

Efecto de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja

Gianpaolo Iovino, Ana Muñoz y Maria E. Da Costa

¹Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Rafael Urdaneta. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

Correo Electrónico: giovino18@gmail.com / ana_dani98@hotmail.com

Recibido: 29-01-2019

Aceptado: 01-05-2019

Resumen

El hidromiel es una bebida alcohólica obtenida mediante fermentación por levaduras de miel diluida. La producción de hidromiel es un proceso que consume mucho tiempo, debido principalmente al bajo contenido de nitrógeno de la miel de abeja. Se evaluaron dos cantidades diferentes de L-arginina como fuente nitrogenada para dos de los sustratos de fermentación, sobre las características fisicoquímicas de los mostos e hidromieles (grados Brix y densidad), así como sobre las características sensoriales del hidromiel obtenido en el menor tiempo de fermentación, en comparación con el obtenido en el tiempo estándar. Las fermentaciones fueron realizadas en un rango de 20 a 25 °C utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*ex-bayanus*). El tiempo de fermentación se redujo en los dos hidromieles con adición de L-arginina (B: 1.05 g y C: 2.10 g) a 12 días y 21 días, respectivamente, en comparación con el A (0 g), 27 días. La adición de L-arginina al hidromiel C no influyó negativamente en el color, aroma y sabor de este, comparándolo con el A.

Palabras clave: Miel, hidromiel, fermentación alcohólica, nitrógeno, L-arginina.

Effect of L-arginine on the alcoholic fermentation process of honey bee

Abstract

Mead is an alcoholic beverage obtained by fermentation by yeasts of dilute honey. Mead production is a time-consuming process, mainly due to the low nitrogen content of honey. Two different amounts of L-arginine were evaluated as a nitrogen source for two of the fermentation substrates on the physicochemical characteristics of musts and meads (Brix degrees and density), as well as on the sensory characteristics of the mead obtained in the shortest time of fermentation, compared to that obtained in the standard time. The fermentations were performed in a range of 20 to 25 °C using *Saccharomyces cerevisiae* (*ex-bayanus*) yeast. The fermentation time was reduced in the two meads with the addition of L-arginine (B: 1.05 g and C: 2.10 g) at 12 days and 21 days, respectively, compared to A (0 g), 27 days. The addition of L-arginine to mead C did not negatively influence its color, aroma and flavor, comparing it with mead A.

Key words: Honey, mead, alcoholic fermentation, nitrogen, L-arginine.

Introducción

El sector agroindustrial de un país requiere el aprovechamiento eficaz de sus recursos; en la actualidad, la apicultura en Venezuela ha incursionado paulatinamente, debido al potencial de sus productos y la importancia que el adecuado mantenimiento de la polinización representa para el sector agrícola. Sin embargo, el consumo de miel de abeja sigue siendo muy bajo.

Se conoce como hidromiel, a la bebida resultante de la fermentación alcohólica de esta sustancia. No obstante, su producción es un proceso que suele tomar bastante tiempo, debido a la cantidad de azúcares presentes en la miel y por la deficiencia de nitrógeno en el medio fermentativo, del cual las levaduras se nutren para poder transformar los azúcares en etanol.

De allí que el propósito de esta investigación fue determinar el efecto de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja, ya que, esta es precursora del óxido nítrico, y por ende, del nitrógeno que las levaduras necesitan.

El presente informe presenta una solución para entusiastas en fermentación que quisieran reducir el tiempo de producción. Además, se incentivaría al sector apícola del país, y por ende, a los apicultores a permanecer con la extracción. Para lograr esto, se caracterizó fisicoquímicamente la miel, se establecieron las proporciones de los compuestos de los sustratos de fermentación y se determinó el efecto de la L-arginina sobre las características fisicoquímicas de los mostos e hidromieles (grados Brix y densidad) y sobre las características sensoriales (color, aroma y sabor) del hidromiel obtenido en el menor tiempo de fermentación, comparándolo con el obtenido en el tiempo fermentativo estándar.

Parte Experimental

Para iniciar esta investigación descriptiva, se procedió a caracterizar fisicoquímicamente la miel de abeja, determinando su densidad, pH, índice de refracción y grados Brix.

Dichas determinaciones se realizaron con el fin de verificar la pureza de la miel, ya que, esta es una propiedad fundamental para éxito de la fermentación alcohólica de la misma, empleando la observación directa como principal herramienta durante los ensayos.

Después de la caracterización fisicoquímica, se procedió a establecer las proporciones de los compuestos de los sustratos de fermentación, en este caso: miel, agua, levadura y L-arginina, a través de una previa revisión bibliográfica acerca de las cantidades empleadas anteriormente; y, con base en la concentración final de nitrógeno en los mostos, se realizaron los cálculos pertinentes para hallar las cantidades de L-arginina. Una vez establecidas las proporciones, se procedió a determinar el efecto de la concentración de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja.

En primer lugar, se procedió a esterilizar todos los materiales y recipientes con jabón líquido, agua caliente y una solución agua/alcohol. Luego, se realizó la inoculación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*ex-bayanus*), según las especificaciones del fabricante. Paralelamente, se prepararon los tres mostos con el agua y la miel. Después, se adicionó la levadura a los mostos y las dos cantidades de L-arginina a dos de ellos (B y C), dejando uno sin adición de esta (A).

De igual manera, se acondicionaron los botellones de vidrio contenidos de los sustratos de fermentación, colocándoles tres corchos de goma a cada uno para insertar en ellos las trampas de aire. Se ubicaron en un lugar oscuro y en un rango de temperaturas de 20 – 25 °C.

Para determinar el efecto de la adición de L-arginina sobre las características fisicoquímicas, cada tres días se realizaron mediciones de grados Brix y densidad a cada hidromiel, con apoyo en el hidrómetro Chefast, tomando como día cero (0) al día que se prepararon los fermentos. Al hacerse constantes los valores de dichas características fisicoquímicas, la fermentación primaria culminó y se realizó un trasvase, con ayuda del sifón, para eliminar la biomasa depositada en el fondo de los botellones y se procedió a realizar la última medición de densidad para determinar el grado alcohólico final de cada hidromiel.

Una vez realizado el primer trasvase, se continuó con la fermentación del líquido, denominada en este punto como maduración, para dejar decantar la turbidez de los hidromieles por 15 días más. Luego, se realizó un segundo trasvase y se añadió gelatina sin sabor, previamente hidratada, para inducir el proceso de clarificación, el cual tomó siete días. Al obtener los sólidos en el fondo, se realizó la filtración, por medio de un colador de acero inoxidable.

Finalmente, los hidromieles clarificados y filtrados, se vertieron directamente en botellas de vino de 0.70 litros, las cuales se refrigeraron hasta su posterior consumo.

Para comparar las características sensoriales (color, aroma y sabor) del hidromiel obtenido en el menor y mayor tiempo de fermentación, respectivamente, se calculó el tamaño de la muestra correspon-

diente a la población de la parroquia Altagracia (ubicación de la sede donde se llevó a cabo la prueba sensorial), y se aplicó el test de preferencia a los degustadores.

Finalmente, los datos obtenidos de ambas muestras (correspondientes a los dos hidromieles comparados), se ingresaron en el programa Microsoft Office Excel, para realizar el análisis estadístico.

Análisis y Discusión

Para verificar la pureza de la miel de abeja, se caracterizó fisicoquímicamente la misma; con el fin de proporcionar resultados precisos durante los experimentos, ya que, la miel cruda (pura) es elemento fundamental para el éxito de estos. En la determinación de la densidad, debido a que esta no fue medida directamente, se siguieron una serie de pasos y se realizaron los debidos cálculos analíticos, mediante recolección de datos, los cuales fueron tomados de la balanza analítica digital Ohaus y registrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos para la determinación de las masas de miel de abeja

Muestra (miel)	Masa del cilindro graduado vacío (g)	Masa del cilindro graduado + muestra (g)
1	27.29	41.41
2	27.67	41.95
3	30.62	44.98

Posterior a la determinación de las masas de los cilindros graduados vacíos y las masas de los cilindros contenidos de las muestras (Tabla 1), por diferencia, se determinaron las tres masas de miel, las cuales se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Masas de miel de abeja

Muestra (miel)	Masa de la miel (g)
1	14.12
2	14.28
3	14.36

Nota: el volumen de los tres cilindros graduados empleados fue de 10 mL; el cual, permaneció constante.

Posterior a la determinación de las masas de miel (Tabla 2), se halló la densidad de las muestras, cuyos valores se registran en la Tabla 3.

Tabla 3. Densidad de la miel de abeja

Muestra (miel)	Densidad (g/mL)
1	1.41
2	1.43
3	1.44
Promedio	1.43

De acuerdo con la literatura, la densidad de la miel pura varía entre 1.39 a 1.44 g/mL [1], rango entre el cual se encuentra el 1.43 g/mL expresado en la Tabla 3.

El pH de cada muestra de miel, fue medido directamente mediante el pHmetro digital Oaklon a 23 °C y 1 atm de presión; los datos fueron recolectados en la Tabla 4.

Tabla 4. pH de la miel de abeja

Muestra (miel)	pH
1	3.77
2	3.78
3	3.78
Promedio	3.78

En correspondencia con la literatura, el valor del pH promedio (3.78) expresado en la Tabla 4, se encuentra dentro del rango debido de pH para mieles puras, específicamente de 3.4 a 6.1 con un valor promedio de 3.80 [2].

Los valores correspondientes a los índices de refracción y grados Brix, fueron medidos a través del refractómetro manual ABBE Bausch & Lomb. De la misma manera, los datos tomados fueron registrados en la Tabla 5 y Tabla 6, respectivamente.

Tabla 5. Índice de refracción de la miel de abeja

Muestra (miel)	Índice de refracción
1	1.49
2	1.49
3	1.49
Promedio	1.49

El valor promedio de índice de refracción (1.49) reportado en la Tabla 5, responde al valor que debe poseer la miel para un promedio de 17.2 % de agua (cantidad de agua estrictamente requerida por la miel, en su estado de pureza), el cual corresponde a un índice de refracción aproximado de 1.49 [3].

Los valores correspondientes a los grados Brix de la miel de abeja, se registraron en la Tabla 6.

Tabla 6. Grados Brix de la miel de abeja

Muestra (miel)	°Bx
1	80.20
2	79.80
3	80.00
Promedio	80.00

El valor promedio de grados Brix determinado (80.00°) se observa en la Tabla 6, el cual concuerda con la literatura, ya que, la miel debe estar conformada por una solución sobresaturada de azúcares (sólidos solubles), representando estos un rango entre 80 – 90 % de su composición total [4]. Además, el promedio general de azúcares de la miel está alrededor del 80 %, repartido entre un 38 % y 32 % de fructosa y glucosa, respectivamente [5].

Posterior a la caracterización fisicoquímica de la miel, se procedió a determinar las proporciones de los compuestos de los sustratos de fermentación. La dilución de miel en agua comúnmente empleada es 1:3 [6], por lo que, se tomó esta relación como referencia para desarrollar los ensayos. Para 4 litros de mosto base y una producción final de hidromiel de aproximadamente 3 litros (por botellón de vidrio de 5 litros), la proporción miel/agua establecida para la parte experimental de la presente investigación fue 1:3 litros, es decir, 1 litro de miel de abeja por 3 litros de agua mineral.

Con respecto a la determinación de la cantidad de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*ex-bayanus*), marca LALVIN EC-1118, se empleó la cantidad sugerida de 5 gramos para un volumen de mosto base de 4 litros [6]. En este caso, cada paquete estaba contenido de 5 gramos de levadura (puede variar según el fabricante), por lo que se utilizó completo por cada botellón.

Para determinar las dos cantidades de L-arginina empleadas en dos de los sustratos de fermentación y debido a que no existen antecedentes de esta fuente nitrogenada en el proceso de fermentación alcohólica de la miel, se realizaron una serie de cálculos tomando como punto de partida 50 mgN/L de

concentración final deseada en los mostos [7], y con base en los pesos moleculares del nitrógeno y de la L-arginina, se determinaron las cantidades de este aminoácido tolerables por las levaduras.

Como primera proporción se estableció 0.53 g de L-arginina/L de mosto (2.10 g de L-arginina/4 L de mosto). Asimismo, para determinar la segunda cantidad a emplear, se tomó un valor por debajo del anteriormente establecido (2.10 g), específicamente la mitad (1.05 g/4 L de mosto), diferenciándose así la segunda cantidad empleada como 0.26 g de L-arginina/L de mosto.

Los datos tomados a través del hidrómetro, durante el seguimiento cada tres días de los grados Brix, fueron registrados en la Tabla 7 y representados gráficamente en la Figura 1.

Tabla 7. Grados Brix de los mostos e hidromieles

Muestra \ Día	A	B	C
	°Bx	°Bx	°Bx
0	28.00	28.00	28.00
3	23.70	19.20	17.00
6	19.20	14.70	7.50
9	14.70	10.00	5.10
12	12.30	7.50	2.50
15	10.00	5.10	2.50
18	7.50	5.10	---
21	5.10	2.50	---
24	5.10	2.50	---
27	2.50	---	---
30	2.50	---	---

De la Tabla 7, se aprecia el descenso del contenido inicial de grados Brix de los mostos a través del monitoreo de este durante la fermentación primaria, detectándose un rápido descenso inicial, el cual fue variando en función de los hidromieles. Se observó un comportamiento similar al obtenido por otros autores [8], donde la transformación de azúcares en etanol produjo una disminución en los sólidos solubles. Asimismo, fermentación alcanza su etapa final alrededor de un nivel de 4 °Bx [9].

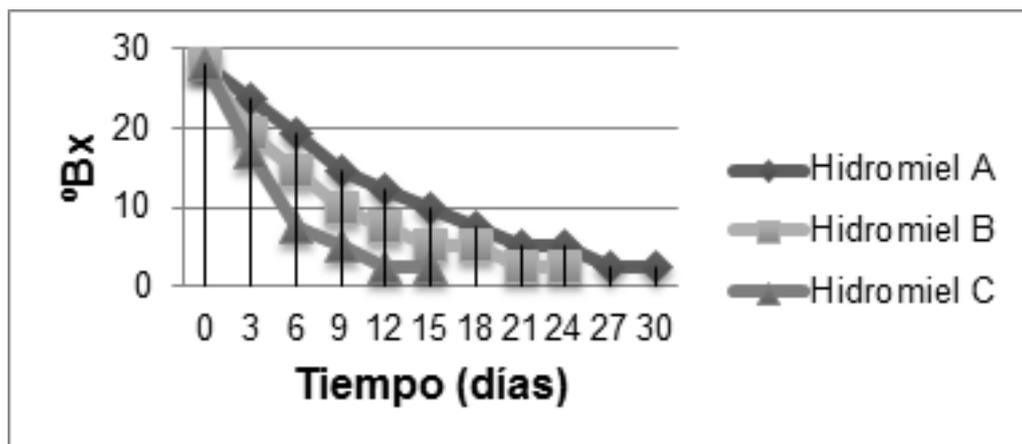


Figura 1. Cambio de °Bx de los mostos, durante la fermentación

En la Figura 1, se observa que el comportamiento de las tres rectas es decreciente. Este comportamiento responde a lo establecido por la literatura [7], y es debido a que, en la fermentación alcohólica de la miel es necesaria la transformación de los azúcares presentes, lo cual provoca una disminución en el nivel de sólidos solubles y el aumento del grado alcohólico.

De la misma forma, se realizaron mediciones de densidad, cada tres días, con apoyo en el hidrómetro; los valores se registraron en la Tabla 8 y se representaron en la Figura 2.

Tabla 8. Densidades de los mostos e hidromieles

Muestra \ Día	A	B	C
	ρ (g/mL)	ρ (g/mL)	ρ (g/mL)
0	1.12	1.12	1.12
3	1.10	1.08	1.07
6	1.08	1.06	1.03
9	1.06	1.04	1.02
12	1.05	1.03	1.01
15	1.04	1.02	1.01
18	1.03	1.02	---
21	1.02	1.01	---
24	1.02	1.01	---
27	1.01	---	---
30	1.01	---	---

De la Tabla 8, se observa que el valor de la densidades de los mostos, 1.12 g/mL (día 0), cumple con ser más denso que el agua (0.99713 g/mL), y menos denso que la miel (1.43 g/mL). Asimismo, la transformación de los azúcares en etanol durante la fase estacionaria, produjo una disminución en las densidades de los mostos al transcurrir los días de la fermentación primaria.

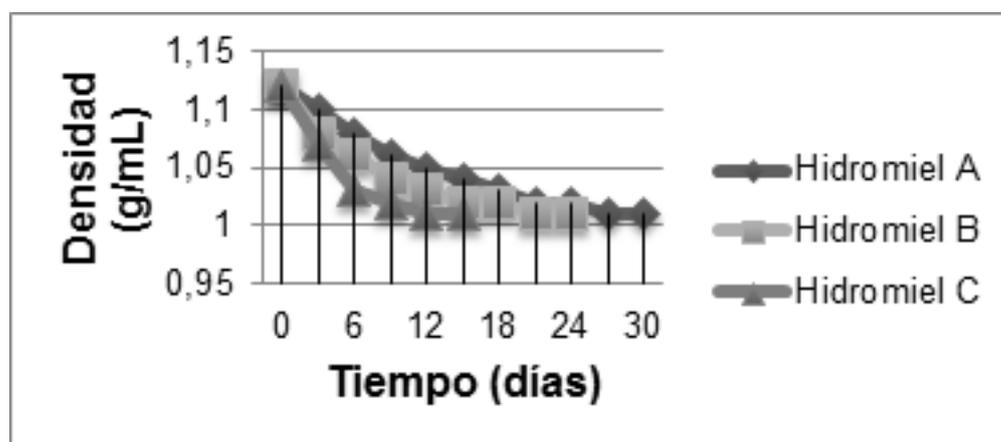


Figura 2. Cambio de la densidad de los mostos, durante la fermentación

De la Figura 2, se puede observar que el comportamiento es semejante al de los grados Brix (Figura 1), donde las tres rectas correspondientes a las densidades de cada hidromiel, son decrecientes. Este comportamiento, concuerda con lo establecido por la literatura [7], y se debe a que, durante la fase inicial de la fermentación primaria, se produjo etanol en gran medida, el cual es menos denso que el mosto.

De manera general, se observó que el mayor cambio de las variables de seguimiento (grados Brix y densidad) se obtuvo en la primera semana. En cuanto al tiempo de fermentación, medido en días, que requirió cada hidromiel para culminar sus respectivas fermentaciones primarias, estuvo en función de la cantidad de L-arginina adicionada a los sustratos.

Para una concentración inicial de 28 °Bx y una concentración final de nitrógeno de 50 mg/L en los mostos, el tiempo de fermentación es reducido a 12 días para el hidromiel C, debido a la adición de 2.10 gramos de L-arginina a este sustrato, lo cual originó una población mayor de levaduras que transformarían los azúcares en etanol, de manera más rápida.

El hidromiel B, constó de 21 días para culminar, es decir, nueve días después del hidromiel C. Esto se debe a que a este sustrato se adicionó 1.05 gramos de L-arginina, cantidad que no fue suficiente para acelerar por completo el proceso de fermentación.

Por otro lado, el hidromiel A (hidromiel de control, 0 gramos de L-arginina) tardó 27 días para culminar su período de fermentación primaria, ya que, a este sustrato no fue adicionada fuente nitrogenada alguna que serviría de nutriente para las levaduras, por lo que, tomó el tiempo que tardaría en fermentar un hidromiel estándar. Se puede afirmar que, con respecto al menor tiempo de fermentación (lo cual se traduce en menores costos de producción), el hidromiel C fue el que arrojó mejores resultados, ya que fue el producto cuya fermentación fue más rápida y lo constituye como el hidromiel más eficiente (contenido de la cantidad más adecuada de L-arginina, en función del tiempo de fermentación), en comparación con el hidromiel B, ya que este tardó 9 días más que el C para culminar su fermentación primaria.

En cuanto al contenido de etanol, no se encontraron diferencias entre los hidromieles, ya que los tres alcanzaron el mismo grado de alcohol; esto se debe a que cada uno de ellos se estabilizó en 1.12 g/mL de densidad el día de la preparación de los mostos, para que los tres estuviesen en las mismas condiciones. De igual forma, estos culminaron sus fermentaciones primarias con 1.01 g/mL de densidad, valor constante en los tres hidromieles.

La normatividad establece el valor de 6 % v/v como contenido mínimo de alcohol, para considerar una bebida tipo vino. Además, para el caso del hidromiel, se ha demostrado que el valor promedio final de alcohol está alrededor de 10 % v/v [10]. En esta oportunidad, se obtuvo un grado alcohólico de 14.18 % v/v.

Para la comparación sensorial de los hidromieles A y C, se tomó como población a la parroquia Altagracia, municipio Miranda, Zulia, Venezuela. Se entregó el test a 30 personas, 15 hombres y 15 mujeres, cuyas edades fueron distribuidas equitativamente entre los rangos: 18 – 25 años, 26 – 35 años y 36 - 55 años. El instrumento requirió marcar con una X una de las cinco categorías presentadas, las cuales se incrementaban del 1 (menor) al 5 (mayor), cuya escala de intervalo fue: 1 = muy inferior, 2 = inferior, 3 = igual, 4 = superior y 5 = muy superior.

La distribución general de las puntuaciones obtenidas en las cinco categorías u opciones de respuestas, en función de las tres características evaluadas (color, aroma y sabor de los hidromieles A y C), se encuentra plasmada en las Figuras 3, 4 y 5. En primer lugar, la Figura 3 representa gráficamente las puntuaciones resultantes de la comparación del color.

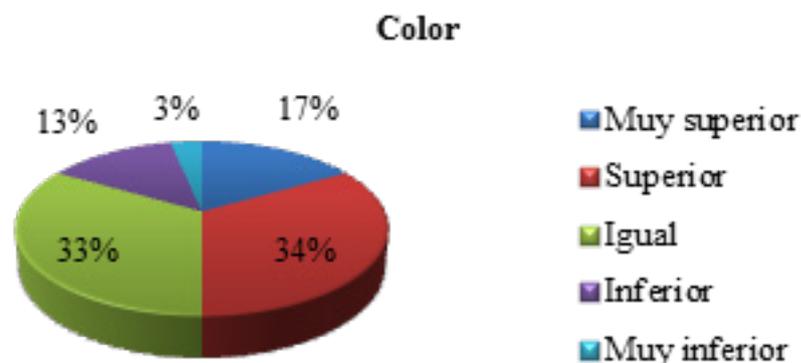


Figura 3. Porcentajes obtenidos en cada categoría, con respecto al color

De la Figura 3, se observa que la puntuación predominante en el color fue la número 5 (superior), indicando que el hidromiel C era superior al A, a simple vista, con el 34 % de elecciones.

Seguidamente, la puntuación número 3 (igual), con una diferencia de la primera en un punto, indicando que los hidromieles eran iguales con un porcentaje de 33 %. Luego, está la puntuación de

5 (muy superior) con 17 %, seguida de la puntuación 2 (inferior) con 13 % y, por último, con 3 %, la puntuación de 1 (muy inferior).

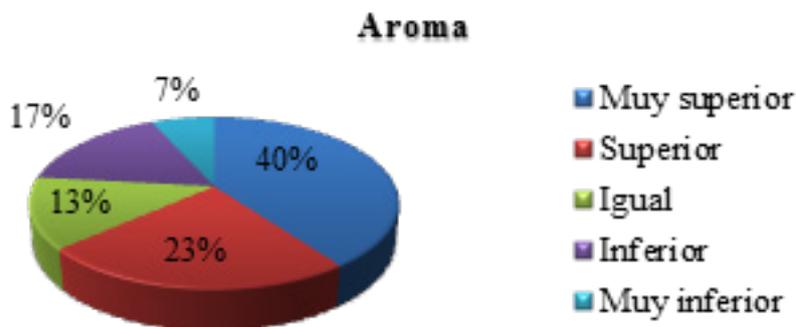


Figura 4. Porcentajes obtenidos en cada categoría, con respecto al aroma

En la Figura 4 se muestra la distribución, en porcentajes, de las puntuaciones correspondientes a las cinco categorías presentadas en el test para el aroma. La puntuación predominante, con 40 %, fue la número 5 (muy superior), lo que significa que la mayoría de los degustadores percibieron el aroma del hidromiel C como muy superior, en comparación con el aroma del A. Seguidamente, se encuentra la puntuación número 4 (superior), con 23 %, indicando, de igual forma, que el aroma del hidromiel C fue superior, con respecto al A.

Una pequeña parte de la muestra de la población puntuó el aroma del hidromiel C con el número 2 (inferior), constituyendo el 17 % de las puntuaciones. Igualmente, el 13 % señaló que los aromas eran similares, con el número 3. Por último, el 7 % de las puntuaciones correspondieron al número 1 (muy inferior), indicando que el aroma del hidromiel C fue muy inferior que el del A.

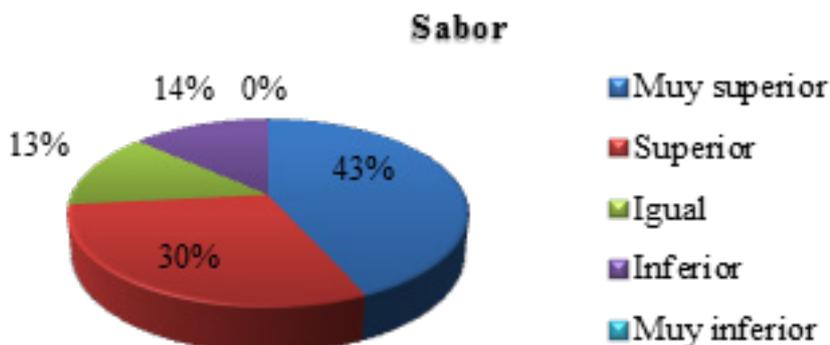


Figura 5. Porcentajes obtenidos en cada categoría, con respecto al sabor

De la Figura 5, se observó que el sabor obtuvo una puntuación predominante de 5 (muy superior), con el 43 %. Asimismo, se obtuvo un 30 % correspondiente a la puntuación número 4 (superior), indicando que el sabor del hidromiel C fue superior al del A. Seguidamente, se encuentra la puntuación número 2 (inferior) con el 14 %. Luego, está la puntuación número 3, con el 13 %, indicando igualdad de los sabores.

Cabe destacar que, la puntuación número 1 obtuvo 0 %, indicando que el hidromiel C no fue muy inferior que el A, en cuanto al sabor; por lo que, se puede afirmar que esta propiedad organoléptica no es afectada significativamente por la rápida fermentación debida a la adición de 2.10 gramos de L-arginina al hidromiel C.

Conclusiones

Se verificó la pureza de la miel de abeja al comparar los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica con los valores establecidos por la literatura, encontrándose estos en correspondencia.

La adición de la L-arginina a dos de los mostos permitió reducir el tiempo de fermentación en 6 días para el hidromiel B (1.05 g de L-arginina) y en 15 días para el C (2.10 g), con respecto al A (0 g).

Se evidenció una abundancia de nutrientes en los sustratos, durante los primeros siete días de fermentación, viéndose reflejado este comportamiento en una pendiente decreciente y 3pronunciada en los grados Brix y densidad.

El grado alcohólico final fue de 14.18 % v/v en los tres hidromieles, obtenido a partir de la elaboración de mostos con diluciones de miel en agua de 28 °Bx.

Referencias Bibliográficas

- [1] Suescún L. y Vit P., Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio, *Fuerza farmacéutica*, Vol.1, No. 1, (2006), p. 81 – 82
- [2] Finola M., Lasagno M. y Marioli J., Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina, *Food Chemistry*, Vol. 2, No. 100, (2007), p. 1649 – 1653.
- [3] Crane E., Índice de refracción de mieles de diferentes contenidos de agua, (1975). Recuperado el 05/02/2019 de https://apicultura.fandom.com/wiki/Humedad_en_miel
- [4] Persano O. y Piro R., Main European unifloral honeys: descriptive sheets, *Apidologie*, Vol. 1, No. 35, (2004), p. S38 - S81
- [5] Cotte H., Casablanca S., Chardon J. y Lheritier G., Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *Journal of Chromatography A*, Vol. 5, No. 1021, (2003), p. 145 – 155.
- [6] Williamson K. (Editorial: Pachamista). *Hidromieles y vinos caseros*, Santiago de Chile, Chile, (2017), p. 3-5, 18, 19.
- [7] Blanco A., Quicazán M. y Cuenca M., Efecto de algunas fuentes de nitrógeno en la fermentación alcohólica de miel, *Vitae*, Vol. 19, No. 1, (2012), p. 234 – 236
- [8] Vidrih R. y Hribar J., Studies on the sensory properties of mead and the formation of aroma compounds related to the type of honey. *Acta Alimentaria*, Vol. 36, No. 2, (2007), p. 151 – 162
- [9] Queris J. (Editorial Andrade), *Memorias curso fermentación de vinos y vinagres de fruta*, Bogotá, Colombia, (2010), p. 55 – 60.
- [10] Mendes-Ferreira A., Cosme F., Barbosa C., Falco V., Ines A. y Mendes-Faia A. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 1, No. 144, (2010), p. 193 – 198

