



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

## ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA EN LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y SENSORIALES EN LA ELABORACIÓN DE HIDROMIEL CON LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES

Tesis para optar al Grado de Ingeniero Agrónomo y Magíster en Enología y  
Vitivinicultura

**Diego Sebastián Torres Aguilera**

Directores de Tesis/AFE:  
Carla Jara Campos  
Jaime Romero Ormazábal

Profesores consejeros:  
Álvaro Peña Neira  
Marcela Medel Maraboli

SANTIAGO - CHILE  
2022

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA EN LAS CARACTERÍSTICAS  
QUÍMICAS Y SENSORIALES EN LA ELABORACIÓN DE HIDROMIEL  
CON LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES**

Tesis para optar al Grado de Ingeniero Agrónomo y Magíster en Enología y  
Vitivinicultura

**Diego Sebastián Torres Aguilera**

	Calificaciones (Memoria de Título)	Calificaciones (Tesis de Grado)
<b>DIRECTORES DE TESIS/AFE</b>		
Carla Jara Campos	6,2	6,2
Ingeniero Agrónomo-Enóloga, Dra,		
Jaime Romero Ormazábal	6,3	6,3
Bioquímico, Dr.		
<b>PROFESORES CONSEJEROS</b>		
Álvaro Peña Neira- Ing. Agrónomo, Dr.	6,7	6,7
Marcela Medel Maraboli- Ing. Agrónomo, Dra.	6,5	6,5

Santiago, Chile  
2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas las personas que fueron parte de mi formación universitaria y a quienes estuvieron presentes durante la elaboración de esta tesis. En primer lugar, a mis padres, Pablo y Jessica, quienes han sido pilar fundamental durante mi crecimiento como futuro profesional y como persona. Por su amor, cariño, apoyo y educación, muchas gracias. A mi hermano y familia, quienes siempre han estado conmigo.

También deseo agradecer a todas las personas que fueron parte de mi vida universitaria, en especial a mis amigos y amigas. A quienes han estado conmigo desde siempre, con quienes he vivido diversas etapas de mi vida y que a través de alegrías, cariño, consejos y apoyo, me han ayudado a crecer y salir adelante. Además, a la “agro familia” que forme durante estos años de estudios, con quienes a través de risas y mucho estudio, nos fuimos apoyando mutuamente durante la carrera.

Por último, agradecer a todos los y las docentes de la Universidad de Chile que fueron parte de mi formación. A mis profesores guías durante esta tesis, en especial a la profesora Carla Jara, por su paciencia, apoyo y consejos para la elaboración de esta investigación.

*“La mejor forma de vencer las dificultades es atacándolas con una  
magnífica sonrisa” Baden-Powell.*

*En dedicatoria a mis Padres, Familia y Amigos.*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	1
Palabras clave.....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
Keywords.....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>HIPÓTESIS</b> .....	5
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	5
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	5
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	6
Lugar de estudio.....	6
Materiales .....	6
Método.....	6
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	7
<b>1. Miel como materia prima</b> .....	7
Mercado nacional e internacional de la miel.....	8
Propiedades físicas de la miel .....	9
Propiedades químicas de la miel .....	12
Aromas primarios de la miel. ....	16
<b>2. Antecedentes generales de la producción de hidromiel</b> .....	17
Consumo de hidromiel a nivel mundial.....	18
<b>3. Proceso de elaboración de la hidromiel</b> .....	19
Fermentación alcohólica de la hidromiel.....	20
Levaduras fermentativas en la elaboración de hidromiel.....	20
Modulación aromática de la hidromiel .....	23
Manejo de inóculos fermentativos en procesos de elaboración de hidromiel.....	29
Elaboración de hidromiel con levaduras <i>No-Saccharomyces</i> .....	32
Uso de levaduras, aisladas desde la miel, para la elaboración de hidromiel.....	42
<b>CONCLUSIONES</b> .....	45
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	46

## ÍNDICE DE CUADROS

**Cuadro 1.** Composición química de la miel..... 13

**Cuadro 2.** Los compuestos volátiles compuestos producidos durante la fermentación alcohólica, asociados con sus sustratos iniciales, enzimas responsables y descripción aromática general..... 24

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Evolución del Valor Unitario promedio de exportación de miel natural en USD/Kg .....	9
<b>Figura 2.</b> Evaluación sensorial de las hidromieles fermentadas por distintas especies de levaduras. Clasificaciones promedio evaluadas en una escala no estructurada de 10 puntos .....	34
<b>Figura 3.</b> Evaluación sensorial en escala de 1 a 5 de mosto de miel e hidromieles fermentadas por 3 cepas de levaduras: <i>T. delbrueckii</i> , <i>S. sereviciae</i> y <i>S. bayanus</i> .....	37
<b>Figura 4.</b> Clasificación de ésteres aromáticos y puntaje promedio de los aromas indicados de los tres mejores hidromieles evaluados en la sumatoria total.....	38
<b>Figura 5.</b> Diagramas de araña de puntajes promedio para atributos de apariencia, aroma y sabor determinados por jueces. Hidromiel fermentada por: (a) <i>H. uvarum</i> (TH); (b) <i>S. cerevisiae</i> (TS); (c) inóculo secuencial con TH y TS; (d) <i>S. cerevisiae</i> (C1).....	40

## RESUMEN

La fermentación alcohólica inducida, a nivel general, es realizada con levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, también puede llevarse a cabo mediante una inoculación secuencial o co-inoculación con levaduras del grupo No-*Saccharomyces* y la especie *Saccharomyces cerevisiae*, lo cual podría mejorar la calidad aromática de la hidromiel. En este tipo de inoculaciones, las levaduras podrían liberar aromas primarios, tales como terpenos y tioles y sintetizar compuestos aromáticos secundarios tales como ésteres y alcoholes superiores durante la fermentación alcohólica de la miel. El objetivo de esta tesis fue analizar el potencial de la elaboración de hidromiel con inoculaciones secuenciales y co-inoculaciones con levaduras No-*Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae*. Se realizó una búsqueda sistemática de información, utilizando fuentes científicas que abarcaron estudios referentes a la acción de las levaduras No-*Saccharomyces* y su aplicación en la elaboración de hidromiel. En primera instancia, este trabajo describe de manera general, las características de la miel como materia prima. Posteriormente, se exponen antecedentes sobre la producción de hidromiel. Por último, se analiza la elaboración de hidromiel, desde la fermentación alcohólica implicada en el proceso de elaboración y la modulación aromática de la hidromiel desde el manejo de inóculos y el uso de levaduras No-*Saccharomyces* en la elaboración de hidromiel. Se concluyó que las cepas No-*Saccharomyces* pueden potenciar el perfil aromático y mejorar las características químicas de las hidromieles, según la cepa de levadura utilizada y la concentración de compuestos volátiles sintetizada. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la acción enzimática de las distintas especies No-*Saccharomyces* debe aún ser estudiada en la elaboración de hidromiel, se aceptó parcialmente la hipótesis.

**Palabras clave:** Inoculación secuencial, calidad aromática, No-*Saccharomyces*, aromas secundarios.



## ABSTRACT

Induced alcoholic fermentation, at a general level, is carried out with *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. However, it can also be carried out by sequential inoculation or co-inoculation with yeasts from the Non-Saccharomyces group and the *Saccharomyces cerevisiae* species, which could improve the aromatic quality of the mead. In this type of inoculations, yeasts could release primary aromas, such as terpenes and thiols, and synthesize secondary aromatic compounds such as esters and higher alcohols during the alcoholic fermentation of honey. The objective of this thesis was to analyze the potential of mead production with sequential inoculations and co-inoculations with Non-Saccharomyces and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. A systematic search for information was carried out, using scientific sources that included studies referring to the action of Non-Saccharomyces yeasts and their application in the production of mead. In the first instance, this work describes in a general way, the characteristics of honey as a raw material. Subsequently, background information on the production of mead is presented. Finally, the production of mead is analyzed, from the alcoholic fermentation involved in the manufacturing process and the aromatic modulation of the mead from the management of inoculums and the use of Non-Saccharomyces yeasts in the production of mead. It was concluded that Non-*Saccharomyces* strains can enhance the aromatic profile and improve the chemical characteristics of meads, depending on the yeast strain used and the concentration of volatile compounds synthesized. Therefore, taking into account that the enzymatic action of the different Non-*Saccharomyces* species has yet to be studied in the production of mead, the hypothesis was partially accepted.

**Keywords:** Sequential inoculation, co-inoculation, aromatic quality, Non-*Sacharomyces*.

## INTRODUCCIÓN

La hidromiel es una bebida alcohólica producida a partir de la fermentación alcohólica de una mezcla azucarada conformada por miel y agua (Pereira *et al.*, 2017). Esta bebida alcohólica es una de las más antiguas, según los antecedentes históricos, ésta es anterior al vino y probablemente, precursora de la cerveza (Peterson, 1979, citado por Barrios *et al.*, 2010).

En Chile, la hidromiel al ser una bebida poco conocida, existe un mercado muy reducido para su elaboración (Morales, 2018). A pesar que, hay reducida información disponible en el mercado, en Chile, su elaboración se encuentra en crecimiento, existiendo más de 15 marcas de hidromiel artesanal (Díaz, 2020). Además, el mercado de la miel en nuestro país, es altamente valorado en comparación con otros países de Latinoamérica. El consumo interno aproximado de miel es de 1.400 t/año. La mayoría de los apicultores registrados se concentran en la región del Maule, seguida por las regiones del Biobío, O'Higgins y Araucanía (González, 2019). Ante este escenario, junto con las capacitaciones a los productores de miel, existe la oportunidad de incorporar la hidromiel en el mercado nacional, como un producto atractivo, novedoso, saludable y no estacionario (FIA, 2008).

Diversos factores físicos y/o químicos pueden determinar la calidad organoléptica de las distintas bebidas fermentadas como la hidromiel. El factor más importante es el *flavor*, definido como la combinación de sensaciones percibidas en las cavidades bucal y nasal (García, 1984). Según la composición cualitativa y cuantitativa de cada compuesto químico presente en la miel, este parámetro es característico (García, 1984). Por lo tanto, existe un alto interés en el análisis de los componentes responsables del aroma y sabores de alimentos, por parte de los/as productores/as e investigadores/as, debido a la alta influencia que tienen en la percepción del producto final, junto con la búsqueda de obtener productos diferenciados por parte del mercado y de los consumidores (Martí *et al.*, 2004).

Los distintos tipos levaduras, que interactúan en el proceso de fermentación alcohólica, son un factor principal para determinar la composición aromática de una bebida fermentada. Estos microorganismos, pueden tener una influencia sobre la naturaleza y la concentración de la amplia gama de compuestos volátiles y no volátiles en la matriz generada. Estos compuestos, influyen en el aroma y sabor del producto final. Entre estos compuestos volátiles, destacan principalmente los alcoholes superiores, los ésteres terpenos, tioles, los ácidos orgánicos, y en menor medida los aldehídos (Romano *et al.*, 2003).

El proceso fermentativo puede llevarse a cabo como un proceso inducido mediante el uso de levaduras comerciales o como un fermentativo espontáneo, en el cual, actúan una sucesión de levaduras nativas. En una primera etapa, que abarca los primeros días de la fermentación alcohólica (1-3 días), está dominada por levaduras del tipo *No-Saccharomyces*, las cuales pueden producir una gran cantidad de enzimas, tales como las  $\beta$ -glucosidasas y  $\beta$ -liasas, las cuales son relevantes por su capacidad de liberar aromas varietales tales como terpenos y tioles, respectivamente, que se encuentran ligados y así puedan ser odorantes, mejorando el *flavor* del producto final, junto con la síntesis de compuestos secundarios (Ciani *et al.*, 2010; Padilla *et al.*, 2016). Una vez que este tipo de

levaduras termina su acción bioquímica, ocurre una segunda etapa, la cual es conducida por levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales tienen una alta tolerancia al alcohol y terminan el proceso fermentativo (Quiñones, 2013).

En este contexto, surge el interés por el estudio del uso de inoculaciones secuenciales y/o co-inoculaciones con levaduras No-*Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae*. En la industria enológica y ahora en otras industrias de elaboración de bebidas alcohólicas, como la hidromiel, la utilización de inoculaciones secuenciales, junto con un programa de selección, representan una estrategia prometedora para obtener fermentados con un perfil organoléptico que satisface las demandas de un número creciente de consumidores (Bourbon-Melo *et al.*, 2020). Según Ocón (2015), especies como *Torulaspota delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima* o *Lachancea thermoeltrants*, destacan como las más estudiadas en inoculaciones secuenciales con *Saccharomyces cerevisiae*. Esto se debe a la capacidad de liberar aromas primarios, producir aromas secundarios, reducir el grado alcohólico, disminuir la acidez volátil, entre otras características.

La composición y el carácter sensorial de los fermentados derivados de la miel, varía según el metabolismo de la levadura utilizada durante el proceso fermentativo (Soden *et al.*, 2000). Además, algunas cepas de levaduras pueden producir fermentados con un menor contenido de alcohol sin la necesidad de desarrollar compuestos en concentraciones que puedan afectar al perfil sensorial (Varela, 2016). Autores como Li & Sun (2019), Barry *et al.* (2018) y Sottit *et al.* (2019), han evidenciado que compuestos como los alcoholes superiores, los ésteres y los ácidos volátiles, podrían variar su concentración según la cepa de levadura No-*Saccharomyces* inoculada y el tipo de miel utilizada como materia prima. De esta manera, se podrían generar variaciones en la percepción aromática de la hidromiel y en las características químicas, tales como el pH o la concentración de alcohol.

En un contexto tradicional, en la elaboración de hidromiel, se utilizan levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en la producción de vino y cerveza. Sin embargo, debido a las características de la composición química de la miel, como mayores niveles de azúcares (>60%) y concentraciones más bajas de nitrógeno ( $\approx 0,04\%$ ), otras cepas de levaduras podrían ser candidatas para su producción (Pereira *et al.*, 2009).

La presente investigación recopila y analiza la información publicada con respecto a la hidromiel y su producción con levaduras No-*Saccharomyces*. Para esto, se expusieron las características de la miel como materia prima, junto con una mirada del mercado nacional e internacional, estrategias de elaboración de la hidromiel y la modulación aromática de la misma. Finalmente, se analizaron las levaduras No-*Saccharomyces* y el efecto e influencia que podrían generar sobre las características químicas y organolépticas de la hidromiel bajo distintos métodos de inoculación.

## HIPÓTESIS

Las inoculaciones secuenciales o co-inoculaciones con levaduras del género *No-Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae*, aumentan la complejidad aromática de la hidromiel, debido al aumento en la concentración de compuestos como ésteres, alcoholes superiores. Además, modifican aspectos químicos de los hidromieles como el pH y la concentración de alcohol.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar el potencial del uso de levaduras *No-Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica en la elaboración de hidromiel.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la influencia sobre la complejidad aromática de inoculaciones secuenciales o co-inoculaciones con levaduras *No-Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae* en la elaboración de hidromiel.
- Evaluar el aumento en la concentración de compuestos como ésteres y alcoholes superiores en la elaboración de hidromiel con levaduras *No-Saccharomyces*.
- Analizar la influencia sobre las características químicas en la elaboración de hidromiel con levaduras *No-Saccharomyces*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de estudio

La revisión bibliográfica se llevó a cabo en las dependencias de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

### Materiales

Para la elaboración de esta revisión bibliográfica, se utilizaron diferentes fuentes de información escritas y diversos textos digitales. Se recurrió a fuentes informativas escritas tales como memorias de títulos, tesis de grado, revistas y artículos científicos relacionados con el tema de investigación. Se accedió a estos recursos bibliográficos digitales a través de plataformas como “ISI-Web of Science”, “Science Direct”, Servicio de Información y Bibliotecas de la Universidad de Chile (SISIB), además de documentos recuperados en internet, entre otras.

### Método

Se inició esta investigación con una búsqueda exhaustiva de información desde lo más general hasta llegar a fuentes más específicas con respecto al tema de la investigación y sus derivados. Se buscaron estudios tanto nacionales como internacionales que abarcaron la elaboración de hidromiel con levaduras del tipo *No-Saccharomyces* con el fin de obtener información íntegra con respaldo científico. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis, clasificación y selección de la información encontrada para obtener las más idóneas y lograr comparar los distintos reportes y resultados encontrados.

Se dio énfasis en exponer que es la hidromiel y cuál es su composición química para demostrar la posibilidad real de la influencia de las levaduras *No-Saccharomyces* sobre sus características químicas y aromáticas durante su elaboración. Para esto, se analizaron distintos puntos derivados del tema principal de la investigación, con la finalidad de responder a la hipótesis y objetivos planteados. Durante el desarrollo de la investigación, se expuso y se analizó a la miel como materia prima, el mercado, con el fin de analizar un factor de mercado de la hidromiel y elaboración de hidromiel, la modulación aromática de la hidromiel, las levaduras que pueden estar involucradas en el proceso de elaboración de hidromiel y su elaboración con levaduras del tipo *No-Saccharomyces*. Terminado este análisis, se procedió a sintetizar e integrar los resultados relevantes para la investigación, con el objetivo de crear un documento robusto que contenga la información adquirida de las distintas fuentes informativas utilizadas en la realización de esta Tesis bibliográfica.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Miel como materia prima

Para la elaboración de hidromiel, se utiliza como sustrato principal la miel, la cual se define como un producto natural producido por abejas *Apis mellifera* (Bobis *et al.*, 2020). Además, según el sedimento presente en las mieles, ésta se puede clasificar en dos tipos. La primera clasificación es la miel de néctar floral, donde domina el polen de plantas nectaríferas. El segundo tipo, es la miel de mielada, la cual procede principalmente de secreciones o exudaciones de otras partes vivas de las plantas o de exudados de insectos (Córdova *et al.*, 2013).

La miel de néctar floral es la que se encuentra disponible en el mercado nacional. Sus características químicas y organolépticas pueden variar según su origen, características climáticas y manejo aplicado en su elaboración (INN, 2007). Según el Instituto Nacional de Normalización (INN, 2007), existen múltiples tipos de miel que se pueden clasificar en: i) monoflorales, las cuales contienen al menos un 45% de granos de polen de una misma especie vegetal, ii) biflorales, cuya composición se encuentra principalmente polen de dos especies vegetales, alcanzando en su conjunto un valor mínimo del 50% y que ambas especies no difieren más de un 5% entre ellas y iii) mieles multiflorales, las cuales se caracterizan por poseer en forma significativa granos de polen de tres o más especies vegetales, sin que ninguna de éstas se encuentre igual o sobre el 45% de su composición.

Los distintos tipos de miel que existen varían en cuanto a su composición química y física, las cuales dependen principalmente de las fuentes vegetales de las cuales se deriva el producto. No obstante, los factores externos como el clima de la zona donde son producidas, el manejo de extracción y almacenamiento de éstas, también tienen una influencia sobre factores físico-químicos como el color, sabor y aroma de la miel (Crane 1980, citado por Ordoñez *et al.*, 2005).

A nivel nacional, existen una serie de normativas y regulaciones legales para el sector apícola, en relación con procedimientos de caracterización y diferenciación de miel. Estas regulaciones abarcan condiciones sobre la composición físico-química de la miel y control sanitario, tanto para la comercialización a nivel nacional y exportaciones a nivel internacional (González, 2020).

En Chile, para realizar las exportaciones de miel, se debe estar inscrito en el Registro de Apicultores de Miel de Exportación (RAMEX), administrado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Pertenecer a este registro, permite proporcionar garantías del cumplimiento de las exigencias sanitarias, de inocuidad alimentaria y calidad (color, concentraciones y tipo de azúcares, origen, entre otras), requeridas por los países de destino, las cuales se detallan en el Manual de requisitos de Establecimientos Exportadores de Miel (SAG, 2021).

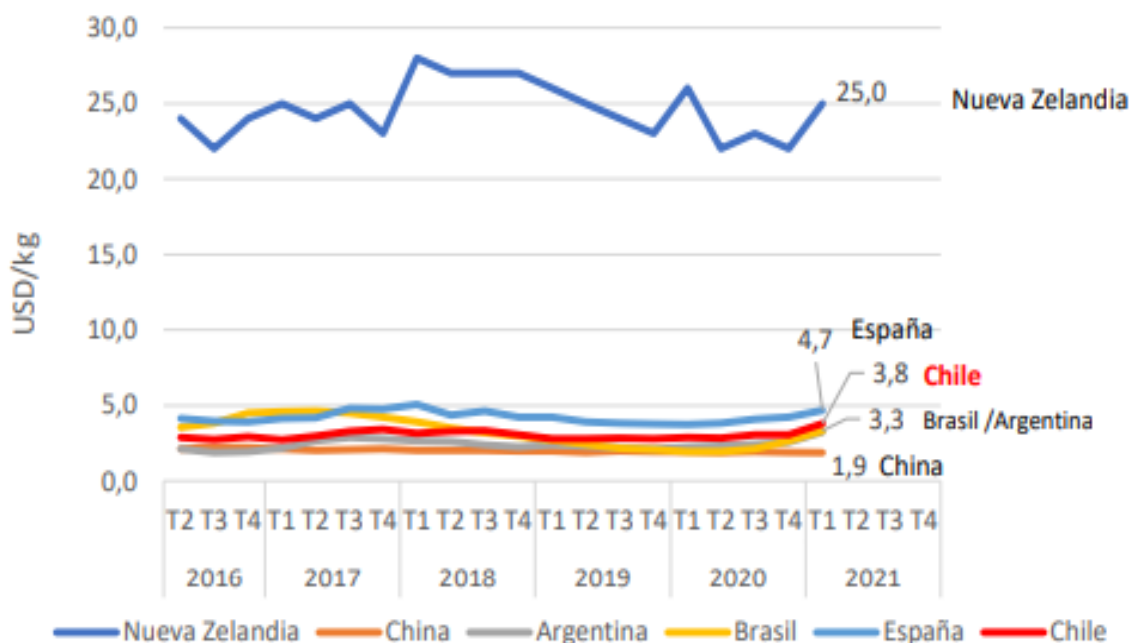
Por lo tanto, todas las mieles deben cumplir con estas condiciones, según cada mercado para poder ser comercializada. Sin embargo, las variaciones físico-químicas que se pueden observar en el producto según el origen floral, zona de producción, clima, entre otras, permite que, a pesar de tener que cumplir con una normativa básica, puedan ser diferentes organolépticamente. Debido a esto, existe la posibilidad de elaborar distintos tipos de hidromieles según el tipo de miel utilizado, las cuales tendrán distintas características físicas, químicas y organolépticas (Hott, 2015; González, 2020).

### **Mercado nacional e internacional de la miel**

El consumo de miel mundial, se ha mantenido en alza durante las últimas décadas debido a dos razones principales. La primera, se refiere al aumento de la población mundial. La segunda, está relacionada con la creciente preferencia de los alimentos naturales por parte de los consumidores (García, 2018). En el año 2019, la producción mundial de miel alcanzó 1,85 millones de toneladas. Además, en el año 2020, en cuanto a volúmenes exportados mundialmente, se alcanzó cerca de 711 mil toneladas, un 11% más que en 2019. Los países que concentran cerca del 54,2% de la miel comercializada en el mundo durante el año 2020 son China, Ucrania, Argentina, India y Brasil (ODEPA, 2021).

Reportes de García (2018), indican que es esperable que los volúmenes de exportación de miel hayan aumentado en algunos países. Sin embargo, en otros disminuyó durante los últimos 10 años. En el caso de Chile, éste se ubica en el grupo de países que produce miel convencional, para la cual, a diferencia de la miel orgánica, se permite el uso compuestos químicos a lo largo de su proceso de obtención. En este grupo, se han mostrado tasas de crecimiento moderadas o disminuciones en las tasas de exportación y los precios durante los últimos años, exportando 4.250 t en el año 2019 y 2.015 t en 2020 (ODEPA, 2021; Polak-Śliwińska & Tańska, 2021)

Según los antecedentes estadísticos de la Oficina De Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), en el año 2021, la miel chilena exportada se comercializa a un precio promedio, el cual es por debajo de los países que han trabajado para lograr un alto nivel de diferenciación en sus productos, tal como Nueva Zelanda. En la figura 1, se aprecian los precios de la miel. En el año 2021, el precio de Chile es de 3.8 US\$ por kilo, en comparación de Nueva Zelanda que fue de 25 US\$.



**Figura 1.** Evolución del Valor Unitario promedio de exportación de miel natural en USD/Kg (ODEPA, 2021).

En relación a la producción de miel que hay en el territorio nacional, existe un consumo interno aproximado de 1.400 t/ año (González, 2019). Hasta septiembre del 2020, los/as apicultores registrados, corresponden a un total de 8.777 a nivel nacional, siendo la región del Maule la que lidera la inscripción con el 18% del total (ODEPA, 2021).

Ante este escenario, la posibilidad de realizar capacitaciones a los/as productores de miel, junto con la realización de inversión en tecnología en la producción de miel, existe la oportunidad de incorporar la hidromiel en el mercado nacional, como un producto atractivo, novedoso, saludable y no estacionario (FIA, 2008).

### Propiedades físicas de la miel

El análisis de las propiedades físicas de la miel puede ser de vital importancia, debido a que, permite conocer el posible origen de la miel y detectar, algún tipo de alteración química en el producto. Además, posibilita la evaluación de las propiedades sensoriales de la miel, las cuales están vinculadas directamente con la calidad de ésta (Fattori, 2004).

Las Propiedades físicas que determinan la calidad de la miel, se detallan a continuación:

**Color.** Este parámetro es uno de los primeros atributos percibidos por los consumidores. Es la propiedad óptica de mayor variabilidad en la miel. Este análisis físico se atribuye principalmente al origen botánico del producto. La naturaleza química del néctar es uno de



los factores principales que afectan el color junto con las condiciones de envejecimiento (Lobos & Silva, 2021).

Desde el punto de vista comercial, este factor es de alta importancia, debido a que las mieles son transadas según su color y poseen un valor diferente en cada mercado de destino (Delmoro *et al.*, 2010). Por lo tanto, la calidad del color dependerá del mercado a cuál va dirigido el producto.

El color en las mieles se puede medir de forma sensorial e instrumental. La medición sensorial, consiste en utilizar un panel de evaluadores entrenados. Estos paneles se basan en la norma IRAM 20022; 2004, utilizando referencias como el Atlas “Royal Horticultural Societ” (RHS), Guías Pantone o el Sistema Munsell. También, el color de las mieles se puede analizar aplicando un sistema visual que compara la miel con un prisma coloreado estándar, mediante la utilización de equipos como los colorímetros Pfund. En cuanto a los métodos instrumentales utilizados para obtener este parámetro, se utilizan técnicas en las cuales se mide la reflectancia o transmitancia de la miel mediante espectrofotómetros o colorímetros triestimulos (Delmoro *et al.*, 2010).

**Viscosidad.** La viscosidad es el factor de más importante en la calidad de la miel. En esta propiedad física, influye el porcentaje del agua y la relación fructosa/glucosa que posee la miel, es decir, a mayor concentración de fructosa, las mieles son menos viscosas. Este es un atributo de los alimentos líquidos, el cual es altamente dependiente de la temperatura y del origen floral (Fattori, 2004).

La determinación de la viscosidad ayuda a detectar posibles adulteraciones en los niveles de fructosa o sacarosa en la miel. Esto se debe a que el incremento de la adición de la fructosa o sacarosa, disminuye la viscosidad en las mieles. La viscosidad, varía según el lugar de origen de la miel. A nivel general, este parámetro tiene un comportamiento Newtoniano, por lo que se puede medir mediante un viscosímetro capilar o de bola comparando una miel natural con una adulterada (Andrade *et al.*, 2016).

La viscosidad también depende del grado de humedad que posea la miel. A temperatura ambiente ( $\approx 20^\circ$ ), la miel con un contenido de agua de 18.9% es igual a 9.9 Pa.s, y hasta 61.1 Pa.s con 13.9% de agua (Bakier, 2007).

Por lo tanto, la viscosidad depende de múltiples factores y ayuda a determinar la calidad y autenticidad de la miel. Sin embargo, no existe una clasificación internacional de viscosidades según la adulteración de fructosa o sacarosa en la miel.

**Humedad.** Este es un factor que señala el nivel de madurez de las mieles. Indica el contenido de agua de la miel, como el resultado final de la deshidratación activa, por parte de las abejas del néctar colectado. La humedad en la miel, aceptada por normas internacionales es de un máximo de 20%, al igual que en Chile. Pueden existir excepciones de acuerdo con la norma del *Codex Alimentarius* para la miel "Norma para la Miel CODEX

STAN 12-1981" (Corbella *et al.*, 2002; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2019).

Esta propiedad influye en el peso específico, la viscosidad, el sabor y condiciona la conservación, palatabilidad y la solubilidad de la miel (Gutiérrez, 2016).

**Conductividad eléctrica.** Este parámetro está relacionado con el contenido de minerales, ácidos orgánicos, proteínas y posiblemente la concentración de azúcares y polioles de la miel. La conductividad eléctrica de la miel está relacionada con su valor nutricional (Santos, 2018). Además, la conductividad eléctrica, permite diferenciar el origen de la miel (floral o mielada) y orientar cual ha sido el origen botánico del néctar (Sanz & Sanz, 1994).

Las mieles con alta conductividad eléctrica indican que presentan un alto contenido de minerales y es posible relacionarlo con el color de la miel. Por tanto, las mieles más claras, tienen menor cantidad de nutrientes y una menor conductividad eléctrica (Santos, 2018).

El Instituto Nacional de Normalización (2007), define en la Norma Chilena (NCh3064), que la medición de la conductividad eléctrica de las mieles debe realizarse mediante una celda de conductividad eléctrica a 20°C de una solución de 20 g de miel en base seca en 100 mL de agua.

En Chile, países de la Comunidad Europea (CE), Estados Unidos y Canadá, se rigen por el *Codex Alimentarius*, junto con los decretos de cada país para comercializar la miel. En estos reglamentos, se señala que la miel debe indicar si es de origen floral. Se marca un límite de conductividad eléctrica de 0,8 mS/cm, a excepción de mieles de *Arbutus*, *Banksia*, *Erica*, *Leptospermum*, *Melaleuca*, *Eucalyptus* y *Tilia*, las cuales marcan una elevada variación en su conductividad eléctrica (Boletín oficial del Estado, 2003; González, 2019).

Por lo tanto, la conductividad eléctrica ayuda a diferenciar el origen botánico de las mieles, permitiendo a los pequeños apicultores conocer si sus productos poseen el origen vegetal que ellos creen e identificar falsas etiquetas de origen. Además, se vincula fuertemente con el valor nutricional que puedan poseer las mieles.

**Higroscopicidad.** La miel es un alimento altamente higroscópico, debido a su alto contenido de azúcares. Según las condiciones ambientales o de almacenamiento, tales como la temperatura, el contenido de humedad en el aire y la humedad relativa, tiene la capacidad de absorber humedad (Machado *et al.*, 2017).

A nivel general, dentro del contenido de azúcares en la miel, el azúcar mayoritario es la fructosa, la cual es bastante higroscópica. A temperatura ambiente ( $\approx 20^{\circ}\text{C}$ ), la fructosa tiene un rápido aumento en su tasa de absorción de agua del aire, cuando la humedad relativa alcanza aproximadamente el 60%. Por lo tanto, la miel debe, en su mayoría, sus cualidades higroscópicas a su contenido de fructosa (Crane, 1982).

Las mieles de origen floral pueden tener un contenido de humedad aproximado entre 13,4 - 22,9%. Por lo tanto, esta propiedad física influye directamente en el contenido de humedad de la miel. Se debe procurar que para su almacenamiento, la humedad relativa del ambiente sea menor al 50%. Con la finalidad que el producto no sea susceptible a sufrir alteraciones microbianas y a mantener los niveles de humedad permitida por el *Codex Alimentarius* (20%) para que pueda ser comercializada tanto nacional como internacionalmente (Fattori, 2004)

### **Propiedades químicas de la miel**

Desde el punto de vista de la composición química de la miel, se puede definir como un alimento natural, el cual está compuesto principalmente de azúcares y agua. Además, posee otros constituyentes menores tales como los minerales, las vitaminas, los aminoácidos, los ácidos orgánicos, los flavonoides y otros compuestos fenólicos, los compuestos volátiles, entre otros (Santos-Buelga & González-Paramás, 2017). En el cuadro 1, se muestran los rangos y promedios de los distintos constituyentes químicos de la miel, haciendo distinción entre sus constituyentes mayoritarios y minoritarios.

Se puede observar que los azúcares pueden representar entre el 80-85% del contenido de la miel. Se han identificado más de 20 hidratos de carbono presentes en las mieles, los cuales otorgan la mayoría de las cualidades físicas, como la higroscopicidad o su capacidad de cristalización, junto con sus cualidades nutricionales y sabor (Derndorfer, 2015). El contenido de minerales en la miel ha sido utilizado principalmente para la identificación del origen botánico y por su correlación con el color de estas (Santos-Buelga & González-Paramás, 2017).

Las concentraciones de los compuestos presentes en las mieles pueden variar según su origen y manejos de elaboración. Además, son de vital importancia para comprender las cualidades organolépticas que puede tener cada tipo de miel.

El *flavor* de la miel, está relacionado especialmente con los compuestos minoritarios, los cuales pueden ser altamente variables según el tipo de miel. El origen de cada compuesto químico puede depender del néctar floral, según su origen botánico y geográfico, incorporación por parte de las mismas abejas o ser generado por reacciones químicas y enzimáticas que ocurren durante la maduración de la miel (Fattori, 2004).

**Cuadro 1.** Composición química de la miel (Santos-Buelga & González-Paramás, 2017).

Constituyentes mayoritarios (%)		
	Promedio	Rango
Agua	17,90	13,21-26,50
Fructosa	39.44	37,07-42,65
Glucosa	28.15	18,20-32,10
Sacarosa	3.19	0,36-16,57
Otros Azúcares	8.50	0,10-16,00
Constituyentes minoritarios (%)		
Minerales	0.36	0,11-0,72
Proteínas Totales	1,13	0,22-2,93
Ácidos	-	0,17-1,17
Vitaminas, enzimas, aromas	<0,10	
Compuestos fenólicos	0,10	0,02-0,20

**Hidratos de carbono.** La concentración de los azúcares presentes en la miel está liderada por los monosacáridos, fructosa y glucosa, los cuales representan casi el 95% del peso seco. Generalmente, la fructosa es el componente dominante. En algunos tipos de miel, como la colza (*Brassica napus*) y el diente de león (*Taraxcum officinale*), la fracción de glucosa podría ser mayor (Escuredo *et al.*, 2014). Este predominio de azúcares simples y, en particular la alta concentración de fructosa, le entregan a la miel la mayoría de sus características físicas y nutricionales (Lobos & Currian, 2021).

Se han detectado más de 25 oligosacáridos en los distintos tipos de miel. Los oligosacáridos más destacados son los disacáridos tales como la sacarosa, maltosa, trehalosa, entre otros. Entre los trisacáridos, resaltan la panosa, kestosa, maltotriosa, entre otros. Finalmente, se presentan azúcares como dextrinas y pentosanos (Bogdanov *et al.*, 2014).

El análisis de los carbohidratos presentes en la miel puede ser utilizado para obtener información con respecto a su calidad. De esta forma, al lograr la determinación de azúcares reductores, sacarosa, azúcar total y glucosa comercial, permite detectar la alteración del producto final. También se debe considerar que la proporción de fructosa/glucosa y las concentraciones de sacarosa, son un buen criterio para diferenciar calidad y tipos de mieles (Bachmann, 2007). Por lo tanto, las mieles de origen floral tienen una relación F/G promedio de 1,2:1, la cual depende principalmente del origen floral. Además, una relación baja (< 1), podría indicar una miel alterada (Zandamela, 2008).

En el mercado nacional, la legislación respecto a la composición de la miel (Decreto N° 977/96 Art. 394), indica los requisitos para que el producto pueda ser comercializado como miel, entre los cuales se encuentra: a) Que el producto contenga como máximo 5% de sacarosa, un máximo de 8% de dextrina, como mínimo 70% de fructosa más glucosa, b) no contener azúcar invertido artificial ni sustancias extrañas como edulcorantes (naturales o artificiales), materias aromáticas, almidón, goma, gelatina, sustancias preservadoras y colorantes, entre otros requisitos (Ministerio de Salud, 2021).

**Acidez y pH.** Desde un punto de vista químico, la miel es bastante ácida. Si es de origen floral, su pH aproximado, está en un rango de 3,2-4,5. Estos parámetros son un factor clave que ayuda a inhibir microorganismos patógenos (Andreea *et al.*, 2019). En mieles de mielada, el pH puede ser superior a la de origen floral, por el efecto regulador de las sales tampones que contienen, logrando a alcanzar hasta un pH de 6,1. Por tanto, el pH de la miel depende tanto de la concentración de los ácidos glucónicos, butírico, láctico, cítrico, succínico, fórmico, málico, maleico y oxálico, como del contenido de las sales minerales que compongan el producto final, especialmente por el potasio, sodio y calcio (Cavia *et al.*, 2005; Zandamela, 2008; Periago *et al.*, 2016).

Dentro de la composición química de la miel, se puede encontrar distintos ácidos orgánicos como el ácido glucónico, el ácido cítrico, el ácido málico, el ácido succínico, el ácido tartárico, entre otros (Zivkov *et al.*, 2018). Estos ácidos componen solo una pequeña parte del total ( $\approx 0,5\%$ ). Sin embargo, son de alto interés porque contribuyen a las propiedades organolépticas de la miel, como el color, el sabor y sus propiedades físicas y químicas, tales como el pH, la acidez y conductividad eléctrica (Mato *et al.*, 2006).

Los ácidos de la miel se originan directamente del néctar o se derivan de los azúcares, por la actividad de las enzimas secretadas por las abejas. El ácido glucónico, es el mayoritario a excepción de algunas mieles, como la de abeto, donde el ácido galacturónico es el ácido principal (Santos-Buelga & González-Paramás, 2017). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la acidez natural de la miel, puede aumentar durante el almacenamiento y maduración de ésta. Esto se debe a la acción de la glucosidasa, la cual transforma los azúcares presentes en la miel en ácidos, sin tener una correlación con el modo de conservación de la miel. Además, la acidez también puede aumentar durante la fermentación alcohólica de la miel, debido a la acción enzimática de las levaduras (Zandamela, 2008; Zivkov *et al.*, 2018).

Por lo tanto, la acidez es un factor altamente variable y con una alta relevancia organoléptica en la miel. Además, la variabilidad de ácidos dependerá según el tipo de miel y su almacenamiento. Esto es altamente relevante, debido a que la acidez es una característica crucial y altamente valorada por los consumidores de hidromiel.

**Proteínas, aminoácidos y enzimas.** A nivel general, la cantidad de nitrógeno presente en la miel es bajo, estando presente en un promedio de 0,04% del peso total de la miel. No obstante, puede variar hasta un 0,13% (Ordoñez *et al.*, 2005). Las proteínas en la miel provienen de la glándula hipofaríngea de las abejas y del origen botánico. Estas proteínas se encuentran presentes en una proporción muy baja, que va entre el 0,1-0,5% de su peso seco, por lo que su estudio se hace muy difícil (Rahaman, 2015).

Dentro de la concentración de aminoácidos, la prolina es la más predominante en mieles florales, constituyendo entre el 50-85% de la fracción aminoácida. Esta puede usarse para representar el contenido total de aminoácidos, seguida de fenilalanina y el ácido glutámico, los cuales están presentes en trazas (Chua, 2013). La prolina se utiliza como un factor de

calidad de la miel, debido a que su concentración se utiliza para detectar adulteraciones. Según el *Codex Alimentarius*, una miel genuina debe contener un mínimo de 180 mg/kg de prolina. Sin embargo, se debe considerar que existen grandes variaciones entre los distintos tipos de mieles (Ordoñez *et al.*, 2005)

Las enzimas que se encuentran comúnmente en las mieles, son provenientes de las abejas y no del néctar floral. La enzima mayoritaria es la  $\alpha$ -glucosidasa (invertasa o sacarasa), la cual está presente en la glándula hipofaríngea de la abeja recolectora. La actividad enzimática también está relacionada con la cantidad, la concentración y la composición del néctar de las flores y este puede disminuir durante el procesamiento de la miel, la calefacción y el almacenamiento (Santos-Buelga & González-Paramás, 2017).

La miel posee diferentes enzimas, donde destacan las amilasas, las invertasas, las glucosidasas, las catalasas y finalmente las enzimas fosfatasas. Estas enzimas son originadas principalmente por las abejas. Sin embargo, la actividad de éstas también se puede utilizar como indicadores de calidad en países occidentales y para diferenciar el origen botánico, siempre y cuando las mieles se encuentren frescas (Chua *et al.*, 2013; Santos-Buelga & González-Paramás, 2017).

**Compuestos fenólicos.** En el último tiempo, se han descrito una serie de compuestos que demuestran el carácter del potencial antioxidante de las mieles. Estos compuestos pueden poseer un notable perfil fenólico aportado por varios ácidos, ésteres y anglicanas flavonoides. Además, este perfil fenólico puede mejorar las cualidades sensoriales y funcionales de la miel (Muñoz *et al.*, 2007; Chávez *et al.*, 2019).

Según Machado De-Melo *et al.* (2017), la miel puede poseer rangos entre 5-1300 mg/kg de compuestos fenólicos. Normalmente, se encuentran grupos de flavanonas y flavononas/flavonoles (Muñoz *et al.*, 2007).

Los flavonoides son los principales componentes funcionales de la miel, a los cuales se les atribuye la propiedad antioxidante (López, 2018). En conjunto con los ácidos fenólicos (No flavonoides) y los ésteres (genéricamente denominados “compuestos fenólicos”), son los componentes más estudiados de la miel. Esto se debe a que el conocimiento de estos compuestos es clave para la tipificación química de las mieles, debido a que podrían ser marcadores de origen vegetal e indicadores de calidad biológica (Ojeda, 2012).

La miel puede contener varios ácidos carboxílicos aromáticos y aril-alifáticos, principalmente derivados hidroxilo y metoxi del ácido benzoico y cinámico (No flavonoides). Estos compuestos contribuyen a las propiedades sensoriales de la miel y podrían indicar su origen floral (Dimitrova *et al.*, 2006). Además, en la miel han sido reportados la presencia de los ácidos benzoico, hidroxibenzoico, salicílico, gálico, vainílico, siríngico, protocatecuico, cafeico, cumárico, ferúlico, clorogénico, fenilacético y rosmarínico. Estos compuestos, además de entregar una cualidad sensorial natural a la miel, pueden servir como marcadores de origen biológico (Trautvetter, 2009).

Reportes de Muñoz *et al.* (2007), indican que en las mieles florales chilenas se encontraron flavonoides tales como pinobanksina, quercetina, kaempferol, crisina, galangina y otras dos flavanonas no identificadas. El mayor contenido de compuestos fenólicos totales, alcanzó a 8,8 mg/100 g de miel. En el caso de mieles de Argentina y de Paraguay, se encontraron cantidades promedio de 240,7 mg/100 g de miel y 148,3 mg/100 g de miel, respectivamente de cada país. Por tanto, de acuerdo con sus resultados, se concluye que los países como Argentina o Paraguay, las mieles pueden contener concentraciones mucho mayores con respecto al reporte de las mieles chilenas (Muñoz *et al.*, 2014).

En otras zonas como en Zaragoza, España, se analizaron el contenido de flavonoides totales en 19 muestras de mieles, encontrándose entre 3,55 y 19,95 mg/100g de miel (García, 2018). En Italia, Colucci *et al.* (2016), analizaron tres variedades de mieles monoflorales, reportando un contenido total de flavonoides que variaba entre 0,17 y 8,35 mg/100g de miel. Estos antecedentes evidencian que el contenido de flavonoides en las mieles se ve influenciado por la geografía y el origen biológico de cada una.

Por lo tanto, los compuestos fenólicos presentes en las mieles varían de gran manera según su origen geográfico y botánico. Esto, hace que su estudio sea de gran interés por la alta variabilidad en el perfil organoléptico que pueden generar en el producto y su potencial antioxidante, a pesar de encontrarse en concentraciones bajas. Además, la concentración presente permitiría tipificar las mieles y según esto, generar una mayor variabilidad de hidromieles con distintas características organolépticas y antioxidantes.

### **Aromas primarios de la miel**

Los compuestos orgánicos volátiles presentes en la miel, tales como alcoholes, mono terpenos, compuestos carbonilos, ácidos carboxílicos, ésteres, entre otros, se encuentran en bajas concentraciones (<0,1%). Sin embargo, estos compuestos están presentes en una alta diversidad, la cual varía según cada tipo de miel. Además, la diversidad y la concentración de estos compuestos varían según el origen floral, el procesamiento de la miel y las condiciones de almacenamiento. Estos compuestos son una parte fundamental de la fracción volátil que puede poseer la hidromiel posterior a su fermentación alcohólica (Gianelli *et al.*, 2010; Jerkovic & Ku's, 2014).

Los compuestos aromáticos primarios, permiten una caracterización varietal y poseen fuertes cualidades sensoriales, siendo característicos sus aromas frutales y florales (Carrau *et al.*, 2007). Dentro de la concentración de los terpenos, los monoterpenos y sesquiterpenos son mayoritarios. Los monoterpenos, poseen una mayor influencia aromática. Dentro de este grupo, destacan principalmente el linalol (limón), el geraniol (geranio), el nerol (rosas), el citronelol (rosas), entre otros (Baron *et al.*, 2017).

En la miel, los terpenos volátiles están representados por hemiterpenos, monoterpenos y sesquiterpenos. Estos grupos, son los constituyentes principales de la volatiloma de plantas y aceites esenciales (Jerkovic & Kus, 2014). Estos tipos de terpenos se producen a partir del precursor pirofosfato de 2-isopentenilo (2-IPP), también conocido como pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) y su isómero 3-isopentenil pirofosfato (3-IPP). Además, destaca la

presencia de derivados del linalol como el trans-linalol, linalol, hotrienol, y otros (Jerkovic & Kus, 2014).

Los norisoprenoides (C13) son compuestos aromáticos primarios de alto interés en algunos fermentados. La presencia de norisoprenoides en la miel, depende principalmente de su origen floral. Estos compuestos, son factores prometedores para la identificación de las mieles florales. Sin embargo, su aislamiento se dificulta debido a que la miel es una matriz rica en azúcares (Guyot-Declerck *et al.*, 2000). Se han detectado norisoprenoides tales como la  $\alpha$ -isoforona,  $\beta$ -isoforona, 4-oxoisoforona o  $\beta$ -damascenona, en mieles de trébol blanco (*Trifolium repens*), mieles de madroño (*Arbustus unedo*) y otras especies, junto con la trans- $\beta$ -damascenona en hidromieles de tilo (El-Sayed *et al.*, 2018; Bianchi *et al.*, 2005; Manyi-Loh *et al.*, 2011; Ku's *et al.*, 2022).

Los distintos tipos de mieles pueden tener una amplia gama de aromas primarios los cuales pueden ser traspasados a la hidromiel durante la fermentación alcohólica. Además, según el complejo enzimático que pueda tener la levadura que lleve a cabo el proceso fermentativo, existe la posibilidad que los aromas primarios que se encuentran ligados, se liberen y éstos formen parte del aroma primario de la hidromiel. (Styger *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2016)

Por lo tanto, se hace importante el estudio de la presencia de terpenos, tioles y norisoprenoides en la miel, con la finalidad de conocer el verdadero potencial aromático que podrían tener los distintos tipos de hidromieles en su elaboración con levaduras del tipo No-*Saccharomyces*.

## 2. Antecedentes generales de la producción de hidromiel

La hidromiel, es un producto prácticamente desconocido en Chile y existe poca experiencia en cuanto a su elaboración. Sin embargo, mediante el uso de levaduras del tipo No-*Saccharomyces*, existe la posibilidad de mejorar aromáticamente el producto, hacerlo conocido y aumentar la tendencia de consumo en un público conocedor (Hott, 2015).

A nivel de las características químicas, la concentración de etanol en las hidromieles, varían entre 8% a 18% de etanol (v/v). Esta concentración, depende de la proporción de miel/agua y de la eficiencia de la levadura utilizada en el proceso fermentativo (Socha *et al.*, 2015). Condiciones físicas como la temperatura de fermentación, o condiciones químicas como las fuentes de nitrógeno disponibles en la miel o el tipo de levadura utilizada, pueden modificar las características químicas y gustativas de la hidromiel. Según las variaciones de estos factores, la producción de hidromiel puede verse afectada por paradas de fermentación, concentración de ácido acético, eficiencia de las levaduras, afectando el contenido de alcohol, entre otros (Barrios *et al.*, 2010).

La elaboración de hidromiel requiere tres componentes como materia prima: el agua, la miel y la acción de las levaduras en la fermentación alcohólica (Hott, 2015). Por otra parte, la hidromiel se puede clasificar de acuerdo a la concentración de azúcares residuales en el producto final. En ese caso, la hidromiel con una limitada concentración de azúcares



residuales, se denomina hidromiel “seca”, la cual posee un rango de concentración de azúcares residuales entre 0.990-1.010 g/L. La hidromiel “dulce”, presenta una concentración de azúcares residuales de 1.025-1.050 g/L (Hott, 2015). En cuanto la gasificación presente en algunas hidromieles, se puede elaborar un producto de tipo “espumante” con efervescencia propia o “gasificado”, mediante una gasificación proporcionada artificialmente (Kember *et al.*, 2018). Estos tipos de hidromiel podrían ser potenciados mediante el uso de levaduras *No-Saccharomyces* durante su elaboración, existiendo la posibilidad de mejorar aromáticamente el producto y entregar variaciones químicas, según el tipo de hidromiel que se elabore (Hott, 2015; Kember *et al.*, 2018).

### **Consumo de hidromiel a nivel mundial**

Actualmente, la exigencia de los consumidores se dirige hacia la búsqueda de productos que puedan proporcionar un valor nutritivo y otros componentes con actividad fisiológica. Por tanto, existe un acelerado crecimiento, en cuanto a materia de consumo de productos funcionales, debido a los beneficios saludables que aportan a las personas (Fuentes *et al.*, 2015). Dentro de estos productos, se encuentra la hidromiel, debido a la conservación del *flavor* natural y de las propiedades nutritivas de la miel (Ramírez, 2018).

Dentro de estas propiedades benéficas, se destacan principalmente el contenido de oligosacáridos, que varían en espectro y concentración según cada tipo de miel. Estos compuestos podrían inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos en los consumidores (Al-Qassemi & Robinson, 2003). También, son relevantes sus propiedades antioxidantes, debido a la presencia de flavonoides. Además, posee un contenido considerable de vitaminas del grupo B, C y E (Al-Qassemi & Robinson, 2003). Sin embargo, es importante destacar que la variedad y cantidad de cada uno de estos componentes, puede variar según la procedencia geográfica (suelo y clima), el origen floral y el manejo pre y post cosecha que tenga la miel (Parra *et al.*, 2019). Considerando lo anterior, la hidromiel ocupa un nicho de mercado que va en aumento (FIA, 2008).

Es difícil conocer la demanda exacta de este fermentado a nivel global, debido a que en muchos países existen pequeñas producciones, en su mayoría a nivel artesanal. Sin embargo, en algunos países es posible encontrar altas producciones (FIA, 2008). Se espera que el mercado mundial se desarrolle a medida se modifiquen las preferencias de los consumidores y aumente el consumo de este producto. Durante el año 2021, el mercado mundial de la hidromiel se valoró en USD 475,2 millones y se espera que alcance un valor de USD 1628,3 millones para 2028 (Skyquest, 2022).

Actualmente, Europa constituye la porción más grande del mercado y consumo mundial de hidromiel, principalmente por la creciente popularidad y penetración en el mercado de este producto. Países como el Reino Unido, Italia y Francia son los principales contribuyentes del mercado de hidromiel europeo. Además, la región de América del Norte tendrá la tasa de crecimiento de mercado más rápida, debido al aumento del consumo de alimentos funcionales, una mayor cantidad de empresas manufactureras que se establezcan en el área y una mayor disponibilidad del producto (Skyquest, 2022).

En Chile, este producto es aún muy desconocido, existiendo una producción comercial muy reducida de hidromiel y que son muy poco desarrolladas. Por lo tanto, no existe un mayor seguimiento a éstas (Hott, 2015). Sin embargo, reportes de Díaz (2020), indican que en nuestro país existen más de 15 marcas de hidromiel, las cuales se comercializan a distintas escalas y mediante distintos canales. Además, a nivel nacional, se puede encontrar el producto en tres principales presentaciones, como tipo espumante, como vino (375 y 750 cc.) y como cerveza (330 cc.). Estos productos, presentan distintos grados de dulzor y gasificación, por lo que satisface las necesidades de un amplio rango de consumidores (Díaz, 2020).

Por lo tanto, la hidromiel en Chile al ser un producto poco conocido, no existen grandes espacios ni mercados para su comercialización como en otros países. Sin embargo, el producto posee un alto potencial de mercado debido a que es un producto funcional con un alto valor nutritivo. Además, en Chile existe una alta producción de miel y una alta variabilidad en cuanto a su origen geográfico, por lo que existe la posibilidad de generar productos distintivos y potenciar su consumo interno.

### **3. Proceso de elaboración de la hidromiel**

La hidromiel se obtiene a partir de la fermentación alcohólica de una solución de aguamiel, la cual se produce al diluir la miel en diferentes proporciones. Estas proporciones dependen del tipo de hidromiel y del grado alcohólico probable (GAP) que se requiera obtener en el producto final. Las proporciones de miel:agua más utilizadas son 1:1, 1:2, 1:3 (Ramalhosa *et al.*, 2011).

En el Decreto N°78 de la ley N°18.455 del Servicio Agrícola y Ganadero (2020), sobre la producción, elaboración y comercialización de bebidas alcohólicas, no se especifica una graduación mínima o máxima para la hidromiel. Sin embargo, en Chile se utilizan estas proporciones de miel:agua, con la finalidad de producir distintos tipos de hidromieles. Estas proporciones varían según el dulzor, grado alcohólico probable, tipo de levaduras que se utilizarán y para lograr un proceso fermentativo alcohólico controlable. Además, influye la concentración de azúcares y nitrógeno disponibles para las levaduras, modificando la concentración de compuestos volátiles que se pueden generar durante el proceso fermentativo (Hott,2015).

La mezcla de aguamiel, antes de ser fermentada, debe ser pasteurizada o sulfitada. En el caso de utilizar el proceso de pasteurización, ésta debe ser sometida a una temperatura de 65°C por 10 minutos, para luego ser enfriada rápidamente a temperatura ambiente ( $\approx 20$  °C) (Hernández *et al.* 2014). De esta forma, se evita que las levaduras fermentativas convivan con otros microorganismos y que no existan posibles alteraciones que afecten el perfil organoléptico del producto final.

Martínez *et al.* (2014), indican que previo a la inoculación de las levaduras se deben medir factores químicos tales como a) grados brix (°B), con el fin de conocer la concentración de

solidos solubles y GAP y b) Acidez total y pH, con la finalidad de conocer las condiciones para llevar a cabo la fermentación alcohólica. Tanto los azúcares disponibles como el pH de la solución aguamiel, condicionan la capacidad de adaptación de las levaduras fermentativas y de microorganismos contaminantes. Por lo tanto, según estos factores químicos, las levaduras logran desarrollarse y entregar las características organolépticas deseadas en la hidromiel.

La duración del proceso fermentativo es variable y depende de factores como el tipo de levadura utilizada, pH, nitrógeno disponible para las levaduras, entre otras. Además, éstas mismas condiciones en conjunto con factores físicos como la temperatura pueden provocar paradas de fermentación, haciendo que puedan existir contaminaciones microbianas o producción de compuestos volátiles desagradables como el ácido sulfhídrico (Iglesias *et al.*, 2014). Sin embargo, el proceso fermentativo puede durar desde 11-14 días, hasta 23 días según las condiciones del proceso fermentativo (Hott, 2015; Tapiero *et al.*, 2017; Rodríguez & Rubiano, 2019).

### **Fermentación alcohólica de la hidromiel**

Este proceso puede ser llevado a cabo por las levaduras mediante una estrategia de fermentación espontánea o inducida. En la primera estrategia, la fermentación alcohólica es conducida por las levaduras presentes en la miel de forma natural. En la segunda estrategia, se realizan inoculaciones, donde comúnmente se utilizan levaduras comerciales de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Vasques y Dacosta, 2007).

Durante una fermentación espontánea, actúan una sucesión de microorganismos. Según el origen de la miel, pueden hallarse levaduras banales y principalmente del grupo *Saccharomyces* y *No-Saccharomyces*, siendo éste último considerado un grupo capaz de contaminar el producto final. Sin embargo, esta aseveración ha ido cambiando, debido a nuevas investigaciones sobre la acción de estas levaduras. Actualmente, se conoce que pueden jugar un rol fundamental en la definición de la calidad sensorial del producto final (Maicas, 2020). Debido a esto, este grupo de levaduras ha sido estudiado para poder ser utilizadas en la producción de bebidas fermentadas. Lo mismo ha ocurrido con el proceso de elaboración de hidromiel, donde cada vez, hay mayor el interés por el estudio de la inclusión de levaduras *No-Saccharomyces* en la elaboración de hidromiel, por la posibilidad de mejorar las características aromáticas y modificar factores químicos como el pH o el grado alcohólico (Maicas, 2020).

### **Levaduras fermentativas en la elaboración de hidromiel**

Las levaduras son microorganismos eucariontes unicelulares, a los cuales pertenece una alta variedad de especies. Cada una de estas especies, posee propiedades diferentes en cuanto a su morfología (forma y reproducción), fisiología y biología molecular (Monroy *et al.*, 2016). Además, se pueden encontrar en una amplia variedad de nichos ecológicos, principalmente en agua, suelo, aire, superficie de plantas y frutos, entre otros (Quiñones, 2013). La diversidad y concentración de cada especie en los distintos nichos, es

determinada por factores macro y micro climáticos, como la temperatura, lluvias, exposición a la luz, entre otros (Barata *et al.*, 2012).

La producción de hidromiel se lleva a cabo principalmente con cultivos puros de cepas *Saccharomyces cerevisiae* utilizados en la elaboración del vino o en menor proporción con cepas *Saccharomyces uvarum*. Sin embargo, otro tipo de levaduras podría generar un mejor perfil organoléptico final en las hidromieles, por lo que el uso de cepas aisladas desde la miel suelen ser estudiadas (Ramalhosa *et al.*, 2011; Morales *et al.*, 2013).

Se tiene un alto interés en el estudio del uso de levaduras del tipo No-*Saccharomyces* debido a su alta presencia en medios fermentativos y la posible contribución que este grupo de levaduras puede aportar durante la fermentación alcohólica. Debido a esto, se busca aprovechar sus distintas características metabólicas, con la finalidad de complementar las fermentaciones alcohólicas con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Ocón, 2015).

El conocimiento sobre las levaduras de tipo No-*Saccharomyces*, ha aumentado durante los últimos años. Gracias a esto, se ha llevado a estudiar y utilizar como cultivos iniciadores especies como *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomycoides ludwigii*, *Hansenula anomala*, *Picchia*, *Torulaspota delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, entre otras. Esto, ha permitido evaluar los efectos sobre la calidad que provocan estas distintas especies sobre los fermentados (Escribano *et al.*, 2017).

Una parte del aroma varietal de la hidromiel, puede provenir de precursores inodoros específicos presentes en la miel. Estos precursores pueden ser glucósidos, moléculas polihdroxiladas o derivados de cisteinilo. Por tanto, enzimas tales como, enzimas carbohidrolasas (celulasas, hemicelulasas, amilasas, pectinasas), glucosidadas ( $\beta$ -D apiosidasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -L-rhamnosidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -D-xilosidasa), proteasas, lipasas, descarboxilasas, sulfito reductasas,  $\beta$ -glucanasas o esterases, las cuales pueden ser sintetizadas por las levaduras del tipo No-*Saccharomyces*, lograrían ser un gran aporte al interactuar con estos precursores, liberando compuestos volátiles que mejoren el aroma final. Sin embargo, esta interacción aún no es totalmente conocida en algunos fermentados como la hidromiel (Hernandezorte *et al.*, 2008). Debido a esto, la investigación de las levaduras No-*Saccharomyces* en la elaboración de hidromiel, puede ser un gran avance en cuanto la optimización del proceso fermentativo y mejora de las cualidades gustativas y aromáticas del producto. Por lo tanto, el estudiar el metabolismo de las distintas cepas No-*Saccharomyces* relacionadas con la producción de hidromiel, junto con analizar el perfil volátil de estas, es de vital importancia para comprender el verdadero aporte que este tipo de levaduras puede realizar al perfil organoléptico del producto final.

Uno de los compuestos aromáticos varietales de alto interés son los terpenos. Se pueden encontrar, tanto en estado libre, como ligados principalmente a glucósidos (Zhu *et al.*, 2016). Los terpenos ligados pueden ser liberados durante la fermentación alcohólica por la acción enzimática de algunas levaduras pertenecientes al grupo No-*Saccharomyces*. Estos terpenos al ser liberados, por la acción de la  $\beta$ -glucosidasa, permiten que estén activos aromáticamente y expresarse en el aroma final de la hidromiel producida (Styger *et al.*, 2011). Por lo tanto, existen aromas primarios de la miel que pueden ser liberados durante la fermentación alcohólica, por algunas levaduras No-*Saccharomyces*, permitiendo una

posible mejora aromática de la hidromiel. Considerando esto, la actividad enzimática de las levaduras *No-Saccharomyces*, podrían ser un aporte en la producción de hidromiel elaborada a partir de mieles con altos niveles de humedad (>20%). En este tipo de mieles, se pueden encontrar menores concentraciones de hotrienol, compuesto relacionado con el descriptor aromático a Jacinto. El hotrienol, se deriva de la deshidratación del 7-dimetilocta-1,7-dieno-3,6-diol, el cual se encuentra glucosilado. Por lo tanto, este compuesto, no se encontraría libre y no se expresaría en el perfil aromático del producto final (Jerkovic & Kus, 2014; Lasanta, 2009; García, 2015). La capacidad de liberar el precursor del monoterpeno hotrienol durante la elaboración de hidromiel, podría potenciar notablemente el perfil aromático de las hidromieles. Sin embargo, aún hacen falta estudios sobre la presencia y liberación de compuestos volátiles ligados en la hidromiel.

Otro grupo de compuestos aromáticos primarios, los cuales se pueden encontrar ligados, son los tioles volátiles. De este grupo de compuestos, se tiene interés especial en el 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (aroma a boj y brote de casis), el acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA) (aroma a boj y fruto de la pasión) y el 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) (aroma a boj, cascara de pomelo y fruto de la pasión). En el caso del vino, estos tres tioles son aromas varietales liberados durante la fermentación alcohólica a partir de precursores no olorosos enlazados como la cisteína o el glutatión (Dubourdiou, 2000).

Para el caso del 4MMP y del 3MH, han sido identificadas tres rutas de formación en vinos. La primera vía, es a partir de los precursores cisteinilados S-3-(hexan-1-ol)-cisteína (Cys3MH) y S-3-(4-mercapto-4-metil-2-ona)-cisteína (Cys4MMP), los cuales son escindidos por la levadura con actividad  $\beta$ -liasa durante los primeros días de fermentación. La segunda ruta, implica los precursores glutatiónados S-3-(hexano-1-ol)-glutatión (G3MH) y s-3-(4-mercapto-4-metil-2-ona)-glutatión (G4MMP). Por último, la tercera ruta de formación involucra compuestos insaturados en C6, tal como el (E)-2-hexenal. Estos últimos, reciben un grupo sulfhídrico durante la fermentación alcohólica y la formación del 3MHA se hace por acetilación del 3MH por la levadura. Sin embargo, la tercera ruta de formación aún no ha sido completamente estudiada (Roland *et al.*, 2012).

En el caso de la miel, no se han encontrado registros de estos precursores, por lo que, a pesar de estar presente la enzima  $\beta$ -liasa por parte de la levadura, estos tioles podrían no estar presentes en la hidromiel. Sin embargo, el (E)-2-hexenal ha sido detectado en algunas plantas superiores y podría pasar a la miel mediante el néctar. Debido a esto, se podría llevar a cabo la tercera ruta de síntesis durante la fermentación alcohólica de algunas mieles (Roland *et al.*, 2012; Burdick *et al.*, 2008).

Para la selección de cepas *No-Saccharomyces*, se debe tener en cuenta los distintos parámetros de interés para el desarrollo de la fermentación alcohólica. Estos parámetros pueden ser el potencial fermentativo de la levadura, la capacidad de producción de compuestos volátiles de interés (ésteres, carbonilos, alcoholes superiores, entre otros), el nivel de secreción enzimática, la tolerancia osmótica y de temperatura, el nivel de floculación, entre otras (Casas *et al.*, 2015).

Por lo tanto, una correcta selección de cepas *No-Saccharomyces* para la elaboración de hidromiel puede generar aspectos positivos no solo en el perfil aromático, sino que también

en las características fisicoquímicas. Sin embargo, si estas condiciones no se cumplen, la cepa de levadura podría generar defectos organolépticos o desarrollar un perfil aromático menos intenso en comparación con mono inoculaciones con levaduras *S. cerevisiae*.

### **Modulación aromática de la hidromiel**

La fermentación alcohólica, sobre distintas materias primas, permite la presencia de una amplia diversidad de bebidas alcohólicas alrededor del mundo. Estos productos fermentados, poseen una complejidad organoléptica variada, la cual es apreciada por los distintos grupos de consumidores. Los atributos organolépticos de la hidromiel, son otorgados principalmente por los metabolitos primarios de la miel y por el metabolismo secundario de las levaduras que conducen el proceso de la fermentación alcohólica (Alderete-Tapia *et al.*, 2019).

El aroma tiene una gran importancia en la calidad del producto final, y por lo que, se tiene un alto interés en el estudio de los compuestos volátiles que contribuyen al aroma de la hidromiel (Cacho, 2003). Al momento de evaluar la composición aromática, se debe tener en cuenta si la concentración de los compuestos volátiles permite que sean aromas activos o inactivos. Para esto, se debe cuantificar el parámetro “valor de actividad aromática” (OAV), el cual mide la actividad aromática de cada compuesto en una matriz determinada. El OAV, se calcula como el cociente entre la concentración detectada y el umbral de percepción del compuesto. Los compuestos con un OAV igual o superior a 1, estarán aromáticamente activos, siendo perceptible por los consumidores, impactando en el aroma final del producto (Alarcón, 2016).

El aroma de la hidromiel está compuesto por sus compuestos volátiles de origen primarios y secundarios. Los aromas primarios derivan de la miel y varían según su fuente botánica, del proceso de transformación de las abejas y del procesamiento y almacenamiento de la miel. Han sido identificados más de 300 compuestos volátiles entre los diferentes tipos de miel y estos pueden ser traspasados a la hidromiel durante la fermentación alcohólica, destacando hidrocarburos, aldehídos, alcoholes, cetonas, ácidos, ésteres, norisoprenoides, terpenos y compuestos de azufre, los cuales pueden ser significativos para el perfil aromático del producto final (Pereira *et al.*, 2017)

Los aromas secundarios, son aquellos sintetizados durante la fermentación alcohólica (Rapp y Mandery, 1986). Estos, son de vital importancia para la calidad y distinción de la hidromiel. Las condiciones de fermentación, la(s) cepa(s) de levadura utilizadas, el tipo/composición de la miel y la concentración del inóculo, influyen la producción de compuestos, tales como, ésteres, alcoholes superiores, ácidos grasos, aldehídos, entre otros. Estos compuestos, en conjunto con los compuestos primarios los aromas terciarios, aportados por una posible crianza en barricas, proporcionan el perfil aromático final del fermentado (Rapp y Mandery, 1986; Cedrón, 2004).

En el cuadro 2, se presentan los principales grupos aromáticos de interés en fermentados como la hidromiel, los cuales se generan durante la fermentación alcohólica. Los distintos tipos de levaduras usadas en la fermentación alcohólica de la miel, deben ser capaces de

synthetizar estos grupos aromáticos de interés mediante sus complejos enzimáticos. Por lo tanto, se debe procurar que la materia prima posea los sustratos para synthetizar los aromas de interés.

**Cuadro 2.** Los compuestos volátiles comunes producidos durante la fermentación, asociados con sustratos iniciales, enzimas responsables y descripción aromática genérica (Borren & Tian, 2020).

Compuestos volátiles	Enzimas responsables	Sustratos	Descripción aromática
Ésteres	Esterasa, acetil alcoholtransferasa	Alcohol + ácido	Afrutado, floral
Terpenos	Glicosidasa	Terpenoide glucósidos	Floral, varietal
Alcoholes superiores	Alcohol deshidrogenasa	Aminoácidos	Bajo: Afrutado Alto: etéreo
Fenoles volátiles	Fenol reductasa, descarboxilasa	Ácidos carboxílicos	Bajo: ahumado, tocino Alto: corral, sudoroso
Compuestos que contienen azufre	Azufre liasa, alcohol deshidrogenasa	Aminoácidos, tioles, azufre natural	Sulfito: huevos podridos Tiol: afrutado tropical
Ácidos grasos volátiles	Descarboxilasa, Ácido graso sintasa	Acetil-CoA, malonil-CoA	Vinagre, rancio, picante

**Alcoholes superiores.** Los alcoholes superiores, son compuestos synthetizados a partir del metabolismo de los aminoácidos por parte de las levaduras. Cuantitativamente son el grupo de compuestos aromáticos volátiles más importantes producidos durante la fermentación alcohólica, por lo que, son un grupo de compuestos aromáticos secundarios que ayudan a potenciar el perfil aromático del producto final. Generalmente, las concentraciones de los alcoholes superiores en hidromiel se encuentran por debajo de 300 mg/L, destacando el 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 1-propanol y 2-feniletanol (Hazel Wood *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2017).

En cuanto a la variabilidad de alcoholes superiores en la hidromiel, Chitarrini *et al.* (2020), analizaron la identificación de alcoholes superiores en hidromiel, detectando compuestos tales como el 4-metil-1-pentanol, alcohol isoamilico, isobutanol, 1-octanol, entre otros. Sin embargo, Chitarrini *et al.* (2020), no estudiaron la concentración de los compuestos identificados en las distintas hidromieles. En el caso de Acosta (2012), detectó alcoholes superiores en distintas concentraciones, según la variación de condiciones de la fermentación alcohólica y del tipo de miel. En las distintas hidromieles, el alcohol mayoritario fue alcohol isoamilico con concentraciones entre  $\approx 125$ -220 ppm, con un promedio de 200 ppm. Además, detectó concentraciones de isobutanol entre  $\approx 30$ -50 ppm, 2-etilhexanol entre  $\approx 40$ -500 ppm, alcohol bencílico por debajo de  $\approx 10$  ppm, n-propanol

entre  $\approx 20$ -40 ppm, entre otros, encontrándose en algunas hidromieles elevados contenidos de hexanoles, los cuales se asocian al desarrollo de aromas y sabores amargos (Acosta, 2012).

Por lo tanto, la concentración y variabilidad de los alcoholes superiores en la hidromiel puede variar según el tipo de miel que se utilice y del tipo de aminoácidos presentes. Sin embargo, tal como ocurrió en los hallazgos de Hazel Wood *et al.* (2008), Pereira *et al.* (2017) y de Chitarrini *et al.* (2020), algunos alcoholes superiores pueden generarse de manera común en las hidromieles.

**Ésteres.** Los ésteres son compuestos volátiles que se originan a partir de una reacción entre ácidos grasos orgánicos con etanol (ésteres etílicos) o entre el ácido acético y alcoholes superiores (ésteres de acetato). Estos compuestos pueden aportar notas afrutadas y florales a los fermentados, por lo que juegan un rol fundamental en el perfil aromático de la hidromiel (Moenne, 2008; Chitarrini *et al.*, 2020).

Cuantitativamente, el acetato de etilo (descriptor aromático relacionado con solvente) es el éster más importante en hidromieles elaborados en Portugal, con concentraciones entre 23-53 ppm, Sudáfrica con 17-60 ppm, España con 8-21 ppm y Eslovenia con 14-23 ppm. Sin embargo, ninguna superó el umbral de percepción de 120 ppm. También se han encontrado concentraciones de acetato de isoamilo (aroma a pera) entre 0,2-77 ppm, acetato de 2-feniletilo (aromas a miel, afrutados y florales) entre 0,06-0,9 ppm, butirato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo, relacionados con aromas afrutados y dulces, entre 0,05-5,7 ppm, 0,05-0,39 ppm y 0,05-0,54 ppm respectivamente (Mendez-Ferreira *et al.*, 2010; Roldán, *et al.*, 2011; Šmogrovičová *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2017). La variabilidad en la composición y concentración de ésteres en la hidromiel, dependerá de la cepa de levadura que lleve cabo la fermentación alcohólica, las condiciones de la fermentación alcohólica, el tipo y origen de la miel y la concentración de nitrógeno asimilable por las levaduras. Por tanto, se pueden encontrar concentraciones por sobre el umbral de percepción en compuestos como el hexanoato de etilo u Octanoato de etilo (ambos con un umbral de percepción sobre 0,005 ppm, y aportan aromas florales, dulces o a manzana cocida), ente otros, los cuales aportan positivamente el perfil aromático del producto final (Alcázar, 2011; Pereira *et al.*, 2017).

Twilley *et al.* (2018), observaron que las hidromieles producidas a temperaturas más bajas ( $\approx 12,8$  °C), podrían relacionarse con una mayor concentración de ésteres, incluyendo el etiloctanoato y el etildecanoato. Esto se debería a que mayores temperaturas inducirían una aceleración del metabolismo de las levaduras, junto con la producción de ésteres hasta cierto punto. Además, una mayor temperatura puede disminuir la concentración de ésteres aromáticos deseables mediante un efecto de volatilización. Por otro lado, a mayores temperaturas ( $\approx 23,9$  °C), ésteres como el etiloctanoato y el etildecanoato, podrían disminuir su concentración por efecto de la volatilización (Twilley *et al.*, 2018). En mieles que no poseen las condiciones óptimas (150 mg/L) de nitrógeno asimilable por las levaduras (YAN) para llevar a cabo la fermentación alcohólica, la adición de YAN en distintos momentos del proceso, permite una mayor síntesis ésteres etílicos. Esto se debe, a la mayor concentración de sustrato para la formación de ésteres. Además, la dosificación en las



aplicaciones, permitiría evitar el exceso de YAN al realizar una aplicación única, evitando posibles paradas de fermentación y microorganismos contaminantes (Twilley *et al.*, 2018).

Por lo tanto, el uso de cepas de levaduras No-*Saccharomyces* junto con la temperatura de fermentación y la concentración de nitrógeno asimilable por la levadura, podrían ser un factor clave para desarrollar una mejor evolución aromática de la hidromiel. Además, se debe tener en cuenta el origen y tipo de miel utilizada.

**Ácidos volátiles.** Los ácidos grasos volátiles, generalmente son compuestos que se clasifican en cadena corta (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>), cadena media (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) y cadena larga (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>). Cuantitativa y sensorialmente, el ácido acético suele ser el ácido graso volátil más importante sintetizado durante la fermentación alcohólica. Este ácido en altas concentraciones puede generar un aroma y sabor a vinagre, siendo rechazado en concentraciones entre 0,7-1,1 g/L y es deseable en concentraciones entre 0,2-0,7 g/L (Pereira *et al.*, 2017; Urbina, 2017).

Según reportes de Chitarrini *et al.* (2020), en la hidromiel, el ácido acético, al final de la fermentación alcohólica puede oscilar entre 0,2-0,4 g/L. Sin embargo, se ha reportado que la concentración de ácido acético podría oscilar entre los 0,4-4 g/L, provocando un efecto indeseado en el perfil organoléptico final de la hidromiel (Pereira *et al.*, 2017). Durante la primera semana de la fermentación alcohólica el pH puede disminuir por consecuencia del aumento de la acidez total de hasta 4,5 g/L. Esto se debe principalmente, a la síntesis de ácido acético y ácido succínico entre 0,7-1 g/L y 0,1-0,3 g/L respectivamente y a la baja capacidad amortiguadora del sustrato (Sroka & Tuszyński, 2007; Chitarrini *et al.*, 2020). Por lo tanto, se debe procurar que el o los tipos de levaduras seleccionadas para realizar la fermentación alcohólica de la miel, logre sintetizar una concentración entre 0,2-0,7 g/L. De esta forma, el ácido acético no producirá desviaciones sensoriales indeseadas en la hidromiel y no se reducirá la disociación de ácidos grasos.

Dentro de este grupo aromático, se encuentran los ácidos octanoico, ácido hexanoico, ácido isobutírico, entre otros. Estos compuestos están asociados principalmente a moléculas odorantes relacionados con descriptores a rancio, queso y graso. A nivel general, los ácidos grasos de cadena corta tales como el ácido acético o el ácido isobutírico, tienen una influencia negativa la hidromiel. Esto se debe a que, en concentraciones por sobre su umbral de percepción, generan olores desagradables y en altas concentraciones (4,5-7,5 g/L) pueden tener un efecto de inhibición sobre las levaduras fermentativas. La concentración de estos ácidos depende de la cepa de levadura que se utilice durante el proceso fermentativo y de su metabolismo, junto con el tipo de miel que se utilice. (Pereira *et al.*, 2019; Chitarrini *et al.*, 2020).

Por otro lado, la concentración de ácidos grasos volátiles en hidromieles puede variar según la condición y tipo de levadura. Pereira *et al.* (2019), observó que en una fermentación alcohólica con el mismo tipo de miel y levadura, se sintetizaron mayores concentraciones de ácidos grasos volátiles totales al utilizar levaduras en estado libre (5,25 mg/L) en comparación con levaduras inmovilizadas (4,76 mg/L). Esto podría deberse al aumento en la absorción de sustratos y mejoras en el rendimiento que pueden tener las levaduras

inmovilizadas. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los formatos de levaduras para estos compuestos. Además, según la cepa de levadura utilizada y el método de inoculación, las concentraciones de los ácidos grasos volátiles pueden variar en la hidromiel. Li & Sun (2019), identificaron que inoculaciones con cepas *S. cerevisiae*, *L. thermotolerans*, *S. cerevisiae/ L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae/ T. delbrueckii*, pueden variar significativamente en las concentraciones de ácido octanoico con 13,69 mg/L, 3,9 mg/L, 1,74 mg/L, 4,38 mg/L y 5,17 mg/L respectivamente. Este efecto se genera por la variedad en el metabolismo de los lípidos por parte de las levaduras.

Por lo tanto, la concentración final de ácido acético u otros ácidos grasos volátiles, dependerá de la cepa de levadura que conduzca la fermentación alcohólica, de la composición de la miel y de las condiciones como la temperatura durante el proceso fermentativo. Además, para el uso de cepas No-*Saccharomyces* en la miel, se deben seleccionar cepas que tengan la capacidad de sintetizar concentraciones de ácidos que no aporten olores desagradables al perfil aromático del producto final. Por otro lado, su uso en conjunto con cepas *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica, podría ayudar a controlar la concentración de este tipo de ácidos y a completar el proceso.

**Aldehídos.** Otro grupo de compuestos aromáticos secundarios de importancia, son los aldehídos alifáticos (acetaldehído y diacetilo). El acetaldehído, destaca como compuesto mayoritario, llegando a representar el 90% de este grupo durante la fermentación alcohólica (Escobal, 1999). Los aldehídos pueden ser sintetizados por las levaduras durante la fermentación alcohólica, por reacciones de oxidación durante la maduración o por bacterias lácticas durante la fermentación maloláctica (diacetilo) (CIATEJ, 2016). Sin embargo, durante la fermentación alcohólica, es más común la reducción de los aldehídos a sus alcoholes correspondientes (Escobal, 1999).

En la hidromiel, el acetaldehído puede encontrarse en bajas concentraciones ( $\approx 30$  mg/L), contribuyendo al sabor y aroma. Se asocia principalmente a descriptores aromáticos relacionados a manzana y nuez. En altas concentraciones (sobre  $\approx 100$  mg/L), aporta olores a oxidación al fermentado (Pereira *et al.*, 2019; Echave *et al.*, 2020). En las hidromieles elaboradas con cepas *S. cerevisiae*, se han reportado concentraciones de acetaldehído entre 5-30 mg/L. Sin embargo, en las hidromieles elaboradas a partir de *S. bayanus*, se han detectado concentraciones de acetaldehído de 608 mg/L en hidromieles elaboradas con miel de lima y 1370 mg/L en hidromieles elaboradas con miel de castaño (Pereira *et al.*, 2017). Por lo tanto, además de la cepa de levadura utilizada durante la fermentación alcohólica, el tipo de miel también puede ser un factor que determina la concentración de aldehídos en la hidromiel final.

Varios compuestos del grupo de los aldehídos, tales como el octanal o el decanal, además de estar relacionados con la oxidación del vino o de la hidromiel, pueden proporcionar contribuciones mixtas al aroma. Esto depende del umbral de percepción y la concentración en que estén presentes en el producto final. Así, muchos aldehídos como el octanal, el nonanal o el decanal, los cuales se conocen como compuestos aromáticos deseados, pueden aportar olores desagradables al superar sus umbrales de percepción de 9,3 ng/L, 12ng/L y 3,4 ng/L respectivamente. Esto se produce en condiciones oxidadas, donde estos

compuestos pueden superar con creces su umbral de percepción. Otros aldehídos, como el fenilacetaldehído, el cual posee un umbral de percepción de 1  $\mu\text{g/L}$ , aporta un aroma similar a la miel. Al ser un aroma altamente valorado por los consumidores se hidromiel, este tipo de aldehídos es relevante para mejorar el perfil aromático de los fermentados (Xu *et al.*, 2017; Aragón, 2020; Echave *et al.*, 2020).

Considerando lo expuesto en los apartados anteriores, en la elaboración de hidromiel, se debe tener cuidado con las condiciones de fermentación y posible guarda. Esto se debe a que la síntesis de aldehídos dependerá principalmente del desarrollo metabólico de las levaduras que conduzcan la fermentación alcohólica y de guarda de la hidromiel. Por lo tanto, el producto se debe mantener en condiciones que eviten la oxidación durante la fermentación alcohólica y su almacenamiento. Además, se debe tener una selección de las levaduras y evitar paradas de fermentación, para que la concentración de estos compuestos aporte aromas afrutados que ayuden a potenciar el perfil organoléptico final.

**Fenoles volátiles.** En la elaboración de hidromiel, también se suele prestar atención a la concentración de los fenoles volátiles. Los compuestos más importantes de este grupo, son los etilfenoles, 4-etilguayacol y 4-etilfenol, y los vinilfenoles, 4-vinilguayacol y 4-vinilfenol, siendo reconocidos por sus olores y sabores desagradables asociados a “sudor de caballo”, “establo” o “fármaco” (Pereira *et al.*, 2017). La formación de los fenoles volátiles, se asocia a la actividad de las enzimas cinamato descarboxilasa y vinifenol reductasa provenientes de levaduras del género *Brettanomyces*. Estos compuestos se forman mediante la descarboxilación de los ácidos hidroxicinámicos, tales como el ácido p-cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico (Navascués, 2009; Pereira *et al.*, 2017).

En la hidromiel se han reportado los compuestos 4-vinilfenol y 4-vinilguayacol en concentraciones por debajo de su umbral de percepción, es decir 400  $\mu\text{g/L}$ . Por lo tanto, según el tipo de miel, la levadura utilizada, la concentración del inóculo y disponibilidad de nitrógeno asimilable por las levaduras, podría variar levemente la concentración de estos compuestos en el producto final (Navascués, 2009; Pereira *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014). La concentración de este tipo de compuestos puede ser mayor en hidromieles elaborados con mieles oscuras y en hidromieles suplementadas con YAN, debido a que existe una mayor concentración de precursores aminoácidos para la formación de ácidos hidroxicinámicos. Por otro lado, la cepa de *S. cerevisiae* utilizada, también puede generar diferencias en la concentración de fenoles volátiles, debido a que, pueden sintetizar estos compuestos con una baja actividad enzimática (Hendrik *et al.*, 2005). Sin embargo, la síntesis de estos compuestos por parte de *S. cerevisiae* es baja y no presentan diferencias significativas en hidromiel (Pereira *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2019). Además, a pesar que en reportes de Pereira *et al.* (2014), la condición de la levadura inoculada no presenta diferencias significativas, Pereira *et al.* (2019), observaron una mayor síntesis de fenoles volátiles al inocular el aguamiel con células libres. Sin embargo, en ningún hidromiel la concentración de estos compuestos superó el umbral de percepción.

Ante esto, el perfil aromático de la hidromiel es generado por la concentración y variabilidad de sus compuestos volátiles primarios y secundarios según su OAV y el sinergismo entre ellos. Por lo tanto, el uso de distintos tipos de mieles junto con cepas de levaduras No-*Saccharomyces* para la elaboración de la hidromiel, puede otorgar la

oportunidad de potenciar el perfil aromático final de los distintos tipos de hidromieles. Además, se debe considerar que los compuestos aromáticos de interés estén presentes en concentraciones perceptibles por los consumidores, con la finalidad de que puedan ser un aporte favorable al perfil aromático de la hidromiel.

### **Manejo de inóculos fermentativos en procesos de elaboración de hidromiel**

Las levaduras, son los microorganismos responsables de llevar a cabo la fermentación alcohólica. Por lo tanto, la selección y el manejo de la levadura en procesos fermentativos marcan y potencian las distintas características de los fermentados, tales como el vino, la hidromiel, entre otros, diferenciando atributos gustativos y aromáticos entre un mismo producto (Gutiérrez, 2018).

Las condiciones del sustrato a fermentar influyen la producción de biomasa de las levaduras inoculadas. Para la correcta implantación y desarrollo de éstas, se deben tener en cuenta principalmente factores como el pH, la temperatura, la aireación, la concentración de nitrógeno asimilable, la concentración de azúcares, entre otros. Además, el inóculo debe estar libre de contaminantes y tener las propiedades fermentativas, tecnológicas y sensoriales deseadas para llevar a cabo la fermentación alcohólica (Arévalo, 1998; Arévalo & Arias, 2008; Suárez-Machín *et al.*, 2016; Castilleja *et al.*, 2017). Por lo tanto, estos puntos se deben considerar y son de vital importancia para lograr una correcta implantación de las levaduras con la finalidad de completar el proceso fermentativo y obtener las características deseadas en el producto final.

En la industria enológica y en las producciones de hidromiel, la mayoría de las fermentaciones alcohólicas son realizadas en forma controlada y estandarizada mediante la mono inoculación de levaduras comerciales. Estos cultivos iniciadores son levaduras Secas Activas (LSA), principalmente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Estos cultivos han sido aislados en ambientes vitivinícolas a nivel mundial y que permiten obtener las diversas características en el producto (Martín *et al.*, 2017).

En la actualidad, existen diversas estrategias de inoculación. El método tradicional, es de mono inoculación de la levadura de la especie *S. cerevisiae*, la cual lleva a cabo la fermentación alcohólica. No obstante, existen nuevas estrategias tales como la inoculación secuencial y co-inoculaciones, las cuales implican el uso de levaduras No-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*. Estas estrategias se han aplicado principalmente en industrias como la cervecera o la enológica (Lambert, 2017; Malakar *et al.* 2020).

La estrategia de inoculación secuencial, involucra la inoculación de una levadura No-*Saccharomyces* y una *Saccharomyces cerevisiae* en distintas etapas del proceso fermentativo, es decir, las inoculaciones se realizan con una diferencia de 24 a 48 h entre las inoculaciones de levaduras. En primer lugar se inocula la levadura No-*Saccharomyces* principalmente por su bajo poder fermentativo. A continuación, se inocula la levadura *S. cerevisiae* con el objetivo de terminar el proceso fermentativo y evitar competencias entre ellas. El objetivo de esta estrategia, es revelar el potencial aromático de la materia prima y favorecer la diversidad de compuestos volátiles, gracias a las distintas baterías enzimáticas

de las levaduras. La estrategia de co-inoculación, también involucra más de una especie de levadura, con la diferencia que éstas son inoculadas en un solo momento de la fermentación alcohólica. Esta estrategia se realiza con el objetivo de evitar microorganismos contaminantes, acortar el proceso fermentativo, mejorar la eficiencia en la elaboración del producto, y producir efectos organolépticos favorables (Cañas *et al.*, 2014; Lambert, 2017; Malakar *et al.* 2020).

El efecto sobre el producto final por parte de estas estrategias de inoculación, dependerá de la cepa de levadura No-*Saccharomyces* que se utilice. Por tanto, se hace necesario analizar y estudiar la dinámica poblacional, junto con el posible impacto que la levadura tendrá en el perfil de compuestos volátiles y su influencia en el perfil sensorial (Santos, 2016). Es por esto, que el estudio del metabolismo de la levadura sobre el sustrato a utilizar es de vital importancia para comprobar la efectividad sobre las mejoras aromáticas del producto final.

Estas estrategias de inoculación han sido estudiadas y actualmente se están aplicando en la elaboración del vino con buenos resultados (Raynal *et al.*, 2011). Entre los géneros más comunes para la aplicación de estas estrategias están *Torulaspora*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* y otros. Según la levadura, ésta puede tener la capacidad de revelar la tipicidad sensorial, por la pureza de su perfil fermentativo y hasta puede corregir algunos defectos como la acidez volátil (Raynal *et al.*, 2011). Por lo tanto, el uso de estas estrategias de inoculación en la elaboración de hidromiel, podrían dar resultados similares, dando la posibilidad de potenciar el consumo de hidromiel mediante la elaboración de productos distintivos.

La investigación y la aplicación del uso de estas estrategias de inoculación en la elaboración de hidromiel son aún muy escasas. Por tanto, ante la oportunidad de mejorar la calidad aromática en los fermentados, se hace necesario el análisis del uso de estas estrategias de inoculación con levaduras No-*Saccharomyces* en otros fermentados como la hidromiel, donde su investigación no ha sido tan intensa. Reynal *et al.* (2011), realizaron estrategias de inoculaciones secuenciales con cultivos seleccionados de *Torulaspora delbrueckii* /*S. cerevisiae* para la elaboración de vino. En cuanto a las diferencias fisicoquímicas, se apreció una diferencia significativa en la concentración de acidez volátil, donde la inoculación secuencial obtuvo concentraciones menores en comparación al control. Sin embargo, ninguna inoculación superó los 0,23 g/L. Además, se evidenció la sinergia de los dos inóculos en la complejidad e intensidad aromática. Al aplicar una inoculación secuencial, se apreció una mayor concentración de ésteres tales como el caprilato (octanoato) de etilo (aroma a piña, pera), el 2-metil butirato de etilo (aroma a fruta fresca, arándano), entre otros, junto con una mayor concentración de terpenos como el 2 feniletanol (aroma a rosa) y linalol (aromas a cítrico, rosa). Estas concentraciones influenciaron una preferencia significativa sobre el vino elaborado con la inoculación secuencial por parte de un jurado de consumidores. Estos resultados podrían indicar que el uso de esta estrategia y una cepa adecuada de una levadura No-*Saccharomyces*, también podría tener un efecto positivo en la elaboración de hidromiel. Teniendo en cuenta que la miel posee una alta concentración de azúcares, el complejo enzimático de las levaduras No-*Saccharomyces*, podría ser efectivo en la reducción del grado alcohólico en la hidromiel. Además, se podría generar una mayor síntesis de ésteres y terpenos durante el proceso fermentativo. Sin embargo, se deben tener en cuenta factores como la nutrición y tipo de

miel, junto con factores físicos como la temperatura o la aireación, para que el complejo enzimático de las levaduras pueda actuar de la misma forma.

En otro estudio para la elaboración de vino, Vaquero *et al.* (2021), realizaron fermentaciones alcohólicas con inoculaciones secuenciales e inoculaciones ternarias con co-inoculaciones e inoculaciones secuenciales. En las distintas inoculaciones se utilizaron cepas *L. thermotolerans*, *H. vineae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* y *S. cerevisiae*, con la finalidad de analizar la biocompatibilidad entre las distintas especies de levadura y su capacidad de modificar el perfil aromático mediante distintas estrategias de inoculación. Vaquero *et al.* (2021), observaron que, según la estrategia de inoculación y las cepas de levadura utilizadas, se obtuvieron distintas concentraciones de alcohol. La inoculación secuencial con *H. vineae* /*S. cerevisiae* obtuvo la menor concentración de alcohol (10,57% v/v) en comparación al control (11,63 % v/v). En cuanto al pH, la co-inoculación de *L. thermotolerans*/*M. pulcherrima* seguida de *S. cerevisiae*, logró el mayor aumento de acidez en comparación al control. Sin embargo, otras estrategias de inoculación y cepas de levaduras mostraron un efecto contrario. Además, en el análisis del perfil sensorial, en todas las muestras se encontraron alcoholes superiores por debajo de los 300 mg/L, encontrándose por debajo del umbral que provoca aromas “irritantes”. Sin embargo, se lograron percibir aromas afrutados. En el caso de los ésteres totales, todas las fermentaciones que involucraban a *L. thermotolerans*, presentaron una mayor cantidad de ésteres aromáticos en comparación al control.

Tanto Reynal *et al.* (2011) como Vaquero *et al.* (2021), observaron que el uso de estas estrategias, en una inoculación secuencial o co-inoculaciones, tuvieron efecto sobre características fisicoquímicas como el pH y el % de alcohol (v/v). En ambos casos, lograron observar una disminución en el grado alcohólico, un aumento en la acidez total y mejoras en el perfil aromático final con el uso de inóculos de *L. thermotolerans* en distintas estrategias de inoculación. Sin embargo, estos resultados solo deben ser usados como referencia para la elaboración de hidromiel, debido a que, la composición química de la mezcla de aguamiel y mosto son completamente diferentes. No obstante, este tipo de inoculaciones podrían ser utilizadas para la investigación de hidromiel, considerando el favorable complejo enzimático que poseen algunas especies de levaduras No-*Saccharomyces*. A pesar que la matriz de la miel es distinta al del mosto de uva, las levaduras podrían llevar a cabo la fermentación alcohólica de manera similar si se tiene en cuenta las condiciones físicas como la temperatura y la aireación, junto con las condiciones químicas como la concentración de nitrógeno asimilable o la concentración de azúcares.

Según estos antecedentes, el uso de estas estrategias de inoculación junto con el uso de levaduras No-*Saccharomyces*, pueden facilitar una acidificación efectiva y reducción del porcentaje de alcohol (v/v), junto con un perfil aromático más complejo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos resultados podrían tener variaciones según las cepas de levaduras No-*Saccharomyces* que se utilicen, la biocompatibilidad entre las levaduras y el tipo de miel.

Por lo tanto, aún es necesaria la investigación y la aplicación de estas estrategias en la elaboración de hidromiel. De esta forma, se podría conocer el real aporte de este tipo de levaduras en su elaboración y observar si el complejo enzimático de las levaduras se

desarrolla de forma similar que, en la elaboración de vinos, modificando las cualidades químicas del producto y sintetizado una mayor concentración y variedad de ésteres y terpenos.

### **Elaboración de hidromiel con levaduras *No-Saccharomyces***

La diferencia en la composición y concentración de los compuestos aromáticos de las hidromieles, es determinada por una actividad metabólica específica del tipo de levadura que se utilice para su elaboración. Existe una variabilidad significativa de levaduras, por lo que se pueden generar aspectos positivos o negativos en el producto final (Romano *et al.*, 2003).

Para que las levaduras puedan completar la fermentación alcohólica y sintetizar los compuestos volátiles y no volátiles de interés, es necesario asegurar un medio rico en nitrógeno asimilable, azúcares, minerales, entre otros (Mas *et al.*, 2013). La concentración de YAN (150 mg/L) es relevante debido a que permiten la reproducción de las levaduras. Además, fuentes nitrogenadas como amonio y aminoácidos, son precursores aromáticos, influenciando las características organolépticas del producto final (Mas *et al.*, 2013).

En este sentido, Pereira *et al.* (2015), evaluaron los efectos de la adición de nitrógeno asimilable (YAN) a la mezcla de aguamiel, para llevar a cabo la elaboración de hidromiel con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* comerciales. Para esto, realizaron un ajuste a 267 mg/L de YAN con fostato diamónico (DAP). El contenido de etanol en las hidromieles vario entre 10-10,5% (v/v) y se observó que la suplementación de nitrógeno aumentó las tasas de fermentación. Sin embargo, se obtuvieron concentraciones similares de azúcares residuales (40 g/L), siendo éstos, azúcares no fermentables como la trehalosa o la sacarosa. Al evaluar el perfil aromático, no se observaron diferencias significativas en la producción de alcoholes superiores, encontrándose concentraciones por debajo de los 300 mg/L en todas las hidromieles. En cuanto a la concentración de ésteres totales, se hallaron concentraciones de  $\approx 2,8$  mg/L y  $\approx 2$  mg/L en hidromieles suplementadas, versus  $\approx 3,8$  mg/L y  $\approx 2,4$  mg/L respectivamente. Por último, la hidromiel suplementada obtuvo mayores concentraciones de ácidos grasos, sin embargo, ninguno superó el umbral de percepción. Por otro lado, reportes de Mendes-Ferreira *et al.* (2010), obtuvieron resultados similares en cuanto al contenido y concentración de azúcares residuales en hidromieles suplementadas con 1,015 g/L y 300 mg/L de DAP. Además, la suplementación fue capaz de reducir el tiempo para completar la fermentación alcohólica, finalizando con concentraciones de etanol entre 10,7-11,4% (v/v), sin diferencias significativas entre ellas.

Teniendo en cuenta los resultados de Pereira *et al.* (2014) y Mendes-Ferreira *et al.* (2010), la suplementación nitrogenada podría no ser necesaria para completar y llevar a cabo la fermentación alcohólica de la hidromiel. Sin embargo, considerando los antecedentes de Pereira *et al.* (2009), estos resultados podrían discrepar según el tipo de miel. Esto se debe a que la fermentación alcohólica de mieles claras, las cuales pueden poseer una menor concentración de nitrógeno en comparación a mieles oscuras, pueden tener dificultades para completar el proceso fermentativo, independiente del tipo de levadura utilizado. Por lo tanto, para llevar a cabo la fermentación alcohólica de la miel, se debe considerar el inóculo

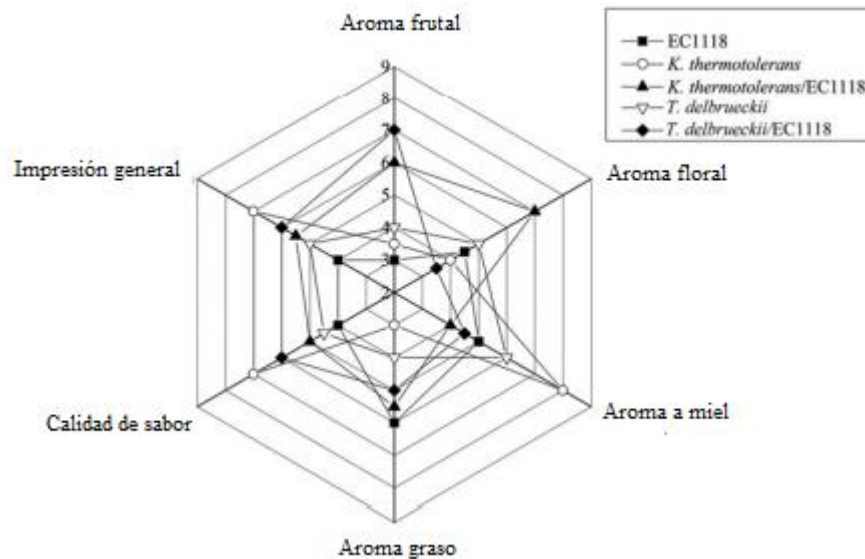
de levadura y el tipo y cualidades de la miel a fermentar. Esto con la finalidad de completar el proceso fermentativo y lograr el perfil aromático deseable, evitando la producción de compuestos que generen olores desagradables.

Como se ha discutido, el perfil organoléptico final de la hidromiel es determinado en gran parte por el metabolismo de las levaduras y el tipo de miel que se utilice para la fermentación alcohólica, también puede influir en las características organolépticas del producto final. Reportes de Li & Sun (2019), indican que la variedad de miel puede tener un efecto significativo sobre los distintos compuestos volátiles al utilizar la misma levadura durante su fermentación (*S. cerevisiae*). Estos investigadores identificaron 66 compuestos volátiles, de los cuales, sólo 43 compuestos pudieron identificarse en todas las muestras analizadas (miel de vitex, acacia, multifloral, de tilo y azufaifo). Los distintos tipos de mieles mostraron diferencias significativas entre las concentraciones y tipos de alcoholes, ésteres e influencia sobre los ácidos volátiles de todas las hidromieles. Por lo tanto, se podría concluir que el metabolismo de las distintas levaduras durante la fermentación alcohólica, no es el único factor que determina el perfil aromático final de la hidromiel. El tipo de miel que se utilice puede ser un factor esencial, debido a que, dependiendo de la zona, manejos y origen botánico de la miel, la composición y concentración de los compuestos volátiles primarios puede variar. Según estos factores, se pueden obtener perfiles aromáticos y gustativos completamente diferentes entre cada hidromiel. Además, estos antecedentes demuestran que, aunque se estudie una cepa de levadura No-*Saccharomyces* para la elaboración de hidromiel, esta no se desarrollará de la misma forma durante la fermentación alcohólica, ni sintetizará el mismo perfil aromático en todas las mieles.

Por otro lado, para estudiar el efecto de las levaduras No-*Saccharomyces* en hidromiel, Li & Sun (2019), analizaron el efecto de este tipo de levaduras sobre los parámetros fisicoquímicos y sobre la composición y concentración de distintos compuestos volátiles en la elaboración de hidromiel de vitex. Esto se llevó a cabo mediante mono inoculaciones con levaduras *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* e inoculaciones secuenciales con *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* y *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae*. En cuanto a las características fisicoquímicas de las hidromieles, la concentración de alcohol (v/v) varió entre 12,73% con la inoculación secuencial de *L.thermotolerans*/*S. cerevisiae* y 11,47% en la inoculación con *S. cerevisiae*. Las mono inoculaciones con *T.delbrueckii* y *L.thermotolerans*, obtuvieron los pH más alto y bajo con 2,89 y 2,78 respectivamente. Además, la hidromiel elaborada con *S. cerevisiae* obtuvo la acidez volátil más alta con 0,97 g/L y el mayor porcentaje de azúcar residual con 5,63%. En el caso contrario, la acidez volátil más baja y el menor porcentaje de azúcar residual se obtuvo en la hidromiel elaborada con la inoculación secuencial de *L.thermotolerans*/*S. cerevisiae* con 0,72 g/L y 4,07% respectivamente. En relación a la composición volátil, de los 96 compuestos volátiles identificados en las hidromieles, solamente 36 se encontraban en todas las muestras con variabilidad en su concentración. La concentración más alta de alcoholes superiores fue hallada en la fermentación con *T. delbrueckii* (76,97 mg/L), seguido de *T. delbrueckii* / *S.cerevisiae* (67,04 mg/L). En el caso de los ésteres, la mayor concentración fue sintetizada en la hidromiel elaborada con *S.cerevisiae*, seguida de *T. delbrueckii* / *S.cerevisiae*. En la figura 2, se muestran los puntajes promedio del análisis sensorial realizado a las hidromieles de vitex. Los resultados evidenciaron que los seis descriptores



utilizados fueron significativamente diferentes. En el caso de la inoculación únicamente con *L. thermotolerans*, se puntuó alto y significativamente diferente en aroma a miel, calidad del sabor, y atributos de impresión general en comparación con las otras muestras. Además, los aromas afrutados de la hidromiel elaborada con inoculación secuencial de *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*, obtuvieron puntuaciones altas y significativamente diferentes. En el caso de la hidromiel elaborada únicamente con *S. cerevisiae*, obtuvo una alta puntuación en el descriptor aromático “graso”. Esto es debido al alto contenido de octanoato de etilo, decanoato de etilo, dodecanoato de etilo y ácido octanoico presentes en esta hidromiel, teniendo un aroma a "jabón" y "cera de vela", junto con sabores a “aceitoso y “graso”.



**Figura 2.** Evaluación sensorial de las hidromieles fermentadas por distintas especies de levaduras. Calificaciones promedio evaluadas en una escala no estructurada de 10 puntos (Li & Sun, 2019).

Por lo tanto, independiente de la estrategia de inoculación, ninguna cepa de levadura No-*Saccharomyces* tuvo problemas para completar el proceso fermentativo. Sin embargo, ninguna estrategia de inoculación con cepas No-*Saccharomyces* fue capaz de reducir la concentración de alcohol en comparación al control. Esto podría generar una menor preferencia por parte de los consumidores hacia las hidromieles elaboradas con cepas No-*Saccharomyces*. La acidez volátil de las todas las hidromieles elaboradas con cepas No-*Saccharomyces* fue menor que en el control. Sin embargo, todas las hidromieles poseen una concentración alta según el rango de ácido acético indicado por Pereira *et al.* (2017). Según este factor, la inoculación secuencial con *L.thermotolerans*/*S. cerevisiae* sería la más adecuada para la elaboración de hidromiel de vitex. Además, solo *L. thermotolerans* y *L.thermotolerans*/*S. cerevisiae* fueron capaces de aumentar la acidez natural de las hidromieles. En cuanto a la composición volátil, independiente de la estrategia de inoculación, todas las cepas No-*Saccharomyces* utilizadas, potenciaron los aromas florales debido a la mayor síntesis de alcoholes superiores, los cuales se encontraron por debajo de los 400 mg/L. Además, la concentración de los alcoholes isopentanol y alcohol  $\alpha$ -feniletil, los cuales sobre su umbral, se describen con aromas a alcohol, dulce, esmalte de uñas, rosas

y miel, fueron significativamente más alto en la hidromiel de *T. delbrueckii*. Por otro lado, todos los ésteres se encontraron por sobre su umbral de percepción. La variabilidad y concentraciones de ésteres difieren a las encontradas por Pereira *et al.* (2017), principalmente por el efecto de la miel y la cepa de levadura. Por lo tanto, a pesar que la concentración total de estos ésteres sea menor con respecto a *S. cerevisiae*, estos se encuentran por sobre su OAV, potenciando los aromas frutales y florales de las distintas hidromieles. Además, entre los ácidos volátiles sintetizados, se encontró el ácido octanoico (aromas rancios y queso) y el ácido hexanoico (aromas a hierba) únicamente en la hidromiel elaborada con la mono inoculación de *S. cerevisiae*, lo que podría generar un rechazo por parte de los consumidores. En la evaluación sensorial, las hidromieles elaboradas con levaduras No-*Saccharomyces* fueron bien evaluadas. Si bien, la hidromiel elaborada a partir de una mono inoculación con *T. delbrueckii*, tuvo la menor concentración y variabilidad de compuestos volátiles en comparación al resto, fue la hidromiel mejor evaluada. Además, se puede observar que las inoculaciones secuenciales con *L. thermotolerans*/ *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*/ *S. cerevisiae*, potenciaron los aromas frutales y florales de los hidromieles, obteniendo mayores puntajes en impresión general y calidad del sabor en comparación con el control.

Por lo tanto, las cepas No-*Saccharomyces* utilizadas por Li & Sun, (2019), fueron adecuadas para llevar a cabo la fermentación alcohólica de la hidromiel de vitex, tanto en mono inoculaciones como en inoculaciones secuenciales. Se debe considerar que, a pesar que estas cepas no obtuvieron la mayor concentración de compuestos volátiles totales, si lograron potenciar el perfil aromático final mediante la mejora de aromas florales y frutales. Estas cepas de levaduras pueden complejizar la concentración de alcoholes superiores y ésteres. Sin embargo, se debe tener en cuenta el tipo de miel que se utiliza para la fermentación.

Con la finalidad de impulsar la innovación en la producción de hidromiel con material microbiológico autóctono, Barry *et al.* (2018), realizaron un análisis fisicoquímico y sensorial a hidromieles elaboradas con miel multiflora originaria de E.E.U.U. Para esta investigación, se utilizaron dos cepas *T. delbrueckii*, aisladas desde el grupo de microorganismos presentes en abejas melíferas y una *Hanseniaspora vineae*. Las fermentaciones de hidromiel se llevaron a cabo mediante mono inoculaciones con cepas de *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* (a), *T. delbrueckii* (b) y *H. vineae* y una co-inoculación con ambas cepas de *T. delbrueckii* (a y b). En cuanto a las características fisicoquímicas, se obtuvieron resultados similares con respecto al control a excepción de la inoculación con *H. vineae*. La mayor concentración de etanol (v/v) se obtuvo en la mono inoculación con *S. cerevisiae* y la levadura (a) con 11,5% y la menor concentración se obtuvo en la hidromiel elaborada con *H. vineae* con 8,2%. En cuanto al pH, todas las levaduras lograron aumentar la acidez natural en comparación al control. El mayor y menor pH lo obtuvieron las hidromieles mono inoculadas con *S. cerevisiae* y *H. vineae*, con 4,25 y 3,1 respectivamente. En la evaluación sensorial, las hidromieles mono inoculadas con las cepas de *T. delbrueckii*, obtuvieron una puntuación más alta en comparación al control con *S. cerevisiae*. Sin embargo, esto no significó que las hidromieles se prefieran de manera significativa. Además, a pesar que las hidromieles de *T. delbrueckii* poseían un nivel de alcohol similar a la de *S. cerevisiae*, esta última destacó por tener un “ardor” de etanol muy fuerte, el cual era enmascarado de forma agradable por las cepas *T. delbrueckii*. La

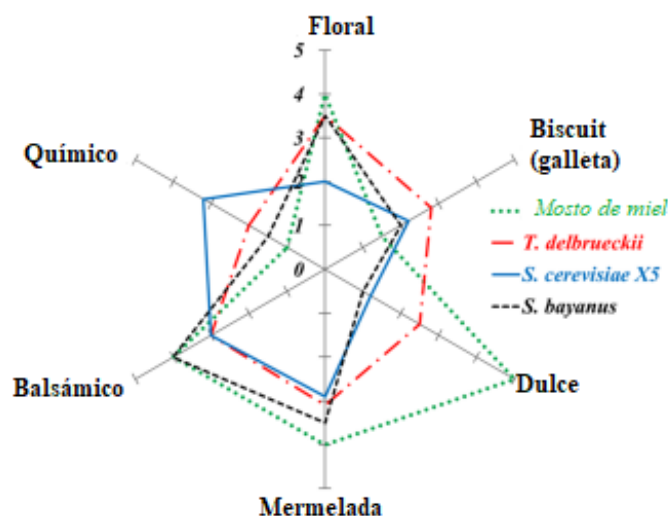
hidromiel elaborada a partir de la cepa *H. vineae*, fue la mejor evaluada en casi todas las categorías, destacando por sus aroma a melocotón, agradable final ácido y buen equilibrio.

En consecuencia, los resultados expuestos por Barry *et al.* (2018), concuerdan con la alta capacidad fermentativa que pueden tener las cepas de la especie *T. delbrueckii* reportadas por Burini *et al.* (2021) en la elaboración de cerveza y por Li & Sun (2019) en la elaboración de hidromiel. Además, a pesar que *H. vineae* sintetizó solo 8,2% de alcohol (v/v), se encuentra dentro del rango que pueden poseer las hidromieles definido por Socha *et al.* (2015). Por lo tanto, en cuanto a la capacidad fermentativa, estas tres cepas No-*Saccharomyces* serían adecuadas para la producción de hidromiel. Además las fermentaciones con las levaduras *T. delbrueckii*, fueron capaces de aumentar la acidez natural de las hidromieles en comparación al control. Este resultado discrepa con los antecedentes presentados por Li & Sun (2019), quien utilizó levaduras de la misma especie en la fermentación alcohólica de mieles de vitex. Por esto, se debe considerar que, aunque la especie de levadura sea la misma, las cepas poseen un metabolismo distinto, el cual se desarrollara según el tipo de miel que se utilice. Además, la cepa *H. vineae*, aumentó considerablemente la acidez natural de la hidromiel, obteniendo un pH de 3,1. Esta especie de levadura suele destacarse por su alta producción de ácido láctico durante la fermentación alcohólica, tal cual como lo reporta Osburn *et al.* (2018) en la elaboración de cerveza. El análisis sensorial demostró que las levaduras *T. delbrueckii* fueron capaces de aumentar el *flavor* de los hidromieles en mono inoculaciones. Además, la hidromiel fermentada con una estrategia de co-inoculación con ambas cepas (a y b), obtuvo una alta puntuación en aroma, pero con sabores a hierbas que eran desagradables para algunos consumidores. Sin embargo, todas los hidromieles recibieron una calificación de “estándar”, a diferencia de la hidromiel elaborada con la cepa *H. vineae*, la cual se clasificó como una hidromiel “superior”. Por tanto, los consumidores en general, podrían preferir hidromieles que poseen una menor graduación alcohólica, una mayor acidez natural y mayores porcentajes de azúcares residuales (hidromieles dulces). Ante esto, las cepas No-*Saccharomyces* utilizadas en este estudio podrían ser buenas candidatas para una posterior investigación que involucre inoculaciones secuenciales con cepas *S. cerevisiae* en la elaboración de hidromiel. Además, la realización de un análisis de la concentración y detección de compuestos volátiles podría ser ideal para poder establecer una relación con las puntuaciones otorgadas por el panel sensorial.

Si bien, el nivel de investigación de cepas No-*Saccharomyces* es reducida en fermentaciones alcohólicas de miel, *T. delbrueckii* es una de las especies más utilizadas para el estudio de este tipo de levaduras. Sottit *et al.* (2019), investigaron el efecto sobre el perfil de los compuestos aromáticos y propiedades organolépticas de hidromieles elaboradas a partir de una miel multiflora de Málaga. Para aquello, se llevaron a cabo mono inoculaciones con cepas *T. delbrueckii*, *S. bayanus* y *S. cerevisiae* utilizadas en la elaboración de vino. Ambas levaduras *Saccharomyces* obtuvieron una mayor concentración de etanol ( $\approx 10.5\%$  (v/v)), en comparación a la cepa *T. delbrueckii* (8,5% v/v). Además, tanto *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* lograron aumentar  $\approx 2$  g de ácido tartárico/L, reflejándose en una reducción del pH, obteniendo valores de 3,9 y 3,8 respectivamente. En cuanto a los compuestos volátiles, la hidromiel elaborada con *T. delbrueckii* alcanzó 299 mg/L de alcoholes superiores, destacando por su mayor concentración de 2-feniletanol, el cual se asocia con un agradable olor a rosa. En el caso de los ésteres, el succinato de dietilo

(aroma a alcanfor), seguido del acetato de etilo, fueron los compuestos mayoritarios en las tres inoculaciones y sintetizados en niveles más altos por la levadura *T. delbrueckii*.

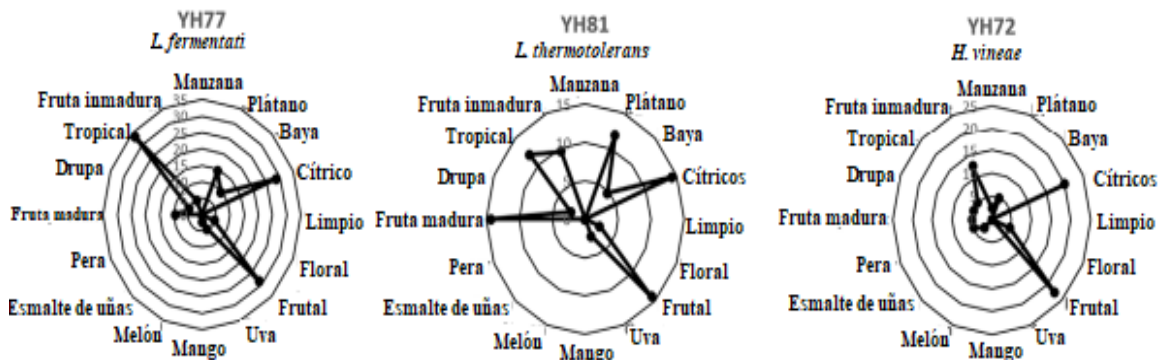
En la figura 3, se aprecia el perfil aromático establecido en la evaluación sensorial, en el cual, todas las hidromieles conservaron los aromas primarios de la miel, según la percepción de los evaluadores. Además, los evaluadores consideraron que los tres tipos de hidromieles eran productos correctamente equilibrados. Sin embargo, la hidromiel elaborada con *T. delbrueckii*, fue la mejor evaluada por su sabor más dulce y aromas florales, afrutados y de mermelada, los cuales son factores muy demandados por los consumidores de hidromiel (Sottit *et al.*, 2019)



**Figura 3.** Evaluación sensorial en escala de 1 a 5 de mosto de miel e hidromieles fermentadas por 3 cepas de levaduras: *T. delbrueckii*, *S. sereviciae* y *S. bayanus* (Sottit *et al.*, 2019).

Los resultados expuestos por Sottit *et al.* (2019), en cuanto a la concentración de etanol por parte de la cepa *T. delbrueckii*, se encuentra por debajo de lo evidenciado por los autores Li & Sun (2019) y Barry *et al.* (2018) en la elaboración de hidromiel con levaduras de la misma especie. Sin embargo, la cepa *T. delbrueckii* completo la fermentación alcohólica de la miel sin inconvenientes. El efecto de acidificación de la cepa *T. delbrueckii*, fue similar al reportado por Li & Sun (2019) y fue menor a los antecedentes presentados por Barry *et al.* (2018). La concentración de alcoholes superiores, concuerdan con los reportes de Li & Sun (2019), donde cepas de *T. delbrueckii* pueden tener una alta capacidad de sintetizar estos compuestos durante la fermentación alcohólica, potenciando perfil aromático de las hidromieles. Además, también encontraron una mayor concentración de 2-feniletanol, en comparación a *S. cerevisiae*, mejorando el perfil aromático de la hidromiel. Por lo tanto, la cepa *T. delbrueckii* utilizada en el estudio de Sottit *et al.* (2019), es idónea para la elaboración de hidromiel por sus cualidades químicas, aromáticas y sabor dulce. Sin embargo, esto puede darse únicamente en la miel multiflora utilizada en este estudio. Además, a futuro se puede utilizar esta cepa en estrategias de inoculación secuencial, teniendo la posibilidad de potenciar las cualidades apreciadas por los evaluadores.

Durante la presente investigación, se ha observado que en los distintos estudios de elaboración de hidromiel, los paneles sensoriales y consumidores inclinan su preferencia hacia hidromieles dulces. Sin embargo, las hidromieles amargas han adquirido popularidad en la fabricación moderna de este producto (Peepall *et al.*, 2019). Ante esto, Peepall *et al.* (2019), estudiaron los parámetros fisicoquímicos y organolépticos en la elaboración de hidromiel con una miel de trébol originaria de Lancaster. Para su elaboración, llevaron a cabo distintas mono inoculaciones con 13 cepas productoras de ácido láctico, entre las cuales se utilizaron: 2 cepas de control (*S. cerevisiae*), 7 cepas *L. thermotolerans*, una cepa *Hanseniospora vineae*, una *Lachacea fermentati*, una *Wickerhamomyces anomalu* y una cepa *Schizosaccharomyces japonicus*. Se observó que todas las hidromieles sintetizaron una menor concentración de etanol en comparación a los controles. La mayor concentración se obtuvo con la levadura *L. thermotolerans* (10,2%) y la menor con *H. vineae* (4,2%). Para los valores de pH, 3 levaduras *L. thermotolerans* lograron los mayores aumentos de acidez, obteniendo pH entre 3-3,02. En la evaluación sensorial, las tres hidromieles mejor evaluadas fueron inoculadas con *L. fermentati*, *L. thermotolerans* y *H. vineae* respectivamente. A pesar que, no se realizó un estudio analítico y cuantitativo de los compuestos, los analistas sensoriales puntuaron los ésteres aromáticos mediante los siguientes descriptores: manzana, plátano, baya, cítricos, limpio, floral, afrutado, uva, mango, melón, esmalte de uñas, pera, fruta madura, tropical, drupa y fruta inmadura. A pesar de esto, al no existir un análisis cromatográfico, no se puede relacionar directamente estos aromas con la presencia de los ésteres sintetizados por las levaduras. A continuación, en la figura 4, se presenta la puntuación de los ésteres aromáticos que obtuvieron los tres mejores hidromieles evaluados.

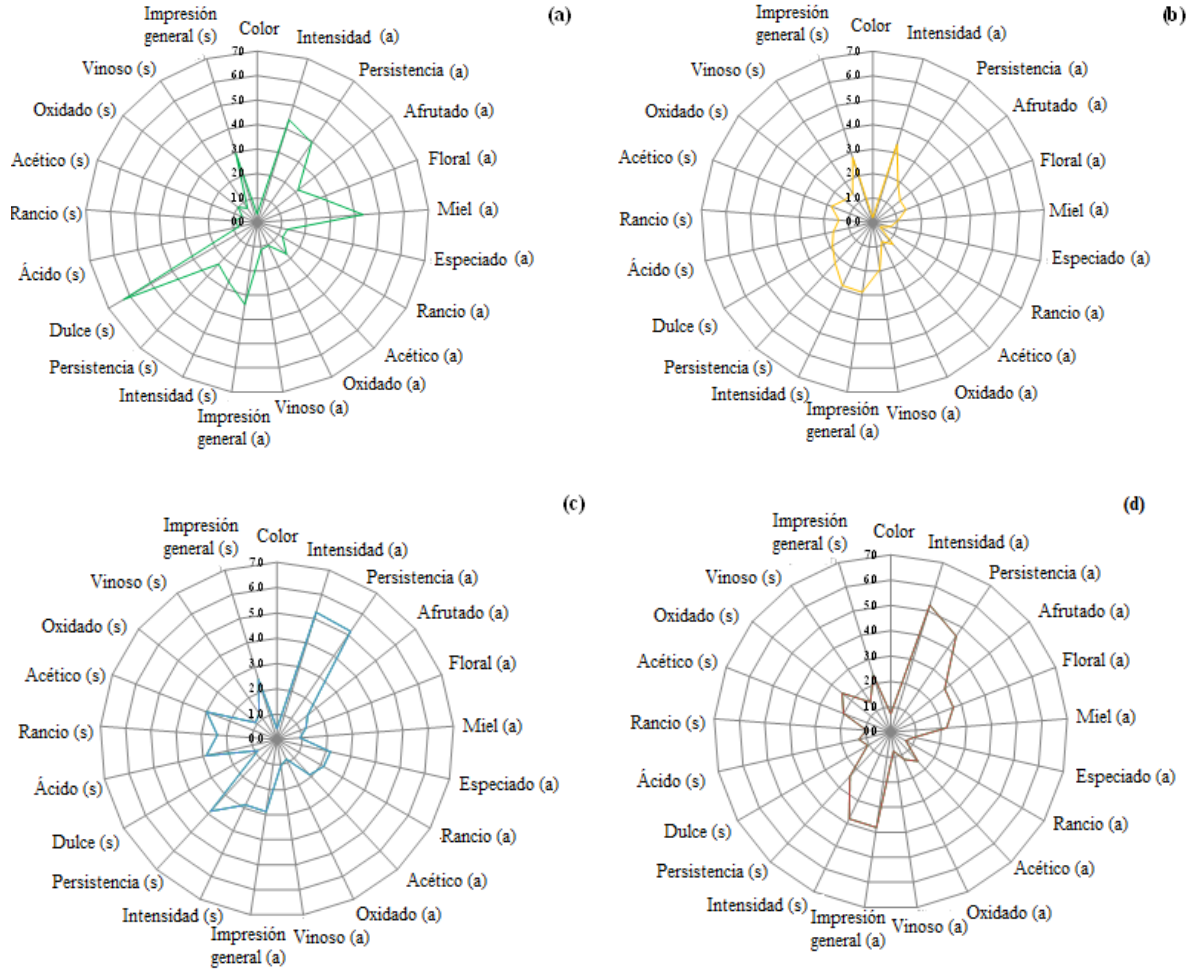


**Figura 4.** Clasificación de ésteres aromáticos y puntaje promedio de los aromas indicados de los tres mejores hidromieles evaluados en la sumatoria total (Peepall *et al.*, 2019).

Los resultados reportados por Peepall *et al.* (2019) en la elaboración de hidromiel, reflejan que la mayoría de las cepas *L. thermotolerans* tuvieron un alto poder fermentativo, logrando alcanzar una concentración de alcohol apta para la elaboración de hidromiel, superando el 8% (v/v) indicado por Barrios *et al.* (2010). Además, se utilizaron cepas *L. thermotolerans* con mayor poder fermentativo que las reportadas por Morata *et al.* (2018) en la elaboración de vino, considerándose cepas interesantes para futuras investigaciones. La cepa *H. vineae* no alcanzó una concentración de alcohol adecuada para la elaboración de hidromiel según

Socha *et al.* (2015), mostrando un poder fermentativo mucho más bajo que la cepa de la misma especie reportada por Barry *et al.* (2018). Además, estas cepas de levaduras pueden ser buenas candidatas para la acidificación natural de hidromieles u otros fermentados. A nivel general, los evaluadores prefirieron las hidromieles con menores concentraciones de etanol. Esto permite deducir nuevamente que, a nivel general, los consumidores prefieren las hidromieles dulces y con menor concentración alcohólica. Además, la hidromiel con mayor acidez no fue necesariamente la más preferida. Sin embargo, los productos con bajo pH fueron altamente apreciados por los consumidores. Por otra parte, los resultados de la figura 4 coinciden con las evaluaciones de Li & Sun (2018), donde la cepa de *L. thermotolerans* que utilizaron, obtuvo una correcta evaluación sensorial y fue altamente puntuada en aromas florales y a miel. La puntuación de la cepa *H. vineae* también fue una de las más altas a pesar que es una especie muy poco utilizada en la elaboración de hidromiel. Los resultados concuerda con los reportes de Burini *et al.* (2021) donde la hidromiel elaborada con la cepa *H. vineae* fue la mejor evaluada, pero con un poder fermentativo mucho mayor.

Según lo analizado, el uso combinado de cepas No-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* para la fermentación alcohólica de la hidromiel, podrían ser altamente beneficiosos en cuanto a la producción de compuestos volátiles y no volátiles. Ante esto, Prestianni *et al.* (2022), investigaron la influencia sobre los atributos organolépticos en hidromieles elaboradas a partir de una miel multiflora de Italia. Se llevaron a cabo mono inoculaciones con *S. cerevisiae* y *H. uvarum*, ambas levaduras aisladas de sub productos de la miel, junto con una inoculación secuencial con ambas levaduras. Las mayores concentraciones de etanol (v/v) se obtuvieron con la mono inoculación de *S. cerevisiae*, la inoculación secuencial *S. cerevisiae*/*H. uvarum* y el control, con valores entre 12,29-12,37% (v/v). Mientras que con la levadura *H. uvarum* se obtuvo 5,35% (v/v) de etanol. En cuanto a la acidez volátil, todas las hidromieles inoculadas presentaron concentraciones por debajo de 0,7 g/L, concentración sobre la cual se considera defectuoso. En el análisis de compuestos volátiles, se observó que la mayor concentración de ésteres fue sintetizada por el control (41,16 ppm), seguida por *S. cerevisiae* (39,3 ppm) y la inoculación secuencial (30, 17 ppm). En alcoholes superiores, la mayor concentración se observó en la inoculación secuencial con 3,6 ppm, seguida por *S. cerevisiae* con una concentración de 3,2 ppm. Además, tanto la mono inoculación con *H. uvarum* y la inoculación secuencial *H. uvarum*/*S. cerevisiae*, no sintetizaron ácidos carboxílicos. Los resultados de la evaluación sensorial, representados en la figura 5, muestran que existe una alta heterogeneidad entre las muestras. La hidromiel de *H. uvarum* obtuvo mayor puntuación en aromas afrutados y vinosos, mientras que la inoculación secuencial destacó en persistencia e impresión general.



**Figura 5.** Diagramas de araña de puntajes promedio para atributos de apariencia, aroma y sabor determinados por jueces. Hidromiel fermentada por: (a) *H. uvarum* (TH); (b) *S. cerevisiae* (TS); (c) inóculo secuencial con TH y TS; (d) *S. cerevisiae* (C1) (Prestianni *et al.*, 2022).

En el ensayo de Prestianni *et al.* (2022), la cepa de *H. uvarum* en mono inoculaciones, mostro un poder fermentativo mayor al expuesto por Vaquero *et al.* (2021) en la elaboración de vinos. La misma levadura en una inoculación secuencial con *S. cerevisiae* logró producir una hidromiel con un nivel de alcohol mucho mayor y por lo tanto, una concentración de azúcar residual menor, logrando producir una hidromiel seca. Considerando estos parámetros fisicoquímicos, la inoculación secuencial con *H. uvarum*/*S. cerevisiae*, puede ser apta para la elaboración de hidromiel. En cuanto a la concentración de compuestos volátiles, se evidencia que la inoculación secuencial sintetizó una menor concentración de ésteres en comparación al control. Sin embargo, esto no se traduce necesariamente en que la hidromiel de la inoculación secuencial sea menos aromática. Esto se debe a que la percepción de estos compuestos depende de los umbrales de percepción y concentración de cada uno. En las hidromieles elaboradas a partir de cepas *No-Saccharomyces*, no se identificaron ácidos carboxílicos, por lo que, los aromas desagradables asociados a estos compuestos podrían no estar presentes, evitando que

opaquen otros aromas favorables, tal como ocurrió en algunas hidromieles de Li & Sun (2019). En cuanto a alcoholes superiores, se puede observar la alta capacidad de síntesis por parte de una inoculación secuencial con *H. uvarum*/*S. cerevisiae*, tal como ocurrió en los estudios de Li & Sun (2019) con otras cepas de No-*Saccharomyces*, en comparación a mono inoculaciones con *S. cerevisiae*. Por otro lado, la evaluación sensorial reflejó que las tres hidromieles elaboradas con levaduras extraídas de subproductos de la miel fueron altamente puntuadas por parte de los evaluadores. La hidromiel elaborada a partir de una inoculación secuencial con *H. uvarum* y *S. cerevisiae*, logró ser mayormente puntuada y preferida en comparación a la hidromiel elaborada con la cepa comercial de *S. cerevisiae*. Esto se debe a la ausencia de malos sabores y olores, junto con la mejor recepción aromática que tuvo por parte del panel evaluador. La hidromiel fermentada únicamente con *H. vineae* también tuvo una buena recepción aromática. Sin embargo, en comparación con la inoculación secuencial, poseen distintos niveles de alcohol y concentración de azúcares residuales, por lo que se ubican en categorías de hidromiel distintas (dulce y seco). Además, la inoculación secuencia con *H. uvarum* y *S. cerevisiae*, al tener una mayor concentración de alcohol, tuvo una mayor síntesis de ésteres etílicos, los cuales se caracterizan por aromas florales y frutales. Ante esto, la inclusión de cepas No-*Saccharomyces*, en este caso, *H. vineae* pueden ser una gran alternativa para la elaboración de hidromiel, sobre todo cuando estas cepas son extraídas de la miel o sub productos de la miel.

En Chile, se ha comenzado a tener interés por el uso de levaduras no convencionales, principalmente en su uso enológico, con la finalidad de potenciar las propiedades organolépticas del producto final de cada región. Este tipo de levaduras se han comenzado a aislar principalmente de ambientes vitícolas, los cuales poseen una alta variabilidad de condiciones climáticas (Jara *et al.*, 2016). Sin embargo, las investigaciones en cuanto a la elaboración de hidromiel mediante el uso de mono inoculaciones, inoculaciones secuenciales u co-inoculaciones con levaduras No-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* son aún muy escasas. A pesar de esto, se ha comenzado a tener interés en su uso para la elaboración de hidromiel con la finalidad de potenciar el desarrollo de productos autóctonos y de mayor calidad.

Con el objetivo de analizar su potencial fermentativo, Villareal *et al.* (2021), llevaron a cabo inoculaciones con las levaduras *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces uvarum*, *Lachancea cidri*, *Kregervanrija delftensis* y *Hanseniaspora valbyensis*, aisladas desde la corteza de *Nothofagus spp.* en la Patagonia central chilena. Estas levaduras se utilizaron para la elaboración de vino, cerveza e hidromiel. En la elaboración de hidromiel, se evidencio que la levadura *L. cidri* tuvo un alto poder fermentativo sobre un sustrato con alta concentración de glucosa y fructosa, logrando alcanzar una concentración de etanol de 10,5% (v/v). Además, las levaduras *S. eubayanus*, *S. uvarum* y *H. valbyensis*, mostraron un poder fermentativo similar al control en la elaboración de hidromiel. La levadura *L. cidri* utilizada en la elaboración de hidromiel, tuvo un poder fermentativo mayor en comparación a otras levaduras No-*Saccharomyces* utilizadas por Barry *et al.* (2018), Sottit *et al.* (2019) y Peepall *et al.* (2019) en mono inoculaciones. Además, *L. cidri* destacó por tener un eficiente consumo de nitrógeno y por no requerir suplementos nutricionales para mantener su alto poder fermentativo. Por otra parte, *L. cidri* no sintetizó una concentración de acidez volátil que pudiera generar defectos organolépticos en las hidromieles según los



rangos mencionados por Pereira *et al.*, (2017). Por lo tanto, considerando estos factores fisicoquímicos, la cepa *L. cidri* aislada en la Patagonia chilena, podría ser un buen inóculo para la elaboración de hidromiel. Sin embargo, en el estudio de Villareal *et al.* (2021), no se llevaron a cabo evaluaciones sensoriales en las distintas hidromieles ni un análisis cromatográfico para analizar la composición volátil de los productos. Estos análisis permitirían reconocer si efectivamente este tipo de levadura ayuda a potenciar el perfil aromático de las hidromieles y si son bien recibidas por parte de los evaluadores o consumidores.

Este tipo de estudios son el inicio para conocer el verdadero efecto que pueden tener las levaduras del tipo No-*Saccharomyces* sobre el perfil fisicoquímico y aromático de la hidromiel. Junto con el resto de las investigaciones como las de Li & Sun (2019), Barry *et al.* (2019), Sottit *et al.* (2019), Peepall *et al.* (2019) y Prestianni *et al.* (2022), permiten observar que el uso de levaduras No-*Saccharomyces* en mono inoculaciones, co-inoculaciones o inoculaciones secuenciales con *S. cerevisiae*, pueden mejorar las características químicas y sensoriales del producto final. Esto podría generar una alta mejora en la producción y características de la hidromiel, las cuales pueden ser apreciadas de gran manera por parte de los consumidores. Sin embargo, su investigación es aún muy escasa.

### **Uso de levaduras, aisladas desde la miel, para la elaboración de hidromiel**

La miel puede considerarse un producto estable en cuanto a la presencia de microorganismos. Sus condiciones como la baja actividad de agua, el pH y otras sustancias, impiden el crecimiento de microorganismos con excepción de algunas levaduras y bacterias osmofílicas. Las condiciones de la miel, actúan impidiendo la proliferación de éstos microorganismos, los cuales pueden permanecer bajo una condición de viables y desarrollarse bajo condiciones favorables (Cárdenas *et al.*, 2008)

Según Cárdenas *et al.* (2008), a pesar que la miel se considera un alimento seguro, puede verse alterada microbiológicamente por problemas de manipulación en procesos de extracción, envasado o conservación, por bacterias del género *Bacillus*, mohos pertenecientes a los géneros *Penicillium* y *Mucor* y en bajos niveles esporas de *Clostridium botulinum*. Por lo tanto, este factor al ser un parámetro de calidad, se debe tener cuidado con las condiciones de viabilidad de algunos de estos microorganismos, principalmente por el aumento de humedad o dilución de la miel con agua Cárdenas *et al.* (2008). Dentro de la microbiota habitual de las mieles, se encuentran las levaduras. Estos microorganismos, principalmente de los géneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Torulaspota*, provienen de las flores de origen, del equipo de extracción y de las condiciones de envasado (Cárdenas *et al.*, 2008).

La autenticidad, singularidad y características organolépticas de vinos u otros fermentos como la hidromiel, pueden depender de la microbiota natural que se encuentra en el sustrato. Esto se debe a que se asocian los sabores y aromas diferenciados con las cepas de levaduras autóctonas presentes en el sustrato al llevar a cabo la fermentación alcohólica (Ilieva *et al.*, 2021). Es por esto, que surge el interés por el estudio de las levaduras nativas

en el contexto enológico, debido a la oportunidad de descubrir un “terroir microbiano” y la contribución que estos microorganismos pueden entregar al proceso y al fermento (Jara *et al.*, 2016).

Este concepto también puede aplicarse en la elaboración de hidromiel, al utilizar cepas aisladas desde la miel. A pesar que su estudio es aún muy escaso, el uso de estas cepas podría generar productos organolépticamente distintivos y mejorar el rendimiento del proceso fermentativo de la mezcla de aguamiel. Además, con el estudio de inoculaciones con levaduras No-*Saccharomyces* aisladas de otros sustratos como la uva para la elaboración de hidromiel, también podría generar el mismo efecto durante la fermentación alcohólica y entregar características distintivas al producto final.

A nivel general, en las mieles se pueden encontrar géneros de levaduras como *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea* y *Zygosaccharomyces* (Bravo, 2011). Además, Carvalho *et al.* (2010), lograron determinar 24 aislados de levadura en mieles de Trás-os-Montes, Portugal, identificando géneros como *Candida magnoliae* (25%), *Rhodotorula mucilaginosa* (17%) y *Zygosaccharomyces mellis* (12,5%). Los aislados de *Candida spp.* representaron más del 45% del total de los aislados obtenidos. Esto demuestra la amplia gama de levaduras que se puede encontrar en las distintas mieles. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la composición microbiana de la miel dependerá de factores como las prácticas de cosecha, el suelo, el néctar, factores climáticos, entre otros (Bravo, 2011). Por lo tanto, existe la posibilidad de aislar levaduras con alto potencial fermentativo y aromático para la elaboración de hidromiel mediante mono inoculaciones o inoculaciones secuenciales con levaduras *S. cerevisiae*.

Ante esto, Pereira *et al.* (2009), estudiaron la cinética de fermentación y los parámetros fisicoquímicos de hidromieles elaboradas con dos levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (a y b) aisladas desde una miel de Portugal. Además, las hidromieles se elaboraron a partir de mieles claras y oscuras con distintos suplementos (1 y 2). Se utilizó un suplemento comercial (1), el cual contenía nutrientes comerciales, SO<sub>2</sub> y ácido tartárico; y un suplemento elaborado por el equipo de investigación (2). Independiente del tipo de suplemento, las tres cepas de levaduras lograron completar la fermentación alcohólica al utilizar mieles oscuras. Las mieles claras poseen de forma natural una menor concentración de nitrógeno disponible para las levaduras, una menor concentración de minerales y un menor pH, en comparación con mieles oscuras. Debido a esto, independientemente del suplemento utilizado, las tres cepas de levaduras tuvieron dificultades para completar la fermentación de manera normal. Además, la cepa de levadura “a” reveló aromas y sabores desagradables en la fermentación alcohólica de mieles claras. Estos efectos se pueden deber a la concentración de compuestos fenólicos como etilfenol o etilguayacol o sulfuro de hidrogeno, debido a que, para la miel clara, ningún suplemento fue el adecuado para elaborar hidromiel. Estos antecedentes permiten concluir que para la elaboración de hidromiel, también se debe tener en cuenta el tipo de miel, la cual debe entregar las condiciones necesarias para completar la fermentación alcohólica y evitar aromas que puedan perjudicar el perfil organoléptico del producto final.

Ante esto, el estudio de la composición aromática y factores fisicoquímicos como el pH, acidez volátil o concentración de alcohol, son necesarios al momento de evaluar el uso de cepas de levaduras para la elaboración de hidromiel. Además, al momento de seleccionar levaduras aisladas desde la miel, ya sean *No-Saccharomyces* o *Saccharomyces cerevisiae*, estas deben ser capaces de adaptarse al mosto del tipo de miel utilizada. Por otra parte, el análisis del mosto de aguamiel también se hace necesario para conocer las condiciones del medio a inocular, con la finalidad de poder utilizar suplementación nitrogenada en caso de ser necesario y con ello, maximizar el potencial fermentativo y aromático de las levaduras aisladas desde la miel.

## CONCLUSIONES

La literatura indica que las cepas No-*Saccharomyces* fueron capaces de modificar las características químicas de las hidromieles. A nivel general, independiente de la estrategia de inoculación, el uso de levaduras No-*Saccharomyces* permitió el aumento de la acidez natural, reflejada en la disminución del pH y una disminución en la concentración de etanol, en comparación a inoculaciones con *S. cerevisiae*. Sin embargo, la capacidad de disminuir la síntesis de alcohol y aumento de la acidez natural por parte de las cepas No-*Saccharomyces*, dependerá de la cepa utilizada.

En las investigaciones revisadas a lo largo de esta tesis, las hidromieles elaboradas con levaduras No-*Saccharomyces*, fueron casi siempre preferidas por los consumidores y evaluadores, principalmente por sus aromas frutales y florales. Por lo tanto, este tipo de levaduras logró influir positivamente sobre la complejidad aromática de las hidromieles. Esto se produjo principalmente por la mayor variabilidad de compuestos y mayor síntesis de ésteres totales o alcoholes superiores totales, logrando superar el umbral de percepción de compuestos con aromas a rosas, afrutados o a miel.

Por lo tanto, se acepta parcialmente la hipótesis planteada. Esto se debe a que las inoculaciones secuenciales y/o co-inoculaciones con cepas No-*Saccharomyces*/ *S. cerevisiae*, pueden mejorar la complejidad aromática de algunos hidromieles, debido a la síntesis de ésteres y alcoholes superiores en concentraciones que potencian el perfil aromático del producto final, junto con variabilidad de estos compuestos presentes en la hidromiel. Sin embargo, se debe considerar que este efecto dependerá del tipo de miel y del metabolismo enzimático de las levaduras utilizadas.

Por otro lado, los estudios en cuanto al uso de inoculaciones secuenciales y co-inoculaciones con levaduras No-*Saccharomyces*/ *S. cerevisiae* en la elaboración de hidromiel, son aún muy escasos. Si bien, este tipo de inoculaciones potencia la complejidad aromática de las hidromieles, es necesario que futuras investigaciones incluyan análisis cromatográficos junto con la realización de análisis sensoriales por parte de un panel de expertos y consumidores, con el objetivo de vincular la presencia y concentración de los compuestos, con las cualidades organolépticas que se detecten. De esta forma, se podrá definir si las cualidades otorgadas por las cepas No-*Saccharomyces* en la elaboración de hidromiel son realmente percibidas y apreciadas por los consumidores de hidromiel.

**LITERATURA CITADA**

- Acosta, C. 2012. Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. Tesis Magister en Ingeniería Química. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 121p.
- Alarcón, R. 2016. Caracterización aromática de Vinos de Fondillón de la D.O. Alicante. Trabajo de grado Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia. 27p.
- Alcázar, E. 2011. Capacidades fermentativas y generación de volátiles de cepas de levadura aisladas en diferentes estados productores de Mezcal. Tesis de Maestría. México: CIATEJ. 101p.
- Alderete-Tapia, A., Miranda, E., Arvizu, M., Martínez, A., Soto, L., & Hernández, M. 2019. Pursuing the perfect performer of fermented beverages: GMMs vs Microbial consortium. *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*. 19p.
- Al-Qassem, R., & Robinson, R. K. 2003. Some special nutritional properties of honey – a brief review. *Nutrition & Food Science*, 33(6), 254–260.
- Andrade, R., Torres, R., & Pérez, A. 2016. Efecto de la adición de jarabes de sacarosa y fructosa en el comportamiento reológico de miel de abejas. *Información Tecnológica*. Vol. 27(1): 3-8.
- Andreea, I., Al-Suod, H., Bukowska, M., Ligor, M., & Buszewski. 2019. Correlation Study of Honey Regarding their Physicochemical Properties and Sugars and Cyclitols Content. *Molecules*. 25(1): 15p.
- Aragón, A. 2020. Estudio de los factores que inciden en la formación de aldehídos de Strecker en la fermentación alcohólica. Trabajo fin de Master. Zaragoza, España: Universidad Zaragoza. 50p.
- Arévalo, H., & Arias, G. 2008. Determinación de la concentración de inóculo y tiempo de fermentación, utilizando microbiota de los granos de kéfir como agente biológico y suero de leche como sustrato. *Ciencia e Investigación*. Vol. 11(2):16-22.
- Arévalo, S. 1998. Optimización de la producción del agente de biocontrol *Candida sake* (CPA-1). Tesis Doctoral. Lerida, España: Universitat de Lleida. 296p.
- Bachmann, H. 2007. Estudios preliminares de caracterización de miel de abeja: Determinación de carbohidratos por GC/MS y análisis enzimáticos. Tesis Licenciado en Bioquímica y Título Profesional de bioquímico. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile. 77p.

- Bakier, S. 2007. Influence of temperature and water content on the rheological properties of polish honeys. *Polish journal of food and nutrition sciences*. Vol. 57(2): 17-23.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*. 153(3) 243–259.
- Baron, M., Prusova, B., Tomaskova, L., Kumsta, M., & Sochor, J. 2017. Terpene content of wine from the aromatic grape variety ‘Irsai Oliver’ (*Vitis vinifera* L.) depends on maceration time. *Open Life Science*. 12(1): 42-50.
- Barrios, C., Principal, J., Sánchez, J., & Guédez, J. C. 2010. Caracterización físico-química y análisis sensorial de un Hidromiel elaborado de manera artesanal. *Zootecnia Tropical*, 28(3), 313-319.
- Barry, J., Metz, M., Hughey, J., Quirk, A., & Bochman, M. 2018. Two Novel Strains of *Torulaspora delbrueckii* Isolated from the Honey Bee Microbiome and Their Use in Honey Fermentation. *Fermentation*. 4(2): 11p.
- Bernardi, A. 2013. Selección de levaduras vínicas provenientes de la provincia de Mendoza. Tesis de Grado Licenciatura en Bromatología. Mendoza, Argentina: Universidad Nacional de Cuyo. 55p.
- Bianchi, F., Careri, M., & Musci, M. 2005. Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*. 89(4): 527–532.
- Bobis, O., Moisea, A., Ballesterosb, I., Sánchez, E., Sánchez, S., Sánchez, J., Cuz-Quntanae, S., Giampierif, F., Battinof, M. and Alvarez, J. 2020. Eucalyptus honey: Quality parameters, chemical composition and health promoting properties. *Food Chemistry*.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. 2008. Honey for Nutrition and Health: A Review. *American Journal of the College of Nutrition*. 27: 677-689.
- Boletín Oficial Del Estado, España. Decreto 1049. 2003. Norma de Calidad Relativa a la Miel. España: BOE, 2003. 3p.
- Bourbon-Melo, N., Palma, M., Pinto, M., Ferreira, A., Bronze, M., Elias, H., and Sá-Correia, I. 2020. *Hanseniaspora opuntiae* to enhance the aromatic profile of beer in mixed-culture fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*. Vol. 95. 25p.
- Borren, E., & Tian, B. 2020. The Important Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to the Aroma Complexity of Wine: A Review. *Foods*. 10(1): 13.
- Bravo, J. 2011. Obtención de hidromiel por fermentación alcohólica de la miel de abeja con una cepa nativa *Saccharomyces sp* y adición de polen, [en línea]. Tesis Ingeniero agroindustrial. Abancay, Perú: Universidad Nacional Micaela Batidas de Apurímac. P115.

Recuperado en:  
[http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/306/T\\_0136.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/306/T_0136.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Burdick, L., Ketola, C., & Buchholz, K. 2008. Identification of plant sources for wildflower honey production, Final report RIF-2008-10. Faculty and Staff Publications. 41p.

Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. 2021. Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza. Revista Argentina de Microbiología. 19p.

Cacho, J. 2003. El vino, su composición y nuestros sentidos. Zaragoza, España: Real academia de ciencias exactas, físicas, químicas y naturales de Zaragoza. 48p.

Cañas, P., Romero, E., Perez-Martín, F., Seseña, S., & Palop, M. 2014. Sequential inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation. Food Science and Technology International. 21(3): 203-212.

Cárdenas, C., Villat, C., Laporte, G., Noia, M., & Mestorino, N. Características microbiológicas de la miel. Revisión bibliográfica. 2008. Research Gate. 29-34.

Carrau, F., Boidoa, E., & Dellacassab, E. 2007. Terpenoids in Grapes and Wines: Origin and Micrometabolism during the Vinification Process. Natural Product Communications. 3(4): 577-592.

Casas, A., Aguilar, C., De la Garza, H., Morlett, J., Montet, D., & Rodríguez R. 2015. Importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación de bebidas alcohólicas. Investigación y Ciencia. 23(65): 73-79.

Castilleja, D. E. M., Tapia, J. A. A., Medrano, S. M. A., Iturriaga, M. H., Muñoz, L. S., & Peniche, R. Á. M. 2017. Growth Kinetics for the Selection of Yeast Strains for Fermented Beverages (Cap. 3, pp. 68-87). En: Morata, A., & Loira, I. Yeast - Industrial Applications. Book on Demand. 300p

Carvalho, C.M., Meirinho, S., Estevinho, M., & Choupina, A. 2010. Yeast species associated with honey: different identification methods. Archivos de Zootecnia. 59(225): 103-113.

Cavia, M., Fernandez-Muiño, M., Alonso-Torre, S., Huidobro, F., & Sancho, M. 2007. Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation. Food Chemistry. 100(4): 1728-1733.

Cédrón, T. 2004. Estudio analítico de compuestos volátiles del vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. Memoria Doctorado. La Rioja, España: Universidad de La Rioja. 438p.

- Chávez, D., Quintero, A., López, A., Martínez, V., Del Razo, O., Jimenez, R., & Campos, R. 2019. Determinación de compuestos bioactivos y contenido de selenio en diversas mieles del estado de Hidalgo. *JEEOS*. Vol 3(2): 1-18.
- Chitarrini, G., Debiassi, L., Stuffer, M., Ueberegger, E., Zehetner, E., Jaeger, H., Robtscher, P., & Conterno, L. 2020. Volatile Profile of Mead Fermenting Blossom Honey and Honeydew Honey with or without *Ribes nigrum*. *Molecules*. 25(8): 15p.
- Chua, L., Lee, J., & Chan, G. 2013. Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405(10): 3063-3074.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10(2): 123–133.
- Colucci, G., De Vito, V., Varrinchio, E., De Cunzo, F., Coccia, E., Paolucci, M., Di Stasio, M., Viola, C., & Volpe M. 2016. Identification of Traceability Markers in Italian Unifloral Honey of different Botanical Origin. *Nutrition & Food Sciences*. 6(462): 10p.
- Corbella, E., Cozzolino, D., Ramallo, G., & Maidana, M. 2002. Conjugar criterios y esfuerzos para fomentar prácticas agropecuarias que tengan en cuenta la biodiversidad, de la cual tanto depende la apicultura: Calidad de mieles de Uruguay. *El país agropecuario*. Vol 8 (92): 25-28.
- Córdova, C., Ramírez, E., Martínez, E., y Zaldívar, J. 2013. Caracterización botánica de miel de abeja (*Apis mellifera* L.) de cuatro regiones del estado de Tabasco, Mexico, mediante técnicas melisopalinológicas. *Universidad y Ciencia, trópico húmedo*. 29(1): 163-178.
- Crane, E. 1982. Learning about honey through fructose. *Bee World*. 63(4): 174-177.
- Delmoro, J., Muñoz, D., Nadal, V., Clementz, A., & Pranzetti, V. 2010. El color en los alimentos: Determinación del color en mieles. *Invenio*, 13(25): 145-152.
- Derndorfer, E. 2015. Sensory Analysis of Honey. DLG Expert report. 7p.
- Diaz, C. 2020. Plan de negocios para empresa de Hidromiel (Meadery). Tesis Magister en gestión y dirección de Empresas. Santiago, Chile: Universidad de Chile. 88p. Recuperado en: < <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/177296/Plan-de-negocios-para-empresa-Hidromiel-%28MEADERY%29.pdf?sequence=1> >
- Dimitrova, B., Gevrenova, R., & Anklam, E. 2006. Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*. 18 (1): 22-32.
- Dubourdieu, D. 2003. Papel de las levaduras en la revelación del aroma varietal azufrado de los vinos: Ejemplo del Sauvignon. *Revista Internet Técnica del Vino*. N°9: 7p.



- Dutraive, O., Benito, S., Fritsch, S., Beisert, B., Claus-Dieter, P., & Rauhut, D. 2019. Effect of Sequential Inoculation with Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition. *Fermentation*. 5(79): 16p.
- Echave, J., Barral, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M., & Simal-Gandara. 2020. Bottle Aging and Storage of Wines: A Review. *Molecules*.713: 23p.
- El-Sayed, A. M., Unelius, C. R., & Suckling, D. M. 2018. Honey norisoprenoids attract bumble bee, *Bombus terrestris*, in New Zealand mountain beech forests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 66: 13065-13072.
- Escobal, A. 1999. Determinación estructural y cuantificación de componentes volátiles en muestras monovarietales de txakoli. *Formula*. Vol. 5: 83-108.
- Escuerdo, O., Dobre, I., Fernandez-González, M., & Seijo, M. 2014. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149: 84-90.
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., & Santamaría, P. 2017. Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science and Technology*. 54(6): 1555–1564.
- Fattori, S. 2004. La miel. Propiedades, composición y análisis físico-químico. *Beekeeping Technology and Bee Products Commission*. p203.
- Fuentes, L., Acevedo, D. y Gelvez, V. 2015. Alimentos Funcionales: Impacto y retos para el desarrollo y bienestar de la sociedad colombiana. [En línea]. *Biocología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2): 140-149. Recuperado en: < <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v13n2/v13n2a16.pdf> >
- Fundación para la Innovación Agraria (FIA). 2008. Evaluación técnica y económica de la elaboración de vino de miel de alta calidad (hidromiel) como alternativa de producción, comercialización y consumo, como actividad sustentable, incorporando valor agregado a la miel de la sexta región. Fundación para la innovación agraria (FIA) Recuperado en: <http://bibliotecadigital.fia.cl/handle/20.500.11944/2181> . Consultado en septiembre de 2019.
- Garica, A. 2018. Contenido total de flavonoides y medida del color en mieles aragonesas. Tesis de Grado. Universidad Zaragoza, Facultad Veterinaria. Zaragoza, España. 30p.
- Ganga, M.A., Carriles, P., Raynal, C., Hera, J.M., Ortiz-Julien, A., & Dumonts, A. 2014. Vincular la *Metschnikowia pulcherrima* y la *Saccharomyces cerevisiae* para una máxima revelación del aroma en vinos blancos. Santiago, Chile. Recurado en: <https://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2014/10/Flavia-Lee-el-documento.pdf> . Consultado en octubre de 2021.

- García, M. 1984. Medida objetiva del "flavor" de los vinos de Andalucía Occidental. Tesis Doctoral. Sevilla, España, Departamento de Química Inorgánica. Universidad de Sevilla. 291p.
- García, N. 2018. The Current Situation on the International Honey Market. *Bee World*. 1–6.
- García, O. 2015. Manual de Buenas Prácticas Apícolas para la Producción de Miel de Abejas. Clúster Apícola Dominicano. Santo Domingo, República Dominicana. 40p.
- Gianelli, M., Ponce, M., & Venegas, C. 2010. Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble province, Chile. *Chilean journal of agricultural research*. 70(1): 75-84.
- González, P. 2019. Etiquetado de la miel, Chile, *Codex Alimentarius* de la miel, Unión Europea, Estados Unidos de Norteamérica y Canadá. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. [en línea]. 9p. Recuperado en: <  
[https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/27085/1/Etiquetado\\_de\\_la\\_miel.pdf](https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/27085/1/Etiquetado_de_la_miel.pdf)>. Consultado en Mayo 2022.
- González, P. 2019. Producción apícola, Chile y Región de la Araucanía. (ATP, N° SUP: 118.974). Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. [En línea].8p. Recuperado en: <  
<https://www.bcn.cl/noticias/documento-bcn-produccion-apicola-en-chile>>
- González, P. 2020. Regulaciones vigentes y proyectos de ley, Sector apícola. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile (BCN). 10p.
- Gutiérrez, D. 2016. Relación estadística de las propiedades químicas, físicas y microbiológicas de tres muestras de mieles (*Apis mellifera L.*) comerciales, distribuidas en supermercados del distrito metropolitano de Quito. Trabajo de titulación para la obtención del grado de Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales. Quito, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana. 62p.
- Gutiérrez, J. 2018. El papel de selección de levaduras en la elaboración del vino. Cuadernos del Tomas. N°10: 169-198.
- Guyot-Declerck, C., Chevance, F., Lermusieai, G., & Collin, S. 2000. Optimized Extraction Procedure for Quantifying Norisoprenoids in Honey and Honey Food Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(12): 5850-5855.
- Hazelwood, L., Daran, J.M., van Maris, A., Pronk, J., & Dickinson, R. 2008. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *American Society for Microbiology*. 74(8): 2259-2266.
- Hernández, C., Blanco, A., & Quicazán, M. 2014. Establecimiento de las condiciones de elaboración de hidromiel mediante diseño de experimentos. ResearchGate. 6p.

Hernandezorte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garciamoruno, E., & Ferreira, V. 2008. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry*. 107(3): 1064–1077.

Hott, R. 2015. Producción y caracterización de *mead* (Hidromiel) espumante. Memoria Ingeniero en Alimentos. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile. 43p. Recuperado en: <file:///C:/Users/Diego%20Torres/Desktop/Uch%20Agro/Tesis-Memoria/Fuentes/Seleccion%202021/Hidromiel/Hott.%20Produccion%20y%20caracterizacion%20de%20hidromiel%20espumante.pdf> >

Ianieva, O., & Podgorsky, V. 2020. Enological potential of non-Saccharomyces yeast strains of enological and brewery origin from Ukrainian Collection of Microorganisms. *Mycology*. 12(3): 203-215.

Iglesias, A., Pacoal, A., Choupina, A., Carvalho, C., Feás, X., and Estevinho, L. 2014. Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. *Molecules*, 19: 12577-12590.

Ilieva, F., Petrov, K., Kostadinov, S., Gunova, N., Dimovska, V., Rocha, J., & Esatbeyoglu, T. 2021. Influence of Autochthonous and Commercial Yeast Strains on Fermentation and Quality of Wines Produced from Vranec and Cabernet Sauvignon Grape Varieties from Tikveš Wine-Growing Region, Republic of North Macedonia. *Applied Science*. 11(13): 15p.

Instituto Nacional de Normalización, Chile. Nch3064. Of2007. Miel de Abejas-Determinación de la conductividad eléctrica. Santiago, Chile: INN, 2007. 7p.

Instituto Nacional de Normalización, Chile. Nch616. of2007. Miel de Abejas - Denominaciones y requisitos. Santiago, Chile: INN, 2007. 10p

Jara, C., Laurie, F., Mas, A., and Romero, J. 2016. Microbial Terroir in Chilean Valleys: Diversity of Non-conventional yeast. *Frontiers in Microbiology*. Vol 7, article 663. 10p.

Jerkovic, I., & Kuš, P. M. 2014. Terpenes in honey: occurrence, origin and their role as chemical biomarkers. *RSC Advances*, 4(60): 31710–31728.

Kember, T., Marún, E., Mercado, M., & Rivero, B. 2018. Producción de hidromiel como valor agregado en la localidad de Almafuerte. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba. 41p.

Kuš, P., Czabaj, S., & Jerković, I. 2022. Comparison of Volatile Profiles of Meads and Related Unifloral Honeys: Traceability Markers. *Molecules*. 27, 4558: 19p.

Lambert, I. 2017. Evaluación enológica de la co-inoculación de levaduras *Saccharomyces* Y no-*Saccharomyces* nativas en cv. Cabernet Sauvignon. Memoria Ingeniera agrónoma. Santiago, Chile: Universidad de Chile. 25p.

- Lasanta, C. 2009. Estudio y Aplicación de Nuevos Procesos para la Mejora de la elaboración de Vinos Tintos en Zonas de Clima Cálido. Tesis Doctoral. Cádiz, España: Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz. 290p.
- Linsenmeierl, A.W., & Löhnertz, O. 2007. Changes in Norisoprenoid Levels with Long-term Nitrogen Fertilisation in Different Vintages of *Vitis vinifera* var. Riesling Wines. *South African journal of enology and viticulture*. 28(1): 17-24.
- Lobos, I., & Currian, M. 2021. Composición nutricional y calidad de miel producida en el territorio Patagonia Verde. *Apicultura en el territorio Patagonia Verde, región de los Lagos- Boletín INIA, capítulo 6: 107-123.*
- Lobos, I. & Silva, M. 2021. Color y origen floral de las mieles producidas en el territorio Patagonia verde. *Apicultura en el territorio Patagonia Verde, región de los Lagos- Boletín INIA, capítulo 7: 124-137.*
- López, M. 2018. Caracterización fenólica de miel de mielada. Trabajo fin de grado en Farmacia. Sevilla, España: Universidad de Sevilla. 39p.
- Li, R., & Sun, Y. 2019. Effects of Honey Variety and *Non-Saccharomyces cerevisiae* on the Flavor Volatiles of Mead. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 77(1): 40-53.
- Machado, A., Bicudo, L., Sanchob, M., & Pascual-Mate, A. 2017. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*. 57(1): 5-37.
- Maicas, S. 2020. The role of yeast in fermentation processes. *Microorganisms*. 8(8): 8p.
- Malakar, S., Paul, S., & Pou K.R. 2020. Biotechnological interventions in beverage production. *The Science of Beverages*. Vol 19: 1-37.
- Manyi-Loh, C. E., Ndip, R. N., & Clarke, A. M. 2011. Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(12): 9514–9532.
- Martí, M., Busto, O., and Guasch, J. 2004. Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety, and ageing. *Journal of Chromatography A*, 1057: 211-217.
- Martínez, A. Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel. Tesis de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 138p.
- Martínez, W., Arias, E., Baez, C., Higuera, J., Duque, O., & Rodríguez, J. La bebida de los Dioses: Hidromiel del Bosque-Apiarios del Bosque. *ResearchGate*. 8p.

Mato, I., Huidobro, J., Simal-Lozano, J., & Sancho, M., 2006. Analytical Methods for the Determination of Organic Acids in Honey. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 36(1): 3-11

Martín, M., Muñoz, F., & Morata de Ambrosini. 2017. Levaduras secas activas (LSA) autóctonas de la DOC San Rafael-Mendoza: Resistencia al proceso de liofilización. CONICET. 11p.

Mas, A., Beltrán, G., Sancho, M., Gutiérrez, A., Chiva, R., y Guillamón, J. 2013. Metabolismo nitrogenado de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación vínica. *Ace: Revista de enología*. N°139: 3p.

Mendes-Ferreira, A., Cosme, F., Barbosa, C., Falco, V., Inês, A., & Mendes-Faia, A. 2010. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *International Journal of Food Microbiology*. 144(1): 193–198.

Ministerio de Salud (MINSAL). 2021. Decreto 977, Aprueba Reglamento Sanitario de los Alimentos. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile (BCN). 9p. Disponible en: <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=71271> . Consultado en enero de 2022.

Moenne, M. 2008. Balances de masa durante la vinificación de Sauvignon Blanc. Tesis Magister en Ciencias de la Ingeniería. Santiago, Chile: Universidad Católica de Chile. 124p.

Monroy, H., Salem, A.Z.M., & Kholif A.E. 2016. Yeast: Descriptions and structure. (cap. 2). En: A.Z.M. Salem, A.E. Kholif, A.K. Puniya. *Yeast Additive and Animal Production*. India: PubBioMed Central. 4-13.

Morales, F. 2018. Evaluación de la factibilidad técnica y económica de producción semiindustrial de hidromiel en la Región de Valparaíso. Taller de título Ingeniero agrónomo. Valparaíso, Chile: Facultad de ciencias agronómicas y de los alimentos, Universidad Católica de Valparaíso. 24p.

Muñoz, A., Ortiz, C., Blanco, T., Castañeda, B., Ruiz, J., & Alvarado, A. 2014. Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(4): 287-297.

Muñoz, O., Copaja, S., Speisky, H., Peña, R., & Montenegro, G. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Química Nova*. 30(4): 848-851.

Morales, E., Alcarde, V., & Angelis, D. 2013. Mead features fermented by *Saccharomyces cerevisiae* (lalvin k1-1116). *African Journal of Biotechnology*. Vol. 12(2): 199-204.

Navacués, E. 2009. Brettanomyces/Dekkera: Control y detección en bodegas. Revista Enología. (1): 5.

Ocón, M.E. Tesis doctoral. Diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* en diferentes ecosistemas vitivinícolas. Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de la Rioja. 173p.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2022. Plan estratégico de desarrollo apícola 2030. 43p. Recuperado en: [https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/71538/Borrador\\_Plan\\_EDA\\_final\\_20220119.pdf](https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/71538/Borrador_Plan_EDA_final_20220119.pdf) . Consultado en agosto de 2022.

Ojeda, R. 2012. Caracterización cualitativa de compuestos fenólicos en miel de diferente origen, y evaluación de actividad antibacteriana y antifúngica. Tesis Químico Farmaceutico. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile. 69p.

Ordoñez, A., Balanza, M., & Chiralt, A. 2005. Prolina y nitrógeno total en mieles poliflorales y almacenadas a distintas temperaturas. Información tecnológica. Vol. 16(5): 11-16.

Ordóñez, Y., González, C., & Escobedo, R. 2005. Calidad fisicoquímica de la miel de abeja *Apis mellifera* producida en el estado de Yucatán durante diferentes etapas del proceso de producción y tipos de floración. Técnica Pecuaria en México. 43(3): 323-334.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2019. NORMA PARA LA MIEL CXS 12-19811. Codex Alimentarius, Normas internacionales de los alimentos. 8P. Recuperado en: [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode%252Fstandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS\\_012s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode%252Fstandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012s.pdf) . Consultado en febrero de 2022.

Osburn, K., Amaral, J., Metcalf, S. R., Nickens, D. M., Rogers, C. M., Sausen, C., & Bochman, M. L. 2018. Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. Food Microbiology. 70: 76–84.

Padilla, B., Gil, J.V., and Manzanares, P. 2016. Past and Future of Non-*Saccharomyces* Yeast: From spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. Frontiers in Microbiology 7: 1-20.

Parra, P., Blanco, G., Mortero, D., y Bolado, B. 2019. Miel de abeja: Propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Revista de divulgación científica de nutrición ambiental y seguridad alimentaria. Vol. 8(2): 14-18.

Peepall, C., Nickens, D. G., Vinciguerra, J., & Bochman, M. L. 2019. An organoleptic survey of meads made with lactic acid-producing yeasts. Food Microbiology. 82: 398-408.

- Pereira, A.P., Dias, T., Andrade, J., Ramalhosa, E., and Estevinho, L. 2009. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*. 47(8): 2057-2063.
- 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.
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J. M., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. 2014. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. *LWT - Food Science and Technology*. 56(1): 21–30.
- Pereira, A.P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J.M., Estevinho, L.M, and Mendes-Faia, A. 2015. Mead production: effect of nitrogen supplementation on growth, fermentation profile and aroma formation by yeast in mead fermentation. *Institute of Brewing & Distilling*. 121: 122-128.
- Pereira, A.P., Oliveira J.M., Mendes-Ferreira, A., Estevinho, L.M., and Mendez-Fahia, A. 2017. Mead and other fermented Beverages. 407-434. *In: Pandey, A., Sanromán, M. Du, G., Soccol, C. and Dussap, G. (eds.)*. Elsevier, Portugal.
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Dias, L. G., Oliveira, J. M., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. 2019. Volatile Composition and Sensory Properties of Mead. *Microorganisms*. 7(10): 16p.
- Periago, M., Navarro-González, I., Alaminos, A., Elvira-Torales, L., García-Alonso, F. 2016. Parámetros de calidad en mieles de diferentes orígenes botánicos producidas en la alpujarra granadina. *Anales de Veterinaria de Murcia*. Vol. 32: 59–71.
- Polak-Śliwińska, M., & Tańska, M. 2021. Conventional and Organic Honeys as a Source of Water- and Ethanol-Soluble Molecules with Nutritional and Antioxidant Characteristics. *Molecules*. 26(12), 3746: 18p.
- Prestianni, R., Matraxia, M., Naselli, V., Pirrone, A., Badalamenti, N., Ingrassia, M., Gaglio, R., Settanni, L., Columba, P., Maggio, A., Bruno, M., Francesca, N., Moschetti, G., & Alfonzo, A. 2022. Use of sequentially inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora uvarum* strains isolated from honey by-products to improve and stabilize the quality of mead produced in Sicily. *Food Microbiology*. 107. 9p.
- Quiñones, A. 2013. Influencia de las levaduras No-*Saccharomyces* en la generación de compuestos aromáticos durante la fermentación alcohólica. *Memoria Ingeniero agrónomo*. Santiago de Chile, Facultad de Ciencias agronómicas, Universidad de Chile. 39p.
- Raham, M. 2015. Characterization of honey proteins and peptides. Thesis of Master of Technology in Agricultural Biotechnology. Kharagpur, India: Indian institute of technology kharagpur. 52p.

Ramalhosa, E., Gomes, T., Pereira, A., Diaz, T., & Estevinho, L. 2011. Mead production: Tradition versus modernity (chap.4, p. 101-118) En: Jackson, R. Food and Nutrition Research, vol 63.

Ramírez, D. 2018. Plan de negocio para la elaboración y comercialización de hidromiel en la ciudad de Quito. [en línea]. Tesis Ingeniero Comercial. Quito, Ecuador: Universidad de las Américas. 60p. Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10064/1/UDLA-EC-TIC-2018-57.pdf>

Rapp, A., & Mandery, H. 1986. Wine aroma. *Experientia*. 42(8): 873–884.

Reynal, C., Wardrop, F., Pillet, O., Languet, P., Heras, J.M., Dumont, A., & Ortiz-Julien, A. 2011. Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura no-*Saccharomyces* y de una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una herramienta innovadora para el enólogo. *Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*. N°428: 83-92.

Rodríguez, N., & Rubiano, M. 2019. Proceso de elaboración de hidromiel. Servicio Nacional de Aprendizaje.

Roland, A., Cavelier, F., & Schneider, R. 2012. Los tioles varietales: información actualizada sobre las vías de la biogénesis y el impacto de técnicas vitivinícolas. *ACE: Revista de enología*. N°134

Roldán, A., van Muiswinkel, G. C. J., Lasanta, C., Palacios, V., & Caro, I. 2011. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*. 126(2): 574–582.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., and Capece, A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*. 86:169 – 180.

Sanz, S., & Sanz, M. 1994. Humedad, cenizas y conductividad eléctrica de mieles de la Rioja. *Zubía*. N°12: 143-158.

Santos-Buelga, C., and González, A. 2017. Chemical Composition of Honey (cap. 3, p. 43-70). En: Suarez, A. Bee Products - Chemical and Biological. [en línea]. Quito, Ecuador: Facultad de ciencias de la salud, Universidad de las Américas. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/304707336\\_Bee\\_products-chemical\\_and\\_biological\\_properties](https://www.researchgate.net/publication/304707336_Bee_products-chemical_and_biological_properties) Consultado el: 20 de Agosto de 2020

Santos, E., Meerhoff, E., García Da Rosa, E., Ferreira J., Raucher, M., Quintana, W., Martínez, A., González, C., and Mancebo, Y. 2018. Color and electrical conductivity of honeys produced by *Apis mellifera* in Uruguay. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*. N°16: 51-55.



Santos, M. 2016. evaluación enológica de co-inoculaciones de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* en vinos chilenos. Proyecto fin de carrera Ingeniería Química. Madrid, España: Universidad Politécnica de Madrid. 141p.

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2020. Boletín Apícola número 5. División de protección pecuaria. 6p.

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2020. Requisitos para los Establecimientos Exportadores de Miel (REEM). Santiago, Chile. Recuperado en: <https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/requisitos-para-los-establecimientos-exportadores-de-miel-reem> . Consultado en octubre de 2021.

Skyquest. 2022. Mead Beverages Market Report. 157p. Recuperado en : <https://skyquestt.com/report/mead-market> . Consultado en agosto de 2022.

Šmogrovičová, D., Nádaský, P., Tandlich, R., Wilhelmi, B., & Cambray, G. 2012. Analytical and aroma profiles of Slovak and South African meads. Czech Journal of Food Sciences. 30(3): 241–246.

Socha, R., Pajak, P., Fortuna, T., and Buksa, K. 2015. Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Polish Meads. International Journal of Food Propertie., 18: 2713-2725.

Soden, A., Francias, I.L., Oakey, H., and Henschke, P.A. 2000. Effects of co-fermentation whit *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. Australian Journal of Grape and Wine Research 6(1): 21-30.

Sottit, C., Salor-Torregrosa, J. M., Moreno-Garcia, J., Peinado, J., Mauricio, J. C., Moreno, J., & Garcia-Martinez, T. 2019. Using *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* wine yeasts as starter cultures for fermentation and quality improvement of mead. European Food Research and Technology. 245: 2705-2714.

Sroka, P., & Tuszyński, T. 2007. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. Food Chemistry. 104(3): 1250–1257.

Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. 2011. Wine flavor and aroma. Journal of Industrial Microbiology. 38:1145–1159.

Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N., & Guevara-Rodríguez, C. 2016. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 50(1): 20-28.

Tapiero, J., Soleno, R., Marín, C., & Salamanca, G. 2017. Cinética de la fermentación de hidromiel monofloral elaborada a partir de miel de *Acacia mangium* Willd colectada en Villanueva, Casanare. Revista de la asociación colombiana de ciencias y tecnología de alimentos. Vol. 25 (40): 43-58.

Trautvetter, S., Koellin-Speer, I., & Speer, K. 2009. Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. *Apidologie*. 40(2): 140-150.

Twilley, J., Jutzi, C., & Tomasino, E. 2018. Influence of Fermentation Temperature and Nutrient Addition on Chemical and Sensory Characteristics of Traditional Honey Wine. *Annals of Food Processing and Preservation*. 3(1): 10p.

Urbina, C. 2017. Efecto del uso de hidrolizado enzimático de proteínas de levadura como fuente de nitrógeno sobre el perfil molecular del vino. Memoria Ingeniero Civil Ambiental. Valparaíso, Chile: Universidad Técnica Federico Santa María. 103p.

Vaquero, C., Loira, I., Heras, J., Carrau, F., González, C., & Morata, A. 2021. Biocompatibility in Ternary Fermentations with *Lachancea thermotolerans*, Other Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* to Control pH and Improve the Sensory Profile of Wines From Warm Areas. *Frontiers on Microbiology*. Vol. 12. 16p.

Varela, C. 2016. The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. [en línea]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(23), 9861–9874. Disponible en: <  
[https://www.researchgate.net/publication/309492101\\_The\\_impact\\_of\\_non-Saccharomyces\\_yeasts\\_in\\_the\\_production\\_of\\_alcoholic\\_beverages](https://www.researchgate.net/publication/309492101_The_impact_of_non-Saccharomyces_yeasts_in_the_production_of_alcoholic_beverages) > Consultado el: 27 de septiembre de 2020.

Vásquez, H.J., & Dacosta, O. 2007. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, investigación y tecnología*. Vol 8(4): 249-259.

Villarreal, P., Quintrel, P. A., Olivares-Muñoz, S., Ruiz, J. I., Nespolo, R. F., & Cubillos, F. A. 2021. Identification of new ethanol-tolerant yeast strains with fermentation potential from central Patagonia. *Yeast*. 13p.

White, J., & Doner, L. 1980. Honey Composition and Properties. *Beekeeping in the United States agriculture handbook*. N° 33: 82-91.

Xu, L., Yu, X., Li, M., Chen, J., & Wang, X. 2017. Monitoring oxidative stability and changes in key volatile compounds in edible oils during ambient storage through HS-SPME/GC-MS. *International Journal of Food Properties*. 20:1-13.

Zandamela, E. 2008. Caracterización Físicoquímica y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria. Barcelona. 221p.

Zhu, F., Du, B., & Li, J. 2016. Aroma Compounds in Wine. En: *Grape and Wine Biotechnology*. 273-283.

Zikov, M., Popovl, N., Vidakovicl, S., Ljubojević, D., Pelićl, M., Mihaljevl, Z., & Jakšićl, S. 2018. Electrical conductivity and acidity of honey. *Arhiv veterinarske medicine*. Vol. 11(1): 91 – 101.