método analítico de pesos seco se muestran en la ilustración 9.

*Ilustración 9. Diagrama método peso seco.*



### 3.3.3. Método analítico por liofilización

La cuantificación de la levadura se determina mediante el secado por liofilización, las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 4000 rpm y son almacenadas en nitrógeno líquido a -190 °C para evitar reacciones de degradación, concluido el proceso experimental las muestras se liofilizaron por 48 horas, de las cuales las primeras 24 horas se realizó la congelación de la muestra y las 24 horas finales se realizó el secado de la

misma para su posterior pesaje (Połomska et al., 2012). Los materiales, equipos y reactivos de muestran en la tabla 10.

**Tabla 10.** Materiales, equipos y reactivos para la cuantificación de biomasa por el método de liofilización.

Materiales	Equipos	Reactivos
Tubos de 7ml	Liofilizador	Agua destilada
Vasos metálicos	Balanza analítica Mettler Toledo	Nitrógeno Líquido
Bandejas metálicas	Centrífuga 80-30	Nitrógeno Gaseoso
Hidromiel proveniente de la experimentación anterior.	Tanque de Nitrógeno líquido	
Piseta		
Pipeta volumétrica de 5ml.		

Fuente: Autor

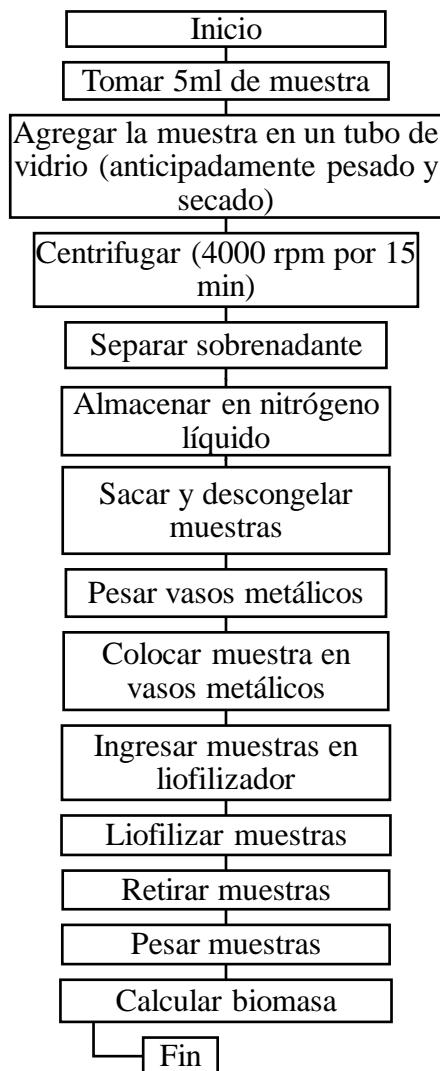
### 3.3.3.1. Procedimiento de liofilización

- Se midió 5 ml de la muestra.
- Se coloco la muestra en tubos de ensayo plásticos.
- Los tubos se introdujeron en la centrífuga 80-30 y la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante un período de 10 min.
- Se desecho el sobrenadante.
- Se guardo la muestra en nitrógeno líquido.
- Cuando se requirió continuar el ensayo se sacaron y descongelaron las muestras.
- Se peso los vasos metálicos a emplear en el liofilizador.
- Se añadió las muestras a los vasos metálicos previamente pesados, y se usó agua destilada en caso de que no se pueda trasvasar la totalidad de la muestra.
- Se introdujo los vasos metálicos con las muestras en el interior del liofilizador.
- Se ajusto las condiciones a las cuales se llevó la liofilización.
- Una vez terminado el proceso de liofilización se retiró las muestras y se pesó.
- Se realizo los cálculos correspondientes con ecuación 6.

### 3.3.3.2. Diagrama procedimiento de liofilización

Los pasos realizados para el procedimiento de liofilización se muestran en la ilustración 10.

*Ilustración 10. Diagrama procedimiento liofilización.*



### 3.3.4. Método fenol - ácido sulfúrico (método de DuBois)

El método fenol-ácido sulfúrico permitió determinar y cuantificar varios azúcares como polisacáridos, oligosacáridos, monosacáridos y sus derivados. El método se fundamenta en formar complejos de color amarillo anaranjado por la reacción con fenol en ácido sulfúrico concentrado. La intensidad del color se encuentra directamente relacionada con la concentración de carbohidratos y se mide por absorbancia en longitudes de onda que van desde 488nm a 492nm. El ensayo se realizó por triplicado en un espectrofotómetro

UV-Visible a una longitud de onda de 490nm, realizando previamente las curvas de calibración (Delgado-Noboa et al., 2021). Los materiales, equipos y reactivos para el método se muestran en la tabla 11.

**Ecuación 7.** Fórmula para obtener el valor de concentración de azúcares.

$$y = mX + b \quad (7)$$

**En Donde:**

y = Absorbancia obtenida de las diluciones estándar.

m= Pendiente.

x= Valor desconocido.

b= Intercepto.

**Tabla 11.** Materiales, equipos y reactivos para método fenol - ácido sulfúrico (método de DuBois).

Materiales	Equipos	Reactivos
Tubos plásticos al vacío	Centrífuga 80 - 30	Agua destilada
Pipeta volumétrica de 5ml	Tanque de nitrógeno líquido	Ácido sulfúrico concentrado
Micropipeta 1ml	Balanza analítica Mettler Toledo	Fenol al 5%
Balones de aforo de distintas capacidades	Espectrofotómetro de UV-Visible	Muestras en análisis
Recipientes plásticos		
Vasos de precipitación		
Piseta		
Varilla de agitación		
Cinta de rotulación		
Tubos de ensayo de vidrio		
Gradillas para tubos		

Fuente: (Delgado-Noboa et al., 2021).

### 3.3.4.1. Procedimiento método fenol - ácido sulfúrico (método de DuBois)

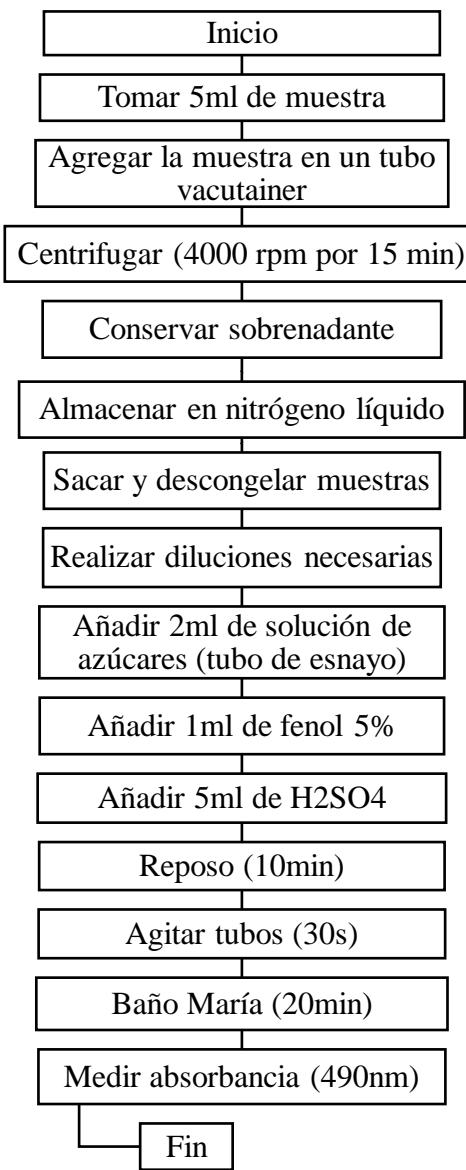
- Se tomaron 5 ml de muestra y se colocó la muestra en un tubo vacutainer.
- Se ingresaron los tubos a la centrífuga y se centrifugó por 10 minutos a una velocidad de 4000 rpm.
- Se desecharon el sobrenadante.
- Se almacenaron las muestras en el tanque de nitrógeno líquido.
- Cuando se requirió continuar con el ensayo se sacó y descongeló las muestras.

- Se realizo las diluciones necesarias (esto se realiza para que las muestras puedan ser medidas por el espectrofotómetro).
- Se añadió 2ml de la solución de azúcares a cada tubo de ensayo.
- Se añadió 1 ml de fenol al 5%.
- Se añadio 5ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.
- Se dejó en reposo durante 10 minutos.
- Se ajito los tubos de ensayo por unos 30 segundos (reacción exotérmica).
- Se dejó los tubos durante 20 minutos en agua fría.
- Se midió la absorbancia (490nm).
- Se realizo el ensayo por triplicado.

### 3.3.4.2. Diagrama método fenol - ácido sulfúrico (método de DuBois)

Los pasos seguidos para realizar el método fenol-acido sulfúrico se muestran en la ilustración 11.

*Ilustración 11. Diagrama método fenol ácido sulfúrico.*



### 3.3.5. Cuantificación de etanol (método de microdifusión)

Para la cuantificación del etanol se utilizó el método de microdifusión, el cual emplea una cámara Conway que permite cuantificar las sustancias susceptibles de volatilización. La cámara debe estar sellada herméticamente y consta de dos compartimentos. El primero contiene el alcohol, que por su alta presión de vapor y la temperatura a la que se

realiza el ensayo se volatiliza y migra hacia la segunda cámara. En la segunda cámara se da la oxidación del etanol a ácido acético por la presencia de dicromato de potasio disuelto en ácido sulfúrico, el exceso de dicromato que queda sin reaccionar se mide mediante la reacción con yoduro de potasio para formar yodo, que se titula con tiosulfato de sodio en presencia de almidón como indicador (Delgado-Noboa et al., 2021).

La microdifusión ocurre por la volatilidad de la muestra, el alcohol presente en la muestra se volatiliza y cuando se encuentra en fase gaseosa migra de una sección de la cámara a otra para reaccionar con dicromato de potasio generando un compuesto de color el cual es cuantificado por medio de titulación o espectrofotometría (Augusto & Mora, 2015).

Es importante mencionar que este método no es específico para etanol, ya que puede determinar sustancias oxidantes como el metanol, propanaldehido, 2-propanol, formaldehido, acetaldehído, alcohol amílico, octanol, éter etílico o cualquier otra sustancia volátil que pueda ser oxidada con el dicromato de potasio produciendo de esta manera interferencia en los resultados del contenido real de etanol; sin embargo, investigaciones previas sobre fermentación alcohólica dejan claro que la producción de estos alcoholes superiores es mínima, lo cual reduce el porcentaje de error del método (Abril, 2014). Los materiales, equipos y reactivos necesarios para el método se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12. Materiales, equipos y reactivos para método microdifusión.**

Equipos	Materiales
Secador de temperatura y tiempo programable.	Cajas bipetri
Balanza analítica	Bureta 25 ml
Centrifuga 4000 rpm	Pipetas de vidrio
	Tubos de plástico para centrífuga
	Varilla de vidrio
	Balones de aforo
	Vasos de precipitación
	Espátula
	Cinta aislante
	Frasco ámbar

Fuente: (Abril, 2014)

### 3.3.5.1. Procedimiento cuantificación de etanol (método de microdifusión)

- Identificación de cajas bipetri.
- En compartimiento A se añadió 2 ml de dicromato de potasio 0,4 N preparado en solución de ácido sulfúrico 10 N.
- En compartimiento B se añadió 4 ml de muestra.
- En compartimiento B se añadió 4 ml de solución de carbonato de potasio 20 % p/v.
- Se cerró herméticamente la caja bipetri con cinta aislante.
- Se dejó en reposo en secador por un periodo de 2 horas a 60 °C.
- Se observó la coloración del compartimiento A (si el color es amarillo la muestra se encuentra libre de etanol; si el color es azul, repetir el ensayo con una dilución de la muestra; si el color difiere hacia amarillo ocre, verde o verde azulado se procede con la titulación).
- Se abrieron las cajas bipetri.
- En el compartimiento A se añadió 2 ml de solución de KI 3N.
- Se añadió 3 gotas de la solución indicadora de almidón en el compartimiento A.
- Se tituló con tiosulfato de sodio 0,1N
- Se anotó el volumen de tiosulfato de sodio consumido.
- Se realizaron los cálculos correspondientes con la siguiente ecuación.

*Ecuación 8. Cálculo de bioetanol en g/L.*

$$Etanol \left( \frac{g}{L} \right) = \frac{N*(V_b - V_m)}{VM} * 11,51 \quad (8)$$

#### Nomenclatura:

N = Normalidad del tiosulfato.

V<sub>b</sub> = Volumen de tiosulfato consumido en la titulación del blanco.

V<sub>m</sub> = Volumen de tiosulfato consumido en la titulación de la muestra.

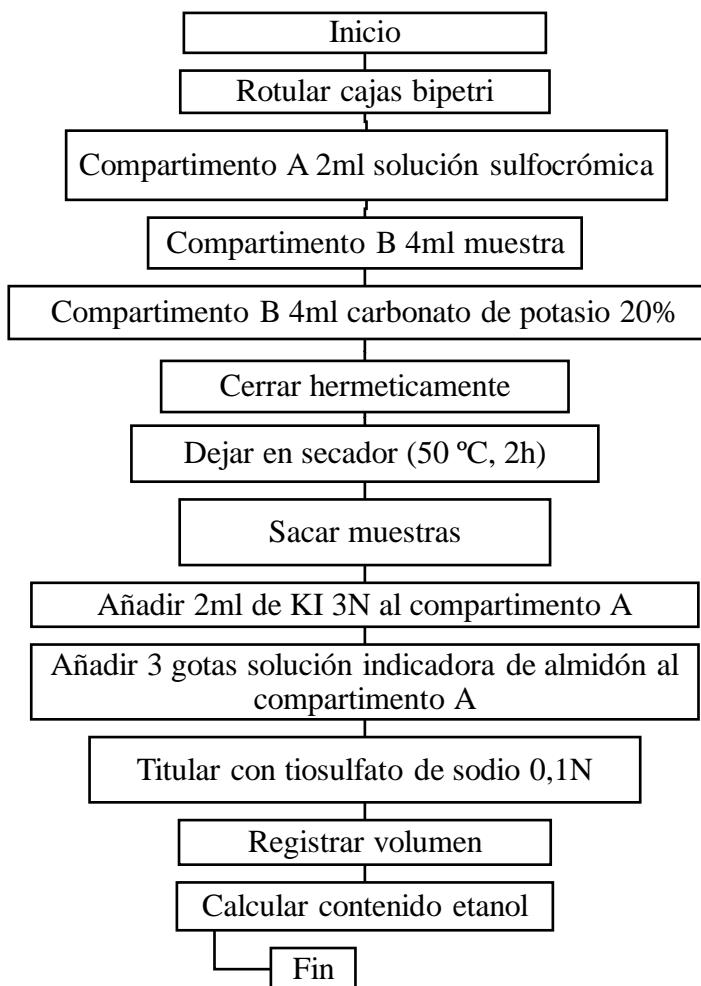
V<sub>M</sub> = Volumen de la muestra.

11,51 = Peso molecular del etanol / 4 (reacción Redox).

### 3.3.5.2. Diagrama método de microdifusión

Los pasos seguidos para realizar el método de microdifusión se encuentran en la ilustración 12.

*Ilustración 12. Diagrama método de microdifusión.*



### 3.3.6. Análisis con cromatógrafo de gases

Por medio de un análisis GC realizado por terceros (el método de cromatografía de gases se realizó por el laboratorio MSV ubicado en la ciudad de Cuenca - Ecuador) se determinó el contenido y la concentración de alcoholes superiores, compuestos que podrían afectar directamente en el sabor del hidromiel y que son productos secundarios generados como resultado del metabolismo de las levaduras. Este análisis se realizó siguiendo las consideraciones establecidas en la norma NTE INEN 2014:2015 “*Bebidas alcohólicas. Determinación de productos congénères por cromatografía de gases*”.

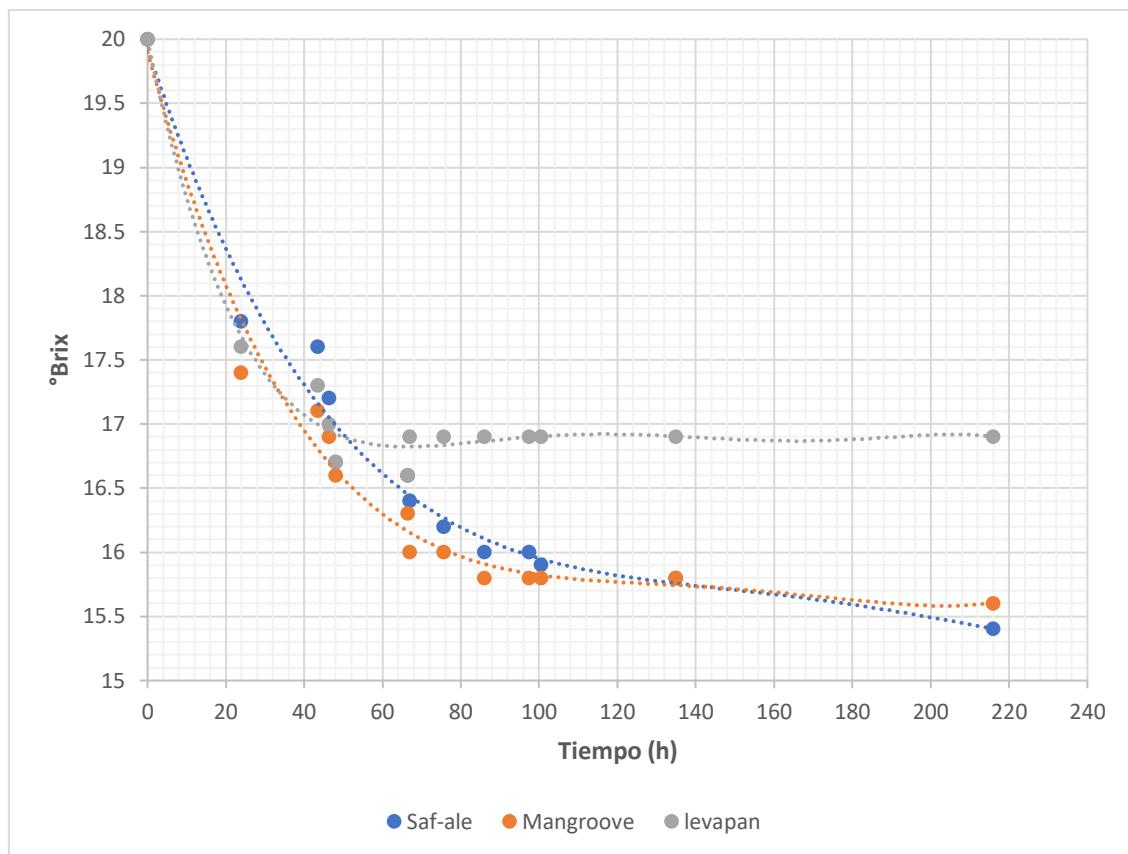
## CAPÍTULO IV: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1. Análisis primera fermentación

Se realizó la fermentación del hidromiel en botellas plásticas de 4 litros de capacidad, las mismas que se pueden observar en el Anexo 4. Se emplearon tres levaduras distintas, a lo largo de la fermentación del hidromiel y se tomaron datos de la evolución de los grados Brix a lo largo del proceso de fermentación, como se puede observar en la ilustración 13 los grados Brix disminuyen con el paso del tiempo, este comportamiento se debe al consumo del sustrato presente en el medio por parte de las levaduras, las cuales cumplen con la ruta metabólica propuesta por Embdene Meyerhof transformando los azúcares del medio y generando como metabolito secundario etanol a la vez que se libera dióxido de carbono.

La fermentación se llevó a cabo con una concentración inicial de 20 °Brix para cada una de las distintas levaduras. En la ilustración 13 se aprecia claramente como para el hidromiel fermentado con levadura marca “Levapan” la misma que es empleada en panadería, la fermentación concluye después de un tiempo aproximado de 67 horas desde que inicia la fermentación, y esta alcanza una concentración final de 16,9 °Brix a diferencia de las levaduras específicas para fermentación de bebidas alcohólicas las cuales alcanzan concentraciones menores de grados Brix siendo una concentración de 15,8 °Brix después de un período de 86 horas para el hidromiel fermentado con levadura Mangrove Jacks, y una concentración de 16 °Brix después de un período de 86 horas para el hidromiel fermentado con la levadura “Fermentis”, dichos valores inferiores de grados Brix nos indican que estas levaduras son mejores a la hora de fermentar, esto demuestra que estas dos levaduras tienen una mayor tolerancia a la acumulación de metabolitos auto-tóxicos, es decir estas levaduras pueden fermentar hidromiel con más grados alcohólicos ya que las levaduras son más robustas y son capaces de soportar ligeramente mayores concentraciones de metabolitos auto-tóxicos.

**Ilustración 13.** Gráfica evolución grados Brix fermentación inicial.



## 4.2. Análisis encuestas

Para la selección de la levadura con características organolépticas más favorables se realizó una prueba de cata en la que participaron un total de 30 personas, la prueba consistió en evaluar las características organolépticas de los tres hidromieles fermentadas en la prueba de fermentación piloto, después de haber capacitado a los participantes encargados de llenar las encuestas para la selección de la mejor levadura para la producción del hidromiel, se capacitó a los encuestados en temas sobre como captar y evaluar las características visuales, olfativas y gustativas del hidromiel previo a la prueba de cata.

## 4.2.1. Análisis apartado visual

*Tabla 13. Tabulación encuestas apartado visual.*

EVALUACIÓN VISUAL	Parámetro	Fermentis	Mangroove	Levapan
LIMPIDEZ	TURBIO			
	LIMPIO	30	30	30
MATIZ O TONO	AMARILLO CLARO	30	30	30
	AMARILLO CLARO			
	AMARILLO QUEMADO			
	OCRE			
	CAFÉ			
	ÁMBAR			
	OTRO			
INTENSIDAD DE COLOR	DÉBIL			
	LIGERO	30	30	30
	MEDIO			
	FUERTE			

En la tabla 13 se observa la tabulación de las respuestas de la prueba de cata con respecto al apartado visual, la misma que nos permite determinar que en cuanto a limpidez ninguna de los tres hidromieles presentó turbiedad (todas son limpias). En cuanto al segundo apartado referente a matiz o tono, los tres hidromieles presentaron la misma coloración siendo esta una coloración amarillo claro y finalmente la intensidad de color fue ligera para las tres bebidas.

## 4.2.2. Análisis apartado olfativo

**Tabla 14.** Tabulación encuestas aparato olfativo.

EVALUACIÓN OLFACTIVA	Grado de Calidad	Fermentis	Mangroove	Levapan
INTENSIDAD DE OLOR	1		4	
	2	5	5	
	3	7	11	3
	4	11	10	5
	5	7		8
	6			12
	7			2
INTENSIDAD DE AROMA	1		4	
	2	4	5	
	3	7	12	3
	4	12	9	4
	5	7		9
	6			12
	7			2
DEFECTOS DE OLOR Y AROMA		No hay	No hay	Lías

En la tabla 14 se aprecia la tabulación de encuestas con respecto a la evaluación olfativa, en cuanto a la intensidad de olor se aprecia como para la levadura de la marca Fermentis la mayoría de respuestas se acopla en torno a un grado de calidad 4, lo que indica que esta bebida en relación al olor presenta una intensidad media, lo mismo se refleja en la siguiente pregunta referente a la intensidad del aroma, obteniéndose un grado de calidad 4 con intensidad media; cabe destacar que para esta bebida no se han detectado defectos de olor ni aroma y se destacan notas a manzana verde, miel, cerveza, cidra, vinagre de manzana y champaña con intensidades muy agradables para el gusto de los catadores.

Para la levadura de marca Mangroove Jacks se aprecia como la mayoría de respuestas apuntan a que la bebida fermentada con esta levadura genera un producto con un grado de calidad 3 en cuanto a la intensidad de olor y aroma, determinando que para ambos casos la intensidad es muy baja. En cuanto a las notas apreciadas por los catadores se encuentran notas muy limitadas a miel y jugo de manzana con intensidad moderada y tanto menor en comparación a la levadura Fermentis.

Para la bebida fermentada con la levadura Levapan se observa en contraste a los otros dos hidromieles que este presenta un grado de calidad 6, tanto para la intensidad de olor como para la intensidad de aroma siendo de los tres hidromieles el que más olor y aroma posee. Los cataadores reportaron olores desagradables avinagrados y un poco fuertes, esto se debe a que esta bebida presento defectos provenientes de olor a lías (levaduras) y ranciedad.

**Tabla 15.** Tabulación encuestas apartado gustativo.

EVALUACIÓN GUSTATIVA	Grado de Calidad	Fermentis	Mangrove	Levapan
INTENSIDAD DE DULCE	1			
	2			
	3	8		6
	4	12	7	11
	5	10	14	13
	6		9	
	7			
INTENSIDAD DE ÁCIDO	1	15	16	4
	2	12	11	14
	3	3	3	10
	4			2
	5			
	6			
	7			
INTENSIDAD DE ALCOHOL	1	2	4	6
	2	7	8	13
	3	12	10	9
	4	9	8	2
	5			
	6			
	7			
INTENSIDAD DE AMARGO	1	30	30	30
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			
ARISTA PRESENTE	DULCE	30	30	30
	ÁCIDO			
	ALCOHOL	21	18	10
	NINGUNA			
CUERPO Y EQUILIBRIO	1			13
	2		5	12
	3	11	14	5
	4	12	6	
	5	7		
	6			
	7			

En la tabla 15 se observa la tabulación de las encuestas referentes al apartado de evaluación gustativa, donde se destaca que la bebida fermentada con levadura Fermentis en cuanto a intensidad de dulce presenta un grado de calidad 4, el mismo que determina que el dulzor es medio; en lo que respecta a la acidez nos encontramos con un grado de calidad 1 siendo este inexistente; en cuanto a la intensidad de alcohol esta bebida presenta la mejor apreciación con un grado de calidad 3, indicando una intensidad de alcohol baja; y finalmente la intensidad de amargo es de grado 1, es decir no se aprecia dentro de la bebida.

En el caso del hidromiel fermentado con levadura Mangroove Jacks se concluye que el dulzor presenta un grado de calidad 5; es decir, es más dulce que el hidromiel fermentado con levadura Fermentis, lo cual se traduce en una desventaja, ya que la bebida se torna empalagosa en comparación al hidromiel anterior, también se determina que el hidromiel de Mangroove Jacks tiene una menor percepción de ácido siendo esta de intensidad 2, muy baja o no se aprecia; en cuanto a la percepción de alcohol esta es menor que el primer hidromiel, siendo esta otra desventaja ya que la presencia de alcohol es muy baja; y finalmente en cuanto al amargo se obtiene un grado de calidad 1, es decir inexistente en la bebida.

Para la última bebida, el hidromiel fermentado con levadura Levapan es el más dulce de todos con un grado de calidad 5, siendo de intensidad muy alta, esto se debe a que esta levadura en comparación a las demás es la que menos grados Brix consumió durante el proceso de fermentación, siendo excesivamente dulce; en cuanto a la apreciación de acidez esta es la que mayor grado presenta en este parámetro siendo de grado 2 tendiendo a 3 y esto se debe a que esta bebida presenta defectos de presencia de lías haciendo que su sabor sea más ácido en comparación a los demás hidromieles; en cuanto a la intensidad de alcohol esta presenta un grado de calidad 2 con una intensidad muy baja; y referente a la intensidad de amargor, al igual que las demás levaduras esta presenta un grado de calidad 1, esto y los parámetros de intensidad anteriores hacen que esta levadura sea la menos apta para la elaboración del hidromiel.

En cuanto a la apreciación de las aristas presentes, el hidromiel fermentado con Fermentis es el que más aristas posee, siendo dominante la apreciación de dulce y alcohol, seguida por el hidromiel fermentado con la levadura Mangrove Jacks el cual presenta las mismas dos aristas que el hidromiel anterior, pero con menor graduación; y posteriormente el hidromiel fermentado con Levapan presenta predominantemente la arista de dulzor.

Para finalizar se observó como el hidromiel fermentado con la levadura Fermentis es el que presenta mejor cuerpo y equilibrio a diferencia de los otros hidromieles que tienen cuerpo desequilibrado con una arista predominante haciendo que estas bebidas sean desagradables para los consumidores, motivo por el cual se seleccionó la levadura de la marca Fermentis como la levadura a usar posteriormente en la determinación de la cinética de fermentación, ya que esta levadura genera un hidromiel con mejores características visuales, olfativas y gustativas según lo determinado en la prueba de cata.

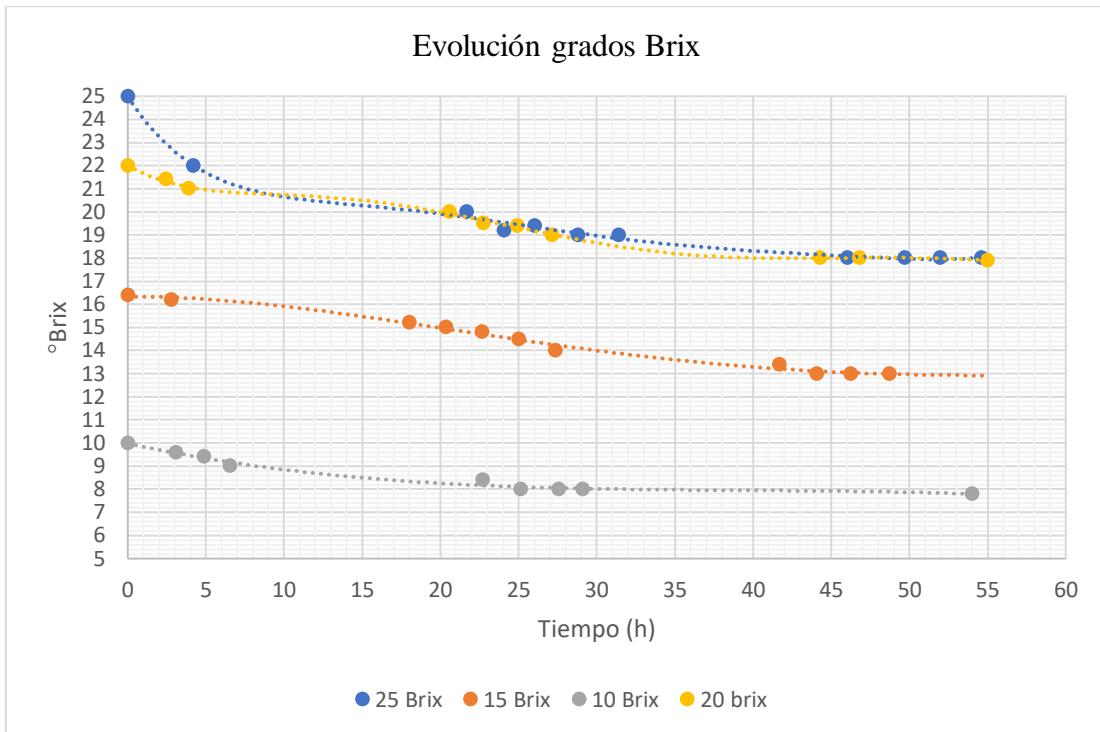
Los resultados obtenidos en la prueba de cata se compararon con los resultados presentes en un estudio semejante realizado por (Blanco, 2016), estudio en donde se ejecutó la misma encuesta en la prueba de cata; dicho estudio efectúo un análisis sensorial realizado por un panel de jueces entrenados sobre los hidromieles obtenidos a escala de laboratorio y piloto que muestran un hidromiel de color amarillo oscuro con un grado de calidad para el cuerpo y equilibrio significativamente medio; los hidromieles evaluados en esta prueba de cata presentaron un perfil de olor y aroma relacionado con descriptores propios de la miel de abejas, indicando una conservación de estos olores y aromas primarios en el producto a los cuales se les añade notas frutales (fruta madura), caramelo y olores relacionados con la actividad apícola (cera, panal, colmena); además dicha hidromiel presenta un defecto de lías el cual hace referencia a los sedimentos de materia orgánica procedentes de la levadura que precipitan en el fondo del fermentador obteniéndose una hidromiel con cuerpo medio, características que son similares a las presentadas en este estudio a excepción del color que en este caso es de color amarillo claro, factor que se debe al uso de mieles distintas en cada uno de estos estudios.

### 4.3. Análisis fermentación de laboratorio

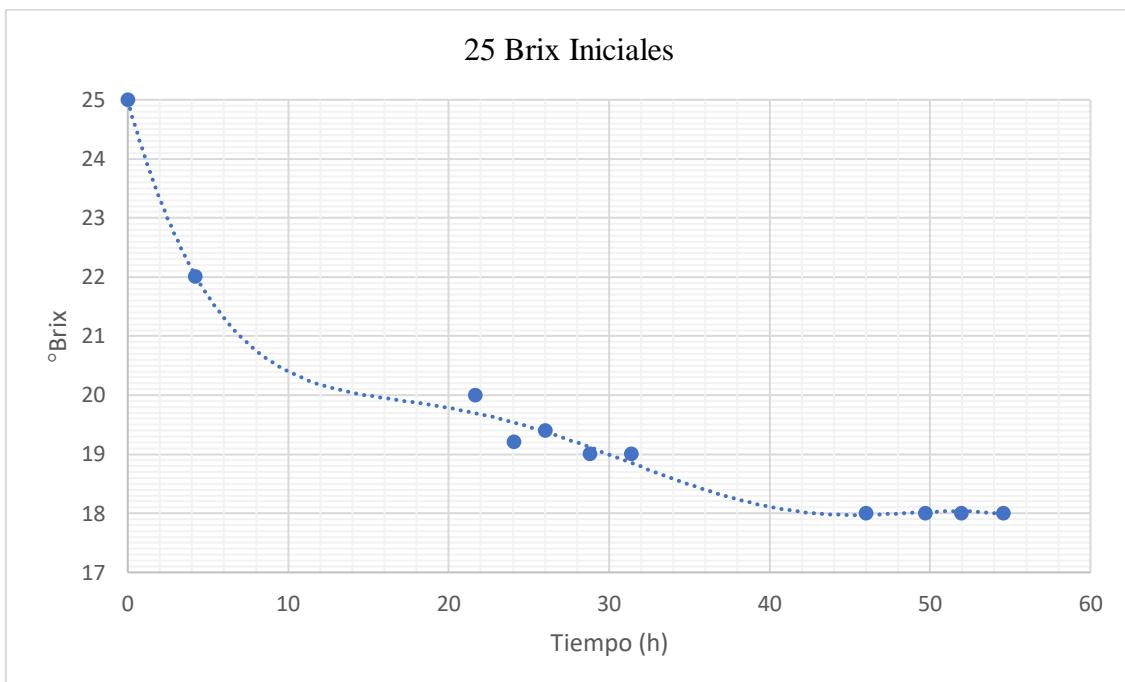
Se realizaron 4 experimentos en el laboratorio, dichos procesos fermentativos se llevaron a cabo con diferentes concentraciones de grados Brix siendo estas de 25, 20, 15 y 10 °Brix respectivamente, fermentaciones que se realizaron en el reactor discontinuo Batch Biotron GS Single Vessel ubicado en el laboratorio del Tecnológico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. En la ilustración 14 se encuentran recopilados la evolución de los grados Brix para estos 4 experimentos.

La toma de muestra para determinar los grados Brix se realizó desde que inicia la experimentación en intervalos de 2 horas conforme avanzó la reacción. Los valores que se obtuvieron nos permitieron identificar las fases de crecimiento y finalización de las fermentaciones; las fermentaciones concluyeron cuando se obtuvieron tres valores repetidos de grados Brix los cuales indican la etapa final del proceso fermentativo.

**Ilustración 14.** Evolución de grados Brix a lo largo del tiempo para los 4 experimentos.



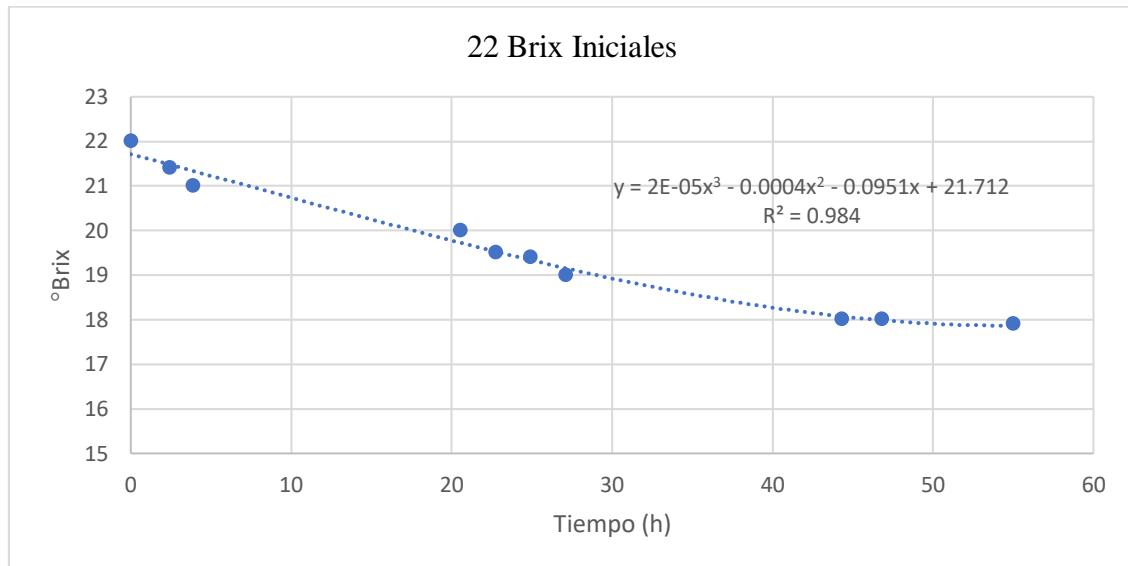
**Ilustración 15.** Evolución de grados Brix a lo largo del tiempo para experimento con 25 °Brix iniciales.



Como se observa en la ilustración 15, la primera fermentación realizada inició con una concentración de 25 °Brix, es importante mencionar que todo el proceso de fermentación se llevó a cabo bajo condiciones controladas de pH (4), temperatura (33 °C), y agitación constante (250 rpm), resultando en un proceso fermentativo que alcanzó una concentración final de 18 °Brix en un tiempo aproximado de 46 horas.

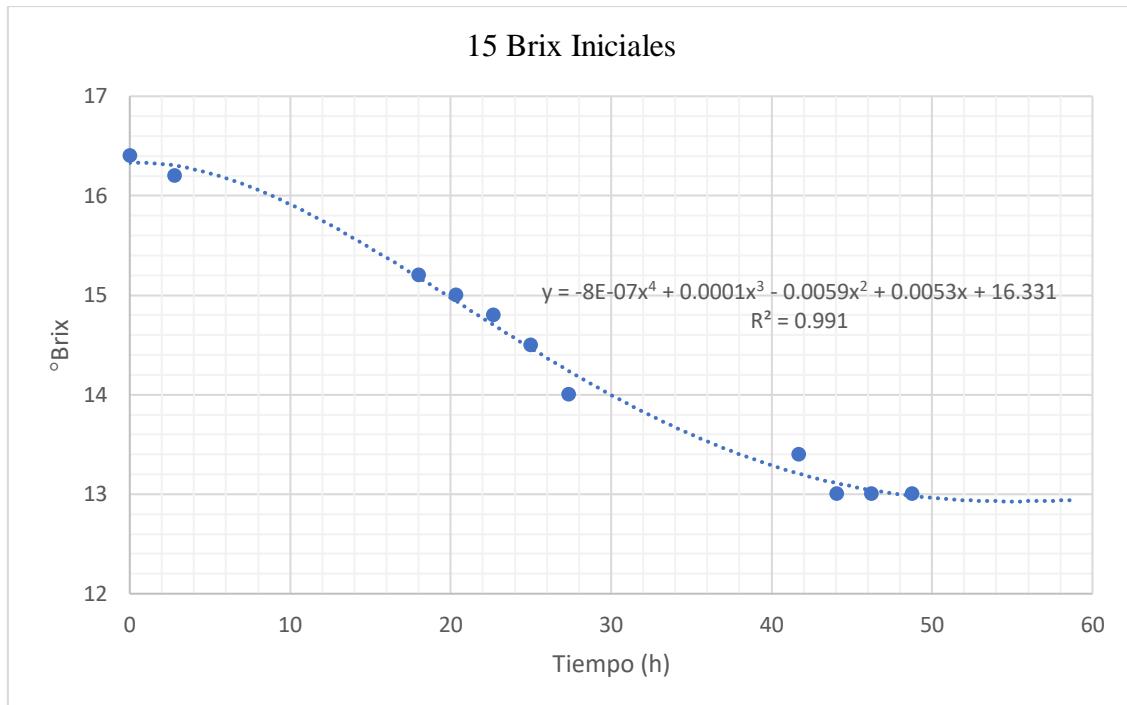
Al comparar este tiempo de fermentación con la fermentación realizada previo a la experimentación de laboratorio, se concluye que el control de los parámetros como el pH, la temperatura y la agitación constante son clave en cuanto a la duración del proceso fermentativo, observándose una disminución del tiempo de fermentación de 22 horas.

**Ilustración 16.** Evolución de grados Brix a lo largo del tiempo para experimento con 22 °Brix iniciales.



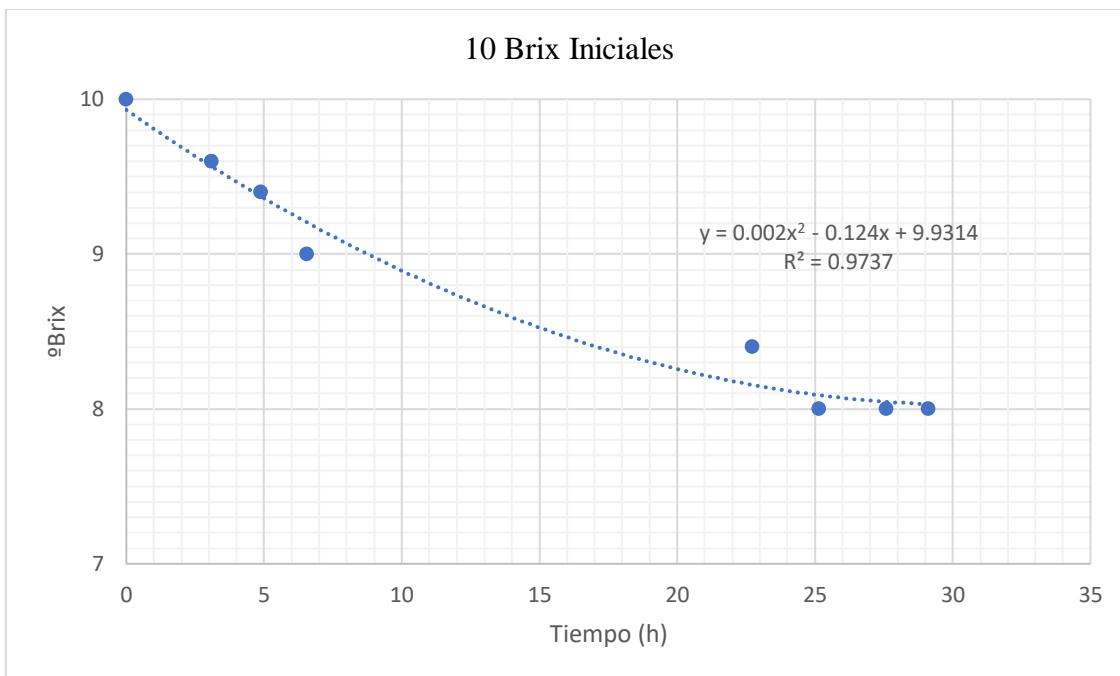
Como se observa en la ilustración 16, la segunda fermentación inició con una concentración de 22 °Brix y este proceso fermentativo duró un período aproximado de 40 horas alcanzando una concentración final de 18 °Brix. Al igual que el primer experimento en este también se controló el pH, la temperatura y la agitación constante con los mismos rangos. Es importante destacar que este experimento a comparación del anterior duró 4 horas menos.

**Ilustración 17.** Evolución de grados Brix a lo largo del tiempo para experimento con 15 °Brix iniciales.



Como se observa en la ilustración 17, la tercera fermentación inició con una concentración de 16,4 °Brix y este proceso fermentativo duró por un período aproximado de 40 horas alcanzando una concentración final de 13 °Brix. Al igual que el primer experimento en este también se controló el pH, la temperatura y la agitación constante con los mismos rangos. Es importante destacar que este experimento a comparación del experimento 2 duró 13 horas menos, y en comparación al experimento 1 duró 17 horas menos.

**Ilustración 18.** Evolución de grados Brix a lo largo del tiempo para experimento con 10 °Brix iniciales.



Como se observa en la ilustración 18, la cuarta fermentación inició con una concentración de 10 °Brix y este proceso fermentativo duró por un período aproximado de 25 horas alcanzando una concentración final de 8 °Brix. Semejante al primer experimento en este también se controló el pH, la temperatura y la agitación constante con los mismos rangos. En contraste la cuarta fermentación duró 4 horas menos que la fermentación con una concentración inicial de 15 °Brix; perduro 13 horas menos que la fermentación con una concentración inicial de 22 °Brix; y 23 horas menos en comparación a la primera fermentación con una concentración inicial de 25 °Brix.

Como se observa en las ilustraciones expuestas anteriormente el tiempo de fermentación disminuyó a medida que el mosto a se encuentra más diluido. Esta disminución en el tiempo de fermentación se debe a la disminución de sustrato que se encuentra presente en el mosto, generando una menor presión osmótica lo cual mejora las reacciones metabólicas que son llevadas a cabo por las levaduras, las mismas que usan como alimento a los hidratos de carbono que se encuentran en el medio.

La evolución del comportamiento de los grados Brix se compara con un estudio de fermentación de cerveza realizado por (Grassi et al., 2014), estudio que muestra los cambios en °Brix para ensayos de fermentación realizados empleando dos cepas de levadura *S. Cerevisiae* y dos temperaturas para el proceso de fermentación (19,1 y 24 °C). En el estudio los °Brix al inicio fueron los mismos para todos los ensayos (9,37 °Brix) correspondientes a un contenido de azúcar de aprox. 97,50g/L. El contenido de azúcar total mostró una rápida disminución en todos los ensayos realizados dentro de tres días de fermentación. El consumo de azúcar fue más rápido cuando la fermentación ocurrió a 24 °C alcanzando una concentración final de 6.55 °Brix después de 46 horas de fermentación, comportamiento que ocurre de manera similar con este estudio y esta concentración de grados Brix se mantuvo constante después de 142 horas de fermentación. Para el caso de las fermentaciones realizadas a 19,1 °C para la fermentación de cerveza se observó que el contenido de azúcar disminuyó a menor velocidad, pero alcanzando al final de la fermentación el mismo nivel de los otros ensayos realizados (5.19 °Brix), la disminución en la velocidad del consumo de grados Brix en este caso se debe a la disminución de la temperatura, factor que influye directamente en la velocidad de fermentación. Con lo mencionado anteriormente decimos que la fermentación de hidromiel presentó un comportamiento similar a la fermentación de cerveza en lo referente al comportamiento de la concentración de grados Brix a lo largo del proceso de fermentación, el cual además dura un período de tiempo semejante.

#### 4.3.1. Análisis cuantificación de biomasa

En este análisis no se tomó en cuenta el método del peso seco dentro de la experimentación debido a que se cometió un error y no se empleó una balanza analítica por lo que los valores respectivos de los pesajes no pueden ser empleados para el análisis de datos, para esto se tomó solo en consideración los datos obtenidos mediante el método de liofilización en donde no se cometió ningún error en la manipulación de las muestras.

La cuantificación de biomasa por el método de liofilización permitió cuantificar la generación de levadura con una mayor exactitud en comparación al método de peso seco ya que el proceso nos permite mantener las características originales de la muestra, es

decir se mantiene la estructura y aspecto inicial de la misma; además, debido a que el proceso es realizado a bajas temperaturas se inhibe el deterioro del color por reacciones químicas lo que también permite minimizar la pérdida de constituyentes volátiles presentes en la muestra (Alvarado & Valdez, 2019).

**Tabla 16.** Concentración inicial y final de levadura.

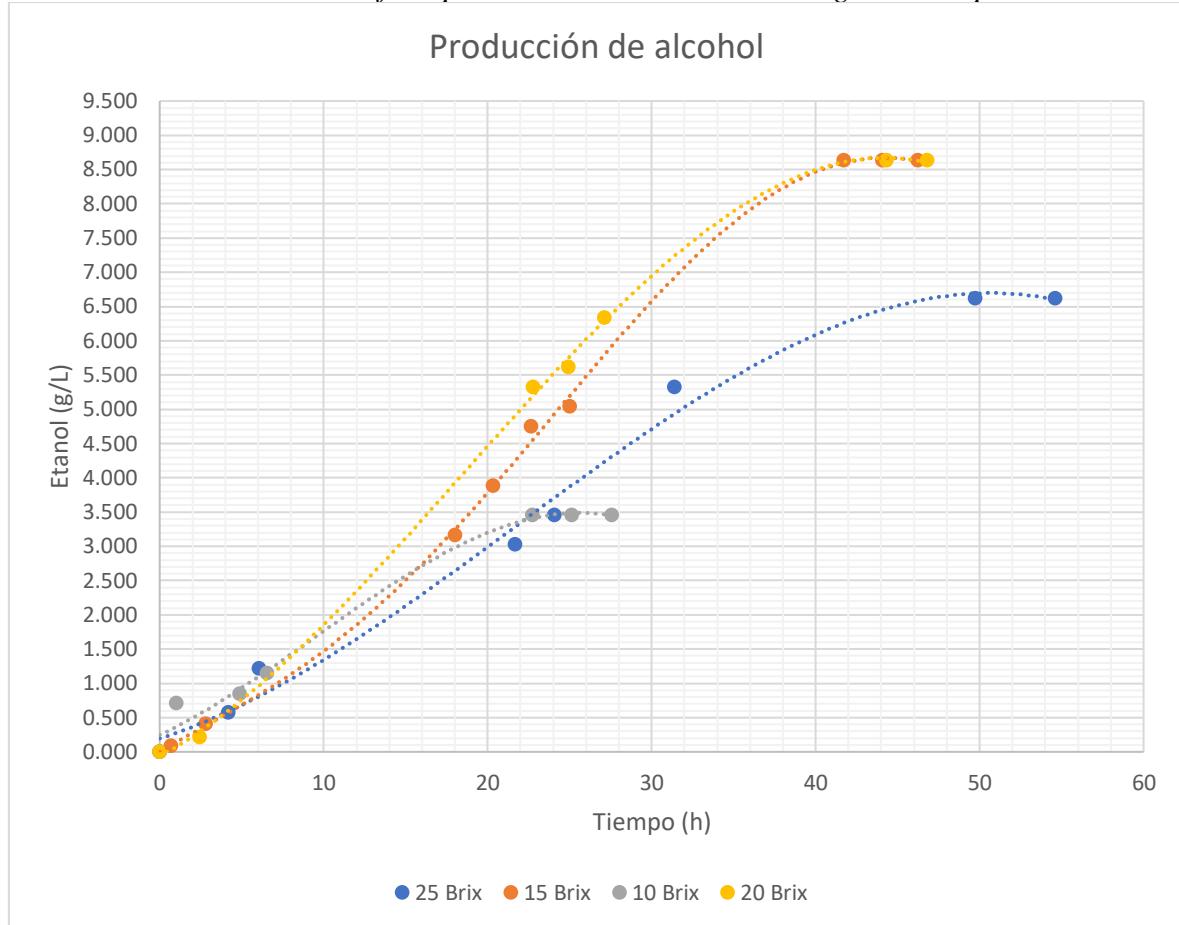
°Brix	Concentración Inicial (g/l)	Concentración Final (g/l)
25	1,5	3,8
20	1,5	8,6
15	1,5	5,8
10	1,5	3,4

Cómo se muestra en la tabla 16 se presentan los valores de concentración obtenidos de biomasa expresados como gramos por litro para cada uno de los experimentos, los valores de concentración inicial se obtuvieron directamente del pesaje de la cantidad de levadura inicial que se empleó siendo el mismo para cada fermentación; ya que este valor permaneció constante y los valores de concentración final se obtuvieron aplicando la ecuación 6.

Además es importante mencionar que para el experimento de 20 °Brix por motivos de disponibilidad de insumos se tuvo que emplear para la fermentación una miel de otra marca, la cual nos demuestra que el tipo de miel a utilizar es un factor de suma importancia para la producción de hidromiel; ya que la misma proporciona el medio en el que las levaduras se van a desarrollar y como se puede apreciar en el experimento esta nueva miel empleada es mejor para la levadura por presentar mayor concentración final de biomasa, demostrando que la miel es uno de los factores más importantes a la hora de fermentar hidromiel.

### 4.3.3. Análisis producción de etanol por método de microdifusión

*Ilustración 19. Gráfica, producción de alcohol a lo largo del tiempo.*



En la ilustración 19 se aprecia cómo se genera el alcohol a lo largo del tiempo, en el caso del primer experimento (25 °Brix) la fermentación llega a su concentración máxima de alcohol en un tiempo aproximado de 45 horas, esta concentración es menor a los experimentos 2 y 3, este comportamiento se puede explicar debido a que la concentración de azúcares es elevada e impide que las levaduras generen mucho alcohol, en este caso se puede apreciar que la concentración máxima de alcohol a la que se llega con un mosto de 25 °Brix es de 6,5 gramos de alcohol por litro de solución.

En el caso de los experimentos de 20 y 15 °Brix se puede apreciar como la concentración de alcohol llega a su máximo en un tiempo aproximado de 42 horas, en ambos casos la concentración de alcohol es muy similar siendo esta de 8,5 gramos de alcohol por litro.

En el último experimento el de 10 °Brix se observó cómo rápidamente se alcanza la concentración máxima de alcohol y esto se debe a que en este caso la cantidad de sustrato es más limitada en comparación a los otros experimentos, llegando a su máximo en un período de 27 horas, en este caso se aprecia una concentración de alcohol de 3,5 gramos por litro.

Existe una tendencia a producir más alcohol en cuanto mayor sea la concentración de sustrato dentro del mosto hasta alcanzar un límite, límite del cual si se sigue aumentando la concentración de azúcares más hostil se vuelve el medio y más difícil es el metabolismo de las levaduras debido a la elevada presión osmótica, por lo que la fermentación con mostos con más de 20 °Brix ya no resultan factibles para generar un producto con una elevada concentración de alcohol (Albernas-Carvajal et al., 2016).

La generación de etanol se compara con los resultados obtenidos en una investigación realizada por (Pereira et al., 2013) estudio donde se fermenta hidromiel empleando levadura *Saccharomyces Cerevisiae* con diferentes concentraciones de biomasa inicial; los resultados de generación de etanol se presentan en grados Gay-Lussac por lo que es necesario trasformar esta medida de concentración de etanol a gramos por litro, los resultados expresados por (Pereira et al., 2013) fueron multiplicados por el volumen al que se realizaron los experimentos y por la densidad del etanol; el estudio muestra una concentración de etanol de 29,8 g/l para el experimento donde se obtuvo una menor concentración de alcohol, el cual empleó una concentración de biomasa inicial de 2,5 g/l; también se obtuvo una concentración de alcohol de 92,4 g/l en otro experimento que uso una concentración de biomasa inicial de 5g/l, siendo este el ensayo que presentó una mayor concentración de etanol. Los resultados mostrados por (Pereira et al., 2013) en comparación presentan concentraciones de etanol mucho mayores a las reportadas en este estudio, este factor se debe a que se usan diferentes cepas de levadura ya que algunas cepas permiten una mayor generación de alcohol y también las diferencias se deben a que en este estudio se emplean concentraciones menores de biomasa inicial en comparación a las reportadas por (Pereira et al., 2013) factor que influye en la cantidad de etanol generado ya que se observa que a mayor concentración de biomasa inicial mayor concentración de etanol.

#### 4.3.4. Análisis consumo de sustrato

La cuantificación de sustrato se realizó empleando un espectrofotómetro de UV-Visible, este procedimiento se realizó al inicio y al final del proceso de fermentación, para la conservación de las muestras, estas se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido, para de esta manera evitar que continúe el proceso de fermentación garantizando el análisis de las mismas; además, es importante mencionar que las muestras fueron analizadas por triplicado para disminuir el porcentaje de error.

*Tabla 17. Concentración de sustrato inicial y final para los cuatro experimentos.*

Muestra	Concentración inicial (g/l)	Concentración final (g/l)
25 °Brix	528,71	389,75
22 °Brix	484,22	392,04
16,4 °Brix	362,41	284,87
10 °Brix	223,58	180,93

El consumo de sustrato se compara con un estudio de fermentación de hidromiel realizado por (Pereira et al., 2013) estudio en el que se fermentó hidromel utilizando levadura *Saccharomyces Cerevisiae* empleando un mosto con una concentración de azúcares inicial de 275 g/l la misma que disminuyó a lo largo del tiempo, dicha concentración de azúcares a las 48 horas de iniciado el proceso de fermentación se redujo hasta un valor de 112 g/l, valores que se encuentran similares a las concentraciones de azúcar iniciales y finales obtenidas en este estudio, por lo que podemos mencionar que la fermentación de hidromiel en cuanto a consumo de sustrato de este estudio se comporta de manera análoga a la investigación realizada por (Pereira et al., 2013).

#### 4.4. Análisis cinética de Monod

##### 4.4.1. Análisis método de regresión lineal

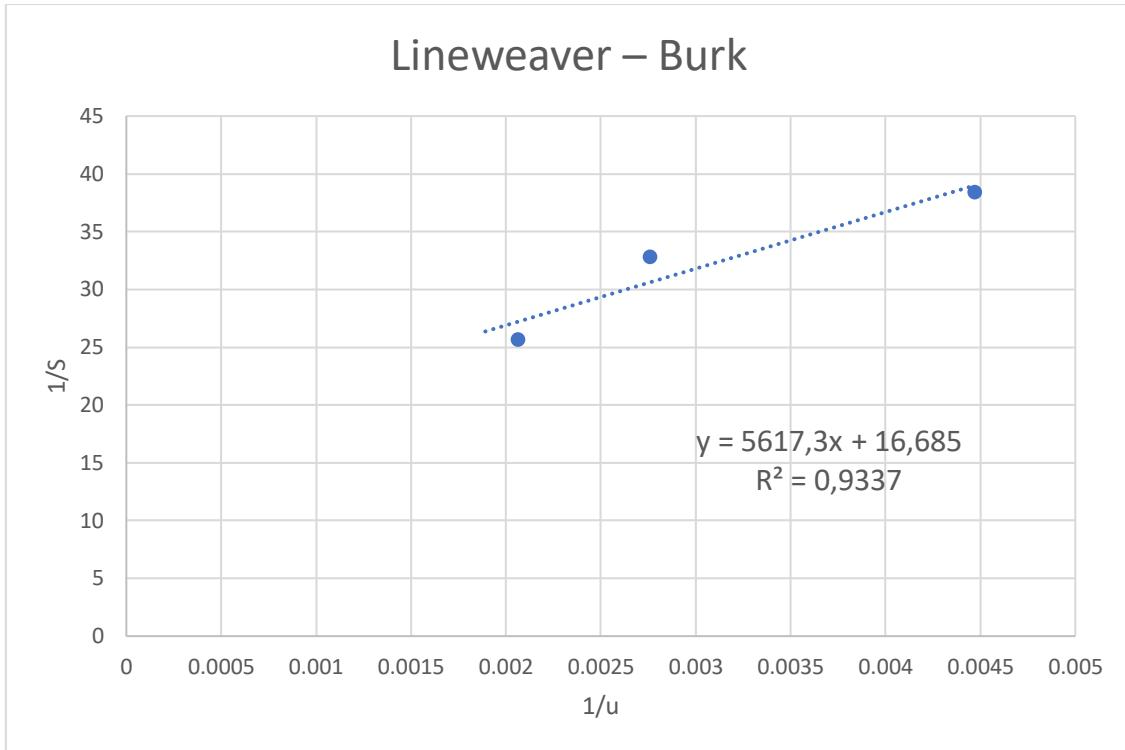
El método de regresión lineal nos permite obtener una ecuación que explica la relación que existe entre las variables predictoras y la variable de respuesta. El método de linealización de Lineweaver-Burk como datos necesarios para su construcción requiere de la velocidad de reacción y la cantidad de sustrato que se obtiene a partir de la ecuación 2, donde se empleó la cantidad de biomasa inicial y final en función del tiempo de experimentación.

**Tabla 18.** Datos necesarios para el método de Lineweaver-Burk.

Método Lineweaver-Burk							
<b>to</b>	<b>tl</b>	<b>X0</b>	<b>Xl</b>	<b>u</b>	<b>s</b>	<b>1/s</b>	<b>1/u</b>
2	29,11	1,5	3,04	0,02605653	223,58	0,00447267	38,3781022
2	46,75	1,5	5,87	0,03048915	362,41	0,00275931	32,7985514
2	46,81	1,5	8,6	0,03897115	484,22	0,00206518	25,6600095
2	54,6	1,5	3,8	0,01767179	528,71	0,0018914	56,5873751

En la tabla se observan los datos obtenidos mediante experimentación para desarrollar el método de Lineweaver-Burk, en la primera columna se observan el tiempo del período de latencia obtenido experimentalmente, este tiempo de latencia se considera un tiempo de 2 horas ya que después de este lapso se observó como inició la fermentación experimentalmente en cada uno de los casos, este tiempo nos indica que las levaduras necesitan de 2 horas para acoplarse a su nuevo entorno; en la segunda columna se encuentran los tiempos de fermentación para cada uno de los experimentos; en la columna tres se observa la cantidad de levadura inicial para cada uno de los experimentos, la biomasa inicial fue de 1,5 g/l para cada experimentación; en la columna cuatro se aprecian los valores de biomasa final, los mismos que fueron determinador por el método de liofilización; en la columna cinco se observa el valor de la velocidad de reacción, la cual se calculó mediante la ecuación 2; en la columna seis se observan los valores de cantidad de sustrato para cada experimento; en la columna siete se aprecian los valores del recíproco de la cantidad de sustrato inicial, valores que son necesarios para obtener la gráfica de Lineweaver-Burk para obtener las constantes cinéticas del modelo de Monod; y finalmente en la columna ocho se aprecian los valores del recíproco de la velocidad de reacción, valores que al igual que el recíproco del sustrato son necesarios para obtener la gráfica del método de linealización.

**Ilustración 20.** Gráfica método de linealización Lineweaver-Burk.



En la ilustración 20 se observa el método de linealización de Lineweaver-Burk, método que nos permite determinar el valor de las constantes cinéticas  $U_{\max}$  y  $K_s$ ; además, podemos observar que la gráfica presenta un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9337$  valor que se considera aceptable ya que  $R^2$  es superior a 0,9; y además se presenta una ecuación  $y = 5617,3x + 16,685$  la cual se relaciona con una línea recta y nos presenta los componentes del método de linealización de Lineweaver-Burk. Ecuación de la cual la pendiente representa el valor de  $K_s/U_{\max}$  y el intercepto con el eje y representa  $1/U_{\max}$ .

Reemplazando los datos obtenidos en la ecuación anterior es posible encontrar los valores de  $U_{\max}$  y  $K_s$  los cuales se presentan en la siguiente tabla. Determinando entonces que el valor de la constante de saturación es de 336,66 g/l y el valor de  $U_{\max}$  es 0,0599 h<sup>-1</sup>.

**Tabla 19.** Resumen datos  $K_s$  y  $U_{max}$  método Lineweaver-Burk.

$K_s$	336,667666 g/L
$U_{max}$	0,05993407 h <sup>-1</sup>

La constante de Monod ( $K_s$ ) nos indica la concentración de sustrato necesaria con la que la tasa de crecimiento es la mitad de la tasa máxima de crecimiento de los microorganismos; esta constante se encuentra ligada al mecanismo de transporte de sustrato a través de la membrana celular, la cual dependen de las propiedades y condiciones intracelulares de la membrana celular, los tipos de proteína de transporte y las propiedades del sustrato por lo que el valor de  $K_s$  se puede definir como el reflejo de la afinidad que tienen las células hacia el sustrato, valor que en este estudio es de  $K_s = 336,66 \text{ g/l}$  (Alvarado & Valdez, 2019; Lerkkasemsan & Lee, 2018).

Los valores de la tasa máxima de crecimiento específico  $U_{max}$  y de la constante de saturación  $K_s$  de esta investigación obtenidas por medio del modelo de Monod son comparadas con las constantes respectivas de varios estudios realizados en condiciones similares, pero empleando sustratos diferentes, experimentos que se muestran en la tabla 20 propuesta por (Rorke & Kana, 2017) la misma que se modifica con el fin de integrar los resultados obtenidos en esta investigación para los datos obtenidos del hidromiel.

**Tabla 20.** Resumen datos  $K_s$  y  $U_{max}$  de la cinética de Monod para varios estudios, [modificación de (Rorke & Kana, 2017)].

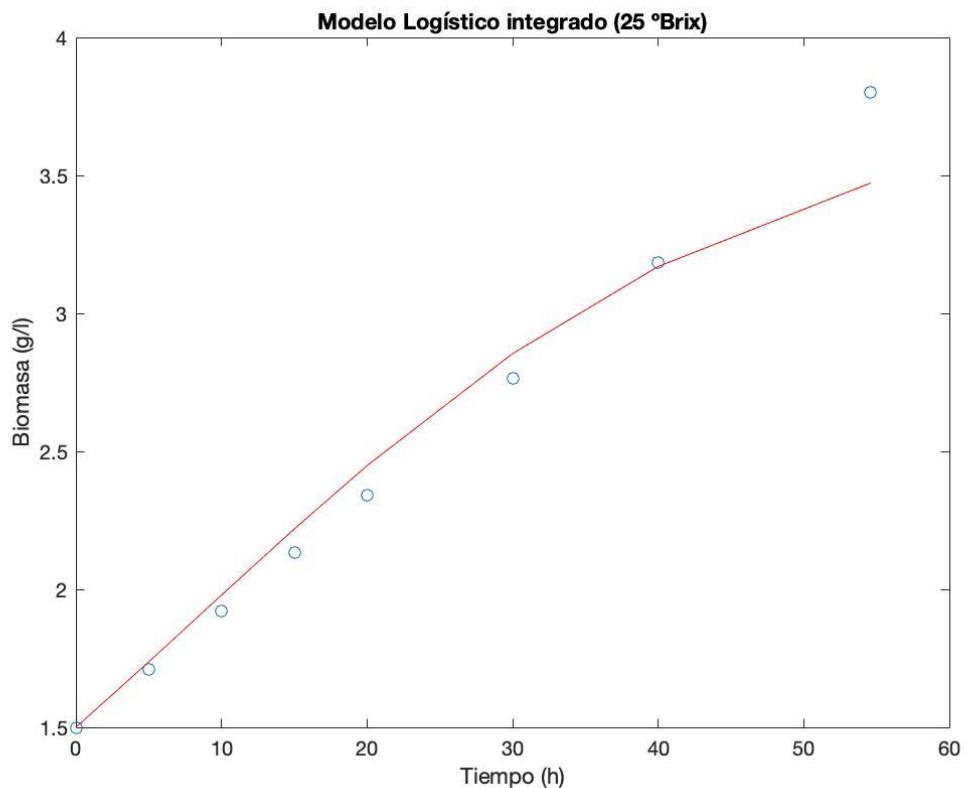
Sustrato	$U_{max}$	$K_s$	Referencia
Hidromiel	0,059	336,66	Este estudio
Hojas de sorgo	0,176	10,110	(Rorke & Kana, 2017)
Jugo de hoja de palma aceitera	0,150	10,210	(Srimachai et al., 2015)
Jugo crudo de remolacha azucarera	1,169	ND	(Dodić et al., 2012)
Jugo de sorgo dulce	0,313	47,510	(Ariyajaroenwong et al., 2016)
Glucosa	0,291	ND	(Govindaswamy & Vane, 2007)
Cáscaras de bananas	1,500	25,000	(Manikandan et al., 2008)
Glucosa	0,084	213,60	(Ahmad et al., 2011)
Glucosa	0,650	11,390	(Shafaghat et al., 2009)
Pulpa de desecho de cítricos	0,350	10,690	(Raposo et al., 2009)
Glucosa	0,133	3,700	(Singh & Sharma, 2015)s
ND = No determinado			

Como se observa en la tabla 20 las fermentaciones realizadas con hojas de sorgo y jugo de hoja de palma aceitera presentan un valor de  $K_s$  muy parecido lo que nos indica que la levadura *S. Cerevisiae* tiene una afinidad similar por estos dos sustratos, en contraste se puede observar una constante de saturación  $K_s$  mayor para el jugo de sorgo dulce lo que nos indica que la levadura presenta una menor afinidad hacia este sustrato y además se puede apreciar que existe una afinidad mucho menor en el caso del hidromiel y de la glucosa en el estudio realizado por (Ahmad et al., 2011), la disminución en la afinidad de la levadura por el sustrato puede ser atribuido a los tipos y las concentraciones de los sustratos, las cepas de levadura empleadas o a los mismos procesos de fermentación, este último factor puede ser explicado con las grandes diferencias en la afinidad del sustrato por la glucosa obtenida por (Shafaghat et al., 2009), estudio en el que se utilizó un volumen de trabajo de menos de 250 ml y el estudio presentado por (Ahmad et al., 2011) en donde se empleó un volumen de trabajo de 8l; las diferencias observadas entre los estudios antes mencionados pueden atribuirse a los desafíos adicionales del proceso que se encuentran en grandes volúmenes, como la mala agitación, la baja transferencia de masa y la falta de homogeneidad. Para finalizar podemos decir que los datos demuestran que el hidromiel como sustrato para el crecimiento de la levadura *S. Cerevisiae* presentan una afinidad similar a la fermentación realizada con glucosa por (Ahmad et al., 2011) por presentar valores de  $U_{max}$  y  $K_s$  muy parecidos.

## 4.5. Modelo Logístico Integrado

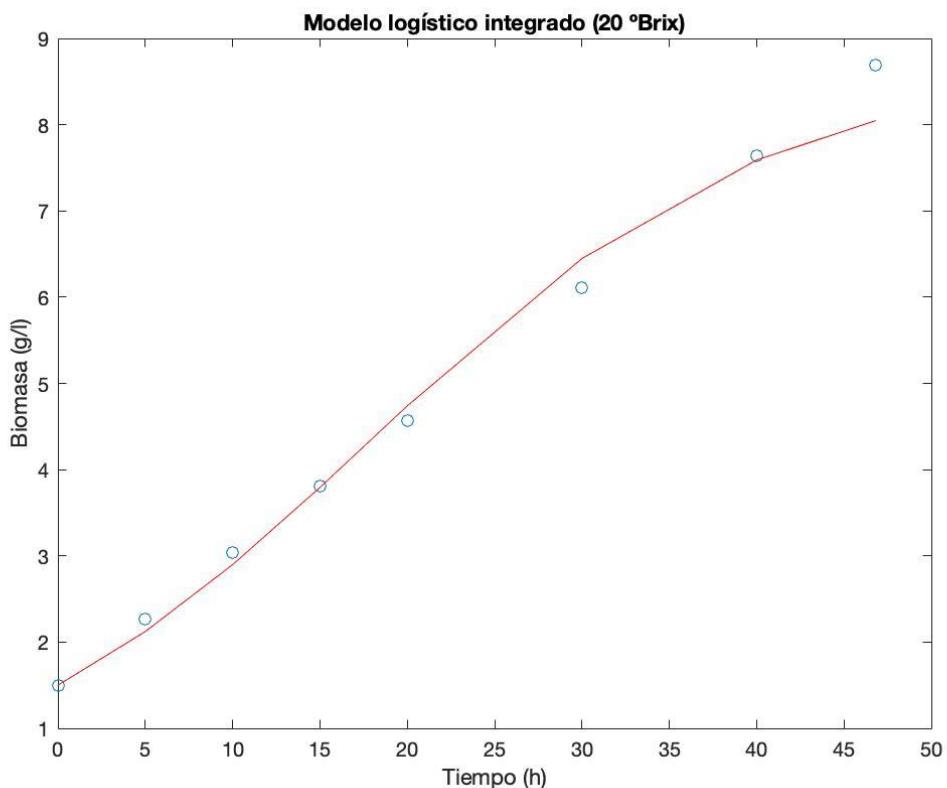
Los resultados obtenidos en la experimentación fueron ajustados al modelo Logístico Integrado empleando un método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt programado en MATLAB. La ecuación Logística Integrada fue empleada para el modelado de los procesos de fermentación y para determinar la tasa máxima de crecimiento específico  $U_{max}$  mediante el ajuste de los datos experimentales correspondientes a cada experimento.

**Ilustración 21.** Gráfica modelo Logístico Integrado 25 °Brix.



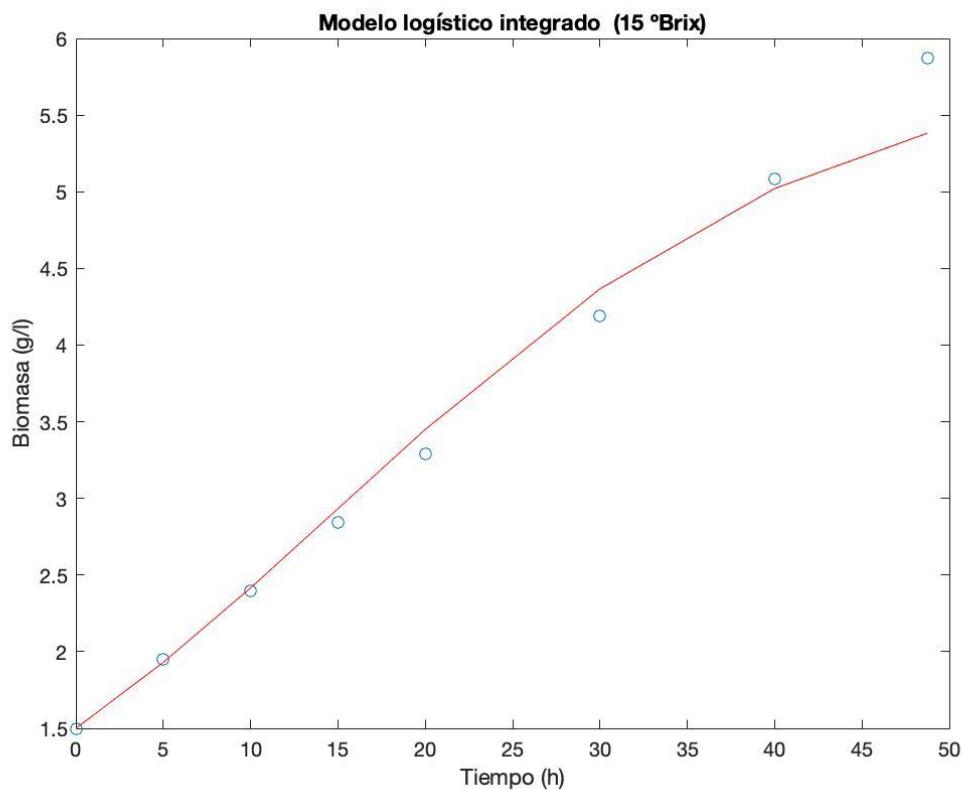
En la ilustración 21 se observa la gráfica obtenida después del ajuste de datos al modelo Logístico Integrado para el experimento de 25 °Brix de la cual se obtuvo un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.9678$  y una tasa de crecimiento máxima específica  $U_{\max}$  de 0.0511; además se puede apreciar como en un tiempo aproximado de 54 horas alcanzamos una concentración de biomasa de 3,8 gramos por litro.

**Ilustración 22.** Gráfica modelo Logístico Integrado 22 °Brix.



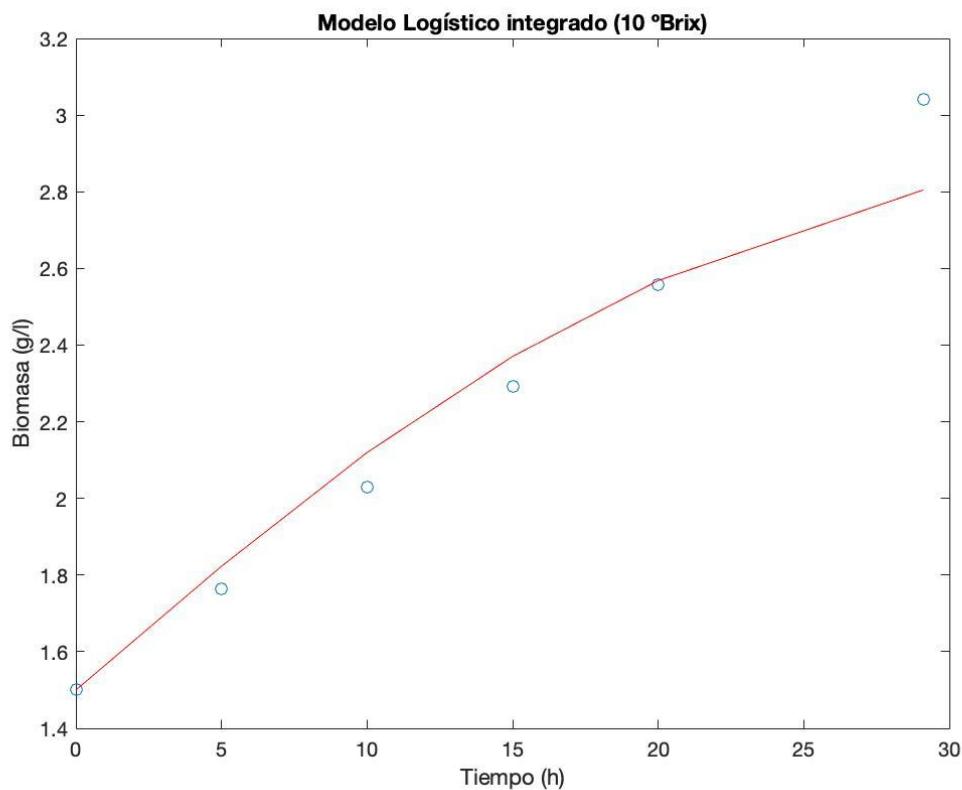
En la ilustración 22 se observa la gráfica obtenida después del ajuste de datos al modelo Logístico Integrado para el experimento de 22 °Brix de la cual se obtuvo un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.9870$  y una tasa de crecimiento máxima específica  $U_{\max}$  de 0.0875; además se puede apreciar como en un tiempo aproximado de 47 horas alcanzamos una concentración de biomasa de 8,6 gramos por litro, valor de biomasa superior que el experimento de 25 °Brix, comportamiento que se debe a que en el experimento de 25 °Brix la concentración de azúcares es tan alta que genera un efecto inhibitorio limitando el crecimiento de las levaduras dentro del mosto a fermentar, efecto que no ocurre en la experimentación de 22 °Brix ya que la concentración de azúcares en este experimento se encuentra dentro de un rango que favorece la generación de biomasa, motivo por el cual la cantidad final de levadura es mayor en este experimento.

**Ilustración 23.** Gráfica modelo Logístico Integrado 16,4 °Brix.



En la ilustración 23 se observa la gráfica obtenida después del ajuste de datos al modelo Logístico Integrado para el experimento de 16,4 °Brix de la cual se obtuvo un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.9815$  y una tasa de crecimiento máxima específica  $U_{\max}$  de 0.0712; además se puede apreciar como en un tiempo aproximado de 48 horas alcanzamos una concentración de biomasa de 5,8 gramos por litro, cantidad de biomasa que es menor que en el experimento de 22 °Brix y esto se debe a que como en el medio existen menor cantidad de azúcares se da una menor generación de biomasa ya que la concentración de azúcares del medio influye directamente en el metabolismo de las levaduras y por lo tanto en la generación de biomasa, por lo que en este experimento es normal que la cantidad de biomasa alcanzada sea tanto menor a experimentos con mayores cantidades de sustrato, es importante mencionar que este comportamiento ocurre hasta antes de llegar a un límite de cantidad de sustrato, después del cual mayores cantidades de sustrato actúan como agentes inhibidores en el crecimiento de las levaduras evitando así que se obtengan valores mayores de generación de biomasa.

**Ilustración 24.** Gráfica modelo Logístico Integrado 10 °Brix.



En la ilustración 24 se observa la gráfica obtenida después del ajuste de datos al modelo Logístico Integrado para el experimento de 10 °Brix de la cual se obtuvo un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.9529$  y una tasa de crecimiento máxima específica  $U_{max}$  de 0.086; además se puede apreciar como en un tiempo aproximado de 27 horas alcanzamos una concentración de biomasa de 3,1 gramos por litro, cantidad de biomasa que es menor que en el experimento de 16,4 °Brix y este comportamiento se debe al mismo motivo que se explicó anteriormente.

**Tabla 21.** Resumen datos  $U_{max}$  para el modelo Logístico Integrado.

Modelo Logístico Integrado		
Experimento	$U_{max}$	$R^2$
25	0,0511	0,9678
22	0,0875	0,987
16,4	0,0712	0,9815
10	0,086	0,9529

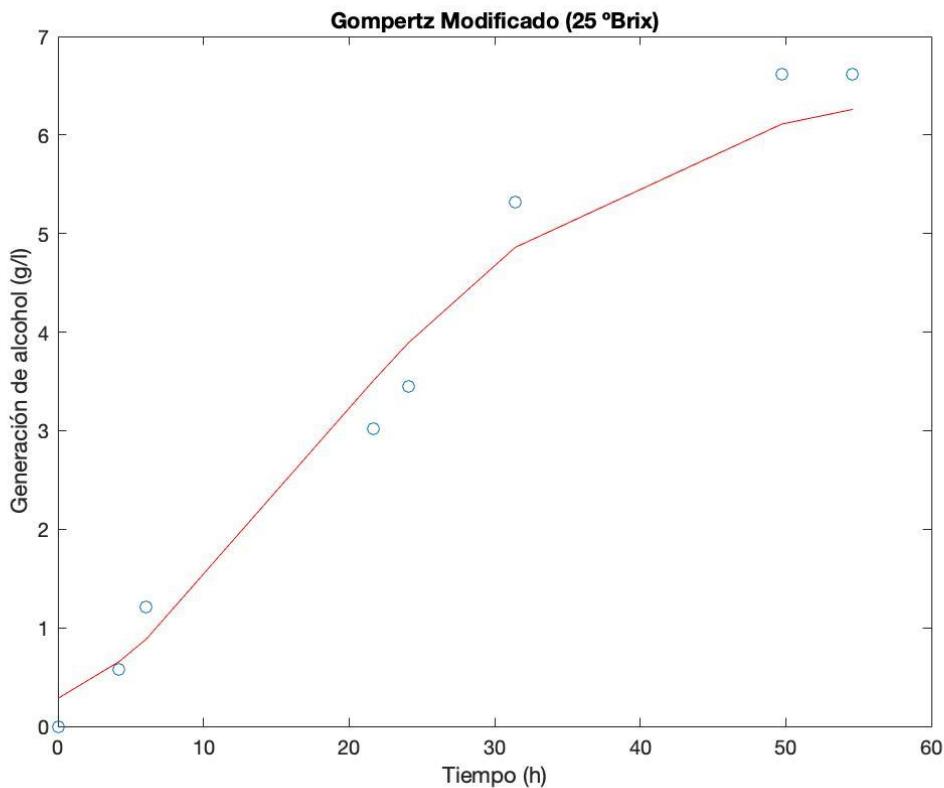
Para comparar los datos experimentales con un estudio similar tomamos el promedio de los experimentos de 22, 16,4 y 10 °Brix obteniendo un valor de  $U_{max}$  global para el

modelo Logístico Integrado de  $0,0815 \text{ h}^{-1}$ ; este valor se compara con un estudio realizado por (Dodić et al., 2012), en donde se obtiene un valor de  $U_{\max}$  de  $0,194 \text{ h}^{-1}$  para el modelamiento de la ecuación Logística Integrada para la fermentación de jugo crudo de remolacha azucarera, experimentación que se realiza en condiciones similares a las de la fermentación de hidromiel, en dicho estudio se fermenta el jugo crudo de remolacha azucarera empleando una cepa de levadura *Saccharomyces Cerevisiae* con una concentración inicial de biomasa de  $2,576 \text{ g/l}$ , concentración de levadura que es un 71% superior a la concentración de biomasa inicial empleada en este estudio, el valor de  $U_{\max}$  obtenido para la fermentación de jugo crudo de remolacha azucarera nos indica que este mosto como medio de fermentación es más aceptado por las levaduras a comparación del hidromiel ya que la afinidad de la levadura por el sustrato es mejor, la mayor aceptación de la levadura hacia el jugo crudo de remolacha azucarera se puede deber a factores como la concentración de sustrato, las cepas de levadura empleadas, el tamaño del inóculo, cambios o variaciones en la composición de nutrientes, el sustrato limitante, condiciones de pH y temperatura, factores de los cuales destacamos la diferencia de un 71% en cuanto a la concentración de inóculo se refiere.

#### 4.6. Modelo de Gompertz Modificado

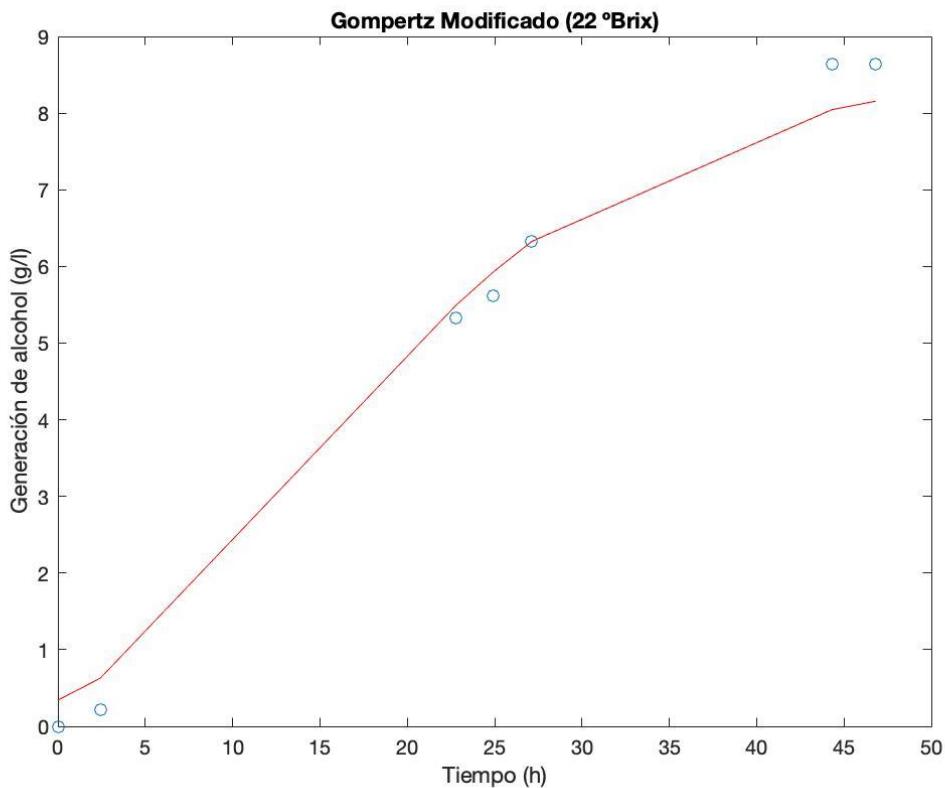
Los resultados obtenidos en la experimentación fueron ajustados al modelo de Gompertz modificado empleando un método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt programado en MATLAB. La ecuación de Gompertz modificado se usó para modelar los procesos de fermentación y determinar la tasa máxima de producción de etanol mediante el ajuste de los datos experimentales correspondientes a cada experimento.

*Ilustración 25. Gráfica modelo Gompertz Modificado 25 °Brix,*



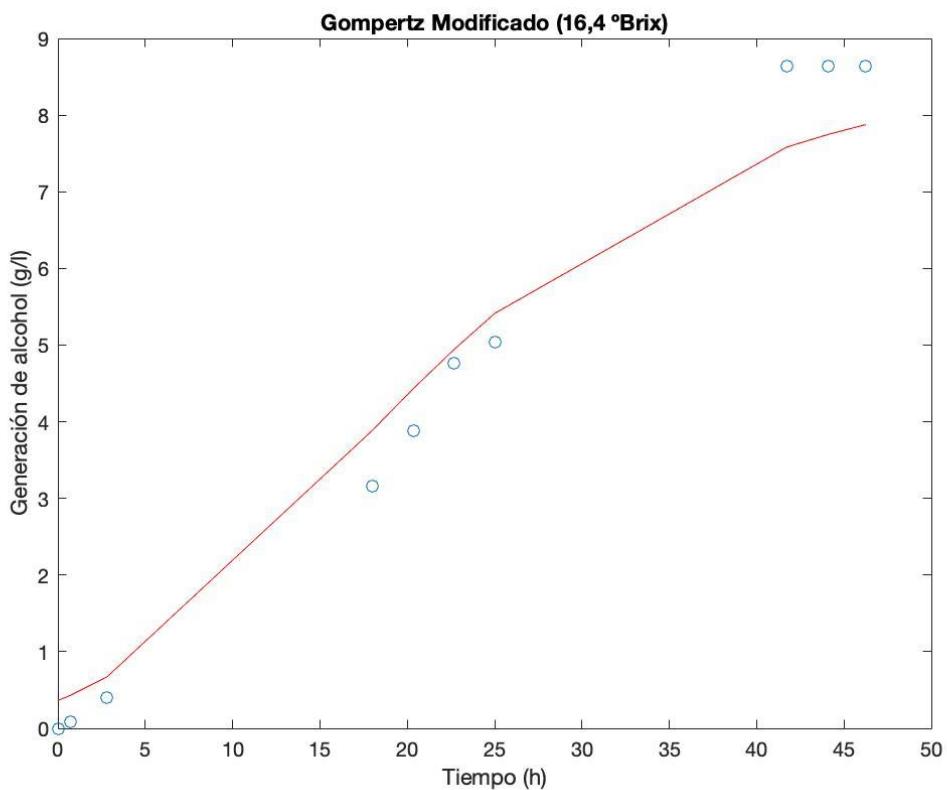
En la ilustración 25 se observa la gráfica obtenida después del ajuste de datos para el modelo de Gompertz modificado la misma que presenta un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9749$  y una tasa máxima de generación de etanol  $rpm = 0,18$  [g/(l.h)] para el experimento de 25 °Brix; además en la gráfica se puede apreciar que se alcanza una concentración máxima de alcohol de 6,5 gramos por litro después de un tiempo de aproximadamente 49 horas después de que se inicia el proceso de fermentación.

*Ilustración 26. Gráfica modelo Gompertz Modificado 22 °Brix,*



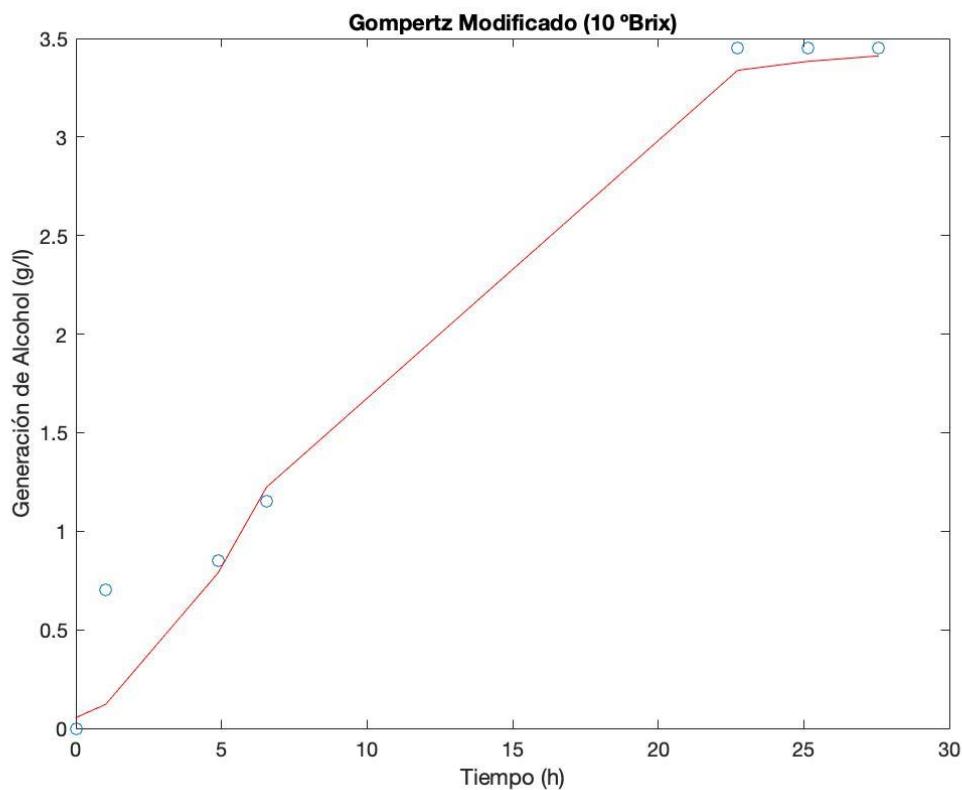
En la ilustración 26 se observa la gráfica obtenida después del ajuste de datos para el modelo de Gompertz modificado la misma que presenta un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.9871$  y una tasa máxima de generación de etanol  $rpm = 0,2741$  [g/(l.h)] para el experimento de 22 °Brix; además en la gráfica se puede apreciar que se alcanza una concentración máxima de alcohol de 8,6 gramos por litro después de un tiempo de aproximadamente 44 horas después de que se inicia el proceso de fermentación.

**Ilustración 27.** Gráfica modelo Gompertz Modificado 16,4 °Brix,



En la ilustración 27 se observa la gráfica obtenida después del ajuste de datos para el modelo de Gompertz modificado la misma que presenta un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9657$  y una tasa máxima de generación de etanol  $rpm = 0,2433$  [g/(l.h)] para el experimento de 22 °Brix; además en la gráfica se puede apreciar que se alcanza una concentración máxima de alcohol de 8,6 gramos por litro después de un tiempo de aproximadamente 44 horas después de que se inicia el proceso de fermentación.

**Ilustración 28.** Gráfica modelo Gompertz Modificado 10 °Brix,



En la ilustración 28 se observa la gráfica obtenida después del ajuste de datos para el modelo de Gompertz modificado la misma que presenta un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9734$  y una tasa máxima de generación de etanol  $rpm = 0,2689$  [g/(l.h)] para el experimento de 22 °Brix; además en la gráfica se puede apreciar que se alcanza una concentración máxima de alcohol de 3,45 gramos por litro después de un tiempo de aproximadamente 23 horas después de que se inicia el proceso de fermentación.

En la tabla 22 se muestra un resumen de los valores de la tasa de producción de alcohol para el modelo de Gompertz modificado.

**Tabla 22:** Resumen valores de rpm para el modelo de Gompertz Modificado.

Modelo de Gompertz Modificado		
Experimento	rpm	$R^2$
25	0,18	0,9749
22	0,2741	0,9871
16,4	0,2433	0,9657

10	0,2689	0,9734
----	--------	--------

Con los datos presentados en la tabla anterior se encuentra un valor global para la tasa máxima de generación de etanol rpm tomando un promedio de los valores individuales para cada experimento, exceptuando el valor de rpm para el experimento de 25 °Brix el cual no se toma en consideración ya que dicho experimento a las condiciones a las cuales fue llevado a cabo, la concentración inicial de sustrato actúa como inhibidor en el metabolismo de las levaduras afectando y ralentizando el proceso de fermentación, comportamiento que no ocurre con los experimentos de 22, 16,4 y 10 °Brix, de los cuales el promedio de los valores de la tasa máxima de generación de alcohol rpm es de 0,2621 [g/(l.h)].

El valor de la tasa máxima de generación de alcohol de esta investigación obtenido por medio de la ecuación de Gompertz modificada es comparada con los valores de rpm de varios estudios realizados en condiciones similares, pero empleando diferentes sustratos, dichos experimentos se muestran resumidos en la tabla 21 propuesta por (Rorke & Kana, 2017). La misma que se modifica con la finalidad de integrar los resultados obtenidos en esta investigación para los datos del hidromiel.

**Tabla 23.** Resumen datos rpm de la ecuación de Gompertz Modificada, [modificación de (Rorke & Kana, 2017)].

Sustrato	Rpm (g/l/h)	Referencia
Hidromiel	0,26	Este estudio
Hojas de sorgo	0,52	(Rorke & Kana, 2017)
Jugo de hoja de palma aceitera (10-20 años)	0,08	(Srimachai et al., 2015)
Jugo de hoja de palma aceitera (3-4 años)	0,24	(Srimachai et al., 2015)
Jugo crudo de remolacha azucarera	4,39	(Dodić et al., 2012)

La tabla 23 muestra una comparación de los valores de rpm obtenidos de este estudio usando hidromiel y los estudios que usaron hojas de sorgo, jugo de hoja de palma aceitera y jugo crudo de remolacha azucarera. De los cuales podemos mencionar que el valor de la tasa máxima de generación de alcohol de este estudio es similar e incluso superior a la tasa reportada por (Srimachai et al., 2015), lo cual ilustra que el hidromiel como medio de fermentación es potencialmente un mejor medio de fermentación que las hojas de palma aceitera al presentar una tasa superior de generación de alcohol; la variación en

los valores de rpm se debe a las cepas de levadura empleadas, el tipo de sustrato, la concentración inicial de azúcares, variaciones en la temperatura y las condiciones de fermentación (Phukoetphim et al., 2017).

#### 4.8. Análisis cromatógrafo de gases

El alcohol obtenido fue caracterizado mediante la técnica instrumental de cromatografía de gases. Este análisis fue realizado por un laboratorio de fuente externa, en los laboratorios MSV.

Por medio de un análisis por cromatografía de gases se determinó que la levadura que genera una mayor concentración de alcoholes superiores es la levadura de la marca Fermentis, la misma que genera una concentración de alcoholes superiores de 0,290 mg/100cc. En la tabla 24 se observa el resumen de los datos obtenidos para la concentración de alcoholes superiores, los mismos que se encuentran como Anexo 2. Este análisis se realizó siguiendo las consideraciones establecidas en la norma NTE INEN 2014:2015 “*Bebidas alcohólicas. Determinación de productos congénères por cromatografía de gases*”.

**Tabla 24.** Concentración de alcoholes superiores para cada levadura.

Muestra	Concentración Alcoholes Superiores (mg/100cc)
Levapan	0,196
Fermentis	0,290
Mangrove Jacks	0,264

Dicho análisis cumple con lo establecido para el apartado de alcoholes superiores en el **Anexo 4. Cuadro de requisitos que deben cumplir las bebidas alcohólicas. Cocteles o bebidas alcohólicas mixtas y los aperitivos, según la Norma INEN 2802: 2015 BEBIDAS ALCOHÓLICAS MIXTAS Y LOS APERITIVOS. REQUISITOS.**

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

El objetivo principal de esta investigación se pone de manifiesto gracias a que en la experimentación se elaboraron tres hidromieles utilizando tres levaduras distintas de las cuales por medio de la prueba de cata con la ayuda de catadores no especializados, se llegó a determinar que la levadura más óptima para la fermentación de hidromiel es la levadura de la marca Fermentis Saf-ale T58 la cual produjo un hidromiel con características organolépticas superiores en comparación a los hidromieles fermentados con las otras dos levaduras comerciales, siendo esta levadura la que generó un producto con mayor aceptación por parte de los consumidores y la cual permitió la determinación de la cinética de fermentación empleando la ecuación cinética de Monod para la determinación de las constantes cinéticas  $K_s$  y  $U_{max}$ , la ecuación Logística Integrada para la determinación de  $U_{max}$  y la ecuación de Gompertz Modificado para la determinación de la tasa máxima de generación de alcohol (rpm).

Por medio de la prueba de cata se concluyó que el hidromiel fermentado con la levadura de la maraca Fermentis Saf-ale T58 genera un producto con gran aceptación por parte de los consumidores, siendo una hidromiel visualmente de color amarillo claro sin la presencia de turbiedad, con una intensidad de olor y aroma media con notas a manzana verde, miel, cerveza, cidra, vinagre de manzana y champaña con un dulzor medio, baja acidez, una apreciación de alcohol baja y sin amargor presentando un producto con cuerpo equilibrado según los parámetros establecidos en análisis sensorial basado en la técnicas y consideraciones para la cata de vinos empleada y complementada con las instrucciones en la guía para el entrenamiento de jueces para la evaluación de hidromieles del “Programa de Certificación de Jueces Cerveceros” empleada por (Blanco, 2016).

El análisis de cromatografía de gases empleada en los tres hidromieles permitió reforzar lo establecido en la prueba de cata, ya que gracias a este análisis se logró determinar que la levadura que genera una mayor concentración de alcoholes superiores es la levadura de la marca Fermentis Saf-ale T58, parámetro que se encuentra directamente relacionado con lo establecido en la prueba de cata ya que esta levadura es la que genera una mayor

concentración de alcoholes superiores siendo estos los mismos que aportan de olor y sabor al producto final. Es importante mencionar que la concentración de alcoholes superiores no supera los límites permitidos en la Norma INEN 2802: 2015 BEBIDAS ALCOHÓLICAS MIXTAS Y LOS APERITIVOS. REQUISITOS.

Por medio de la experimentación llevada a cabo en el laboratorio se determinó que la fermentación de hidromiel se realiza de manera óptima con una concentración de 20 °Brix, ya que ha concentraciones superiores de grados Brix el sustrato actúa como inhibidor generando problemas en el metabolismo de las levaduras y como consecuencia provocando que la fermentación sea ineficiente; A 20 °Brix se llega a obtener una hidromiel con una concentración de 8,5 g/l de alcohol después de un período de 40 horas.

La cuantificación de biomasa se llevó a cabo por el método de peso seco y por el método de liofilización, métodos de los cuales concluimos que el método de liofilización genera menos error en comparación al método de peso seco ya que por medio de la liofilización es posible una mejor eliminación de la cantidad de humedad presente en la muestra conservando las características iniciales de la misma.

Se comprobó que la generación de biomasa se encuentra relacionada con la cantidad inicial de sustrato presente en la muestra, ya que a medida que se aumenta la cantidad inicial de sustrato limitante, mayor será la cantidad de biomasa final, concluyendo que este comportamiento ocurre hasta una cantidad límite de sustrato, ya que ha mayor cantidad de sustrato este actúa como inhibidor en el metabolismo de las levadura haciendo que la fermentación sea ineficiente; se determinó experimentalmente que esta cantidad de sustrato para no presentar efecto inhibitorio no debe ser superior a 20 °Brix y se obtuvo una concentración máxima de biomasa de 8,6 g/l para el experimento realizado con 20 °Brix.

El consumo de sustrato se cuantificó a lo largo de la experimentación por medio del método fenol-ácido sulfúrico (DuBois), en cada uno de los experimentos se pudo apreciar como la concentración inicial de sustrato disminuye a lo largo del proceso de

fermentación hasta llegar a una concentración final que se mantiene constante, lo cual indica el final del proceso de fermentación.

La concentración de alcohol se cuantificó a lo largo de la experimentación por medio del método de microdifusión, en cada uno de los experimentos se observa como la concentración de alcohol aumenta paulatinamente a lo largo del proceso de fermentación hasta llegar a un valor máximo que indica el final de la fermentación.

El modelo de Monod aplicado para el estudio cinético del proceso fermentativo del hidromiel tiene como base para la construcción de su gráfica las variables de la velocidad de reacción y la cantidad de sustrato, variables que nos permiten obtener una hipérbola con una asíntota superior, la cual expresa la tasa máxima de crecimiento específico y que por el método de linealización de Lineweaver-Burk encontramos el valor de las constantes cinéticas  $U_{max}$  y  $K_s$ , determinando que para la fermentación de hidromiel el valor de la constante de saturación  $K_s = 336,66 \text{ g/l}$  y el valor de  $U_{max} = 0.0599 \text{ h}^{-1}$  con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9337$ .

El modelo Logístico Integrado aplicado para el estudio cinético del proceso fermentativo del hidromiel tiene como base para la construcción de su grafica las variables de concentración de biomasa y el tiempo, lo que permitió trazar la curva sigmoidea característica bien conocida del crecimiento de la población con el tiempo para cada experimento, los cuales tienen una precisión muy alta ya que el coeficiente de correlación para el experimento de 25 °Brix es de  $R^2 = 0,967$  con un valor de  $U_{max}$  de 0,051; para el experimento de 20 °Brix es de  $R^2 = 0,987$  con un valor de  $U_{max}$  de 0,087; para el experimento de 16,4 °Brix es de  $R^2 = 0,981$  con un valor de  $U_{max}$  de 0,071; para el experimento de 10 °Brix es de  $R^2 = 0,952$  con un valor de  $U_{max}$  de 0,086. Se realizó un promedio de los valores de  $U_{max}$  para cada experimento exceptuando el valor de  $U_{max}$  para el experimento de 25 °Brix por motivos de inhibición y se obtuvo un  $U_{max}$  global de 0,0815 para el proceso de fermentación de hidromiel.

El modelo de Gompertz Modificado aplicado para el estudio cinético del proceso fermentativo del hidromiel como base para la construcción de su gráfica requiere de la

evolución de la concentración de alcohol a lo largo del tiempo lo cual nos permitió determinar el valor para la tasa máxima de generación de etanol (rpm) con un valor de 0,18 [g/(l.h)] para el experimento de 25 °Brix con un  $R^2$  de 0,974; un valor de rpm de 0,274 para el experimento de 20 °Brix con un  $R^2$  de 0,987; un valor de rpm de 0,243 para el experimento de 16,4 °Brix con un  $R^2$  de 0,965; un valor de rpm de 0,2689 para el experimento de 10 °Brix con un  $R^2$  de 0,973; y finalmente un valor promedio tomando de los valores individuales para cada experimento, exceptuando el valor de rpm para el experimento de 25 °Brix por motivo de inhibición, determinado que el valor global de la tasa máxima de generación de alcohol rpm es de 0,2621 [g/(l.h)].

## 5.2. Recomendaciones

- Se recomienda emplear una balanza analítica para la determinación de pesos en el método de cuantificación de biomasa por peso seco.
- Se recomienda emplear el método de liofilización para la determinación de biomasa ya que este método presenta mejores resultados en comparación al método de peso seco.
- Se recomienda realizar el mismo estudio empleando como sustrato diferentes tipos de miel de coloración oscura debido a que la composición de este sustrato influye directamente en las características del producto final.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abril, C. (2014). *Determinación de etanol con fines medicos y medico legales*. Universidad Católica de Cuenca.
- Ahmad, F., Jameel, A. T., Kamarudin, M. H., & Mel, M. (2011). Study of growth kinetic and modeling of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Biotechnology*, 10(81), 18842–18846.  
<https://doi.org/10.5897/AJB11.2763>
- Albernas-Carvajal, Y., Pedraza Gárciga, J., Corsario, G., Rodríguez Rodríguez, L., & González Suárez, E. (2016). Primera aproximación a la cinética de la obtención de etanol mediante sacarificación y fermentación simultánea del bagazo. *Afinidad*, 73(575), 192–197.
- Alvarado, I., & Valdez, M. (2019). *Determinación de los parámetros cinéticos como: la velocidad máxima de reacción y la constante de crecimiento en el proceso fermentativo del mucílago de cacao CCN-51 caso Ecuador, Zona 6*. Universidad de Cuenca.
- Ariyajaroenwong, P., Laopaiboon, P., Salakkam, A., Srinophakun, P., & Laopaiboon, L. (2016). Kinetic models for batch and continuous ethanol fermentation from sweet sorghum juice by yeast immobilized on sweet sorghum stalks. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 66, 210–216.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.06.023>
- Augusto, J., & Mora, H. (2015). *Producción de etanol a partir de glicerina por vía fermentativa con *Saccharomyces cerevisiae* y simulación del proceso a escala industrial*.
- Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26(1), 89–105. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>
- Blanco, A. (2016). *Modelamiento cinético de la fermentación alcohólica de miel de*

- abejas a diferentes escalas de producción.* 149.  
<http://www.bdigital.unal.edu.co/56557/>
- Bogdanov, S. (2011). Honey Composition, Chapter 5. *The Honey Book, May*, 1–13.  
<http://www.bee-hexagon.net/honey/>
- Breeden, L. (1989). Molecular and cell biology of yeasts. *Trends in Genetics*, 5(January), 388. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90180-7](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90180-7)
- Coradello, G., & Tirelli, N. (2021). Yeast cells in microencapsulation. General features and controlling factors of the encapsulation process. *Molecules*, 26(11).  
<https://doi.org/10.3390/molecules26113123>
- Cornish-Bowden, A. (1985). Enzyme Kinetics. *Compr Biotech, The Princip, Appl and Regul of Biotechnol in Ind, Agric and Med*, 1, 521–538.  
<https://doi.org/10.4324/9780203967621-16>
- Csonka, L. (1991). Prokaryotic Osmoregulation: Genetics And Physiology. *Annual Review of Microbiology*, 45(1), 569–606.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.45.1.569>
- Delgado-Noboa, J., Bernal, T., Soler, J., & Peña, J. Á. (2021). Kinetic modeling of batch bioethanol production from CCN-51 Cocoa Mucilage. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 000, 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.08.040>
- Dodić, J. M., Vučurović, D. G., Dodić, S. N., Grahovac, J. A., Popov, S. D., & Nedeljković, N. M. (2012). Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. *Applied Energy*, 99, 192–197.  
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.05.016>
- FAO/WHO. (2019). STANDARD FOR HONEY CXS 12-19811 Adopted in 1981. Revised in 1987,2001. Amended in 2019. *Codex Alimentarius*, 1, 1–13.
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P. R., Powell, C. D., & Smart, K. A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. In *FEMS*

*Microbiology Reviews* (Vol. 31, Issue 5). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x>

Govindaswamy, S., & Vane, L. M. (2007). Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. *Bioresource Technology*, 98(3), 677–685.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.012>

Granda, R. (2017). Análisis del potencial de la actividad apícola como desarrollado socioeconómico en sectores rurales. *Economista*, X, 21–23.  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/17610/1/T-UCE-0005-CEC-011-P.pdf>

Grassi, S., Amigo, J. M., Lyndgaard, C. B., Foschino, R., & Casiraghi, E. (2014). Beer fermentation: Monitoring of process parameters by FT-NIR and multivariate data analysis. *Food Chemistry*, 155, 279–286.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.060>

Jacques, Lyons, & Kelsal. (2010). The Alcohol Textbook 4th edition. In *In: Jacques KA, Lyons TP, Kelsall DR (eds) The alcohol textbook.*

Joseph, R., & Bachhawat, A. K. (2014). Yeasts: Production and Commercial Uses. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (Second Edi, Vol. 3). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00361-X>

Kampen, W. H. (2014). Nutritional Requirements in Fermentation Processes. In *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook: Principles, Process Design, and Equipment: Third Edition* (Third Edit). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2553-3.00004-0>

Kosuke. (2020). *MODELING AND SIMULATION Kosuke imamura Modeling and Simulation*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819983-1.00004-1>

Lerkkasemsan, N., & Lee, W. C. (2018). Study of ethanol fermentation reaction using *Saccharomyces diastaticus* in a two-tank fermentation system with cell recycling.

*Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 91, 86–96.*

<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.06.001>

Líderes. (2018). *La apicultura se mueve con tres ejes estratégicos en Ecuador.*

<https://www.revistalideres.ec/lideres/apicultura-miel-abejas-ministerio-agricultura.html>

Lira Silva, E., & Jasso Chávez, R. (2013). Comparación De Los Diferentes Métodos De Análisis Cinéticos Para Determinar El Tipo De Inhibición De Dos Compuestos\*. *Reb, 32(1), 19–32.*

Manikandan, K., Saravanan, V., & Viruthagiri, T. (2008). Kinetics studies on ethanol production from banana peel waste using mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian Journal of Biotechnology, 7(1), 83–88.*

McConnell, D. S., & Schramm, K. D. (1995). Mead success: Ingredients, processes and techniques. *ZYMURGY Spring.*

Mitchell, D. A., Von Meien, O. F., Krieger, N., & Dalsenter, F. D. H. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal, 17(1), 15–26.* [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00120-7)

Montes de Oca, R., Salem, A. Z. , Kholif, A. , Monroy, H., Pérez, L. , Zamora, J. , & Gutiérez, A. (2016). Yeast : Description and Structure Chapter 2 Yeast : Description and Structure. *Yeast Additive and Animal Production, February, 3–13.*

MORA, Y. E. (2014). *MODELACIÓN CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL ZUMO DE POMARROSA [UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR].* <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2308/1/T-UCE-0017-64.pdf>

Muloiwa, M., Nyende-Byakika, S., & Dinka, M. (2020). Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models. *South African Journal of Chemical Engineering,*

33(July), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.07.006>

Muniraj, I. K., Desikan, R., & Subburamu, K. (2019). Perspectives and Prospects of Fermentation Technology. *Advances in Food Bioproducts and Bioprocessing Technologies, July 2020*, 217–232. <https://doi.org/10.1201/9780429331817-10>

National HoneyBoard. (2001). *Making Mead: the Art and the Science*. 12(303), 1–12.

Nielsen, J. (2014). Bioreaction Engineering Principles. In *Psychological Science* (Vol. 25, Issue 9).

Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J. M., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. (2013). High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. *Food Microbiology*, 33(1), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.006>

Pereira, A. P., Oliveira, J. M., Mendes-Ferreira, A., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. (2017). Mead and Other Fermented Beverages. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry, December 2019*, 407–434. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00014-5>

Perricone, M., Gallo, M., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Yeasts. In *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00008-X>

Phukoetphim, N., Salakkam, A., Laopaiboon, P., & Laopaiboon, L. (2017). Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models. *Journal of Biotechnology*, 243, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.012>

Połomska, X., Wojtatówicz, M., Zarowska, B., Szołtysik, M., & Chrzanowska, J. (2012). Freeze-drying preservation of yeast adjunct cultures for cheese production. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(3), 143–150. <https://doi.org/10.2478/v10222-011-0045-1>

Ramalhosa, E., Gomes, T., Pereira, A. P., Dias, T., & Estevinho, L. M. (2011). Mead

- production: Tradition versus modernity. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 63). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384927-4.00004-X>
- Raposo, S., Pardão, J. M., Díaz, I., & Lima-costa, M. E. (2009). *Kinetic modelling of bioethanol production using agro-industrial by-products*. 3(1), 1–8.
- Rorke, D. C. S., & Kana, E. B. G. (2017). Kinetics of bioethanol production from waste sorghum leaves using *Saccharomyces cerevisiae* BY4743. *Fermentation*, 3(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation3020019>
- Sakanoue, S. (2013). Integration of logistic and kinetics equations of population growth. *Ecological Modelling*, 261–262, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2013.04.007>
- Shafaghat, H., Najafpour, G. D., Rezaei, P. S., & Sharifzadeh, M. (2009). Growth kinetics and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 24860 on various carbon sources. *World Applied Sciences Journal*, 7(2), 140–144. <http://www.cabdirect.org/abstracts/20093350557.html;jsessionid=15083E9EEA9F13FC29AA8D374F92A425?gitCommit=4.13.8-6-g6e31ff9>
- Shopska, V., Denkova, R., Lyubenova, V., & Kostov, G. (2019). Kinetic characteristics of alcohol fermentation in brewing: State of art and control of the fermentation process. In *Fermented Beverages: Volume 5. The Science of Beverages*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815271-3.00013-0>
- Singh, J., & Sharma, R. (2015). Growth kinetic and modeling of ethanol production by wilds and mutant *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 170. *Pelagia Research Library European Journal of Experimental Biology*, 5(4), 1–6.
- Song, H., Jang, S. H., Park, J. M., & Lee, S. Y. (2008). Modeling of batch fermentation kinetics for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Biochemical Engineering Journal*, 40(1), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.021>

- Srimachai, T., Nuithitikul, K., O-Thong, S., Kongjan, P., & Panpong, K. (2015). Optimization and Kinetic Modeling of Ethanol Production from Oil Palm Frond Juice in Batch Fermentation. In *Energy Procedia* (Vol. 79). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.11.490>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). Microbial growth kinetics. *Principles of Fermentation Technology*, 21–74. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-099953-1.00002-8>
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *Revista de Investigación*, 50, 20–28.
- Trinidad Bello, A. (2014). *MODELOS DE CRECIMIENTO BIOLÓGICO Y SELECCIÓN DEL MODELO EN BIOLOGÍA, SU SIGNIFICADO POR SU AJUSTE* [Trinidad Bello, A. (2014). MODELOS DE CRECIMIENTO BIOLÓGICO Y SELECCIÓN DEL MODELO EN BIOLOGÍA, SU SIGNIFICADO POR SU AJUSTE.].
- [http://mat.itzt.uam.mx/mcmai/documentos/tesis/Gen.11-O/Adalberto\\_Trinidad.pdf](http://mat.itzt.uam.mx/mcmai/documentos/tesis/Gen.11-O/Adalberto_Trinidad.pdf)
- Üçok, G., & Sert, D. (2020). Growth kinetics and biomass characteristics of *Lactobacillus plantarum* L14 isolated from sourdough: Effect of fermentation time on dough machinability. *Lwt*, 129(April). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109516>
- Uwaha, M. (2015). Growth Kinetics. *Handbook of Crystal Growth*, 359–399. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-56369-9.00008-3>
- Wachenheim, D. E., Patterson, J. A., & Ladisch, M. R. (2003). Analysis of the logistic function model: Derivation and applications specific to batch cultured microorganisms. *Bioresource Technology*, 86(2), 157–164. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00149-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00149-9)
- Walditch, B. (2012). *You Don't Just Drink It! What you need to know - and do- before drinking mead*. Heart of Albion.

Walker, S., & Brightmore, G. (2020). The drink of the Gods. *Education in Chemistry*, 47(2), 2018–2021.

Yıldırım, H. K. (2021). Insights into the role of yeasts in alcoholic beverages. In *Microbial Biotechnology in Food and Health*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819813-1.00002-5>

Zajšek, K., & Goršek, A. (2010). Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora. *Food and Bioproducts Processing*, 88(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.09.002>

## ANEXOS

### Anexo 1. Modelo de encuesta

#### ANÁLISIS SENSORIAL APLICADO A HIDROMIELES Proyecto de tesis de maestría en Ingeniería química

##### 1. Evaluación visual

**Limpidez:** Seleccionar una o varias opciones

Turbio   
Limpio

**Matiz o tono:** Seleccionar una opción

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

**Intensidad del color:** Seleccionar una opción

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

##### 2. Evaluación olfativa

<b>Intensidad del olor</b> <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 <input type="radio"/> 6 <input type="radio"/> 7	<b>Descripción del olor</b> _____
---	--------------------------------------

<b>Intensidad de aroma</b> <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 <input type="radio"/> 6 <input type="radio"/> 7	<b>Descripción del aroma</b> _____
---	---------------------------------------

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

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

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

1  2  3  4  5  6  7

##### 3. Evaluación gustativa

<b>Intensidad del dulce</b> <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 <input type="radio"/> 6 <input type="radio"/> 7	<b>Intensidad del ácido</b> <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 <input type="radio"/> 6 <input type="radio"/> 7
--	--

<b>Intensidad de alcohol</b> <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 <input type="radio"/> 6 <input type="radio"/> 7	<b>Intensidad de amargo</b> <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 <input type="radio"/> 6 <input type="radio"/> 7
---	--

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

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

**Cuerpo y equilibrio:** Consultar guía

1  2  3  4  5  6  7

**Comentarios e impresiones generales**

---

---

---

## Anexo 2. Resultados análisis de laboratorio

### Análisis laboratorio muestra levadura Levapan



ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y SUELOS

#### INFORME DE RESULTADOS

Informe: MSV-IE-1359-22  
Orden de ingreso: OI-629-22  
Cuenca, 25 de Julio del 2022

#### DATOS DEL CLIENTE

Cliente: GUSTAVO GARCIA  
Dirección: AZOGUES  
Teléfono: 0980471387

#### DATOS DE LA MUESTRA

*NOMBRE DE LA MUESTRA: HIDROMIEL - L		
*MARCA COMERCIAL: N/A		*FABRICANTE: GUSTAVO GARCIA
PROCEDENCIA: AZOGUES	TIPO DE MUESTRA: BEBIDA	*TIPO DE ENVASE: BOTELLA PLASTICA
*PRESENTACIONES: 340 ml		*FORMA DE CONSERVACION: REFRIGERACION
CODIGO MUESTRA: OI62922	*LOTE: N/A	*FECHA ELAB: 2022-03-12 *FECHA CAD:
FECHA RECEPCION: 2022-07-12	FECHA ANALISIS: 2022-07-12 - 2022-07-20	FECHA ENTREGA: 2022-07-25
ENSAYO EN: LABORATORIO	MUESTREO: CLIENTE	NUMERO DE MUESTRAS: UNO (1)

#### ENSAJOS ANÁLISIS FISICO-QUÍMICOS

PARÁMETRO	MÉTODO - TÉCNICA	UNIDAD	RESULTADO
*ALCOHOLÉS SUPERIORES	NTE INEN 2014:2015 - CROMATOGRAFIA DE GASES	mg/100cc	0.196
*GRADO ALCOHOLICO	NTE INEN 340:2016 - DESTILACION	°GL	4.9

\*Fuera del alcance de la acreditación. \*\*Subcontratado acreditado. \*\*\*Subcontratado no acreditado. U:INCERTIDUMBRE.

Dra. Sandra Guaraca  
GERENTE DE LABORATORIO



Cualquier información adicional correspondiente a los ensayos que requiera el cliente, están a disposición. Los datos e información de las muestras (tal como se reciben) y de los clientes, que puedan afectar la validez de los resultados han sido proporcionados por el cliente y son de su exclusiva responsabilidad. El Laboratorio no será responsable de los desvíos encontrados en los ítems de ensayo entregados por los clientes que puedan afectar a los resultados, que al ser detectados serán comunicados al cliente.

Los resultados expresados en este informe tienen validez solo para la muestra recibida en el laboratorio. Este informe no será reproducido sin la aprobación de MSV. <sup>1</sup>Opiniones e interpretaciones están fuera del alcance del SAE. <sup>2</sup>Información proporcionada por el cliente, MSV se responsabiliza exclusivamente de los análisis realizados. Regla de decisión: •Pasa: el valor medido está por debajo del límite de tolerancia. •Falla: el valor medido está por encima del límite de tolerancia; se tomará en cuenta la incertidumbre asociada al resultado, riesgo < 50% de probabilidad de aceptación falsa, se aplicará solo en los ensayos dentro del alcance de la acreditación del SAE., MSV está comprometido con la imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (este informe representa la aceptación de la política declarada de MSV en relación al tema)

## Análisis laboratorio muestra levadura Fermentis



### INFORME DE RESULTADOS

Informe: MSV-IE-1358-22  
Orden de ingreso: OI-628-22  
Cuenca, 25 de Julio del 2022

#### DATOS DEL CLIENTE

Cliente: GUSTAVO GARCIA  
Dirección: AZOGUES  
Teléfono: 0980471387

#### DATOS DE LA MUESTRA

²NOMBRE DE LA MUESTRA: HIDROMIEL - S			
²MARCA COMERCIAL: N/A		²FABRICANTE: GUSTAVO GARCIA	
PROCEDENCIA: AZOGUES	TIPO DE MUESTRA: BEBIDA	²TIPO DE ENVASE: BOTELLA PLASTICA	
²PRESENTACIONES: 340 ml		²FORMA DE CONSERVACION: REFRIGERACIÓN	
CODIGO MUESTRA: OI62822	²LOTE: N/A	²FECHA ELAB: 2022-03-12	²FECHA CAD:
FECHA RECEPCION: 2022-07-12	FECHA ANALISIS: 2022-07-12 - 2022-07-20	FECHA ENTREGA: 2022-07-25	
ENSAYO EN: LABORATORIO	MUESTREO: CLIENTE	NUMERO DE MUESTRAS: UNO (1)	

#### ENSAYOS ANÁLISIS FISICO-QUIMICOS

PARÁMETRO	MÉTODO - TÉCNICA	UNIDAD	RESULTADO
*ALCOHOLES SUPERIORES	NTE INEN 2014:2015 - CROMATOGRAFIA DE GASES	mg/100cc	0.290
*GRADO ALCOHOLICO	NTE INEN 340:2016 - DESTILACION	°GL	5.7

\*Fuera del alcance de la acreditación. \*\*Subcontratado acreditado. \*\*\*Subcontratado no acreditado. U:INCERTIDUMBRE.



Dra. Sandra Guaraca

GERENTE DE LABORATORIO

Cualquier información adicional correspondientes a los ensayos que requiera el cliente, están a disposición. Los datos e información de las muestras (tal como se reciben) y de los clientes, que puedan afectar la validez de los resultados han sido proporcionados por el cliente y son de su exclusiva responsabilidad. El Laboratorio no será responsable de los desvíos encontrados en los ítems de ensayo entregados por los clientes que puedan afectar a los resultados, que al ser detectados serán comunicados al cliente.

Los resultados expresados en este informe tienen validez solo para la muestra recibida en el laboratorio. Este informe no será reproducido sin la aprobación de MSV. <sup>1</sup>Opiniones e interpretaciones están fuera del alcance del SAE. <sup>2</sup>Información proporcionada por el cliente, MSV se responsabiliza exclusivamente de los análisis realizados. Regla de decisión: •Pasa: si el valor medido está por debajo del límite de tolerancia, •Falla: si el valor medido está por encima del límite de tolerancia; se tomará en cuenta la incertidumbre asociada al resultado, riesgo < 50% de probabilidad de aceptación falsa, se aplicará solo en los ensayos dentro del alcance de la acreditación del SAE. MSV está comprometido con la imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (este informe representa la aceptación de la política declarada de MSV en relación al tema).

## Análisis laboratorio muestra levadura Mangroove Jacks



### INFORME DE RESULTADOS

Informe: MSV-IE-1357-22  
Orden de ingreso: OI-627-22  
Cuenca, 25 de Julio del 2022

#### DATOS DEL CLIENTE

Cliente: GUSTAVO GARCIA  
Dirección: AZOGUES  
Teléfono: 0980471387

#### DATOS DE LA MUESTRA

*NOMBRE DE LA MUESTRA: HIDROMIEL - M			
*MARCA COMERCIAL: N/A		*FABRICANTE: GUSTAVO GARCIA	
PROCEDENCIA: AZOGUES		TIPO DE MUESTRA: BEBIDA	*TIPO DE ENVASE: BOTELLA PLASTICA
*PRESENTACIONES: 340 ml			*FORMA DE CONSERVACION: REFRIGERACION
CODIGO MUESTRA: OI62722	*LOTE: N/A	*FECHA ELAB: 2022-03-12	*FECHA CAD:
FECHA RECEPCION: 2022-07-12	FECHA ANALISIS: 2022-07-12 - 2022-07-20	FECHA ENTREGA: 2022-07-25	
ENSAYO EN: LABORATORIO	MUESTREO: CLIENTE	NUMERO DE MUESTRAS: UNO (1)	

#### ENSAYOS ANÁLISIS FISICO-QUIMICOS

PARÁMETRO	MÉTODO - TÉCNICA	UNIDAD	RESULTADO
*ALCOHOLES SUPERIORES	NTE INEN 2014:2015 - CROMATOGRAFIA DE GASES	mg/100cc	0.264
*GRADO ALCOHOLICO	NTE INEN 340:2016 - DESTILACION	°GL	6.3

\*Fuera del alcance de la acreditación. \*\*Subcontratado acreditado. \*\*\*Subcontratado no acreditado. U:INCERTIDUMBRE.



Cualquier información adicional correspondientes a los ensayos que requiera el cliente, están a disposición. Los datos e información de las muestras (tal como se reciben) y de los clientes, que puedan afectar la validez de los resultados han sido proporcionados por el cliente y son de su exclusiva responsabilidad. El Laboratorio no será responsable de los desvíos encontrados en los ítems de ensayo entregados por los clientes que puedan afectar a los resultados, que al ser detectados serán comunicados al cliente.

Los resultados expresados en este informe tienen validez solo para la muestra recibida en el laboratorio. Este informe no será reproducido sin la aprobación de MSV. <sup>1</sup>Opiniones e interpretaciones están fuera del alcance del SAE. <sup>2</sup>Información proporcionada por el cliente, MSV se responsabiliza exclusivamente de los análisis realizados. Regla de decisión: •Pasa: el valor medido está por debajo del límite de tolerancia, •Falla: el valor medido está por encima del límite de tolerancia; se tomará en cuenta la incertidumbre asociada al resultado, riesgo < 50% de probabilidad de aceptación falsa, se aplicará solo en los ensayos dentro del alcance de la acreditación del SAE, MSV está comprometido con la imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (este informe representa la aceptación de la política declarada de MSV en relación al tema)

**Anexo 3. cuadro de requisitos que deben cumplir las bebidas alcohólicas. Cocteles o bebidas alcohólicas mixtas y los aperitivos, según la Norma INEN 2802: 2015 BEBIDAS ALCOHÓLICAS MIXTAS Y LOS APERITIVOS. REQUISITOS.**

**TABLA 1. Requisitos físicos y químicos para los cocteles o bebidas alcohólicas mixtas y los aperitivos**

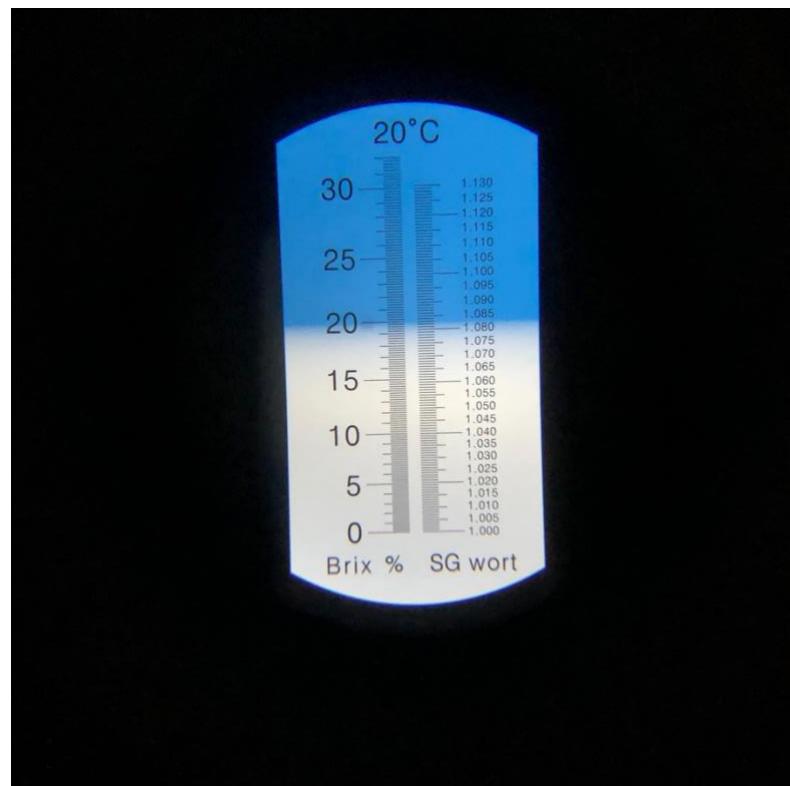
Requisitos	Unidad	Mínimo	Máximo	Método de ensayo
Alcohol, fracción volumétrica	%	0,5	50,0	NTE INEN 340
Furfural	mg/100 cm <sup>3</sup> (*)	-	10	NTE INEN 2014
Metanol	mg/100 cm <sup>3</sup> (*)	-	10	NTE INEN 2014
Alcoholes superiores**	mg/100 cm <sup>3</sup> (*)	-	250	NTE INEN 2014

\* El volumen de 100 cm<sup>3</sup> corresponde al alcohol absoluto.  
 \*\* Los alcoholes superiores comprenden: isopropanol, propanol, isobutanol, isoamilico, amilico.

#### Anexo 4. Fotografías fermentación piloto







## Anexo 5. Fotografías biorreactor



## Anexo 6. Fotografías método microdifusión



## Anexo 7. Fotografías método fenol ácido sulfúrico



## Anexo 8. Fotografías liofilización

