

ZUBÍA	12	181 - 191	Logroño	1994
-------	----	-----------	---------	------

## ÍNDICE DE DIASTASAS Y CONTENIDO EN HIDROXIMETILFURFURAL EN LAS MIELES DE LA RIOJA\*

Susana Sanz Cervera\*\*  
M.<sup>a</sup> Mercedes Sanz Cervera\*\*\*

### RESUMEN

*Las diastasas son enzimas aportados por las abejas con el objeto de hidrolizar azúcares complejos en simples. Su actividad se pierde con el almacenamiento prolongado y son inactivadas por altas temperaturas. El hidroximetilfurfural (HMF) es un aldehído cíclico que se forma lentamente a partir de la fructosa de la miel en un proceso espontáneo que es acelerado por altas temperaturas y tratamientos térmicos inadecuados. Ambos permiten, por tanto, evaluar el grado de frescura de la miel y juzgar las condiciones de procesado y almacenamiento de este alimento.*

*Por ello, la legislación española establece un valor mínimo de 8 en la escala Gothe para la actividad diastasa (en las mieles de bajo contenido enzimático se permite un mínimo de 3 en la escala Gothe, siempre que el contenido en hidroximetilfurfural no exceda de 15 mg/kg) y un valor máximo de 40 mg/kg para el contenido en HMF.*

\* Recibido el 28 de abril de 1993. Aprobado el 21 de abril de 1994. Este artículo se incluye dentro del proyecto "Caracterización de las Mieles de La Rioja", subvencionado por la Consejería de Agricultura y Alimentación de la Comunidad Autónoma de La Rioja.

\*\* Profesora Titular Universidad. Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja. C/Luis de Ulloa, 20 - 26004 Logroño

\*\*\* Alumna de 3<sup>er</sup> Ciclo. Departamento de Producción Animal y Ciencias de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. C/ Vara de Rey, 24-1.º B - 26002 Logroño

*En los análisis del contenido en estos dos parámetros realizados en mieles de La Rioja, se han encontrado valores muy bajos en cuanto a contenido en HMF (valor medio de 1,6 mg/kg, con un máximo de apenas 10,1 mg/kg en una miel calentada en el momento de su extracción). Por su parte, el índice de diastasas de las mieles riojanas analizadas supera el mínimo establecido legalmente (valor medio 25,9.º Gothe, siendo el menor valor detectado de 11,3.º Gothe en la misma muestra referida anteriormente).*

*Así pues, todas las mieles de La Rioja cumplen ampliamente los requisitos legales establecidos para estos parámetros. Los datos obtenidos permiten sugerir establecer los límites máximos de 15 mg/kg para contenido en HMF y mínimos de 12.º Gothe para índice de diastasas en una Norma de Calidad de Miel de La Rioja.*

*Palabras clave: Miel, Diastasas, Hidroximetilfurfural.*

*Diastases are enzymes produced by bees whose object is to hydrolyze complex sugars and therefore transform them into simple ones. Their activity is lost through the long storing and their are inactive at high temperatures. Hydroxymethylfurfural (HMF) is a cyclic aldehyde which is formed slowly with the fructose of honey in a spontaneous process which is accelerated by high temperatures and inadequate thermic treatments. Therefore through the both of them it is possible to evaluate the degree of freshness of honey and to judge the conditions of process and storing of this nourishment.*

*Because of this, the Spanish law establishes a minimum value of 8 on the Gothe's scale for the activity of diastases (for honey with a low enzyme content there is allowed minimum level of 3 on the Gothe's scale, whenever the content of HMF is not higher than 15 mg/kg) and a maximum value of 40 mg/kg for the content in HMF. In the analysis of content in these two parametres tested on La Rioja honey, very low values for the content of HMF have been found (average value of 1,6 mg/Kg, with a maximum of hardly 10,1 mg/k in a heated honey at the moment of its extraction).*

*Moreover the rate of diastase in the analysed Riojan honey surpasses the established legal minimum (being the smallest value found at 11,3.º Gothe in the same above mentioned sample where the average value is 25,9.º Gothe).*

*Therefore all the honey in La Rioja fulfill all the legal established requirements for these parametres. The obtained information suggests the allowable established maximum limits of 15 mg/kg per content of HMF and minimum of 12.º Gothe per diastases rate in a honey of regular quality in La Rioja.*

*Key words: Honey, Diastase, Hydroxymethylfurfural.*

## 0. INTRODUCCIÓN

Las diastasas o amilasas son proteínas enzimáticas aportadas por las abejas durante la elaboración de la miel, con funciones hidrolíticas sobre azúcares complejos a los que transforman en azúcares simples. Su actividad es máxima en el momento de su extracción y decrece con el tiempo. También las altas temperaturas desestabilizan estas enzimas llegando a inactivarlas (Schade et al, 1958; Hadorn, 1961; Huidobro et al, 1984a).

El hidroximetilfurfural (HMF) es un aldehído cíclico que se origina espontáneamente a partir de la fructosa en medio ácido (valor medio de pH 3,9) en un proceso lento (se calcula que el aumento de HMF en mieles es de 1 mg/k por mes en climas suaves con temperaturas máximas de 30°C, Espada, 1982). Este proceso es acelerado fundamentalmente por el calor: almacenamientos de pocos días a 50°C tienen el mismo efecto sobre el aumento de HMF en miel que varios meses a 20°C. También los calentamientos para la licuefacción o pasteurización de la miel elevan los niveles de HMF (Winkler, 1955; Schade et al, 1958; White, 1979; Pichler et al, 1984; Huidobro et al, 1984b; Ghazali et al, 1986). El HMF no es una sustancia tóxica ni altera la miel a no ser que se encuentre en cantidad excesiva, lo que provocaría el oscurecimiento de la misma por interacciones con compuestos aminorados y azúcares, sufriendo polimerización y reordenación, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Jeuring et al, 1980).

Hay estudios que demuestran que el nivel de formación de HMF está correlacionado directamente con la humedad y contenido inicial de HMF en la miel (Schade et al, 1958). También la acidez ejerce un efecto positivo en su formación (Lampitt et al, 1929), comprobándose la existencia de una baja tasa de HMF en mieles calentadas debido a su más alto pH (4,5-5,0) (Hadorn, 1962). Igualmente este parámetro ha sido estudiado como indicador de adulteración de la miel con jarabes invertidos (Serra et al, 1986).

El aumento del contenido en HMF de la miel y la disminución en actividad diastasa son procesos paralelos a la degradación de vitaminas, proteínas y enzimas de este alimento, así como a la pérdida de sabor y aroma por lo que se han convertido en los mejores parámetros indicadores de la frescura de la miel y permiten juzgar sus condiciones de procesado y almacenamiento. Así, la legislación española permite un máximo de 40 mg/kg de HMF y un mínimo de 8 en la escala Gothe para el índice de diastasas (en las mieles de baja actividad enzimática se permite un mínimo de 3 Gothe siempre que el contenido en HMF no supere los 15 mg/kg) (B.O.E., 1983).

Para la determinación del índice de Diastasas, el método original de Gothe (1914) fué desarrollado por Kiermeier y Köberlein (1954) hasta el método colorimétrico actual en el que la detección visual se sustituye por medidas espectrofotométricas (Schade et al, 1958; Hadorn, 1961). Estos cambios y los realizados por White (1959 y 1964) se han incorporado en el método oficial de Codex Alimentarius Commission (1969) que es en la actualidad "Final Action" en la AOAC (1989) y oficial en España (BOE, 1986). Este procedimiento ha sido también seguido por

Dahle et al (1983), Huidobro y Simal (1984a), Dustman et al (1985), Tharasyvoulou (1986) y Sancho et al (1990) por citar algunos ejemplos.

Para la determinación del hidroximetilfurfural, White (1979) propuso un método espectrofotométrico en la región ultravioleta en el que el blanco se forma por reacción con bisulfito. Los resultados no coincidían con los de Whinkler (1955) que utilizaba el ultravioleta directo que daba resultados muy superiores. El método de White (1979) es actualmente oficial "Final Action" en la AOAC (1989) y oficial en España (BOE, 1986). Huidobro y Simal (1984b) comprobaron la idoneidad del método de White (1979) y no así la del método de Whinkler (1955) cuya imprecisión pusieron de manifiesto. El procedimiento de White (1979) es también seguido por Pichler et al (1984), Dustman et al (1985), Chepurnoi et al (1987) y Sancho et al (1990) entre otros.

En este trabajo nos hemos propuesto la determinación del índice de diastasas y contenido en HMF en las mieles de La Rioja, con objeto de establecer su adecuación a la normativa vigente.

## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1. Muestras

El estudio se ha realizado sobre 48 mieles de La Rioja pertenecientes a la cosecha de otoño de 1992. Su distribución geográfica se recoge en la figura 1 del trabajo de Sanz y Sanz (1994).

### 1.2. Origen botánico de las muestras

Para la determinación del origen floral de las mieles recogidas, se realizó el análisis microscópico del sedimento obtenido tras sucesivos lavados y centrifugaciones de 10 g de muestra una vez bien homogenizada (Louveaux et al, 1978). Botánicamente las mieles recogidas se clasificaron en cuatro tipos: "milflores" (27), "brezo" (*Ericaceae*) (6), "romero" (*Rosmarinus officinale*) (1) y "bosque" (de mielada o sus mezclas) (14).

El estudio del sedimento polínico muestra estrecha correspondencia con la flora existente en su localidad de origen (Sanz, 1991).

### 1.3. Determinación del Índice de Diastasas

El índice de Diastasas se ha medido por el método oficial en la AOAC (1984) y en España (BOE; 1986) basado en observar la acción de las diastasas de la miel

sobre una solución de almidón empleando, para hacer visible la hidrólisis, una solución yodo-yodurada. Hay que destacar que el almidón utilizado debe cumplir unas condiciones de humedad y de índice de azul muy específicas, por lo que deben utilizarse cualquiera de los almidones específicos para esta determinación que figuran en la AOAC (1989) o similares siempre que cumplan las exigencias del método. Además la disolución de almidón debe prepararse diariamente ya que se altera fácilmente y con el tiempo forma geles. Por otra parte, en esta determinación es conveniente hacer una corrección del color de la miel.

En este trabajo se ha empleado un baño termostático Selecta Unitronic 320 OR, espectrofotómetro Spectronic 20D y cronómetro marca Casio.

El cálculo del índice de diastasa se ha realizado haciendo uso de la recta de regresión sin tener en cuenta el valor de la absorbancia a 0 minutos a fin de establecer el tiempo en el que se alcanza la absorbancia de 0,235. En muestras de baja actividad diastásica se calcula este valor con los tres últimos puntos de la recta resultando así un coeficiente de correlación lineal más elevado que si se utilizan todos los valores. Para mieles de alta actividad diastásica, se determina el tiempo empleado en alcanzar 0,235 con las absorbancias a los tiempos 5, 10 y 15 minutos. La longitud de onda empleada en la medida de la absorbancia fue de 660 nm.

#### **1.4. Determinación del contenido en Hidroximetilfurfural**

El hidroximetilfurfural se determina por el método propuesto por White (1979) y oficial en España (BOE, 1986) basado en utilizar dos porciones alicuotas de la muestra previamente clarificada mediante la adición de reactivos Carrez y posterior filtración. Una de ellas, a la que se adicionan 5 ml de agua destilada, se lee frente a la otra, a la que se añade igual volumen de solución de bisulfito sódico el cual hace desaparecer la absorción debida al hidroximetilfurfural por rotura del doble enlace conjugado, con lo que otras absorbancias inespecíficas son corregidas. El bisulfito sódico debe prepararse diariamente a partir del producto sólido.

En este trabajo se ha utilizado el espectrofotómetro marca Perkin-Elmer modelo Lambda 3B UV/VIS.

El contenido en HMF se expresa en mg/kg.

## **2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La Tabla I muestra los valores medios, desviaciones estándar y valores máximos y mínimos encontrados tanto en el contenido en hidroximetilfurfural como índice de diastasas para las 48 muestras analizadas.

Las figuras 1 y 2 recogen gráficamente la distribución de los valores obtenidos para el conjunto de las mieles estudiadas para cada uno de los parámetros analizados.

Puede verse como el 95,8% del total de las muestras presentaron un contenido en HMF menor a 6 mg/kg (figura 1). Sólo una muestra correspondiente a miel de brezo (cuya viscosidad hace su extracción de los panales particularmente difícil) y que fue calentada por el apicultor en el momento de su obtención, presentó un contenido de HMF superior a 10 mg/kg. En un 8% de las mieles analizadas, el contenido en HMF fue tan pequeño que no pudo ser apreciado analíticamente. Puede comprobarse, por tanto, como la totalidad de las muestras analizadas cumplen ampliamente las especificaciones legales establecidas respecto a este parámetro.

El índice de diastasas de las mieles estudiadas queda igualmente por encima del mínimo permitido por la normativa vigente. Así, el 93,8% del total de muestras analizadas presentaron valores superiores a 15 Gothe (figura 2). Sólo tres muestras, entre las que se cuentan la miel de brezo antes comentada y otras dos muestras de miel milflores presentaron valores inferiores, aunque en ningún caso por debajo de 11,3 Gothe (valor mínimo encontrado).

A la espera de los resultados que se obtengan en el análisis de las cosechas de años posteriores, y cara al establecimiento de una Normativa de Calidad para la Miel de La Rioja, proponemos los límites máximos de 15 mg/kg para el contenido en HMF y un mínimo de 12 en la escala Gothe para el índice de diastasas.

Los valores propuestos coinciden con los aceptados para la Denominación de Origen Miel de La Alcarria (Tovar,1993) y los propuestos para mieles de otras Comunidades Autónomas (Sancho et al, 1990, Martínez Gómez et al, 1990; Riobos, 1990...). Para las mieles de bajo contenido enzimático, de las que no ha aparecido ninguna muestra en este estudio, y hasta la obtención de datos en mieles riojanas de este tipo, nos parece fundamentado el criterio seguido por otros autores que proponen establecer un mínimo de 3 en la escala Gothe para el índice de diastasas siempre y cuando el contenido en HMF no supere los 3 mg/kg (Sancho et al, 1990).

### 3. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. Se insiste en la utilización de almidones específicos para la determinación del índice de diastasas.
2. Las mieles de La Rioja, después de su extracción, cumplen los requisitos establecidos legalmente en cuanto a su índice de diastasas y a su contenido en HMF se refiere.
3. Para establecer una "Norma de Calidad" de la miel riojana, siempre y cuando no haya sido pasteurizada, se recomiendan los siguientes límites en los parámetros indicativos del grado de frescura:

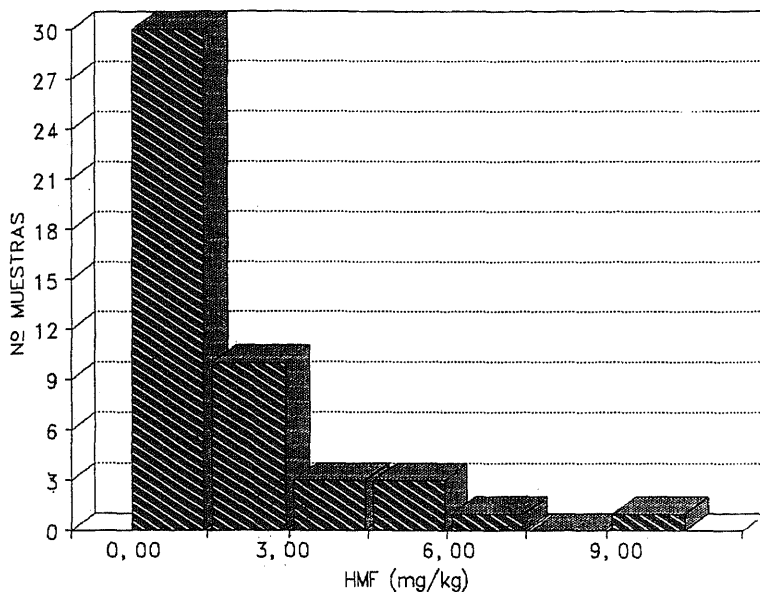


Figura 1. Gráfico de distribución de los valores de hidroximetilfurfural (HMF) en las 48 muestras analizadas, expresados en mg/kg.

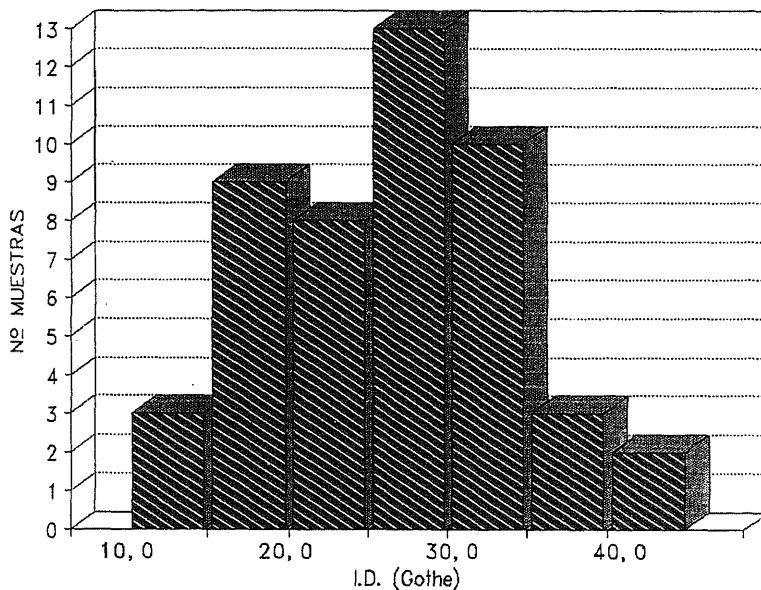


Figura 2. Gráfico de distribución de los Indices de Diastasas (I.D.) obtenidos en las 48 muestras analizadas, expresados en grados Gothe.

Tabla I. Resultados obtenidos en el análisis de hidroximetilfurfural (HMF), expresado en mg/kg e Índice de Diastasas (I.D.), expresado en grados Gothe de las 48 muestras estudiadas. (Resultados y Discusión).

	Procedencia	Tipo	HMF	I.D.
1	El Collado	Bosque	0,3	26,1
2	Bucesta	Bosque	0,6	23,1
3	Alcanadre	Milflores	1,9	25,3
4	Fuenmayor	Milflores	0,3	17,1
5	Fuenmayor	Milflores	0,6	16,9
6	Vinuesa	Brezo	0,0	30,1
7	Valvanera	Milflores	2,3	28,6
8	Varea	Milflores	1,9	29,5
9	Ezcaray	Milflores	0,3	32,1
10	Daroca	Bosque	0,2	31,8
11	Daroca	Bosque	0,6	28,6
12	El Rasillo	Bosque	1,3	21,5
13	Nivea	Bosque	3,0	18,2
14	Nieva	Bosque	1,8	25,3
15	Panzares	Bosque	0,7	30,1
16	Panzares	Bosque	0,5	32,7
17	Nalda	Milflores	5,1	15,5
18	San Román	Bosque	3,5	19,2
19	Alcanadre	Milflores	0,6	27,8
20	Enciso	Milflores	4,1	18,3
21	Anguiano	Brezo	0,9	25,9
22	Anguiano	Romero	1,3	24,8
23	Ezcaray	Milflores	1,5	24,3
24	Mansilla	Bos-Bre	2,2	20,5
25	Cornago	Milflores	0,0	38,2
26	Cervera	Milflores	0,8	26,2
27	Igea	Milflores	0,4	31,5
28	Igea	Milflores	0,0	40,2
29	Ortigosa	Milflores	0,0	39,1
30	Ortigosa	Bosque	0,2	32,1
31	Ortigosa	Bosque	0,3	33,2
32	Matute	Bosque	0,6	30,7
33	Grávalos	Milflores	1,1	28,2
34	Soto	Brezo	1,5	28,2
35	Ventosa	Brezo	2,3	23,5
36	Quel	Milflores	0,8	27,4
37	Alfaro	Milflores	4,3	12,5
38	Aguilar	Milflores	3,6	15,6
39	Rodezno	Milflores	2,3	18,9
40	Aguilar	Milflores	1,9	23,2
41	Villaverde	Milflores	1,4	28,2
42	Entrena	Milflores	1,2	30,1
43	Piqueras	Milflores	0,0	38,7
44	Calahorra	Milflores	0,0	41,5
45	Tudelilla	Brezo	0,8	22,6
46	Clavijo	Milflores	2,4	17,8
47	Fonzaleche	Milflores	6,4	13,4
48	Piqueras	Brezo	10,1	11,3
Valor medio			1,6	26,0
Desviación standar			1,9	7,4
Valor máximo			10,1	41,5
Valor mínimo			0,0	11,3



- Hidroximetilfurfural: No más de 15 mg/kg
- Índice de diastasas: Como mínimo 12 en la escala de Gothe.

Para mieles de bajo contenido enzimático 3 en la escala Gothe, siempre que su contenido en HMF sea inferior a 3mg/kg.

#### 4. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a la ayuda recibida de la Consejería de Agricultura y Alimentación de la Comunidad Autónoma de La Rioja y la Universidad de La Rioja. La Dra. Dña. Consuelo Pérez Arquillué de la Universidad de Zaragoza orientó con su experiencia los primeros pasos de este estudio.

Las autoras agradecen la colaboración de Juan Hidalgo Torres en la elaboración de gráficas y en el análisis estadístico, así como a los Apicultores que desinteresadamente han colaborado proporcionando muestras y datos de interés.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

- Association of Official Analytical Chemist, 1989. Official Methods of Analysis. 15th Edition. Arlington, Virginia. 22209 USA.
- Boletín Oficial del Estado, 1983. Normas de Calidad. Miel destinada al comercio interior. Orden de 5 de agosto de 1983. *B.O.E.* (193), 22384-22386.
- Boletín Oficial del Estado, 1986. Métodos oficiales de análisis para la miel. Orden de 12 de junio de 1986. *B.O.E.* (145), 22195-22202.
- Chepurnoi, I.P., Kunizhev, S.M. y Chebotareva, N.G., 1987. Formation of HMF during storage and treatment of certain food products. *Vopr. Pitan.* (67), 8-19.
- Codex Alimentarius Commission, 1969. Recommended European Standard for Honey. CAC/RS-12-1969.Jt. FAO/WHO Food Stand. Program, Roma. Reprinted in *Bee World*, 1970 (51), 79-91.
- Dahle, H.K., Tomtum, M. y Norum, E., 1983. Control of amylase of honey. *Nor. Veterinaertidsskr.* (95), 17-23.
- Dustmann, J.H., Van Praagh, J.P. y Bote, K., 1985. Determination of diastase, invertase and hydroxymethylfurfural in honey. *Apidologie* (16), 19-29.
- Espada, T., 1982. El Hidroximetilfurfural y el oscurecimiento de la miel. *Vida Apícola.* (3), 15-17.
- Ghazali, H.M. y Sin, H.K., 1986. Coconut honey, the effect of storage temperature on some physicochemical properties. *m.J.Api.Res.* (25-2), 109-112.

- Gothe, F., 1914. Experimentelle-Studin über Eigenschaften und Wirkungsweise der Honigdiastase sowie die Beurteilung des Honigs auf Grund seines Diastasegehaltes. *Z. Unters. Nahr. u. Genussmittel* (28), 286-321.
- Hadorn, H., 1961. Zur Problematik der quantitativen Diastasebestimmung in Honig. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. u. Hyg.* (52), 67-103.
- Huidobro, J.F y Simal, J., 1984a. Parámetros de calidad de la miel (V): Índice de diastasas. *Offarm.*(3), 705-714.
- Huidobro, J.F. y Simal, J., 1984b. Parámetros de calidad de la miel (VI): Hidroximetilfurfural. *Offarm.*(3), 767-781.
- Jeuring, J. y Koppers, M., 1980. Effect of storage on carbohydrates, acidity and diastase content of honey. *J.Food.Sci.* (254), 63-71.
- Keimeier, F. y Köberlein, W., 1954. über die Hitzeaktivierung von Enzymen im Honig. *Z. Lebensmittelunters. u. Forsch* (98), 329-347.
- Lampitt, G. y Dyce, E.J.,1929. Evolution of some phisicochemical properties of honey during the storage. *Cornell. Univ. Agric. Exp. Sattion Ithaca N.Y. Bull* (528), 124-132.
- Louveaux, J., Maurizio, A. y Vorwohl., 1978. Methods of melissopalynology. *Bee World.* (59-4), 139-157.
- Martínez Gómez, E., Montilla Gómez, J. y Guerra Hernández, E., 1990. Análisis de la composición de miel comercial de eucalipto adquirida en España. *Comunicaciones al 5.º Congreso Nacional Apícola.* Don Benito. Badajoz, 114-118.
- Pichler, F.J., Vorwohl, G. y Gierschner, K., 1984. Factors controlling the production of hydroxymethylfurfural. *Apidologie* (15), 171-187.
- Riolobos, S., 1990. Estudio de la composición físico-química de las mieles extremeñas y extranjeras. *Comunicaciones del 5.º Congreso Nacional Apícola.* Don Benito, Badajoz. 86-90.
- Sancho, M.T., Muniategui, S., Huidobro, J.F. y Simai, J., 1990. Índice de diastasas y contenido en hidroximetilfurfural en las mieles de la Comunidad Autónoma del País Vasco. *Comunicaciones al 5.º Congreso Nacional Apícola.* Don Benito, Badajoz, 126-130.
- Sanz, S., 1991. *Flora de interés apícola de La Rioja.* Consejería de Agricultura y Alimentación. Gobierno de La Rioja (21), 1-256.
- Sanz, S. y Sanz, M., 1994. Humedad, Cenizas y Conductividad eléctrica de mieles de La Rioja. *Zubía* (12), 143-158.
- Schade, J.W., Marsh, G.L. y Eckert, J.E.,1958. Diastase activity and hydroxymethyl-furfural in honey and their usefulness in detecting heat alteration. *Food Res.* (23), 446-463.

- Serra, J. y Gómez, A., 1986. Determinación de la miel adulterada. *Alimentación, equipos y tecnología*. Jul-Ag., 143-147.
- Tharasyvoulou, A.T., 1986. The use of HMF and diastase as criteria of quality of Greek honey. *J.Apic.Res.* (25), 186-195.
- Tovar, A., 1993. Denominación para la miel de Alcarria. *Vida apícola* (58), 18-24.
- White, J.W.Jr., 1959. Report on the analysis of honey. *J.Ass.Off.Analyt.Chem.* (42), 341-348.
- White, J.W.Jr., 1964. Diastase in honey. The Schade method. *J. Ass.Off.Analyt.Chem.* (47), 486-488.
- White, J.W.Jr., 1979. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *J.AOAC* (62-3), 509-514.
- Whinkler, O., 1955. Beitrag zum Nachweis und zur Bestimmung von Oxymethylfurfural in Honig und Kunsthoing. *Z. Lebensmittelunters. u. Forsch.* (102-3), 161-167.