UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL

VALPARAÍSO – CHILE

"FACTIBILIDAD DEL USO DE HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE LEVADURAS COMO FUENTE DE NITRÓGENO ORGÁNICA EN LA FERMENTACIÓN VÍNICA"

PAULA CONSTANZA ROJAS VILLALOBOS

MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE

INGENIERO CIVIL QUÍMICO

PROFESOR GUÍA

DR. PEDRO VALENCIA ARAYA

PROFESOR GUÍA

DRA. ALEJANDRA URTUBIA URBINA

SEPTIEMBRE – 2016

Agradecimientos

Gracias a mis padres y hermana, quienes me han apoyado incondicionalmente en todos mis proyectos, y con todo el amor del mundo. Gracias a mis tíos y primos por su apoyo y ayuda durante toda mi vida. Gracias a mis abuelos por enseñarme la belleza de pensar. Gracias a mis amigos del liceo, por todos estos años de cariño y amistad, por las alegrías, las penas y los infinitos momentos que vivimos juntos. Gracias a mis amigos de la universidad, por su compañía y aguante en todo este proceso, por las jornadas de aprendizaje y debate en conjunto. Gracias a los amigos que conocí en Alemania, quienes me enseñaron que efectivamente, y como canta Jorge González, no necesitamos banderas. Gracias a Alex, por todo su cariño y por permitirme formar parte de su vida. Gracias a todos quienes me ayudaron a crecer. Gracias a la vida, que me ha dado tanto.

Resumen

La borra generada en la industria del vino corresponde a un potencial subproducto que contiene, entre otros, levaduras formadas durante el proceso de fermentación. El diaminofosfato (DAP) es una fuente de nitrógeno inorgánica utilizada como nutriente para las levaduras. En este trabajo se propone utilizar la levadura remanente de la fermentación del vino como fuente de nitrógeno orgánica para nuevas fermentaciones, en reemplazo del DAP. Para lograr una mayor biodisponibilidad de los nutrientes para la levadura, se realizó un pretratamiento de ultrasonido para lograr la ruptura celular y posteriormente se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de las proteínas con el fin de aumentar la biodisponibilidad del nitrógeno presente en dichas proteínas. Este estudio comprende determinar los efectos que tiene el pretratamiento de las levaduras sobre la hidrólisis enzimática de las proteínas y la factibilidad de utilizar este hidrolizado como fuente de nitrógeno orgánica en la fermentación.

La estrategia utilizada fue estudiar la cinética de liberación de proteínas con ultrasonido, para determinar las condiciones adecuadas en este proceso. Una vez elegidas las condiciones, se preparó el hidrolizado que fue utilizado como fuente de nitrógeno, con un diseño de experimentos que contempla una fermentación control con DAP, además de los hidrolizados que son preparados según aplicación o no de ultrasonido, y grado de hidrólisis de 5% y 15%. Para realizar el seguimiento de las fermentaciones se midió densidad, turbidez, °Brix, azúcares reductores finales y °Alcohólico final.

Se obtuvo que el pretratamiento aumentó la eficiencia de la hidrólisis enzimática de proteínas de levadura, logrando una mayor velocidad de reacción y un mayor grado de hidrólisis. El grado de hidrólisis de las levaduras sin pretratamiento fue de 10%, mientras que el de las levaduras sometidas a autoclavado y ultrasonido fue de 14%.

Durante las fermentaciones la evolución de la densidad, turbidez y °Brix no mostraron diferencias significativas respecto entre los distintos tipos de fuente de nitrógeno. Se observó que la fermentación control tuvo una mayor variación de densidad al inicio, lo cual

se infiere que es debido a la mayor tasa de asimilación del DAP por parte de las levaduras, en contraste con los péptidos y aminoácidos que se encuentran en el hidrolizado. La concentración de azúcares reductores finales estuvo entre 1,45 [g/L] y 1,6 [g/L], mientras que el °Alcohólico final estuvo entre 12,5° y 14,5°. Tanto para los azúcares reductores como °Alcohólico no se encontró diferencia significativa entre el uso de DAP y los experimentos que usaron el hidrolizado como fuente de nitrógeno bajo distintos tratamientos.

Finalmente, se establece que es posible utilizar el hidrolizado enzimático de levadura como fuente de nitrógeno en la fermentación del vino. Se recomiendan futuros estudios donde además se cuantifiquen otros parámetros involucrados en las características organolépticas del vino, como son los alcoholes pesados, ésteres y compuestos fenólicos, entre otros.

Índice

Agradecimientos I
Resumen II
Índice IV
Índice de Tablas VI
Índice de Figuras VII
Introducción 2
1 Antecedentes 5
1.1 Industria alimentaria en Chile: residuos y su revalorización. 5
1.2 Industria del Vino 7
1.2.1 Proceso de elaboración del vino 9
1.2.2 Residuos en la industria del vino 11
1.2.3 Efectos de la fuente de nitrógeno sobre la fermentación vínica 13
1.3 Potenciales usos de levaduras residuales de la fermentación vínica 17
1.3.1 Preparación de extracto de levaduras a partir de la borra 17
1.3.2 Técnicas de ruptura celular 18
1.3.3 Ultrasonido 21
1.4 Hidrólisis de proteínas 22
1.4.1 Hidrólisis química 23
1.4.2 Hidrólisis enzimática de proteínas 24
1.4.3 Elaboración de hidrolizados proteicos 27
1.4.4 Propiedades funcionales de los hidrolizados enzimáticos 28
1.4.5 Grado de hidrólisis 31
1.4.6 Método del pH-stat 32
1.5 Uso de levaduras como fuente de nitrógeno en la fermentación vínica 33
2 Hipótesis y Objetivos 36
2.1 Hipótesis 36
2.2 Objetivos 37
2.2.1 Objetivo general 37
2.2.2 Objetivos específicos 37
3 Metodología 39
3.1 Materiales y Equipos 41
3.1.1 Equipo de emisión de ondas de Ultrasonido (Sonicador) 41

3.1.2 Autotitulador 42
3.1.3 Reactivos 43
3.1.4 Levadura 43
3.1.5 Mosto de uva para fermentación 44
3.2 Procesamiento en autoclave 44
3.3 Diseño de experimentos 45
3.4 Pretratamiento: Ultrasonido 46
3.4.1 Cinética de sonicación 46
3.4.2 Lisis celular 47
3.5 Hidrólisis enzimática 48
3.5.1 Hidrólisis para análisis de efectividad de pretratamiento 48
3.5.2 Hidrólisis de fracción soluble e insoluble 48
3.5.3 Preparación de hidrolizado para fermentación 49
3.5.4 Hidrólisis de la borra de las fermentaciones 51
3.6 Fermentación 51
3.6.1 Montaje 51
3.6.2 Análisis y equipos 57
4 Resultados y discusión 63
4.1 Cinética de ruptura de estructura celular con ultrasonido. 63
4.1.1 Lisis celular 63
4.1.2 Tratamiento mediante ultrasonido 64
4.2 Hidrólisis enzimática de proteínas de levadura 65
4.2.1 Efecto del pretratamiento sobre la hidrólisis de levaduras 65
4.2.2 Efecto del pretratamiento sobre la hidrólisis de levaduras separadas en fases. 67
4.2.3 Autolisis 70
4.2.4 Preparación de hidrolizado a usar como fuente de nitrógeno en la fermentación vínica 71
4.3 Seguimiento de la fermentación 72
4.4 Hidrólisis enzimática de la borra de fermentaciones 83
5 Conclusiones y Proyecciones 86
6 Referencias 89
7 Anexos 93
7.1 Análisis de Lowry para cuantificación de concentración de proteínas 93
7.2 Análisis de DNS para cuantificación de concentración de azúcares reductores 95

7.3 Resultados experimentales 97
7.3.1 Lisis celular 97
7.3.2 Cinética de ultrasonido 98
7.3.3 Fermentación: densidad 99
7.3.4 Fermentación: Turbidez 99
7.3.5 Fermentación: °Brix 100
7.3.6 Fermentación: Azúcares reductores residuales 100
7.3.7 Fermentación: ° Alcohólico final 101

Índice de Tablas

Tabla 1.1: Fuentes de nitrógeno comúnmente usadas en la fermentación de alimentos [23] 15
Tabla 1.2: Consumo de energía y selectividad de extracción de producto para cada método de ruptura celular (Adaptado de [26]) 20
Tabla 3.1: Especificaciones técnicas Autotitulador Compact Titrator G20 42
Tabla 3.2: Resultados de análisis proximal a levaduras Lalvin EC1118 44
Tabla 3.3: Especificaciones mosto de uva 44
Tabla 3.4: Diseño de experimentos 45
Tabla 3.5: Parámetros usados en el cálculo del grado de hidrólisis 50
Tabla 4.1: Reacción de fermentación alcohólica y cálculo de moles consumidos y producidos considerando 100% de rendimiento 79
Tabla 4.2: Comparación entre °Alcohólico medido y °Alcohólico estequiómetrico: Rendimiento de la reacción 81
Tabla 4.3: Promedios de concentración de azúcares reductores residuales para cada experimento 82
Tabla 4.4: Resultados prueba t entre dos muestras para azúcares reductores residuales 82
Tabla 4.5: Promedios de °Alcohólico final para cada experimento 82
Tabla 4.6: Resultados prueba t entre dos muestras para °Alcohólico final 83
Tabla 7.1: Resultados experimentales para Lisis celular, réplica I 97
Tabla 7.2: Resultados experimentales para Lisis celular, réplica II 97

Tabla 7.3: Resultados experimentales para Cinética de ultrasonido, régimen 10% 98
Tabla 7.4: Resultados experimentales para cinética de ultrasonido, régimen 80% 98
Tabla 7.5: Resultados experimentales para densidad de fermentaciones 99
Tabla 7.6: Resultados experimentales para turbidez de fermentaciones 99
Tabla 7.7: Resultados experimentales para °Brix de fermentaciones 100
Tabla 7.8: Resultados experimentales para azúcares reductores de fermentaciones mediante método DNS 100
Tabla 7.9: Resultados experimentales para °Alcohólico medido el último día de la fermentación (día 7) 101

Índice de Figuras

Figura 1.1: Porcentaje del PIB correspondiente al sector agropecuario y pesca [9] 5
Figura 1.2: Producción de Vino en Chile para consumo [13] 7
Figura 1.3: Principales exportadores de vino año 2014 [14] 8
Figura 1.4: Evolución de la superficie nacional de viñedos [15]. 8
Figura 1.5: Proceso de elaboración del vino [17] 9
Figura 1.6: Etapas de vinificación y producción de desechos (Adaptado de [21]) 12
Figura 1.7: Principales componentes que le otorgan sabor al vino metabolizados por la levadura [7] 14
Figura 1.8: Clasificación de los tipos de ruptura celular (Adaptado de [26]). 19
Figura 1.9: Esquema de ruptura celular y liberación de componentes intracelulares mediante ultrasonido 21
Figura 1.10: Reacción de hidrólisis de proteínas 23
Figura 1.11: Clasificación de proteasas (Adaptado de [4]) 26
Figura 1.12: Evolución de las aplicaciones de los hidrolizados proteicos [31] 28
Figura 1.13: Efectos fisiológicos de alimentos derivados de proteínas bioactivas (Adaptado de [33]) 29
Figura 1.14: Esquema de elaboración actual de vino versus propuesta de elaboración 34
Figura 3.1: Esquema de metodología para preparación de hidrolizado 40

Figura 3.2: Esquema de metodología para fermentaciones 41
Figura 3.3: Sonicador modelo VCX-130 42
Figura 3.4: Potenciómetro Compact Titrator G20 marca Mettler Toledo 43
Figura 4.1: Liberación de proteínas en lisis celular en medio alcalino. Concentración de levaduras 0,5% p/p, NaOH 0,05 [N], 90°C. 63
Figura 4.2: Porcentaje de proteína liberada mediante ultrasonido. 10%: 1[s] operando, 9[s] en reposo; 80%: 8[s] operando, 2[s] en reposo; Tiempo total 90[min]; Amplitud 50%. 64
Figura 4.3: Producto formado en hidrólisis enzimática de proteínas de levaduras con pretratamiento de autoclave, ultrasonido y control. T=50[°C]; 40 [g] de solución; 20% p/p de levaduras; pH = 8; 6,75 [mAU/g] de enzima. 66
Figura 4.4: Grado de hidrólisis enzimática de proteínas de levaduras con pretratamiento de autoclave, ultrasonido y control. T=50[°C]; 40 [g] de solución; 20% p/p de levaduras; pH = 8; 6,75 [mAU/g] de enzima. 66
Figura 4.5: Producto formado en hidrólisis enzimática de proteínas de levaduras en fracción soluble con pretratamiento de autoclave, ultrasonido y control. T=50[°C]; 40 [g] de solución; 20% p/p de levaduras; pH = 8; 2 [mAU/g] de enzima 68
Figura 4.6: Producto formado en hidrólisis enzimática de proteínas de levaduras en fracción insoluble con pretratamiento de autoclave, ultrasonido y control. T=50[°C]; 40 [g] de solución; 20% p/p de levaduras; pH = 8; 2 [mAU/g] de enzima 69
Figura 4.7: Producto formado en autolisis de proteínas de levaduras. T = 50[°C], 40[g] de solución, 20% p/p de levaduras, pH = 8 70
Figura 4.8: Grado de hidrólisis en autolisis de proteínas de levaduras. T = 50[°C], 40[g] de solución, 20% p/p de levaduras, pH = 8 71
Figura 4.9: Grado de hidrólisis enzimática de proteínas de levaduras. T = 50[°C]; 40[g] de solución; 20% p/p de levaduras; pH=8; 6,75 [mAU/g] de enzima. 72
Figura 4.10: Densidad de fermentación v/s tiempo. T =28[°C]; Agitación = 120[rpm] 73
Figura 4.11: Razón de variación de densidad respecto a la variación del tiempo. T =28[°C]; Agitación = 120[rpm] 74
Figura 4.12: Turbidez v/s tiempo. T =28[°C]; Agitación = 120[rpm] 76
Figura 4.13: °Brix v/s tiempo. T =28[°C]; Agitación = 120[rpm] 77

Figura 4.14: Concentración de azúcares reductores residuales al día 7 de fermentación. T =28[°C]; Agitación = 120[rpm] 78
Figura 4.15: °Alcohólico día 7 en comparación al °Alcohólico estequiométrico. T =28[°C]; Agitación = 120[rpm] 80
Figura 4.16: Hidrólisis enzimática de proteínas de borra de vino recuperada desde las fermentaciones realizadas. T = 50[°C]; 40[g] de solución; 50% p/p de borra; pH=8; 6,75 [mAU/g] de enzima. 84
Figura 7.1: Curva de calibración de albúmina para método Lowry 94
Figura 7.2: Curva de calibración de glucosa para método DNS 96

Introducción

La industria de alimentos tiene un constante aumento en su producción, lo cual es producto del crecimiento de la población en los últimos siglos. Esto trae consigo el aumento de los residuos generados por la industria, los cuales corresponden al 50% de la materia prima [1]. Los residuos poseen distintos orígenes y características, definiendo los orígenes según sea la industria agropecuaria, avícola, agrícola o acuícola, y sus características de acuerdo a la composición del residuo.

En Chile, la industria vitivinícola es una de las más importantes, gracias a la excelente calidad y variedad de sus vinos. Estas características son producto del tipo de suelo y clima que existe dentro del territorio nacional, particularmente en la zona central del país. Al año 2014, el área de viñedos plantados alcanzó cerca de 140 mil hectáreas, lo cual es equivalente a alrededor del 10% de la superficie total destinada a siembra, que considera hortalizas, frutas, cereales, leguminosas, entre otros [2].

Los residuos orgánicos generados en la elaboración del vino son principalmente los componentes que se obtienen al separar la uva de su racimo: el orujo, que corresponde a la piel y pepas de la uva; y la borra, que es el precipitado generado durante la fermentación y almacenamiento del vino, compuesto por sales de tartrato y levadura. Dado que estos residuos son de origen vegetal, se cuenta con numerosas alternativas de tratamiento y aprovechamiento, sin embargo no existe mucha aplicación de ellas a nivel industrial. Hoy en día, los principales tratamientos corresponden a la elaboración de destilados de orujo y el uso de la borra como fertilizante.

La borra tiene un especial potencial como subproducto de la fermentación, ya que contiene las levaduras remanentes del proceso. Las levaduras tienen una composición rica en proteínas e hidratos de carbono, lo cual las convierte en una fuente de nutrientes con potenciales aplicaciones en distintas áreas, como por ejemplo la industria farmacéutica, alimentaria, agropecuaria, entre otras. Para esto se requiere generar un extracto de levaduras a partir de la ruptura de la estructura celular y así aprovechar su contenido.

Una alternativa de tratamiento es la hidrólisis de sus proteínas, que consiste en romper la estructura proteica formando péptidos y aminoácidos libres, los cuales resultan ser una fuente de nitrógeno con numerosas aplicaciones. Particularmente, la hidrólisis enzimática de proteínas resulta ser una opción llamativa, ya que el producto generado cuenta con propiedades funcionales que mejoran la calidad respecto a la materia prima original. Algunas de estas propiedades son beneficiosas para la salud, como es la capacidad antioxidante, efectos anti hipertensivos e incluso la posibilidad de reducir la grasa abdominal [3]. Dentro de las propiedades funcionales también se enumeran un aumento en la solubilidad, emulsión y capacidad espumante, entre otras [4]. Las propiedades mencionadas anteriormente son las que generan un particular interés en el producto obtenido desde la hidrólisis enzimática de proteínas, específicamente, en la industria alimentaria y agropecuaria por sus beneficios asociados a la ingesta del hidrolizado.

Otro de los potenciales usos para este hidrolizado es su uso como fuente de nitrógeno orgánica en la fermentación vínica, lo cual podría tener numerosos beneficios en el vino generado. Se ha documentado que el uso de fuentes orgánicas de nitrógeno en la fermentación del vino permite un aumento en la generación de los compuestos volátiles, los cuales son los encargados del aroma y sabor, y a la vez mejorando la percepción sensorial del vino [5–7]. Asimismo, se tiene una mayor velocidad en la formación de etanol, alcanzando el grado alcohólico deseado en menos tiempo. Esto representa una alternativa atractiva, ya que sería posible tener un producto de mejor calidad en un menor tiempo de fermentación [7,8].

Sin embargo, no se tiene certeza de que estos serían los efectos observables al utilizar el hidrolizado enzimático de levaduras como fuente de nitrógeno en la fermentación del vino, ya que en este caso se trata de una mezcla de péptidos y aminoácidos, lo cual podría ser una fuente de nitrógeno difícil de asimilar por la levadura. Es por esto que el presente trabajo busca establecer la factibilidad del uso de este hidrolizado en los procesos de fermentación vínica, y determinar la relación que exista entre las variaciones de la fuente de nitrógeno y los parámetros a medir durante el seguimiento de la fermentación.

Capítulo 1

Antecedentes

1 Antecedentes

1.1 Industria alimentaria en Chile: residuos y su revalorización.

La industria alimenticia es uno de los sectores que se mantiene en constante alza, debido al sostenido aumento de población en los últimos años y por consiguiente, el aumento del consumo de alimentos. Además, se debe considerar el interés de los últimos gobiernos de llevar al país a ser una potencia alimentaria reconocida a nivel mundial. Dentro de la industria de alimentos, se considera también el sector agroalimentario, que comprende productos hortofrutícolas, animales vivos y productos cárnicos, pescados y mariscos, aceites y grasas, lácteos, entre otros.

En Chile esta industria se ha mantenido con una producción constante, pero que toma importancia dentro del producto interno bruto, alcanzando un valor del 3% del PIB como se muestra en la Figura 1.1:

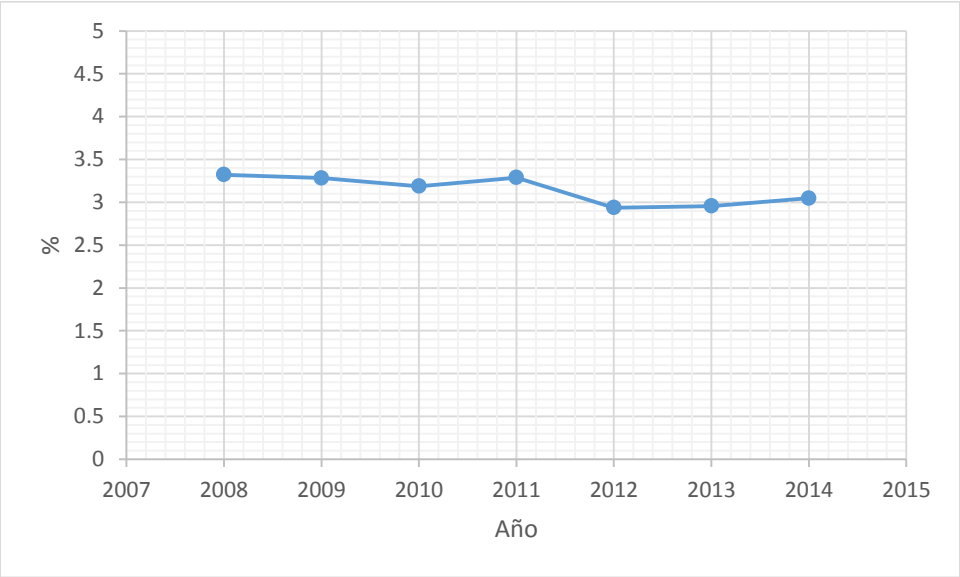

Figura 1.1: Porcentaje del PIB correspondiente al sector agropecuario y pesca [9]

En el cuarto trimestre del 2014 el PIB agropecuario y silvícola incrementó en un 4,9% en relación al mismo trimestre del 2013. Además se registró un crecimiento sectorial de 0,8% en el año 2014. La industria de alimentos es la principal rama de la industria manufacturera chilena, y contribuyó con 22,1% del valor agregado de la manufactura en 2014. El PIB de la industria de alimentos se elevó 3,3% durante el año pasado, impulsada por el dinamismo de la industria pesquera. [10]

Este crecimiento trae consigo un aumento de los residuos orgánicos provenientes de los procesos de manufactura alimentaria, dentro de los cuales es posible encontrar plumas, sangre y huesos para la industria avícola; piel, cabeza, espina y cola para la industria pesquera y diversos residuos vegetales para la agricultura, entre otros.

Junto a lo anterior, es posible detallar el impacto de los desechos de la industria alimentaria a nivel mundial. Por ejemplo, la agencia de medioambiente de la Unión Europea cuantifica el desperdicio o pérdida de los alimentos en un tercio de la producción mundial total, donde un 39% corresponde a la industria manufacturera de alimentos. Esto incluye subproductos, productos dañados o sobreproducción [11]. Por otro lado, del total de los residuos de la cadena de suministro de alimentos (es decir, desde su recolección o elaboración hasta su consumo), cerca del 40% de los residuos son generados en la etapa de producción agrícola y un 15% se generan en la etapa de procesamiento de los alimentos. Es decir, existe un gran volumen de elementos que son considerados como residuos, y que son desaprovechados cuando aún tienen el potencial de ser procesados y convertirse o incorporarse a nuevos productos [12].

En la actualidad, es posible otorgar el carácter de subproducto a diversos residuos de origen animal. Sin embargo, éstos son procesados para elaborar harinas y aceites las cuales tienen un bajo valor nutricional y que en su mayoría son utilizadas como alimento para ganado. Por otro lado, para los residuos de origen vegetal existe menos procesamiento, utilizándose en su mayoría como compost para los mismos cultivos, o quemándose completamente.

1.2 Industria del Vino

La industria del vino en Chile posee un aumento sostenido a lo largo de los últimos años, gracias a su posicionamiento en el mercado mundial y el consiguiente aumento de las exportaciones según la Figura 1.2.

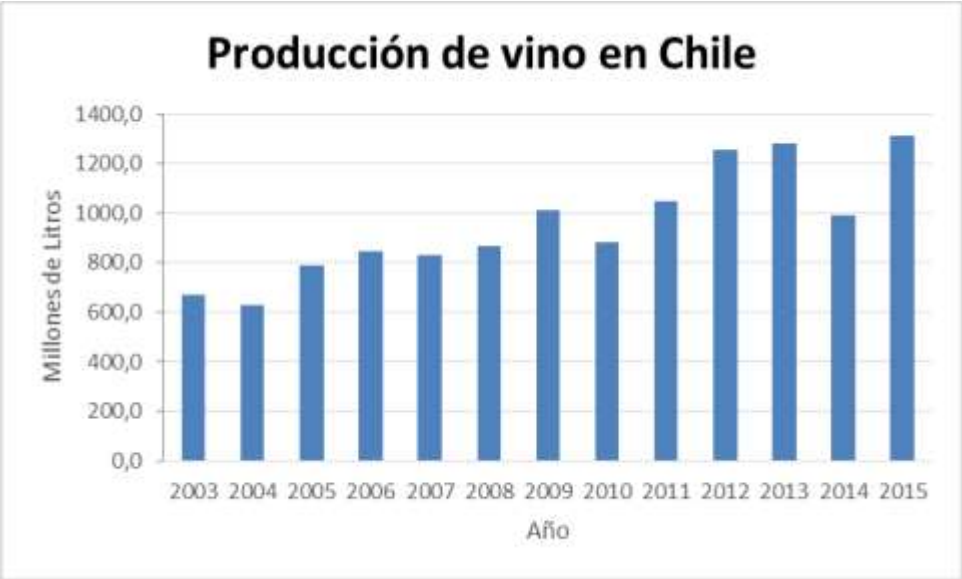

Figura 1.2: Producción de Vino en Chile para consumo [13]

Al año 2014, Chile se encuentra en el cuarto lugar de la producción mundial de vino, con un total de 806 millones de litros anuales [14] (Figura 1.3). Esto confirma el comportamiento al alza del mercado vitivinícola chileno, el cual se consolida como potente y de gran volumen de producción.

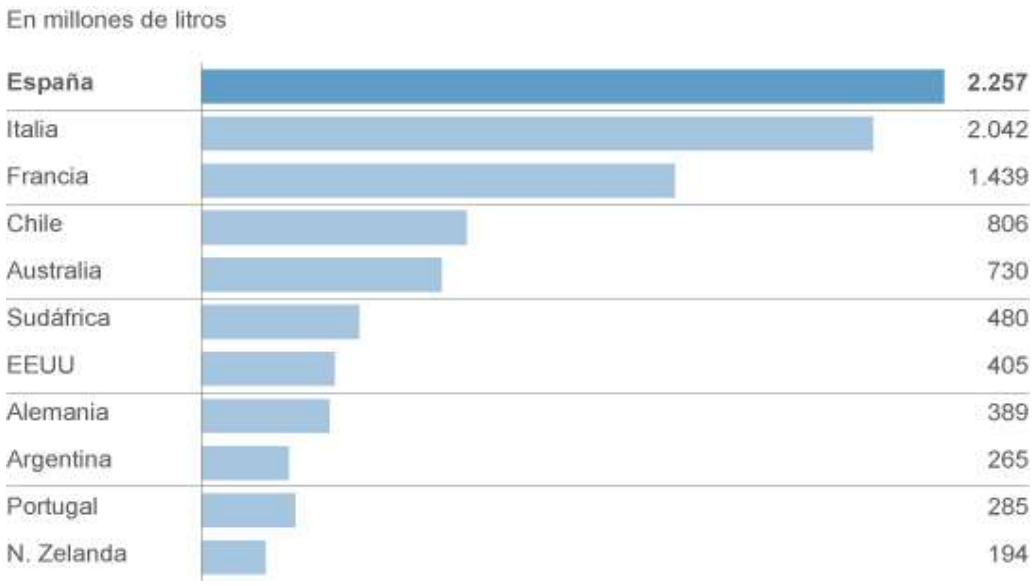

Figura 1.3: Principales exportadores de vino año 2014 [14]

Asimismo, el área de vides cultivadas ha ido en aumento en los últimos años, cuya proyección también tiende al alza. Según el catastro vitivinícola del Servicio agrícola y ganadero (SAG) del año 2014, esta tendencia presenta una tasa anual de crecimiento del 3% para el período entre los años 1998 y 2014, estipulado en la Figura 1.4. La superficie total al año 2014 alcanza las 137.582 hectáreas, de las cuales 101.746 (74%) corresponden a variedades tintas y 34.836 (26%) corresponden a variedades blancas.

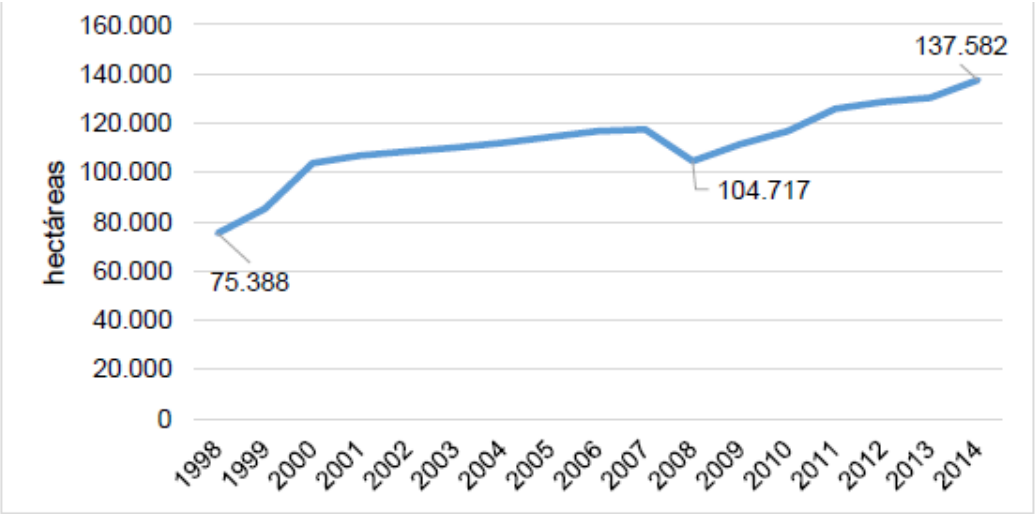

Figura 1.4: Evolución de la superficie nacional de viñedos [15].

En este crecimiento se refleja el aumento de la producción de litros de vino para consumo a nivel nacional, y de la mano un aumento del volumen de desechos provenientes del procesamiento y fabricación de esta bebida alcohólica.

1.2.1 Proceso de elaboración del vino

Según la Ley 18.455 elaborada por el ministerio de agricultura [16], se establece que el vino corresponde a una bebida fermentada, obtenida exclusivamente de la fermentación del mosto de uvas frescas o asoleadas de la especie Vitis vinífera.

Si bien el proceso de fabricación del vino se encuentra estandarizado, es posible encontrar variaciones realizadas por cada fábrica debido a la aplicación de nuevas tecnologías, la búsqueda de características especiales del producto, entre otras.

La elaboración del vino consta de varias etapas, las cuales se muestran en la Figura 1.5.

Figura 1.5: Proceso de elaboración del vino [17]

- Vendimia o cosecha: Cuando la uva ha alcanzado la maduración deseada se realiza la recolección de la uva, separando el fruto dañado y descartándolo. Luego se transporta a la bodega, con el cuidado que la uva llegue entera y fresca.
- Despalillado: En esta etapa se elimina toda la parte vegetal que acompaña a la uva, es decir raspón, hojas, tallos, etc. y cualquier otro cuerpo extraño que sea ajeno a la uva.
- Estrujado o prensado: Se rompe la piel de la uva mediante estrujadoras o pisadoras, con el fin de abrirla y que su jugo sea liberado para facilitar el proceso de fermentación. Se aplica la presión justa para no romper otras partes, como las pepas.
- Fermentación: Se añaden levaduras y comienza el proceso de fermentación alcohólica, donde los azúcares son transformados en etanol, CO_2 y otros productos. Esto se logra gracias a determinadas condiciones del proceso (pH, temperatura, nitrógeno, SO_2) que permiten que la levadura esté en un entorno favorable para su crecimiento, y que la fermentación ocurra a una velocidad adecuada.
- Remontado: El CO_2 producido durante la fermentación empuja hacia arriba el orujo, que forma una barrera en la parte superior. Esta capa debe ser remojada con el mosto para permitir la extracción del color y también la aireación del mosto.
- Descube: Una vez finalizada la fermentación alcohólica, se traslada el vino desde el estanque a otro recipiente, y así separar el líquido del orujo.
- Fermentación maloláctica: o también denominada fermentación “lenta”, es donde el ácido málico, de un sabor fuerte y vegetal se transforma en ácido láctico, que es un compuesto más suave y que confiere al vino finura y suavidad.
- Trasiego: corresponde a un proceso de remoción c al sólido remanente y clarificación del vino, para luego ser almacenado.
- Selección: se separan los vinos que se desean permanezcan jóvenes, para pasar a embotellado o bien para ir al proceso de crianza en madera.
- Crianza en barricas de roble: Se almacena el vino en barricas de roble para que tenga una mejor calidad y un sabor más intenso. El tiempo varía entre bodegas y tipos de vino, así como el tipo de roble usado.

- Embotellado: El vino es embotellado y etiquetado para su distribución y consumo.

1.2.2 Residuos en la industria del vino

Como resultado del proceso de elaboración del vino, por cada tonelada de uva se obtienen 0,13 toneladas de orujo, 0,06 toneladas de borra, 0,03 toneladas de tallos y hojas, y 1,65 [m^3] de agua de desecho [18]. El decreto 78 de la ley 18.455 que fija normas sobre producción, elaboración y comercialización de alcoholes etílicos, bebidas alcohólicas y vinagres define la borra como "el producto semilíquido obtenido de la fermentación del zumo de uva y de la elaboración del vino, constituido entre otros por sales de calcio y potasio del ácido tartárico, sustancias orgánicas, restos de tejido vegetal, levaduras y materia colorante". Además se establece su graduación alcohólica máxima en 5°, el extracto seco mínimo en 300 [g/L] y un contenido mínimo de 20 [g/L] de tartratos expresados en ácido tartárico [19]. Por otro lado, el orujo se define como el desecho obtenido después que el jugo de uva es recolectado al presionar las uvas para la producción del vino, e incluye la piel de la uva, pulpa, semillas, tallos y jugo residual [20]. En la Figura 1.6 se especifica en qué etapa del proceso se genera cada residuo.

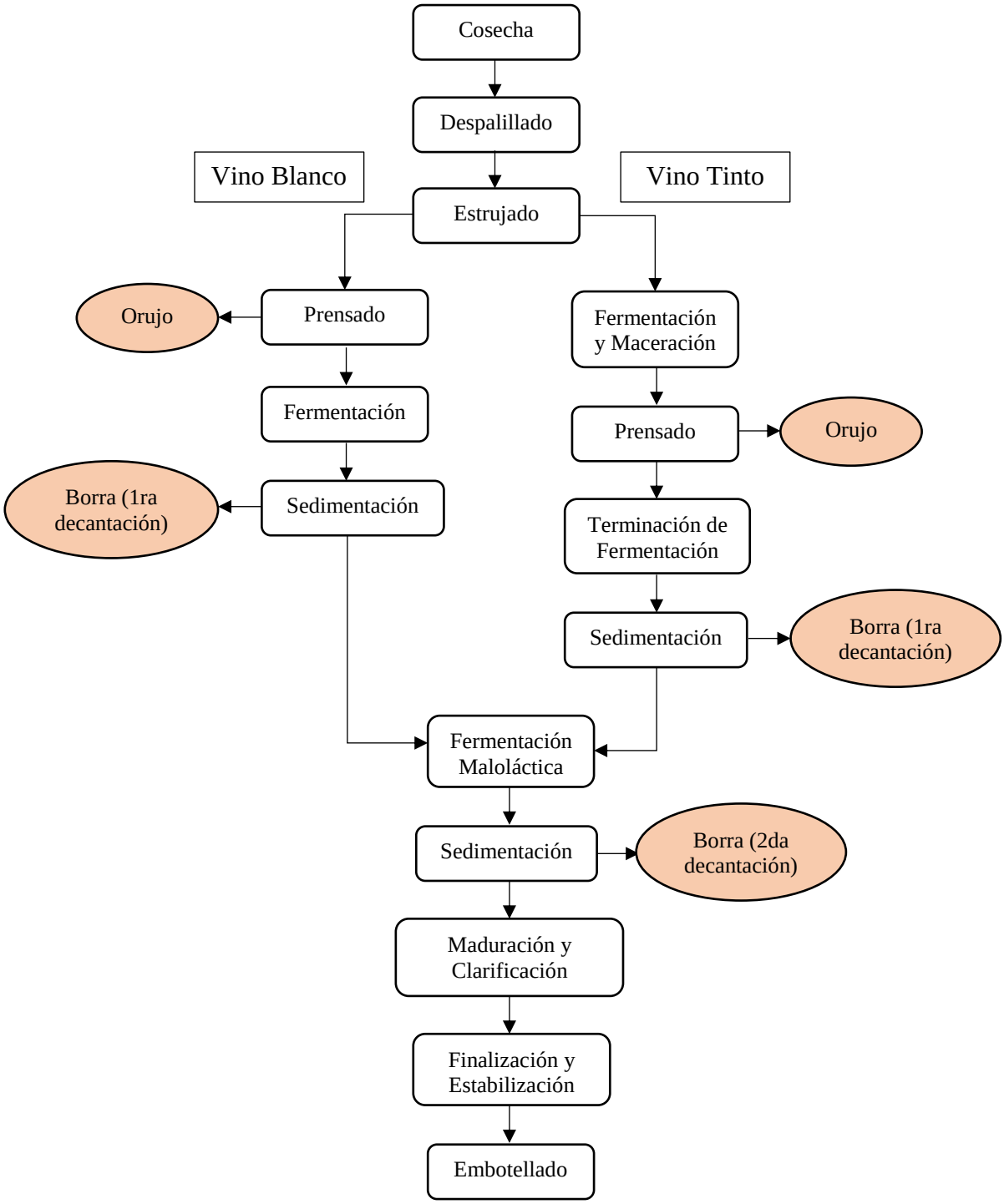

Figura 1.6: Etapas de vinificación y producción de desechos (Adaptado de [21]*)*

La composición de la borra depende de la tecnología del proceso y del tipo de vino, pero se pueden establecer características generales como un pH entre 3,6 y 7,2, contenidos aproximados de materia orgánica entre 600 y 930 [g/Kg], nitrógeno total entre 17 y 60 [g/kg], potasio entre 18 y 158 [g/Kg] y polifenoles solubles entre 2 y 16 [g/Kg], todos en base seca [22].

Gracias a la composición de la borra, es posible considerar diversas formas de aprovechamiento de este residuo, como es la recuperación de etanol por destilación y la recuperación de polifenoles, importantes para las características aromáticas del vino. También puede ser aprovechado en la recuperación de sales, particularmente el tartrato ya que es un componente abundante en las uvas, y consecuentemente en el orujo y la borra. El ácido tartárico tiene distintas aplicaciones en la elaboración de alimentos, ya que es una alternativa al uso de ácido cítrico y fosfórico, compuestos ampliamente usados en la industria. Sin embargo, se debe considerar el gran requerimiento energético para alcanzar la evaporación de la fase líquida, y que puede tener un gran costo [18].

Asimismo, también es posible utilizar la borra como fertilizante y complemento nutricional para los suelos, gracias al contenido de carbono, nitrógeno, potasio, magnesio y fósforo, componentes necesarios para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, al someter la borra a pruebas biológicas empleando semillas de berros, cebada y césped perenne, se observó que no hubo germinación, debido al bajo pH y a la alta razón carbono – nitrógeno [21].

1.2.3 Efectos de la fuente de nitrógeno sobre la fermentación vínica

El nitrógeno es uno de los macronutrientes más importantes dentro del proceso de elaboración del vino, ya que juega un rol fundamental dentro de las funciones biológicas de los microorganismos asociados a la fermentación (alcohólica y maloláctica). Por lo tanto, la concentración y composición de las fuentes de nitrógeno tiene implicancias significativas en la calidad del vino. El crecimiento de las levaduras, la cinética de la fermentación y el metabolismo de los compuestos que le dan el sabor al vino son afectados por el nitrógeno

contenido en el mosto, que cuando se encuentra en menor cantidad que la requerida, suele añadirse en fuentes externas de forma previa o durante la fermentación.

En la Figura 1.7 se muestran los principales compuestos que se obtienen desde el metabolismo de la levadura y que le entregan el sabor y aroma al vino, y que a su vez son influenciados por el nitrógeno presente en el mosto. Esto debido a que el nitrógeno contribuye al metabolismo, y por consiguiente a la producción de ciertos compuestos, así como es un precursor para la formación de otros, como es el caso de los alcoholes pesados.

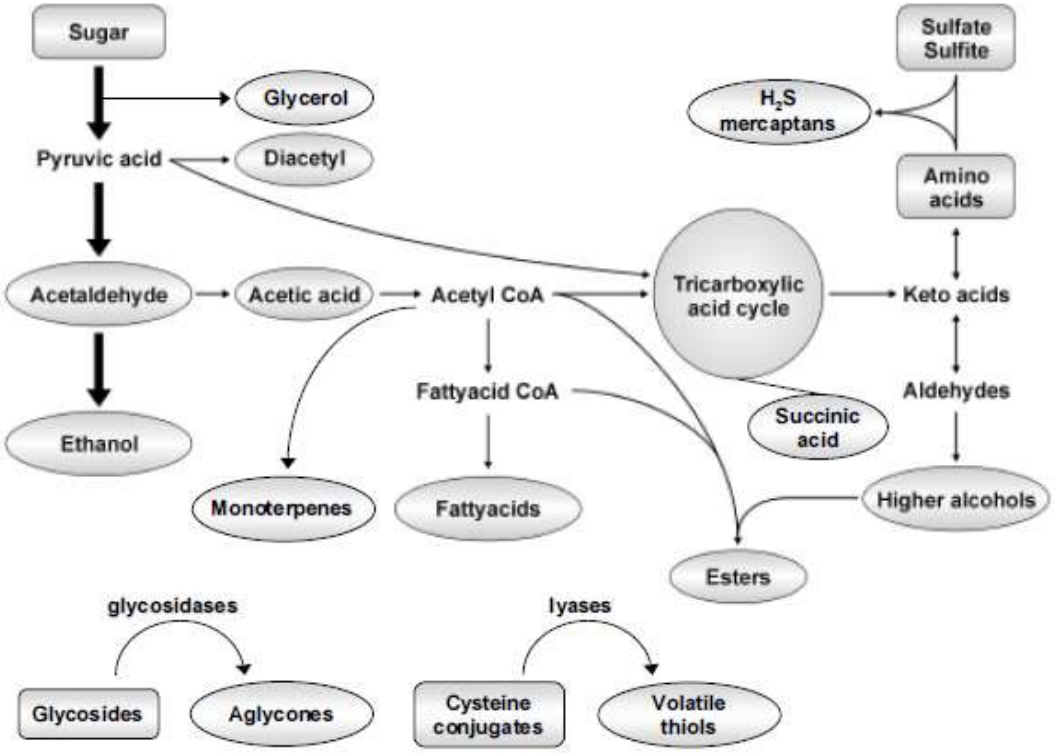

Figura 1.7: Principales componentes que le otorgan sabor al vino metabolizados por la levadura [7]

Las fuentes de nitrógeno que son utilizadas hoy en día para la fermentación de alimentos pueden ser tanto de origen orgánico como inorgánico, y de distinto origen. En la Tabla 1.1 se muestran las fuentes de nitrógeno más comunes:

Tabla 1.1: Fuentes de nitrógeno comúnmente usadas en la fermentación de alimentos [23]

Fuentes de Nitrógeno orgánicas	***Fuentes de Nitrógeno inorgánicas***
Licor de maíz fermentado	$(NH_4)_2SO_4$
Hidrolizado de caseína	NH_4Cl
Harina de soya	NH_3
Extracto de levaduras	$(NH_4)_2HPO_4$
Cebada malteada	$(NH_4)_2PO_4$
Granos secos de destilería con solubles (DDGS)	NH_4NO_3
Medio farmacéutico (harina de semilla de algodón)	NH_4OH
Harina de gluten de maíz	Urea
Harina de linaza	
Harina de arroz y trigo	

Las fuentes de nitrógeno de mayor uso en la industria del vino suelen ser diaminofosfato (DAP) u otras sales de amonio, diversas mezclas de aminoácidos y extracto de levaduras.

Existen distintos efectos de acuerdo a las distintas fuentes de nitrógeno utilizadas. Estos efectos son normalmente referentes a la concentración de compuestos formados (deseables e indeseables) en la fermentación vínica, así como a la cantidad de biomasa formada en el proceso.

En un estudio donde se busca la relación entre la producción de biomasa y la concentración de azúcar inicial, nitrógeno y la fuente de este último, se estableció que para todas las concentraciones de azúcar la máxima formación de biomasa fue con dos fuentes de nitrógeno, una compleja compuesta de una mezcla de aminoácidos y cloruro de amonio y otra compuesta de una mezcla de diversos aminoácidos (leucina, isoleucina, valina, fenilalanina y treonina en distintas proporciones) frente a otras dos fuentes de nitrógeno: cloruro de amonio y arginina [24].

También se ha estudiado la influencia de la fuente de nitrógeno sobre la producción de etanol y glicerol, compuestos primordiales en la elaboración del vino. Se ha observado que el uso de una mezcla de aminoácidos como fuente de nitrógeno tiene como efecto una mayor velocidad en la producción de etanol, respecto al uso de una fuente inorgánica de nitrógeno (como se ha mencionado anteriormente, normalmente corresponde a sales de amonio). Esto ocurre debido a que la levadura debe elaborar los aminoácidos a partir de glucosa y una fuente de nitrógeno inorgánica, lo cual aumenta la producción de NADH. Esta molécula debe ser reoxidada a NAD+ a través de la vía metabólica de producción de glicerol, lo que a su vez ralentiza la formación de etanol [8].

La fuente de nitrógeno tiene efecto sobre los compuestos volátiles, los cuales son responsables de los aromas y sabores del vino. Existe evidencia que el uso de una mezcla de aminoácidos como fuente de nitrógeno en la fermentación vínica genera una mayor producción de compuestos como etil-ésteres, 2-feniletilacetato y etil acetatos, los cuales son algunos de los que otorgan el aroma floral y frutal al vino [5]. Asimismo, se ha observado un aumento en la producción de alcoholes pesados, etil-ésteres y etil-acetatos en la producción de vino Chardonnay, al utilizar una mezcla de aminoácido y amonio como fuente de nitrógeno, frente al uso de únicamente amonio [6].

En consecuencia, la fuente de nitrógeno tiene un impacto considerable en los distintos compuestos formados en el proceso fermentativo, ya que su efecto aplica directamente al metabolismo de la levadura, así como en las reacciones que ocurren dentro del medio de fermentación.

El uso de péptidos como fuente de nitrógeno es también una opción viable, aunque no se encontraron estudios que describieran los efectos de esta fuente sobre los productos de la fermentación. Dado que los péptidos se componen por cadenas de aminoácidos y dada también su naturaleza de fuente orgánica de nitrógeno, se presume que el efecto podría ser similar al uso de aminoácidos. Sin embargo, se debe tomar en consideración el hecho que la levadura deberá romper los enlaces peptídicos para poder asimilar a los aminoácidos, y así utilizarlos dentro de su proceso metabólico.

1.3 Potenciales usos de levaduras residuales de la fermentación vínica

Actualmente, la borra obtenida desde la fermentación del vino es desaprovechada, ya que la mayoría de las viñas en donde se elabora esta bebida alcohólica arrojan la borra a los cultivos de vides a modo de fertilizante [18], debido al alto contenido de nitrógeno que posee la levadura. Sin embargo, este residuo tiene el potencial de transformarse en un subproducto, por lo que se presentan alternativas para su tratamiento y procesamiento.

1.3.1 Preparación de extracto de levaduras a partir de la borra

La preparación de un extracto de levaduras es una alternativa que permitiría valorizar la borra obtenida desde el proceso de vinificación, gracias a las levaduras remanentes que forman parte de la composición de este residuo.

El extracto de levaduras corresponde a proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y otros componentes que se encuentran en las levaduras como parte de su morfología celular. La fabricación de los extractos se realiza mediante la ruptura celular de la levadura, y que en la mayoría de los casos incluye un proceso de secado posterior para su comercialización en formato de polvo. El extracto de levadura es mayormente usado en la industria de las bebidas fermentadas, así como sustrato para sabor en la industria de los alimentos, particularmente en sopas, salsas, aderezos, snacks, entre otros. Otras aplicaciones incluyen los suplementos vitamínicos en alimentos saludables [18].

Actualmente los procesos de fabricación consideran dos formas para la elaboración del producto, la autolisis y la ruptura celular con agentes externos.

- Autolisis

La autolisis corresponde a la ruptura y degradación de la estructura celular gracias a la acción de las enzimas endógenas de la levadura. Las enzimas generalmente están dentro de compartimientos en la célula viva, y se localizan en la matriz de la levadura. Estas enzimas

hidrolíticas (particularmente nucleasas y proteasas) rompen las macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, resultando productos solubles como péptidos, aminoácidos, nucleótidos y derivados de aminoácidos [25].

- Ruptura celular con agentes externos

Este tipo corresponde a cualquier ruptura que se logre con un agente externo a la célula, existiendo la ruptura mecánica, química, térmica y enzimática. Los distintos métodos de ruptura celular junto a sus ventajas y desventajas serán explorados de manera más profunda en las páginas siguientes de este trabajo.

La elaboración de los extractos de levaduras requiere la disrupción de la membrana celular para alcanzar la solubilización de los componentes intracelulares, pero también es importante lograr la disponibilidad de los nutrientes al reducirlos a monómeros gracias a la acción de enzimas. Es por esto que se recomienda la combinación de alguna de las formas de ruptura celular, junto con el proceso de proteólisis enzimática llevado a cabo por enzimas exógenas [18].

1.3.2 Técnicas de ruptura celular

El uso de los componentes de las células microbianas ha sido ampliamente estudiado y aplicado en la industria. Enzimas, proteínas y otros bioproductos han sido extraídos de estos organismos para su aprovechamiento de acuerdo a las funciones y propiedades que poseen, y su potencial uso en procesos de distinta naturaleza. Sin embargo, la mayoría de estas moléculas se encuentran dentro de la matriz celular, encerradas en el citoplasma por la membrana celular. Es por esto que diversos métodos y técnicas de ruptura celular han sido desarrollados en las últimas décadas, con el fin de obtener los componentes conservando su integridad. Los microorganismos que son usados mayormente en aplicaciones tecnológicas son *Echerichia coli, Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis.*

Como se ha mencionado anteriormente, el uso de las levaduras provenientes desde la borra del vino tiene un potencial uso como materia prima para la elaboración de un extracto de

levaduras rico en proteínas, pero para lograrlo se debe romper la membrana celular para permitir la liberación del contenido intracelular.

La membrana celular de la levadura varía su aspecto de acuerdo a distintos factores, como son las condiciones químicas y físicas de crecimiento. La membrana celular de la levadura se caracteriza por ser gruesa (100 a 200 [nm]) y representa el 20-25% del peso seco de la célula y su composición consiste en mayormente polisacáridos (80-90%), y el resto de los componentes son glucanos, mananos, quitinas y proteínas. Por otro lado, los componentes intracelulares de la levadura tipo *Saccharomyces cerevisiae* son proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos [26]. Junto a las características de las levaduras, las técnicas de ruptura aplicadas sobre este microorganismo han sido ampliamente estudiadas, debido a la necesidad de la extracción de sus componentes intracelulares para su estudio y aprovechamiento en la industria, así como el hecho de que la ruptura de levaduras resulta ser un poco más sencilla que la ruptura de paredes celulares en bacterias, debido a su mayor tamaño y tipo de estructura [27].

Para lograr la ruptura de la membrana celular de la levadura, es necesario destruir los componentes que proveen de fuerza a la membrana, es decir los complejos de manoproteínas y el glucano. Existen diversos métodos de ruptura, divididos principalmente en mecánicos y no mecánicos, como se muestra en la Figura 1.8. Todos los métodos poseen tanto ventajas como desventajas, siendo los factores más importantes la selectividad y el uso de energía, debido a sus implicancias económicas.

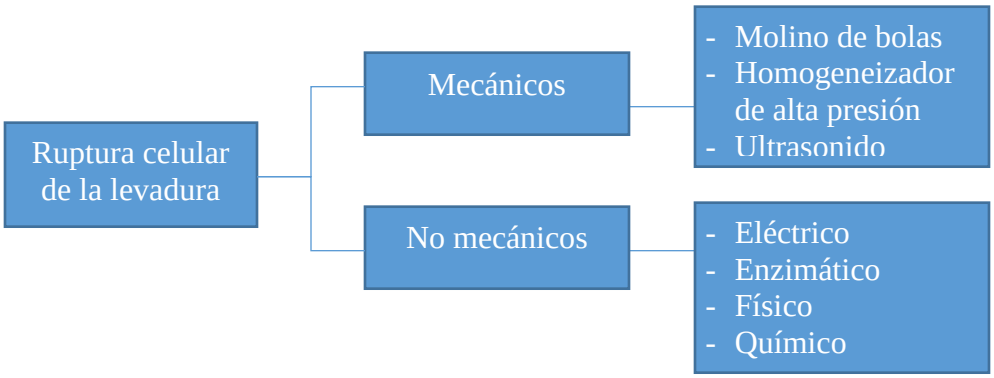

Figura 1.8: Clasificación de los tipos de ruptura celular (Adaptado de [26]*).*

Los métodos mecánicos se caracterizan por ser simples en su operación, por lo que pueden ser escalables a un tamaño industrial. No poseen especificidad en el la liberación de los componentes, ya que sólo rompen la membrana celular. Por otro lado, los métodos no mecánicos si poseen una alta especificidad, sobretodo el método enzimático. Sin embargo, dada su complejidad técnica normalmente son utilizados a escala de laboratorio, ya que su uso a escala industrial podría aumentar de manera considerable los costos de la operación [26].

En la Tabla 1.2 se detalla el uso de energía de los métodos y la especificidad en la extracción de los componentes.

Tabla 1.2: Consumo de energía y selectividad de extracción de producto para cada método de ruptura celular (Adaptado de [26]*)*

Método	***Selectividad en recuperación de producto***	***Consumo de energía***
Molino de bolas	Bajo	Alto/medio
Homogeneización a alta presión	Bajo	Alto/medio
Ultrasonido	Bajo	Alto/medio
Tratamiento físico	Intermedio	Medio/bajo
Tratamiento eléctrico	Intermedio	Medio/bajo
Tratamiento químico	Alto	Medio/bajo
Lisis enzimática	Alto	Bajo

El ultrasonido es uno de los métodos más utilizados en la industria, ya que el proceso es simple y no se dañan los componentes bioactivos contenidos dentro de la célula. El principio de operación, condiciones, ventajas y desventajas serán detalladas a continuación.

1.3.3 Ultrasonido

El método e irradiación ultrasónica funciona bajo la generación de microburbujas por cavitación dentro de la matriz celular, las cuales crecen paulatinamente para luego implotar en la fase de compresión. La cavitación es el principio que opera tras la ruptura por ultrasonido, en donde la formación, crecimiento y colapso de las burbujas de gas o vapor ocurre debido a la conversión de la energía transportada en la onda del ultrasonido a energía mecánica, en la forma de ondas intensas de choque. Estas ondas equivalen a aplicar una gran cantidad de atmósferas de presión, cercana al orden de las miles [26,28], como se observa en la Figura 1.9:

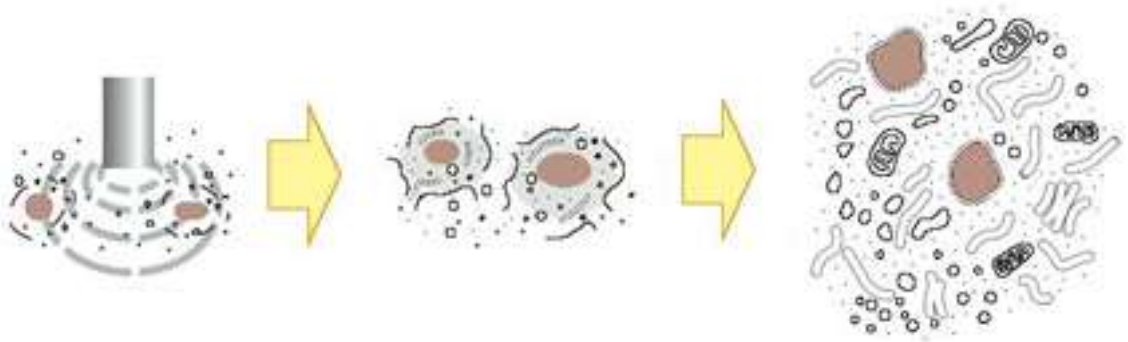

Figura 1.9: Esquema de ruptura celular y liberación de componentes intracelulares mediante ultrasonido

Las ventajas de este método son principalmente la independencia de la concentración de células, y también la simpleza del proceso, donde además no es necesario el uso de ningún otro insumo para su óptimo funcionamiento. Se tiene además un amplio manejo de las variables del proceso, siendo estos la potencia, el tiempo de ciclo y el tiempo total del proceso. Por otro lado la desventaja principal es que existe un aumento de temperatura durante el proceso, debido a la liberación de energía. Se debe tener especial cuidado si los compuestos de interés son termolábiles, y se debe tener en consideración algún sistema de enfriamiento de ocurrir este caso [26,27].

Diversos estudios se han realizado sobre la ruptura de la membrana celular de las levaduras a través del ultrasonido, determinando que existen algunos factores claves para mejorar el rendimiento de la ruptura celular. Algunos autores determinan que es importante la potencia del ultrasonido, el tiempo del ciclo de operación y la temperatura del sistema [26].

Particularmente para la liberación de proteínas, en [29] se establece que el aumento de la potencia y del tiempo del ciclo de operación incurren en una mejora en el porcentaje de proteínas liberado, siendo independiente de la concentración de células y a un pH óptimo de 7. Se determinó además que al aumentar la potencia, consecuentemente aumenta el consumo de energía del equipo. Sin embargo, al aumentar el tiempo de ciclo no se observó un aumento de energía considerable, pero sí una disminución en el tiempo total del proceso para alcanzar el mismo porcentaje de liberación de proteínas.

Se ha estudiado además la efectividad de la aplicación del ultrasonido en levaduras contenidas en la borra de vino, particularmente en la liberación de proteínas y polisacáridos a partir de la autolisis de la levadura. Si bien en el proceso de maduración del vino ocurre la autolisis celular de las levaduras, este proceso suele ser lento, alcanzando un bajo rendimiento. Sin embargo, al aplicar ultrasonido en contraste con experimentos de autolisis a 25°C, se observó un incremento sustancial en la concentración de estas dos moléculas, donde además para los polisacáridos se obtuvo la máxima concentración en un tiempo mucho menor (9 meses solo con el proceso de maduración sin intervención, en contraste con 96 horas de tratamiento con ultrasonido). Además se observó una disminución en el número de células viables, producto de la ruptura celular [30].

1.4 Hidrólisis de proteínas

La hidrólisis se define como la ruptura química de un compuesto por acción del agua. Particularmente, la hidrólisis de proteínas corresponde a la ruptura del enlace peptídico que une a dos aminoácidos dentro de una cadena proteica, cuya reacción se ve en la Figura 1.10. Al hidrolizar una proteína, se obtienen péptidos de distinto tamaño junto a

aminoácidos libres, y cuando se alcanza la ruptura de todos los enlaces peptídicos de la proteína, se habla de hidrólisis total.

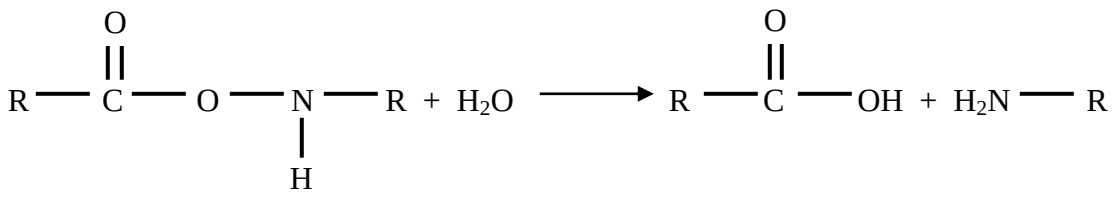

Figura 1.10: Reacción de hidrólisis de proteínas

1.4.1 Hidrólisis química

La hidrólisis química de proteínas corresponde a la ruptura de un enlace peptídico en presencia de un ácido o base. Existen muchas variaciones de estos procesos, dependiendo del grado de ruptura que se quiera alcanzar, la materia prima, el reactivo ácido o básico, entre otros. Este proceso puede ser de menor costo, sin embargo se tiene poco control del mismo. Además, se requieren de temperatura y pH extremos, lo que puede afectar a los productos finales de la hidrólisis, reducidos en propiedades nutricionales, pobre funcionalidad y restringidos a solo ser usados como potenciadores de sabor [4].

- Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es ampliamente usada en la industria de alimentos, a pesar de que es un proceso severo y difícil de controlar. Se utiliza un ácido fuerte, principalmente ácido clorhídrico o sulfúrico a altas concentraciones, a alta temperatura y por un largo período de tiempo (muchas veces también puede incluirse el uso de alta presión). Posteriormente la solución debe ser neutralizada, alcanzando un pH entre 6 y 7, para luego ser concentrado o secado. Con este método se alcanza una hidrólisis total de proteínas, donde el producto tiene una alta solubilidad, pero con altas concentraciones de NaCl, lo cual le otorga un sabor desagradable. Un ejemplo de las condiciones de operación de la hidrólisis ácida es la

hidrólisis total de proteínas de pescado, la cual se alcanza a las 18 horas, con 118°C de temperatura y ácido clorhídrico de concentración 6 [N] [4].

- Hidrólisis básica

La hidrólisis básica se lleva a cabo al utilizar una base fuerte, normalmente NaOH junto a altas temperaturas. Un ejemplo es la hidrólisis del concentrado de proteínas de pescado, donde las condiciones son un alto pH (12,5), a 95°C por 20 minutos. Este tipo de hidrólisis es ampliamente usado en la industria, a pesar de afecta negativamente el valor nutricional del hidrolizado. Varias reacciones de deterioro ocurren en la solución alcalina durante la hidrólisis, siendo la más importante la racemización de los L-aminoácidos a D-aminoácidos, los cuales no son absorbidos por humanos. Además, los enlaces disulfuro se rompen, provocando la pérdida de aminoácidos como la cisteína, serina y treonina. Algunas de estas reacciones de eliminación y adición pueden llevar a la formación de compuestos tóxicos (por ejemplo, lisinoalanina), los cuales son altamente indeseados en alimentos. Finalmente, la hidrólisis alcalina tiene un efecto inhibitorio en las enzimas proteolíticas, reduciendo la velocidad de hidrólisis enzimática [4].

1.4.2 Hidrólisis enzimática de proteínas

La hidrólisis enzimática de proteínas es llevada a cabo por proteasas, las cuales rompen el enlace peptídico que une a las proteínas. Estas proteasas pueden ser propias del organismo cuyas proteínas se deseen hidrolizar (autolisis) o pueden ser de una fuente externa.

Las enzimas son catalizadores bioquímicos vitales para los seres vivos, ya que aceleran las reacciones químicas que pudiesen tomar un tiempo muy largo para llevarse a cabo. Las enzimas son ampliamente usadas en la industria de alimentos, cuyo fin es realizar funciones específicas en el procesamiento y análisis en la industria, además de facilitar la conversión de la materia prima en componentes de alimentos de mejor calidad. Las enzimas logran

esto gracias a su sitio activo, el cual es altamente específico para ciertos sustratos al catalizar solo una reacción química en específico.

Las proteasas pueden clasificarse según las características de su sitio activo, de acuerdo a los grupos funcionales que allí se encuentren: serina, tiol, carboxil y metalo, el mecanismo, que corresponde a endoproteasas: hidrolizan los enlaces peptídicos que se encuentran al interior de la proteína, exoproteasas: hidrolizan el enlace que se encuentra en el extremo de la cadena proteica o el origen de ellas según la especie de donde se obtenga, animal, vegetal, bacteria, fungi. El esquema se encuentra en la Figura 1.11.

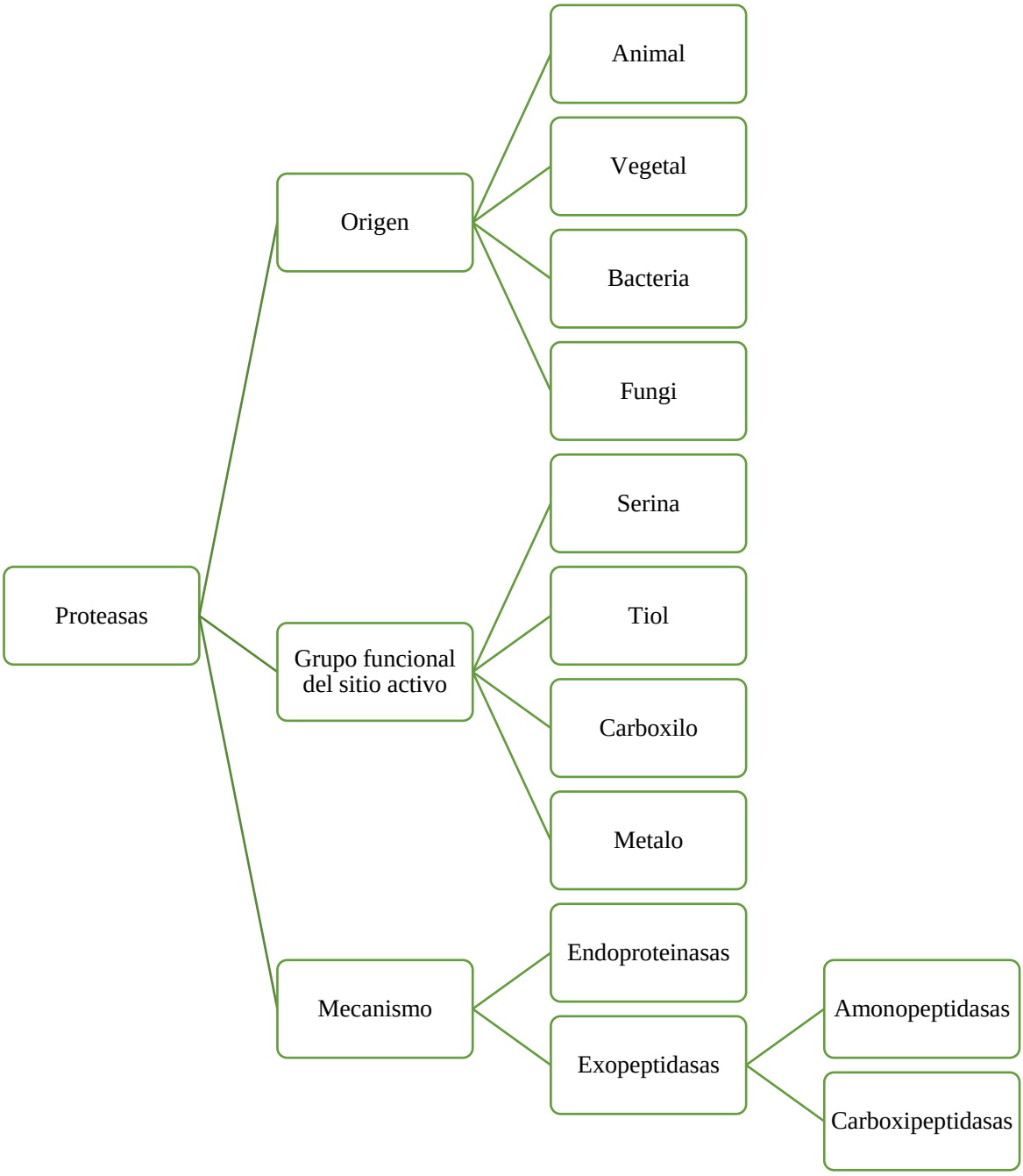

Figura 1.11: Clasificación de proteasas (Adaptado de [4]*)*

El uso de enzimas añadidas para hidrolizar proteínas en la industria de alimentos permite mejorar o modificar las propiedades fisicoquímicas, funcionales y sensoriales sin estropear

el valor nutricional original de la proteína. Además, es posible tener control sobre el proceso de hidrólisis enzimática, lo cual no ocurre con la hidrólisis química o autolisis.

Las variables a considerar para la hidrólisis enzimática son la concentración del sustrato, la actividad de la enzima, pH, temperatura y tiempo. Estas condiciones suelen ser entre rangos de pH 4 a 8, y temperatura entre 40°C y 60°C. Es decir, se opera bajo rangos que no son difíciles de alcanzar y mantener en un proceso a gran escala, además de no tener un costo elevado.

Sin embargo, existen ciertas desventajas al considerar un proceso batch de hidrólisis enzimática a escala industrial. Principalmente es el alto costo de la enzima, en caso que se requiera una gran cantidad de ella, además de la necesidad de inactivar la enzima al final del proceso, lo cual puede hacerse al alterar el pH o aumentar la temperatura de forma drástica, lo cual incurre en costos extras del proceso.

1.4.3 Elaboración de hidrolizados proteicos

Los hidrolizados proteicos se definen como los productos obtenidos luego de la hidrólisis de proteínas, ya sea ácida, alcalina o enzimática, y cuyo producto contiene péptidos, aminoácidos, minerales, carbohidratos y lípidos si es que éstos están presentes en el sustrato o en la enzima junto a la proteína. Particularmente, si se hidroliza solo proteína se obtiene una mezcla de aminoácidos, di-, tri- y oligopéptidos [31].

En la Figura 1.12 se muestra que la primera aplicación de los hidrolizados de proteína data desde 1880, cuando Nagelli lo usaba para cultivos microbianos. Los siguientes usos fueron registrados al principio del siglo XX, donde se continuó utilizando como medio de cultivo para bacterias. Desde ese entonces, el uso del hidrolizado de proteínas ha sido ampliamente usado en la industria farmacéutica, alimentaria y biotecnológica.

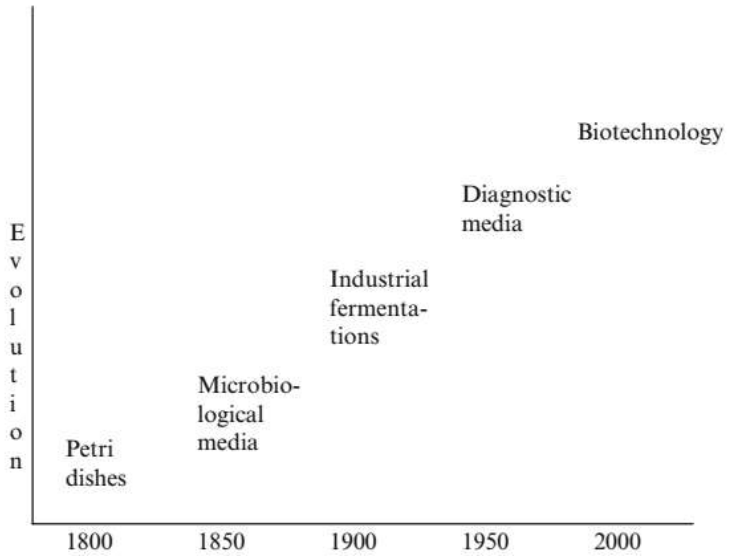

Figura 1.12: Evolución de las aplicaciones de los hidrolizados proteicos [31]

El uso de los hidrolizados proteicos en la industria de alimentos ha tenido un aumento sustancial en los últimos años, gracias a sus propiedades funcionales y al incremento de la biodisponibilidad de los aminoácidos y péptidos.

Junto a esto, es necesario destacar la importancia de esta alternativa como un proceso recuperador de residuos en la industria alimenticia, donde es posible tomar los residuos orgánicos con alto contenido proteico, y transformarlos a esta mezcla de péptidos y aminoácidos que tiene características definidas, las cuales resultan ser beneficiosas para el consumo humano.

1.4.4 Propiedades funcionales de los hidrolizados enzimáticos

Kristinsson y Rasco [4] definen la funcionalidad de las proteínas en alimentos como “las propiedades funcionales y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en sistemas alimenticios durante el procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo”. Por otro lado, el International Life Science Institute ILSI declara que “un alimento puede considerarse como funcional si se demuestra satisfactoriamente que afecta a una o más

funciones objetivo en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales adecuados, de una manera que sea relevante ya sea para una mejora del estado de salud y bienestar y/o que signifique la reducción de los riesgos de enfermedad" [32].

El consumo de hidrolizados proteicos entrega numerosos beneficios a la salud de las personas, gracias a la bioactividad de sus péptidos. Es por esto que los hidrolizados han sido añadidos a distintas formulaciones alimenticias, como son bebidas energéticas, productos para control de peso y de nutrición para deportistas, y fuentes de nutrición para pacientes inmuno-comprometidos. Los beneficios se encuentran desglosados en la Figura 1.13:

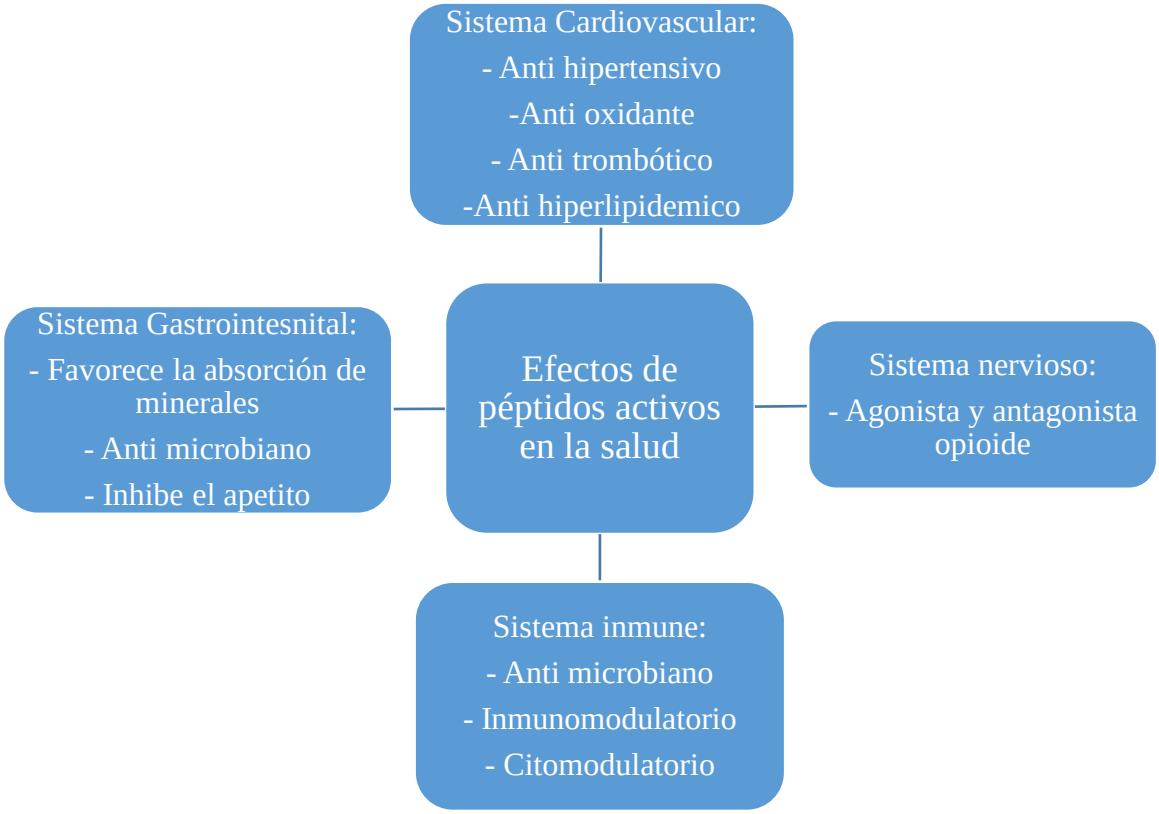

Figura 1.13: Efectos fisiológicos de alimentos derivados de proteínas bioactivas (Adaptado de [33]*)*

Para los hidrolizados proteicos, las propiedades físicas y químicas que influyen sobre las propiedades funcionales son el tamaño, forma, composición y secuencia de aminoácidos,

carga neta y distribución de cargas, comportamiento hidrofóbico o hidrofílico, estructura de los péptidos, flexibilidad o rigidez molecular, y la capacidad de interactuar o reaccionar con otros componentes.

Entre las propiedades funcionales más importantes del hidrolizado de proteínas se encuentran las siguientes:

- Solubilidad

La solubilidad se define como la capacidad que tiene un soluto (en este caso, aminoácidos y péptidos) para disolverse en un solvente. Es la propiedad más importante, ya que afecta a las otras y es posible utilizarla como indicador de la funcionalidad del hidrolizado, y sus potenciales aplicaciones. Los factores que más influyen sobre la solubilidad son la hidrofobia y las interacciones iónicas, ya que al haber un comportamiento más hidrofóbico se favorecen las interacciones entre proteínas, disminuyendo la solubilidad. Por otro lado, al haber más interacciones iónicas se favorece a su vez la interacción con el agua, aumentando la solubilidad. Esto se logra al romper el enlace peptídico en la hidrólisis, gracias a la liberación de grupos amino y carboxilo. La solubilidad es una característica favorable en la industria de alimentos, ya que representa la disponibilidad de los nutrientes en el alimento [4].

- Propiedades de emulsión

La emulsión como propiedad funcional se refiere a como el hidrolizado disminuye la tensión entre las fases hidrofóbica e hidrofílica de los componentes del alimento. Los hidrolizados promueven la formación de emulsiones “aceite en agua”, debido a que poseen ambas fases en los grupos funcionales que los componen, y son solubles en agua. Los atributos principales son la habilidad de las proteínas de absorberse a una fase rápidamente, la habilidad de desplegarse rápidamente y reorientarse a una cierta fase, y la habilidad de una vez estando en la interfase de interactuar con las moléculas vecinas, formando una película fuerte, cohesiva y viscoelástica que puede resistir variaciones térmicas y mecánicas. Esta propiedad es importante en la industria de alimentos, ya que la interacción con los componentes lipídicos del alimento le otorga estabilidad al producto final [4,33].

- Propiedades espumantes

Las propiedades espumantes son de interés en la industria alimenticia, ya que le entregan una textura particular a un cierto segmento de alimentos, como por ejemplo helados, pan, pasteles, cremas, champaña y cerveza. La “espuma” de los alimentos consiste en pequeñas gotas de aire dispersas y envueltas por un líquido que contiene un surfactante soluble, disminuyendo la superficie y tensión interfase del líquido [4,33].

1.4.5 Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis se define como la razón entre los enlaces peptídicos rotos (h) respecto a los enlaces peptídicos totales (h_t), y es utilizado para cuantificar el porcentaje de hidrólisis de la reacción. Se expresa como:

$$DH[\%] = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \qquad (1)$$

Como indica Benitez et al. [34], El grado de hidrólisis depende de distintos factores, como son la cantidad de enzima utilizada, el tipo y las condiciones del sustrato, temperatura y pH. Este parámetro es uno de los más importantes para evaluar el desempeño de la hidrólisis, además de tener un seguimiento y control de la misma. Es posible discriminar el uso del hidrolizado en alimentación según el grado de hidrólisis alcanzado; por ejemplo, con un bajo grado de hidrólisis (entre 1% y 10%) se logra una mejora en las propiedades funcionales; con un grado de hidrólisis variable es posible utilizarlo como saborizante y finalmente, los hidrolizados extensivos (grado de hidrólisis superior al 10%) permite su uso para alimentación especializada.

Existen diversos métodos para cuantificar los enlaces peptídicos hidrolizados, como es la determinación de los grupo α-amino libres en distintos métodos analíticos (OPA, TNBS).

También se puede determinar con la determinación del nitrógeno soluble con el método Kjeldhal, o con el método de valoración del protón o pH-stat.

1.4.6 Método del pH-stat

El método de valoración del protón o pH-stat se basa en la cuantificación de los protones liberados en la reacción de hidrólisis, cuya reacción se enunció en el punto anterior. Luego de ocurrir la hidrólisis, existe un intercambio de iones entre el grupo carboxilo y el grupo amino de los péptidos recién hidrolizados, como se muestra en la ecuación a continuación [35]:

$$R_1COOH + R_2NH_2 \rightarrow R_1COO^- + R_2NH_3^+ \tag{2}$$

$$R_2NH_2^+ \leftrightarrow R_2NH_2 + H^+ \tag{3}$$

Luego, la valoración se realiza con una base, cuantificando los grupos aminos que han sido liberados:

$$R_2NH_3^+ + OH^- \rightarrow +R_2NH_2 + H_2O \tag{4}$$

El método requiere que el sistema se mantenga a un pH constante (mayores a 7) [36], por lo que cada vez que se rompe un enlace peptídico, el pH disminuye y se debe añadir un volumen suficiente de una base fuerte para neutralizar los protones y mantener el valor ya establecido de pH. De esta forma es posible seguir la cinética de la hidrólisis de forma continua y precisa, gracias a la adición paulatina de la base.

La cantidad de base añadida es proporcional al grado de hidrólisis alcanzado, pudiendo calcular esta variable según lo establecido por Adler-Nissen [37]:

$$DH[\%] = \frac{V_b \times N_b}{M_p \times h_t \times \alpha} \tag{5}$$

Donde:

h_t: Enlaces peptídicos totales del sustrato

V_b: Volumen de base añadida

N_b: Concentración de la base, expresada en Normalidad

M_p: Masa total de la proteína

α: Grado promedio de disociación de los grupos α-NH_2

El grado de disociación se calcula según la ecuación (*6*), y es válida para hidrólisis realizadas a pH por sobre el pK del grupo α-NH_2, para hidrólisis que se realizan a pH igual o mayor a 7 [4].

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \tag{6}$$

Se debe considerar también que para un pH superior a 6,5 la disociación de los grupos α-NH_2 protonados se vuelve significativa, por lo que se hace importante conocer el pK de los grupos α-NH_2, necesario para determinar el pH de la reacción y para calcular la constante de disociación de forma correcta [4].

$$pK = 7{,}8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400 \tag{7}$$

Donde T es la temperatura en grados K.

1.5 Uso de levaduras como fuente de nitrógeno en la fermentación vínica

Los antecedentes recabados indican que la borra proveniente del proceso del vino tiene varios potenciales usos, estando uno de ellos enfocado al uso de las levaduras que son parte del residuo. Es posible romper y degradar estas células para que sus componentes

nitrogenados (proteínas principalmente) sean reutilizados en otros procesos que requieran de nitrógeno.

Hoy en día, en la mayoría de los procesos de vinificación a nivel industrial se utiliza el diamino fosfato (DAP) como fuente de nitrógeno, que corresponde a un compuesto inorgánico que debe ser adquirido de forma externa.

Se propone entonces el uso de las levaduras provenientes de la fermentación vínica como fuente de nitrógeno orgánica para ser utilizada en nuevas fermentaciones. Con esto se busca tanto la disminución de la generación de los desechos de la industria del vino, así como el aprovechamiento de este residuo como posible agente que reemplace o complemente el uso de fuentes de nitrógeno de tipo inorgánicas. El proceso se resume en la Figura 1.14:

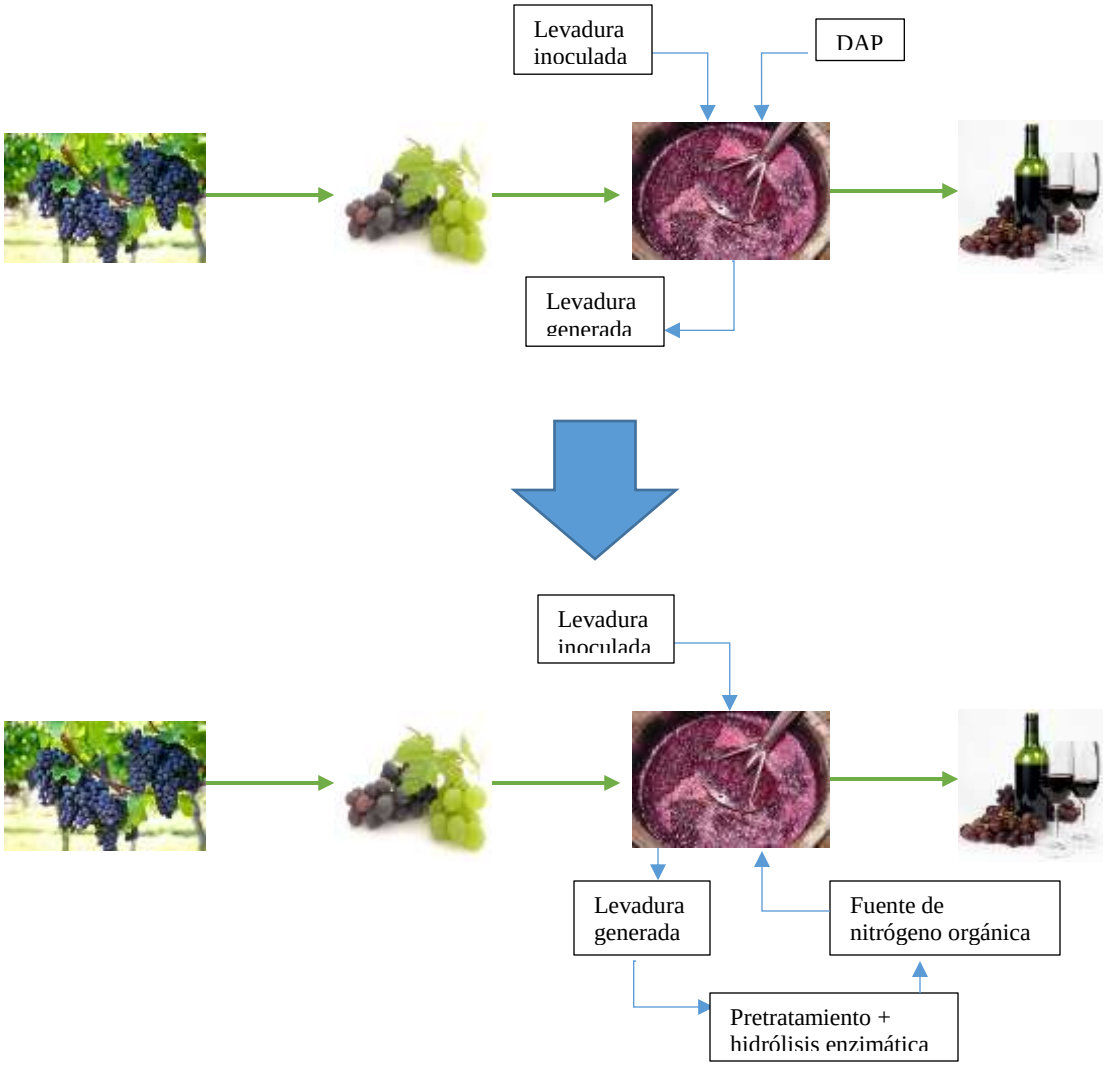

Figura 1.14: Esquema de elaboración actual de vino versus propuesta de elaboración

Capítulo 2

Hipótesis y Objetivos

2 Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

En esta investigación se propone analizar la factibilidad del uso del hidrolizado enzimático de proteínas como fuente de nitrógeno en la fermentación del vino, para de esta forma darle el carácter de subproducto a este residuo mediante pretratamientos de ruptura celular y posterior hidrólisis enzimática, para luego utilizarlo dentro del mismo proceso de vinificación y eliminar el uso de DAP en el proceso.

Para el planteamiento de la hipótesis se consideran las siguientes premisas:

1. La ruptura de la célula mediante un pretratamiento permite la liberación de los componentes intracelulares, lo cual tiene como consecuencia una mayor disponibilidad de proteínas libres en la solución (como se aprecia en la **¡Error! No e encuentra el origen de la referencia.**).
2. El pretratamiento a utilizar (ultrasonido) no tiene efecto sobre la estructura de las proteínas, por lo que no genera hidrólisis de éstas.

Por lo tanto se plantea la siguiente hipótesis:

El pretratamiento de levaduras mediante ruptura celular mejora el rendimiento de la hidrólisis enzimática de las proteínas, para su posterior uso como fuente de nitrógeno orgánica en la fermentación del vino.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Evaluar la factibilidad del uso de hidrolizado enzimático de proteínas de levaduras como fuente de nitrógeno orgánica en la fermentación del vino.

2.2.2 Objetivos específicos

- Analizar el efecto de la ruptura celular sobre la hidrólisis enzimática de las proteínas de levaduras.
- Evaluar y comparar el efecto de las fuentes de nitrógeno DAP e hidrolizado enzimático de levaduras sobre la fermentación del vino.
- Determinar el efecto del grado de hidrólisis sobre la fermentación del vino.

Capítulo 3

Metodología

3 Metodología

Para alcanzar los objetivos mencionados anteriormente es necesario establecer una estrategia experimental, la cual se desarrolla a continuación:

En primer lugar se determinó que es necesario el procesamiento en autoclave de la solución de levaduras, ya que de otra forma las células que pudiesen permanecer vivas una vez finalizado el pretratamiento y proteólisis enzimática, afectarían el curso de la fermentación al aumentar la población celular más allá de la inoculada. El autoclavado también es considerado como pretratamiento para la ruptura celular.

Para efectos de este estudio, se escogió el ultrasonido como pretratamiento. Con ello se busca encontrar los parámetros (tiempo de ciclo y tiempo total de operación) para lograr una mejor ruptura de la membrana y pared celular que conforman la célula, lo que permite la liberación de las proteínas y organelos contenidos, y así permitir una mayor exposición al momento de la hidrólisis enzimática.

Es necesario determinar la cinética de la ruptura realizada por el ultrasonido, con el fin de establecer el tiempo óptimo donde los efectos de ruptura del pretratamiento alcanzan su nivel máximo. Luego se realizaron experimentos con y sin el pretratamiento de ultrasonido, para analizar su efecto sobre los parámetros a medir de la fermentación (Figura 3.1)

Posteriormente se desarrollaron los experimentos de hidrólisis enzimática de las proteínas de la levadura, producto que fue utilizado como fuente de nitrógeno en la fermentación vínica. Se efectuaron experimentos de hidrólisis exclusivos para determinar el efecto del pretratamiento sobre la hidrólisis enzimática, y por otro lado se preparó el hidrolizado que fue utilizado como fuente de nitrógeno en la fermentación. Este hidrolizado se preparó bajo condiciones fijas de temperatura y concentración de enzima, las cuales son 50 [°C] y 6,75 [mAU/g], respectivamente, variando solamente el grado de hidrólisis final. Esto es posible gracias a una hidrólisis de mayor duración, permitiendo que la enzima actúe por un período de tiempo más largo y rompa más enlaces peptídicos. Se trabajó con dos grados de hidrólisis para el hidrolizado de levaduras en las fermentaciones: 5% y 15%, los cuales son

considerados como un valor bajo y alto respectivamente en la hidrólisis enzimática de proteínas.

En el experimento control, se utilizó el Diaminofosfato (DAP) como fuente de nitrógeno inorgánica y control. Este experimento tiene por objetivo establecer un parámetro de comparación respecto a la fermentación con una fuente de nitrógeno orgánica, realizando un seguimiento en distintos factores: densidad, grados °Brix, turbidez, grado alcohólico y azúcares reductores al final de la fermentación, resumido en la Figura 3.2.

Por último, se realizaron las fermentaciones con el hidrolizado como fuente de nitrógeno, preparados con los diferentes pretratamientos. Estos resultados fueron contrastados con los obtenidos en las fermentaciones patrón, para de esta forma observar cambios tanto en la población de levaduras como en la concentración de los productos generados y consumidos.

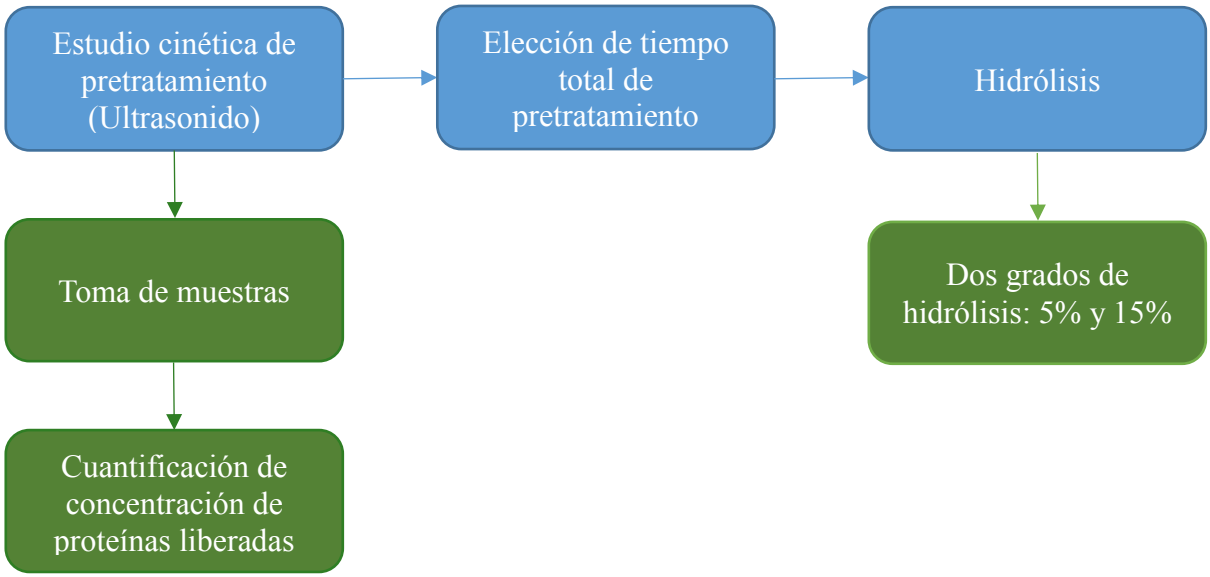

Figura 3.1: Esquema de metodología para preparación de hidrolizado

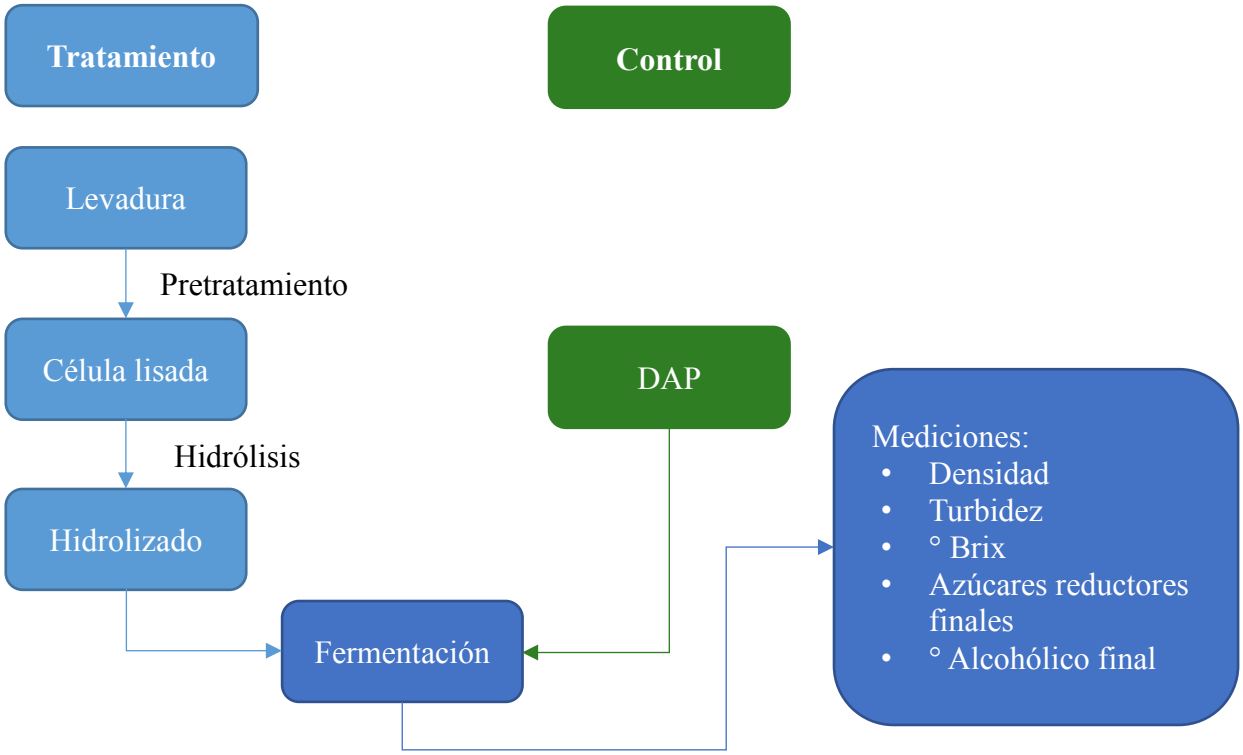

Figura 3.2: Esquema de metodología para fermentaciones

3.1 Materiales y Equipos

3.1.1 Equipo de emisión de ondas de Ultrasonido (Sonicador)

El equipo utilizado corresponde a un sonicador marca SONICS, modelo VCX-130, en la Figura 3.3. Este equipo es capaz de procesar un volumen que va entre los 150 [μL] hasta los 150 [ml]. La potencia del equipo es fija, equivalente a 130 [W] además de una frecuencia de 20 [kHz]. Dentro de sus características se encuentran un display digital donde el usuario puede establecer los parámetros de operación, los cuales son el tiempo total de operación, los ciclos de operación (pulsador ON/OFF independiente de 1-59 [s]). El vástago del equipo tiene un diámetro de 6 [mm], y un largo de 113 [mm]. El material es una aleación de titanio Ti-6Al-4V, autoclavable [38].

Figura 3.3: Sonicador modelo VCX-130

3.1.2 Autotitulador

El autotitulador corresponde al potenciómetro Compact Titrator modelo G20 de Mettler Toledo (Figura 3.4), cuyas especificaciones más importantes se resumen en la Tabla 3.1 a continuación:

Tabla 3.1: Especificaciones técnicas Autotitulador Compact Titrator G20

Parámetro	***Valor***
Rango de medición de potenciómetro	± 2000 [mV]
Rango de medición de termocupla	-20 [°C] a 130 [°C]
Volumen de bureta	20 [ml]
Resolución de bureta	1 [μL]

Figura 3.4: Potenciómetro Compact Titrator G20 marca Mettler Toledo

3.1.3 Reactivos

Los reactivos utilizados fueron:

- NaOH de grado analítico distribuido por *Winkler*, como titulante en los análisis de hidrólisis.
- Enzima ALCALASE de *Novoenzymes*, cuya actividad nominal es de 3000 [mAU/L].

3.1.4 Levadura

Las levaduras utilizadas en el proceso son de la marca LALVIN EC1118, de la empresa Lallemand Health Solutions. Esta levadura es del tipo S*accharomyces Cerevisiae*, cuyo fin es su aplicación en la fermentación vínica. Dentro de sus características, se encuentra su bajo requerimiento de oxígeno y nitrógeno asimilable, además de la baja producción de ácido sulfhídrico y una alta tolerancia al alcohol (hasta una graduación de 18% v/v).

Se realizó un análisis proximal a las levaduras utilizadas durante la fase de experimentación, donde las características analizadas y sus resultados se adjuntan en la Tabla 3.2:

Tabla 3.2: Resultados de análisis proximal a levaduras Lalvin EC1118

Componente	***Resultados [%p/p]***
Humedad	8,20
Proteína	32,53
Grasa total	0,64
Hidratos de carbono (ENN)	53,68
Fibra cruda	0,63
Ceniza	4,32
Total	100

3.1.5 Mosto de uva para fermentación

El mosto de uva utilizado para la fermentación es del tipo *Cabernet Sauvignon*, y cuyas características se especifican en la Tabla 3.3:

Tabla 3.3: Especificaciones mosto de uva

Parámetro	***Valor***
°Brix	22,3 °
Turbidez	2030 NTU
Densidad	1,087 [g/ml]

3.2 Procesamiento en autoclave

El autoclavado de la solución de levaduras se llevó a cabo bajo las condiciones enunciadas a continuación:

- Procesamiento en autoclave de 21 [L], marca Amilab y de potencia de 1500 Watts.
- Temperatura: 121 [°C]
- Tiempo de tratamiento: 15 [min]

Todas las soluciones que se utilizaron en los ensayos fueron autoclavadas.

3.3 Diseño de experimentos

El diseño planteado para las fermentaciones corresponde a un diseño factorial con 2 factores y 2 niveles. Los factores son la aplicación de ultrasonido o no, y el grado de hidrólisis.

Se agrega además el experimento de la fermentación control con DAP, lo que entrega un total de 10 experimentos ya que todos se realizan en duplicado. Los experimentos están desglosados en la Tabla 3.4:

Tabla 3.4: Diseño de experimentos

Número de fermentación	***Tiempo de pretratamiento***	***Grado de hidrólisis***
C1	Fermentación con DAP	Fermentación con DAP
C2	Fermentación con DAP	Fermentación con DAP
F1	Sin ultrasonido	5%
F2	Sin ultrasonido	5%
F3	Sin ultrasonido	15%
F4	Sin ultrasonido	15%
F5	Con ultrasonido	5%
F6	Con ultrasonido	5%
F7	Con ultrasonido	15%
F8	Con ultrasonido	15%

3.4 Pretratamiento: Ultrasonido

Para determinar el tiempo óptimo de ruptura celular, el cual es necesario tanto para los análisis del efecto del pretratamiento sobre la hidrólisis enzimática, como para la elaboración del hidrolizado a utilizar en la fermentación, se debe establecer la cinética de la ruptura y así determinar el tiempo óptimo en donde el efecto del pretratamiento es suficiente y significativo. Esto se logró mediante la toma de muestras sucesivas cada determinados intervalos de tiempo, para luego ser separadas en dos fases gracias a la sedimentación por centrifugación. Una vez hecho esto, se extrajo una cantidad suficiente de sobrenadante, el cual es diluido para ser analizado mediante el método Lowry (Anexo 7.1). De esta forma es posible determinar las proteínas solubilizadas gracias a la acción del ultrasonido, y así corroborar la efectividad del mismo.

Las condiciones de operación para el sonicador fueron las siguientes:

- Amplitud: 50%
- Ciclo de operación: 8 [s] en operación y 2 [s] detenido (denominado 80%) y 1 [s] en operación y 9 [s] detenido (denominado 10%)
- Profundidad: 1 [cm] (vástago sumergido en la solución).
- Masa total inicial de muestra: 50 [g]

El tratamiento para las muestras fue el siguiente:

- Solución de levaduras al 20% p/p
- Tiempos de muestreo (considerando tiempo total de operación): 0s, 10s, 30s, 1m, 2m, 5m, 10m, 15m, 22m, 30m, 40m, 50m, 60m, 75m y 90m. El volumen de la muestra fue de 2 [ml].
- Centrifugación: 10 [min] a 10.000g

3.4.1 Cinética de sonicación

Una vez determinada la cantidad de proteína en el sobrenadante para todos los tiempos de muestreo, se elabora una curva en donde es posible describir el rendimiento de la ruptura celular en el intervalo total del tiempo del ensayo. Con esto es posible fijar el tiempo donde la ruptura alcanza su nivel máximo, tiempo que se fijó como constante al momento de hacer las hidrólisis.

3.4.2 Lisis celular

Para expresar la ruptura de proteínas como un porcentaje del total es necesario conocer la concentración total de proteínas en la célula. Es por esto que se realizó la lisis alcalina de las levaduras, según se especifica a continuación:

Se prepararon 50[ml] de la solución de levaduras en una solución de NaOH 0,05[M]. Luego se llevó a agitación durante 30 [min], aplicando una temperatura moderada para su disolución (aproximadamente 35-40 [°C]). Se trasvasijó 5 [ml] a tubos de vidrio, los cuales luego se posicionaron en el baño seco. Se tomó una muestra en este momento, luego se enciendió el baño y se esperó a que llegara a la temperatura deseada. Posteriormente, se comenzó con el muestreo de tiempos sucesivos, los cuales se almacenaron en tubos eppendorf de 1,5 [ml] para ser centrifugados y así separar las fracciones solubles e insolubles. Finalmente, se analizó el contenido de proteínas en la fracción soluble mediante el método Lowry.

Las condiciones del experimento son las siguientes:

- Concentración de levaduras: 0,5% p/p en una solución de NaOH 0,05[M]
- Temperatura de baño seco: 90[°C]
- Tiempo total desde que se alcanzan los 90[°C] en baño seco: 100 [min]
- Tiempo de muestreo: 0* (que corresponde al tiempo en el que se coloca la solución en el baño seco), 0 (tiempo en el que se alcanzan los 90[°C]), 5 [min], 10 [min], 20 [min], 30 [min], 45 [min], 60 [min], 80 [min], 100 [min].
- Centrifugación: 10 [min] a 10.000g

3.5 Hidrólisis enzimática

3.5.1 Hidrólisis para análisis de efectividad de pretratamiento

Para establecer los efectos del pretratamiento sobre la hidrólisis enzimática de levaduras, se llevó a cabo el pretratamiento con ultrasonido y luego una posterior hidrólisis, las cuales fueron comparadas con soluciones control a la misma concentración, pero que no ha sido pre tratada.

Se preparó una solución de levaduras al 20% p/p, con una masa total de 40 [g]. Esta solución se pre trató con ultrasonido bajo las siguientes condiciones:

- Amplitud: 50%
- Tiempo total: Determinado según análisis de cinética de ultrasonido
- Ciclo de operación: Determinado según análisis de cinética de ultrasonido
- Profundidad: Vástago sumergido 1 [cm] en solución.

Todas las soluciones fueron hidrolizadas con ALCALASE, con los siguientes parámetros:

- Temperatura: 50°C
- Concentración de enzima: 6,75 [mAU/g]
- Tiempo total de hidrólisis: 120 [min]

3.5.2 Hidrólisis de fracción soluble e insoluble

Con el objetivo de comprender mejor el comportamiento de la curva de hidrólisis, y también verificar si existe una mayor solubilización de proteínas gracias a la acción del pretratamiento, es que se realizó la hidrólisis de las soluciones de levaduras separadas por fracción soluble (sobrenadante) e insoluble (fracción sólida). Estas pruebas se llevaron a cabo con soluciones de levaduras al 20% p/p. Una solución fue usada como control sin ningún tipo de tratamiento, otra fue autoclavada solamente mientras que la última fue autoclavada y pretratada con ultrasonido, bajo las mismas condiciones mencionadas en el punto anterior.

Se llevó todas las soluciones a la centrífuga para separar el sobrenadante del remanente sólido, y así hidrolizar ambas partes por separado. Las condiciones para la centrífuga fueron un tiempo total de 12 [min], con velocidad de 4000 g. Se preparó suficiente solución para ambos experimentos considerando una masa de sobrenadante de 40 [g] como mínimo. Para la hidrólisis del pellet sólido se añadió 8 [g] de esta fracción y luego se completaron los 40[g] de solución con agua destilada.

Posteriormente, se realizó la hidrólisis de estas soluciones a una temperatura de 50 [°C] y con un volumen de enzima de 2[mAU/g]. El tiempo máximo de hidrólisis para cada experimento fue de 2 [h], y la concentración del NaOH varió en cada hidrólisis, por lo que se especifica este valor al momento de reportar los resultados en el siguiente capítulo.

3.5.3 Preparación de hidrolizado para fermentación

De modo preliminar, se llevó a cabo una hidrólisis de 24 horas para conocer los tiempos aproximados en los que se alcanzarán los grados de hidrólisis deseados. Esta hidrólisis se realizó bajo las mismas condiciones para el autoclave y ultrasonido aplicadas a todos los experimentos y a definir según la cinética de ultrasonido, junto con las mismas condiciones de hidrólisis mencionadas anteriormente. Una vez conocido este resultado, es posible tener mayor precaución al momento de la operación del equipo para la elaboración del hidrolizado final, y así además tener un criterio respecto al tiempo total de operación en este caso.

El hidrolizado a ser usado como fuente de nitrógeno en la fermentación fue preparado con una solución de levaduras al 20% p/p, la cual fue autoclavada bajo las condiciones mencionadas**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, para luego ser tratada o o con ultrasonido, dependiendo de las especificaciones del diseño de experimentos. Las condiciones del ultrasonido fueron:

- Amplitud: 50%.
- Tiempo total: 90 [min].
- Ciclo de operación: 8 [s] en operación, 2 [s] en reposo.
- Profundidad: Vástago sumergido 1 [cm] en solución.

Se llevó 40 [g] de esta solución tratada de levaduras a hidrólisis hasta alcanzar los grados de hidrólisis deseados, de 5% y 15%. La hidrólisis se realizó con una concentración de enzima de 6,75 [mAU/g] y 50°C; y la concentración del titulante NaOH fue de 0,88384 [N].

Para conocer en qué punto se debe detener la hidrólisis, se calcula según el volumen añadido del titulante y la ecuación de grado de hidrólisis, según:

$$V_{NaOH} = \frac{DH \times h_t \times \alpha}{N_{NaOH} \times 100} \tag{8}$$

En esta ecuación se reemplaza con los parámetros indicados, los cuales son conocidos y se especifican en la Tabla 3.5

Tabla 3.5: Parámetros usados en el cálculo del grado de hidrólisis

Parámetro	***Valor***
DH	5% o 15% (según corresponda)
h_t	22,46 [meq]
α	0,888
N_{NaOH}	0,8839 [N]

Con estos valores, se establece que el volumen que se debe añadir de titulante, y que a la vez sirve como indicador de cuando detener la reacción, es de 1,129 [ml] para 5% DH y 3,386 [ml] para 15% DH.

Una vez alcanzados los DH requeridos, se inactivó la enzima en un baño termorregulado con agua a 85 [°C] durante media hora. Posteriormente se almacenaron las soluciones en tubos Falcon y se mantuvieron en el congelador.

3.5.4 Hidrólisis de la borra de las fermentaciones

Las condiciones de hidrólisis fueron las mismas que las de los experimentos anteriores, es decir a 50 [°C] y con 6,75 [mAU/g] de enzima. El tiempo total de hidrólisis fue de 4 horas. La borra fue recuperada al dividir el producto final de la fermentación en tubos falcon de 50 [ml], los cuales fueron centrifugados a 4.000 g durante 12 [min]. Se separó el vino de la borra de forma manual, para luego recolectar todo el precipitado en un recipiente. El aspecto de éste es de una sustancia pastosa color café rojizo; y se pesaron 20 [g] de borra que fue mezclada con agua hasta alcanzar una concentración de 50% p/p.

3.6 Fermentación

3.6.1 Montaje

a) Esterilización de materiales

Todos los materiales de vidrio fueron esterilizados en un autoclave a 121 [°C] durante 15 [min]. El equipo utilizado posee un control digital de temperatura y tiempo, por lo que se fija a los valores mencionados anteriormente.

b) Preparación del mosto

Se utilizó un mosto de cepa Cabernet Sauvignon, el cual estaba almacenado en un congelador a -22 [°C], por lo que se sacó el día anterior para su descongelamiento. El mosto se filtró con gasa de 4 capas ajustada al tamaño necesario. Para este experimento se requirieron 5 [L] de mosto filtrado, volumen que fue dosificado en 400 [ml] para cada matraz Erlenmeyer de 500 [ml]. Se utilizaron 10 matraces en total.

Se hicieron 3 ajustes al mosto, estos fueron SO_2 libre, nitrógeno asimilable y pH:

- SO_2 libre

Se midió el contenido en el mosto con el equipo mini titrador de sulfuroso libre y total HI 84100, HANNA. El procedimiento que se especifica a continuación:

1. Calibración: Se verifica que la solución con la que se va a titular sea el reactivo 84100-50, y se deja purgar unas gotas para asegurar la limpieza de la manguera. Se miden 50 [ml] de estándar en el vaso que utiliza el equipo. Luego se añaden 20 [ml] de reactivo ácido HI 84100-53 y un sobre del reactivo en polvo HI 84100-54. Se coloca el electrodo dentro de esta solución a 2 [cm] de profundidad aproximadamente, además de una barra de agitación magnética. Se tiene cuidado con que el electrodo no toque la barra. Se inserta la punta de dosificación sumergida levemente en la solución, y se presiona el botón CAL para iniciar la calibración.
2. Medición de SO_2 en vino: El procedimiento es el mismo que el anterior, solo que se toman 50 [ml] de muestra del mosto que se utilizará. Una vez terminado el montaje del equipo, se presiona el botón START/STOP para iniciar y/o detener la medición. Una vez terminada la medición, el equipo mostrará la concentración de SO_2 total.
3. Ajuste de SO_2: La concentración de SO_2 debe ser mayor a 30 [ppm]. Si ésta es menor se añade Metabisulfito de potasio ($K_2S_2O_3$) para aumentar esta concentración. Se añade al mosto y se vuelve a medir hasta tener la concentración adecuada.

- Nitrógeno asimilable (YAN)

Se midió en el equipo G20 Compac Tritator, el cual opera como un autotitulador.

1. Calibración: El equipo se calibra con los estándares de pH 7 y 10. Se presiona el botón CAL y se siguen las instrucciones que va indicando el equipo a medida que avanza en el procedimiento. Una vez listo, entrega un mensaje de "OK" o "error" para la pendiente. si entregar el mensaje de error, se debe volver a calibrar.

2. Medición: Se toman 3 [ml] de mosto en un vaso plástico y se añade agua destilada hasta alcanzar los 60 [ml]. Se establece el pH con valor de 8 como set point, y se comienza la titulación con NaOH (se debe tomar nota de la concentración de la solución, la cual es cercana a 0,1 [N]). Una vez alcanzado pH 8, se añaden 2 [ml] de Formol y se lleva nuevamente a pH 8. Se toma nota del volumen añadido en la segunda etapa, el cual es usado para calcular la concentración de nitrógeno como sigue:

$$V_{NaOH} \times \frac{N_{NaOH}}{V_{muestra}} \times 14\left[\frac{g}{L}\right] \times 1000\left[\frac{mg}{g}\right] = C_{N\ asimilable}\left[\frac{mg}{L}\right] \tag{9}$$

El mosto utilizado tenía una concentración de 134,24 [mg/L].

3. Corrección de la concentración de nitrógeno: El valor apropiado es cercano a 250 [mg/L], por lo que se ajusta la concentración de nitrógeno con DAP y con el hidrolizado de levaduras, según lo establece el diseño de experimentos.

El volumen de DAP a añadir se calculó como sigue:

$$\left(250\left[\frac{mg}{L}\right] - C_{N\ asimilable}\left[\frac{mg}{L}\right]\right) \times \frac{V_{fermentación}}{1000} \times \frac{1}{14\left[\frac{gr}{mol_N}\right]} \times \frac{1[mol_{DAP}]}{2[mol_N]} \times 132\left[\frac{gr_{DAP}}{mol_{DAP}}\right] = m_{DAP}[g] \tag{10}$$

Por lo que se reemplazaron los datos en la ecuación (10), obteniendo la masa de DAP a añadir.

$$\left(250\left[\frac{mg}{L}\right] - 157{,}5\left[\frac{mg}{L}\right]\right) \times \frac{0{,}4[L]}{1000} \times \frac{1}{14\left[\frac{gr}{mol_N}\right]} \times \frac{1[mol_{DAP}]}{2[mol_N]} \times 132\left[\frac{g_{DAP}}{mol_{DAP}}\right] = 0{,}22[g_{DAP}] \tag{11}$$

Fue necesario añadir 0,22 [g] de DAP a cada matraz donde se realizaron las fermentaciones, los cuales fueron llenados con 400 [ml] de mosto. La concentración del

DAP utilizado es de 300[g/L], por lo que el volumen añadido de DAP a cada matraz es de 0,73[ml].

Para la corrección de concentración de nitrógeno en fermentaciones con hidrolizado de levaduras, es necesario conocer la concentración de nitrógeno de éste. Según lo estipulado en 3.1.4, el porcentaje de proteínas por gramo de levadura es de 32,53% y la equivalencia entre proteína y nitrógeno corresponde a 6,25 gramos de proteína contienen 1 gramo de nitrógeno. Luego, es posible calcular el contenido de nitrógeno del hidrolizado considerando que la solución está al 20% p/p (o 200 gramos por litro):

$$\frac{200[gr\ de\ levadura]}{1\ [L\ de\ hidrolizado]} \times 0{,}3253\ \left[\frac{g\ de\ Proteína}{gr\ de\ levadura}\right] \times \frac{1[g\ de\ Nitrógeno]}{6{,}25\ [g\ de\ Proteína]} = 10{,}41\left[\frac{g\ de\ Nitrógeno}{L\ de\ hidrolizado}\right] \quad (12)$$

La masa a que se añadió a cada matraz de mosto está dada según:

$$\left(250\left[\frac{mg}{L}\right] - 134{,}24\left[\frac{mg}{L}\right]\right) \times 0{,}4[L] = 46{,}3\ [mg\ de\ Nitrógeno] \quad (13)$$

Posteriormente se calculó el volumen de hidrolizado a añadir:

$$46{,}3\ [mg\ de\ Nitrógeno] \times \frac{1[g]}{1000[mg]} \times \frac{1}{10{,}41}\left[\frac{L\ de\ hidrolizado}{g\ de\ Nitrógeno}\right] \times \frac{1000\ [ml]}{1\ [L]} = 4{,}45\ [ml\ de\ hidrolizado] \quad (14)$$

- Ajuste de pH:

El pH del mosto se ajustó a 3,45, utilizando soluciones ácidas o básicas según corresponda. Para este caso se utilizó el Carbonato de Potasio (K_2CO_3) como solución básica y Ácido Tartárico ($C_4H_6O_6$) como solución ácida. La medición se realizó con el pH-metro

1. Calibración: Se realizó según el procedimiento disponible para el equipo, con los estándares de pH=4 y pH=7. Se coloca el electrodo y la termocupla dentro de la solución de pH=4, se presiona el botón *cal* y luego se siguen las instrucciones que indica el equipo, procurando lavar con agua destilada y secar los medidores cuando se cambia de solución.

2. Medición: Se inserta el electrodo y la termocupla en el recipiente que contiene el mosto, donde dependiendo del valor obtenido es el reactivo que se aplica para corregir el pH. Se aplican gotas y se homogeneiza la solución hasta obtener una nueva lectura estable y alcanzar el valor de 3,45.

c) Preparación del inóculo

La dosis recomendada de levaduras es cercana a 0,1 a 0,2 [g] de levadura seca por litro de mosto, dando una concentración inicial de 10^6 [células/ml] [39]. La levadura utilizada es marca Levin, del tipo EC 1118 para fermentación de vinos.

Se tomaron 20 [ml] de mosto y 20 [ml] de agua en un vaso precipitado. Se colocó en una plancha calefaccionada hasta llegar a una temperatura entre 35[°C] y 40[°C]. Se añadió 4 [g] de levadura, sin agitar. Es importante que la temperatura no sobrepase los 40[°C], ya que esto afecta directamente a las levaduras. Se esperó 10 [min], y se agita el vaso manualmente, sin introducir algún elemento externo a la solución. Luego se esperaron 15 [min] más y se retiró el vaso de la plancha. Se esperó a que el inóculo se enfriara a temperatura ambiente, y se añadió a los matraces Erlenmeyer una vez que la diferencia de temperatura entre el inóculo y el mosto fuese menor a 5[°C].

d) Preparación de fermentador y condiciones de operación

- Volumen: 400 [ml] de mosto en cada fermentación
- Temperatura: La temperatura de la cámara de agitación se fijó en 28 [°C], la cual se mantiene a lo largo de toda la fermentación.

- Agitación: Los matraces Erlenmeyer fueron posicionados en una cámara termorregulada y con agitación constante, la cual permite la homogeneización de los componentes y mantener las células en suspensión. El valor usado fue de 120 [rpm].
- Aireación del mosto: Si bien la fermentación es anaerobia, las levaduras requieren ciertos niveles de oxígeno para su crecimiento y su viabilidad al final de la fermentación alcohólica. Es por esto que se aireó el mosto durante 10 [min] con aire en cada matraz Erlenmeyer y previamente al proceso de inoculación.

e) Inoculación

Se debe verificar que la diferencia de temperatura entre la levadura y el mosto sea menor a 5[°C], si es así se adiciona un volumen determinado de inóculo para alcanzar una concentración de 0,05 [g/L] de levadura, lo cual se calcula según la siguiente relación:

$$V_{mosto\ en\ matraz} \times 0{,}05 \left[\frac{g}{L}\right] = V_{inóculo} \times 100 \left[\frac{g}{L}\right] \qquad (15)$$

Para este caso, se tiene un volumen de 0,4 [L], por lo que el inóculo en cada matraz fue de 0,2 [ml].

f) Fermentación

La fermentación comienza cuando la levadura entra en contacto con el mosto, y tiene una duración aproximada de 7 días. Los parámetros operacionales deben mantenerse dentro del rango recomendado, por lo que deben ajustarse periódicamente o mantenerse de forma automática si es posible. Para los experimentos realizados en este trabajo, estos parámetros fueron pH, temperatura y agitación, donde solo el pH debía ser ajustado al momento de las mediciones de la misma forma mencionada anteriormente.

Una fermentación normal comienza con una concentración entre 22 y 24 [°Brix], lo que equivale a 220 y 240 [g/L] de azúcar total inicial. La fermentación completa se alcanza cuando los azúcares residuales fermentables en el vino alcanzan una concentración menor a 2 [g/L].

g) Seguimiento de la fermentación

En este caso, el seguimiento de la fermentación se hizo al medir los siguientes parámetros:

- Densidad
- Turbidez
- °Brix
- ° Alcohólico final
- Azúcares reductores finales

3.6.2 Análisis y equipos

La toma de muestra se realizó diariamente a lo largo de toda la fermentación, manteniendo registro de la cantidad de horas que pasaban entre cada medición. Se tomaron 12 [ml] de muestra diariamente, volumen suficiente para llevar a cabo las mediciones.

- Densidad

La densidad fue medida con un picnómetro con capacidad de 10 [ml] y con una balanza analítica. Características: Marca: Nahita, Modelo: 5’34-EX, Capacidad: 200 ± 0,0001[g]. Pesada en gramos, miligramos, onzas y quilates. Adaptador CA 220V.

Procedimiento:

1. Llenar el picnómetro con agua destilada hasta el tope, dependiendo del volumen del picnómetro 10 o 50 [mL].

2. Secar con un pequeño trozo de papel.

3. Pesar el picnómetro.

4. Vaciar el picnómetro, enjuagar con acetona, y secar al aire.

5. Dejar el picnómetro vacío, y pesar.

6. La masa de agua corresponde a la diferencia entre el picnómetro lleno y el picnómetro vacío.

7. El volumen del picnómetro corresponde a la masa del agua dividido en la densidad del agua a la temperatura que se encuentre.

8. Tomar la muestra a analizar y comenzar desde el paso 1, pero con la muestra a analizar, el volumen del picnómetro corresponderá al obtenido en el paso 7.

$$\rho\ (20ºC)\left[\frac{g}{mL}\right] = \frac{(Masa\ picnómetro\ con\ muestra - Masa\ picnómetro\ vacío)}{Volumen\ picnómetro} \quad (16)$$

- Turbidez

La turbidez fue medida con un turbidímetro, el cual entrega los resultados en unidades NTU (Nephelometric Turbidity Unit) y que se relaciona con la biomasa que tiene la muestra.

Características: Marca: HANNA Instruments, Modelo: HI 83749. Rango: 0,00 a 9,99 [NTU]; 10,0 a 99,9 [NTU]; 100 a 1200 [NTU] ± 2%. Fuente luminosa: Lámpara de tungsteno, Condiciones de uso: De 0 [°C] a 50 [°C]; H.R. máx. 95%, Alimentación: 4 pilas alcalinas de 1,5V AA o transformador a 12 Vcc.

Procedimiento

1. Se calibra el equipo.

2. El equipo viene provisto con pequeñas botellas de vidrio para realizar las mediciones, las cuales se llenan con 10 [ml] y según la dilución deseada. Se utiliza una botella por cada muestra.

3. Se limpia bien la superficie de la botella, para evitar que se perjudiquen las mediciones, y se pone en marcha el equipo presionando “Read”.

4. Un vez que termina la medición, se pone la siguiente botella para ser leída.

5. Una vez que terminen las mediciones se apaga el equipo.

La dilución utilizada fue de 1:20, por lo que se tomaron 0,5 [ml] de muestra y se llevaron a 10 [ml].

- °Brix

Los °Brix corresponden a los azúcares disueltos, los cuales se miden con un refractómetro. Características: Marca: HANNA Instruments. Modelo: HI96811. Rango de medición: 0 – 50 ± 0,1°Brix. Temperatura: 0 a 80 [°C] ± 0,1[°C]. Batería de 9V.

Procedimiento:

1. Calibrar el refractómetro con agua destilada
2. Pasar el mosto o la muestra a través de una gasa doblada en cuatro si es necesario, y después de eliminadas la primeras gotas, se toma la muestra.
3. Llevar la muestra a una temperatura cercana a 20ºC.
4. Colocar una pequeña muestra en el prisma del refractómetro, teniendo en cuenta que la muestra cubra uniformemente toda la superficie del prisma.
5. Leer índice refractivo, y realizar al menos dos determinaciones de la muestra preparada.

Se recomienda tener en cuenta la temperatura en todo momento.

- ° Alcohólico

La lectura del grado alcohólico se hizo con un vinómetro, el cual es una especie de embudo con un vástago que posee un capilar interior, y donde se especifica la escala de graduación alcohólica en el exterior.

Procedimiento:

1. Lavar el vinómetro con agua destilada. Es decir, se agrega agua al embudo y se dejan caer dos o tres gotas por el extremo de salida del capilar
2. Voltear el vinómetro para eliminar el exceso de agua en el embudo
3. Colocar la muestra en el embudo (se requieren aproximadamente 3 ml) y se dejan caer 2 o 3 gotas por el extremo del capilar.
4. Voltear el vinómetro para eliminar el exceso de muestra, y esperar que el líquido dentro del capilar baje a lo largo del mismo. Se debe procurar que no haya aire dentro del capilar.
5. Registrar el valor que marca la muestra dentro del capilar, de acuerdo a la graduación del vinómetro.

- Azúcares reductores

La cuantificación de los azúcares reductores se hace según el método de DNS, cuyo protocolo de preparación de reactivo DNS y elaboración de curva de calibración se especifica en el Anexo 7.2.

Procedimiento:

1. Preparar la curva de calibración con glucosa según concentraciones elegidas.
2. Preparar la dilución de las muestras de acuerdo a rango de absorbancia indicado por la curva de calibración.
3. Tomar 0,5 [ml] de muestra y añadir a un tubo falcon de 15 [ml]. Posteriormente, añadir 0,5 [ml] de reactivo DNS.
4. Llevar a 95°C en un baño térmico durante 5 minutos. Luego enfriar en agua con hielo para alcanzar la temperatura ambiente. Añadir 5 [ml] de agua destilada y agitar bien.
5. Leer en espectrofotómetro a 540 [nm] y registrar la absorbancia.

6. Para la curva de calibración, se toman 0,5 [ml] de cada punto de la curva y se ejecuta desde el paso 3 al 5.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4 Resultados y discusión

4.1 Cinética de ruptura de estructura celular con ultrasonido.

Como se mencionó en el capítulo anterior, para determinar el tiempo de ciclo y el tiempo total de aplicación de ultrasonido sobre la solución de levaduras, es necesario estudiar la cinética de ruptura de las células.

4.1.1 Lisis celular

Para conocer el contenido total de proteínas por gramo de levadura, se realizó la lisis alcalina de las levaduras, cuyos resultados se muestran en la Figura 4.1:

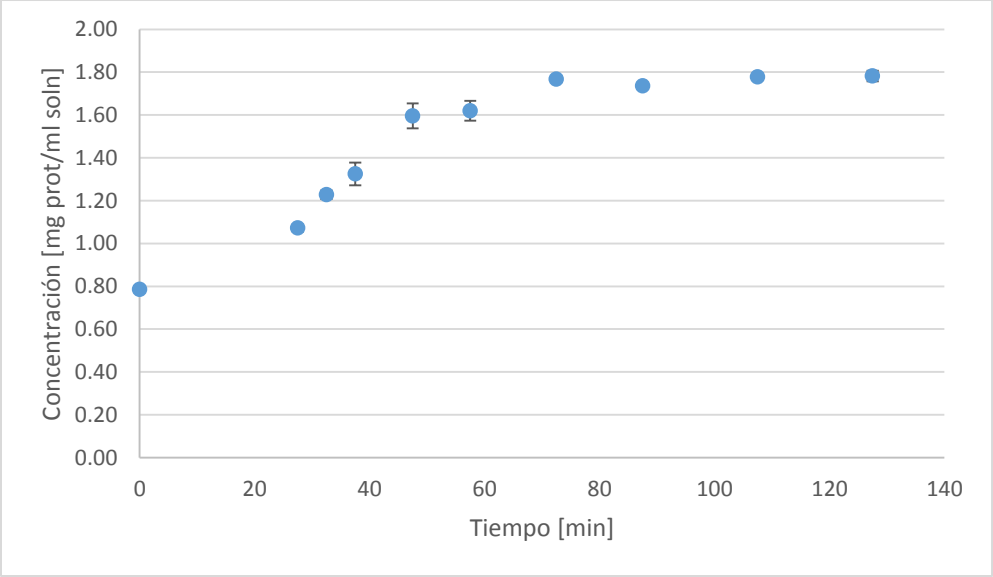

Figura 4.1: Liberación de proteínas en lisis celular en medio alcalino. Concentración de levaduras 0,5% p/p, NaOH 0,05 [N], 90°C.

Se observa que al minuto 75 se alcanza un valor de concentración de proteínas que permanece constante, donde se infiere que se obtiene el máximo de liberación de proteínas

intracelulares. Este valor es de 353,2 [mg de proteína/g de levadura], el cual se utiliza como valor de proteína total para calcular el % de liberación de proteína con la lisis alcalina.

4.1.2 Tratamiento mediante ultrasonido

Las curvas obtenidas se presentan en la Figura 4.2, destacando que se cuantifica liberación de proteínas al tiempo inicial ya que las soluciones de levaduras fueron previamente esterilizadas, lo que contribuye a la ruptura celular y liberación de proteínas al medio.

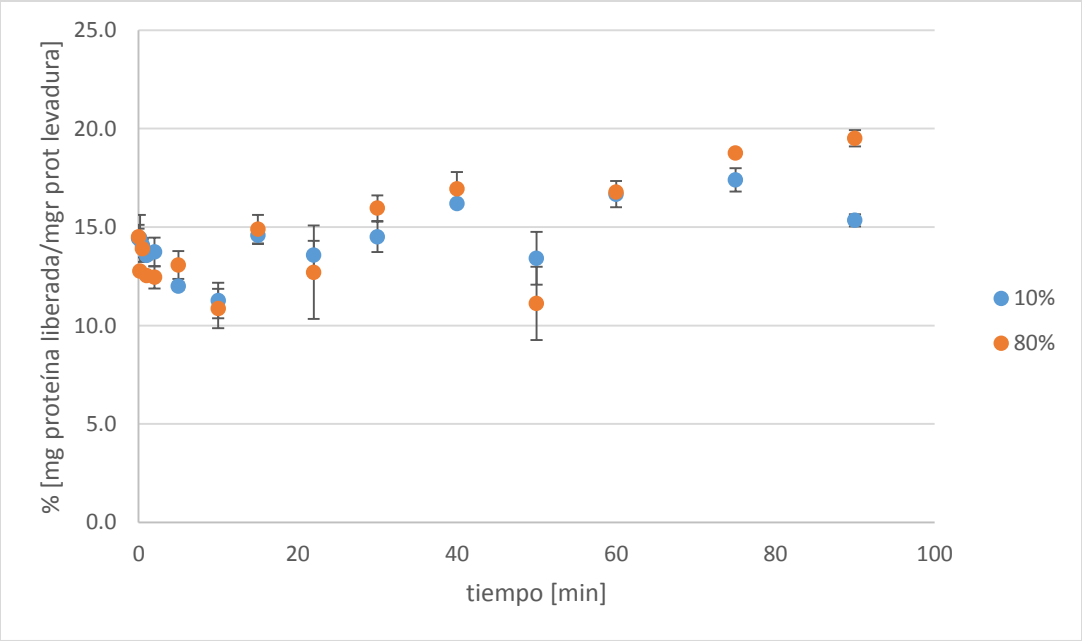

Figura 4.2: Porcentaje de proteína liberada mediante ultrasonido. 10%: 1[s] operando, 9[s] en reposo; 80%: 8[s] operando, 2[s] en reposo; Tiempo total 90[min]; Amplitud 50%.

En la gráfica se observa que la curva de liberación de proteínas tiene una tendencia creciente para ambos tiempos de ciclo, y no se observa una secuencia de valores que permanezca constante, por lo que no se puede asumir que se alcanza el porcentaje de liberación máximo de proteínas dentro de los 90 [min] de tratamiento. Sin embargo, para un tiempo total de tratamiento de 90 minutos, existe un mayor porcentaje de liberación de

proteínas para el tiempo de ciclo 80% que para el tiempo de ciclo 10% respecto al punto inicial, donde el porcentaje promedio de liberación de proteínas es de 14,5%.

Con los resultados obtenidos se escogen las condiciones para el tratamiento con ultrasonido, que corresponden a un tiempo total de tratamiento de 90 [min] y tiempo de ciclo de 8 [s] en funcionamiento y 2 [s] en reposo. Estas condiciones permanecerán constantes tanto para los experimentos de hidrólisis, como para la preparación del hidrolizado que será utilizado en la fermentación.

4.2 Hidrólisis enzimática de proteínas de levadura

4.2.1 Efecto del pretratamiento sobre la hidrólisis de levaduras

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de proteínas 3 soluciones de levaduras con igual composición pero con distintos pretratamientos: una solución control sin ningún tipo de pretratamiento (C), una autoclavada (A) y otra autoclavada y además tratada con ultrasonido (A+U). Los resultados se muestran en las Figura 4.3 y Figura 4.4.

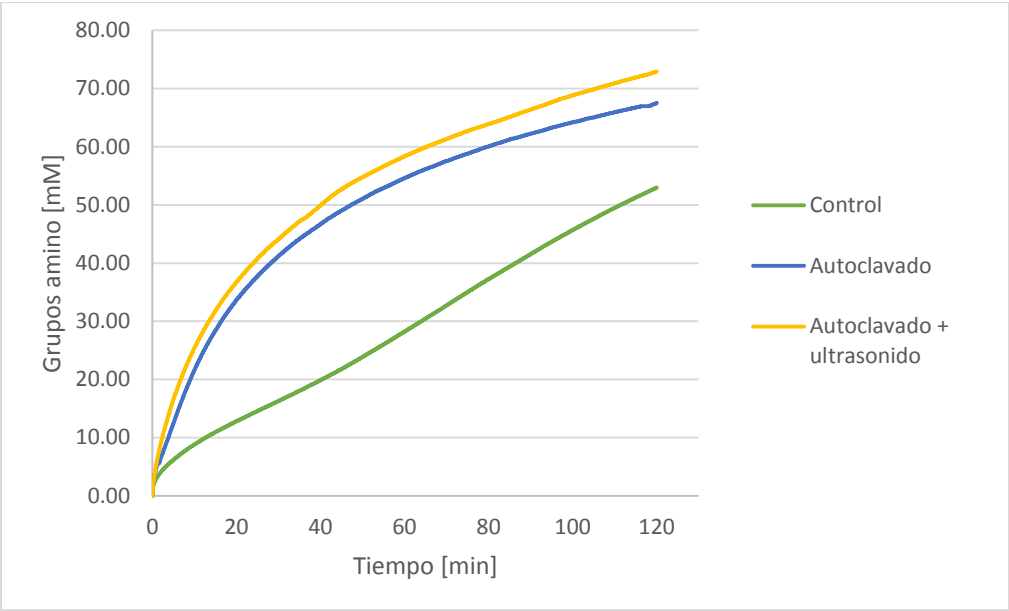

Figura 4.3: Producto formado en hidrólisis enzimática de proteínas de levaduras con pretratamiento de autoclave, ultrasonido y control. T=50[°C]; 40 [g] de solución; 20% p/p de levaduras; pH = 8; 6,75 [mAU/g] de enzima.

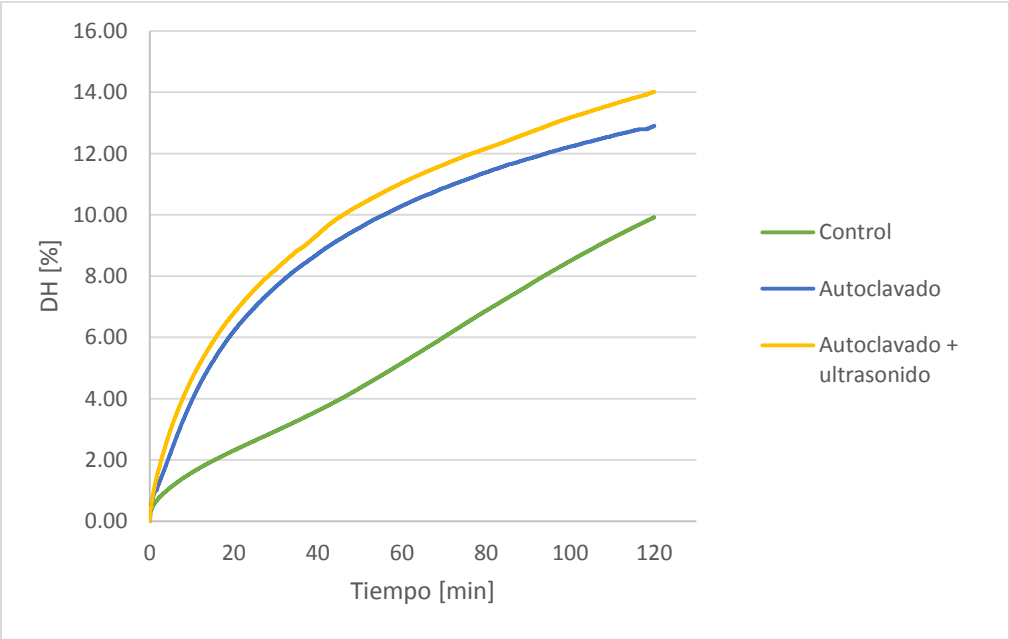

Figura 4.4: Grado de hidrólisis enzimática de proteínas de levaduras con pretratamiento de autoclave, ultrasonido y control. T=50[°C]; 40 [g] de solución; 20% p/p de levaduras; pH = 8; 6,75 [mAU/g] de enzima.

Se aprecia que existe una mayor formación de producto en la solución autoclavada y tratada con ultrasonido, seguida de la solución autoclavada y finalmente la solución control. Se obtuvo un grado de hidrólisis de 14% para A+U, 13% para A y 10% para C luego de dos horas de reacción.

Se destacan dos cosas de estas gráficas; la primera es la poca diferencia de formación de producto entre la solución A+U y la solución A, lo cual se condice con la poca diferencia registrada en el liberación de proteínas que tiene este pretratamiento respecto a la solución ya autoclavada (Figura 4.2). Es decir, el ultrasonido tiene un efecto leve sobre las levaduras autoclavadas, lo que indica que la mayoría de las proteínas son liberadas en este proceso.

En segundo lugar, la forma de la curva control difiere de la forma típica que se observa en la hidrólisis enzimática de proteínas (modelada por Qi & He, [35]). La curva tiene un inicio con una pendiente menor que las dos anteriores, pero llega un punto en que su crecimiento es casi lineal. Se infiere que este comportamiento puede deberse a la acción de la Alcalase, ya que ésta hidroliza las proteínas que conforman parte de la membrana plasmática, lo que lleva a su ruptura y a la liberación de las proteínas intracelulares. Esto significa un aumento constante del sustrato disponible para la hidrólisis, lo cual puede dar explicación a la tendencia lineal de la curva de hidrólisis. Asimismo, otra posible razón pudiese ser gracias a la acción de las proteasas endógenas de la levadura, las cuales contribuyen a la formación de producto. Esto ocurre solo en el caso del control, ya que en la solución autoclavada de levaduras estas enzimas han sido inactivadas debido a las condiciones de operación del autoclave.

4.2.2 Efecto del pretratamiento sobre la hidrólisis de levaduras separadas en fases

Posteriormente, se realizó la hidrólisis enzimática junto a los pretratamientos y control ya mencionados, pero esta vez se separó la solución en una fracción soluble y otra insoluble, de forma previa a la hidrólisis. Se presenta la curva de formación de producto para la fracción soluble Figura 4.5 a continuación:

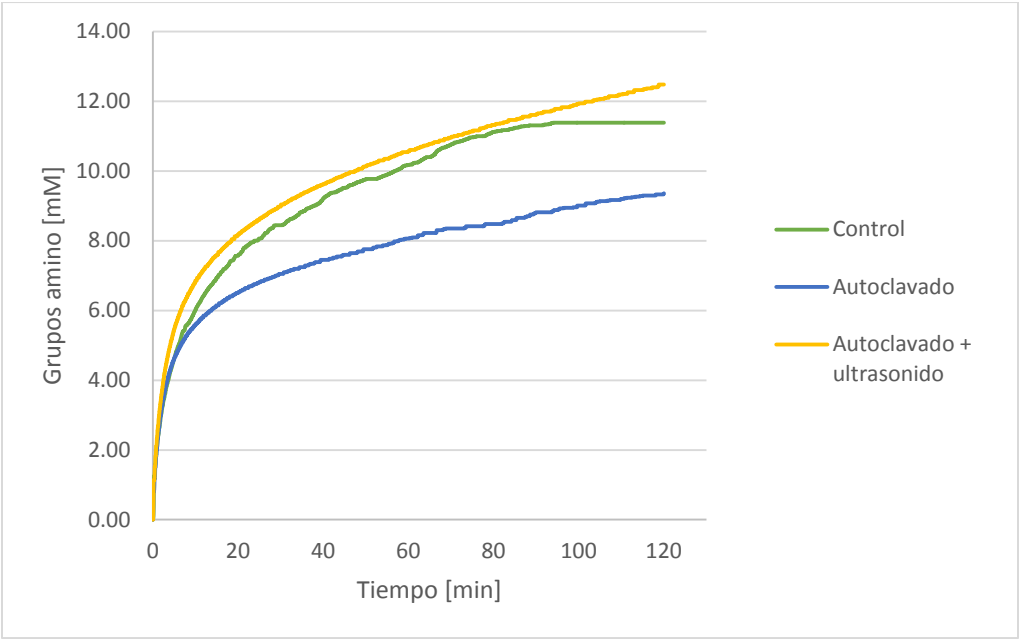

Figura 4.5: Producto formado en hidrólisis enzimática de proteínas de levaduras en fracción soluble con pretratamiento de autoclave, ultrasonido y control. T=50[°C]; 40 [g] de solución; 20% p/p de levaduras; pH = 8; 2 [mAU/g] de enzima

Para la fracción soluble, se observa que la generación de producto en C y A+U a las 2 horas de hidrólisis son muy parecidos y ambos resultan ser mayores a lo alcanzado en la hidrólisis de A. El hecho que la solución A+U tenga una mayor concentración de producto que A responde al efecto del ultrasonido, donde éste fue capaz de liberar más proteínas, lo que le da una mayor disponibilidad de sustrato a la enzima dentro de la fase soluble para su hidrólisis. Por otro lado, la similitud entre la curva C y A+U resulta ser interesante, ya que se esperaría que la curva control fuera la que tuviera una menor concentración de producto debido a lo encapsulados que se encuentran los componentes intracelulares. Esto puede tener explicación en las enzimas propias de la levadura, las cuales y como ya se mencionó anteriormente, contribuyen con la formación de producto en la hidrólisis control únicamente, ya que tanto en A como en A+U se encuentran inactivas.

Se destaca además que las tres curvas tienen un comportamiento similar al típico de la hidrólisis de proteínas libres, lo cual se condice con el hecho de que en la fase soluble solo se encuentran las proteínas en este estado, mientras que los componentes más complejos han precipitado a la fase insoluble.

Por otro lado, se tiene la curva de hidrólisis de la fracción insoluble (Figura 4.6), la cual es analizada a continuación:

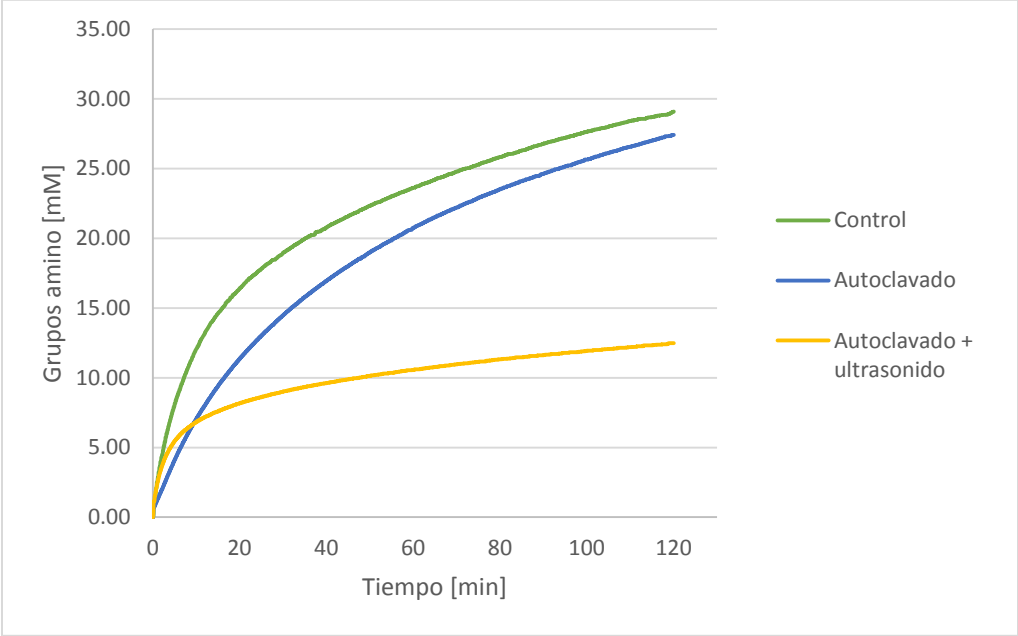

Figura 4.6: Producto formado en hidrólisis enzimática de proteínas de levaduras en fracción insoluble con pretratamiento de autoclave, ultrasonido y control. T=50[°C]; 40 [g] de solución; 20% p/p de levaduras; pH = 8; 2 [mAU/g] de enzima

En este caso, existe una menor concentración de producto en el experimento A+U, lo cual puede deberse a que al haber pretratado las levaduras hubo más liberación de proteínas, las cuales pasaron a la fracción soluble. Por otro lado, el experimento control muestra la mayor concentración de producto en la fase insoluble, por lo que se presume que al no haber tratamiento previo a las levaduras se liberó una menor cantidad de proteínas respecto a los otros experimentos. La formación de producto en la hidrólisis de la solución tratada con autoclave es cercana a la de la solución control, y cuya concentración de grupos amino es mayor a la de la solución tratada con ultrasonido y autoclave. Llama la atención la gran diferencia de concentración de grupos amino que existe la curva A+U y las otras, lo cual no se evidencia en la hidrólisis de la mezcla completa de levaduras. Esto pudo ocurrir ya que al separar las fracciones luego del tratamiento con ultrasonido, la fase soluble tuvo una turbidez considerable, hecho que no se vio en la separación de la solución control y la autoclavada.

4.2.3 Autolisis

Dado que se presume que existe hidrólisis de proteínas hecha por las enzimas endógenas de la levadura, es que se realiza el ensayo de autolisis celular. Este corresponde al seguimiento de la cinética de la hidrólisis en el autotitulador, con las mismas condiciones de temperatura y concentración de levadura, pero sin añadir la Alcalasa. La curva obtenida se muestra en la Figura 4.7, y su grado de hidrólisis se muestra en la Figura 4.8

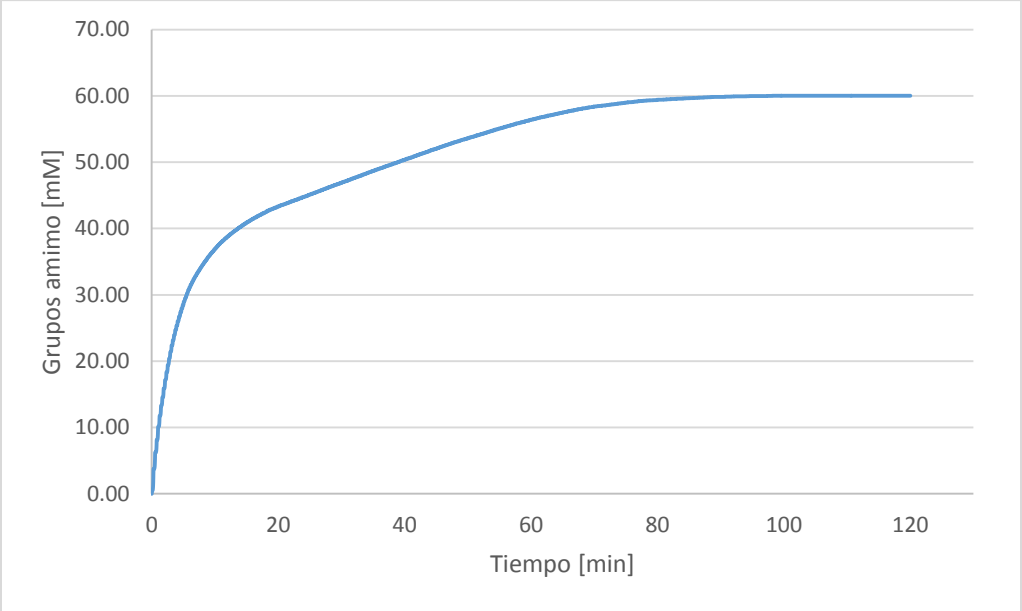

Figura 4.7: Producto formado en autolisis de proteínas de levaduras. T = 50[°C], 40[g] de solución, 20% p/p de levaduras, pH = 8

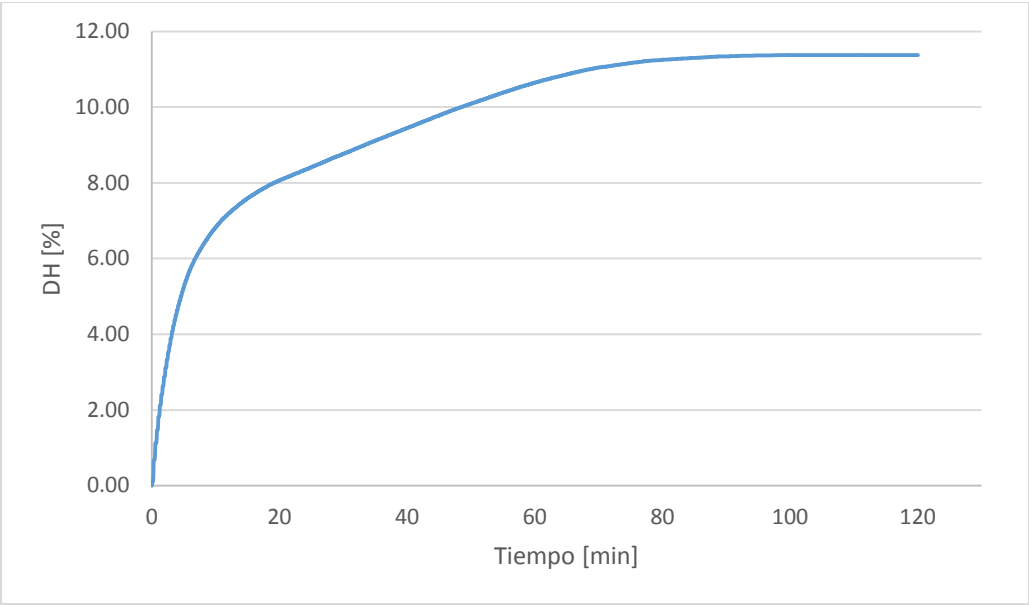

Figura 4.8: Grado de hidrólisis en autolisis de proteínas de levaduras. T = 50[°C], 40[g] de solución, 20% p/p de levaduras, pH = 8

Se evidencia que existe hidrólisis enzimática, la cual es realizada únicamente por las proteasas endógenas de la levadura. Bajo las condiciones mencionadas, se alcanza el punto máximo de formación de producto y grado de hidrólisis en el minuto 70 aproximadamente, con valores de 60 [mM] y 11,5% respectivamente. Cabe mencionar que la concentración de producto formado en la autolisis corresponde a cerca del 80% de los grupos amino generados en la hidrólisis de levaduras (Figura 4.3), por lo que es posible afirmar que la acción de estas enzimas influye en los experimentos control de hidrólisis, aumentando la cantidad de proteínas hidrolizadas.

4.2.4 Preparación de hidrolizado a usar como fuente de nitrógeno en la fermentación vínica

Se estableció en el diseño de experimentos que los grados de hidrólisis a alcanzar son 5% y 15%, por lo que se llevó a cabo la hidrólisis de 24 horas (Figura 4.9) para conocer a que tiempos se alcanzan estos grados de hidrólisis.

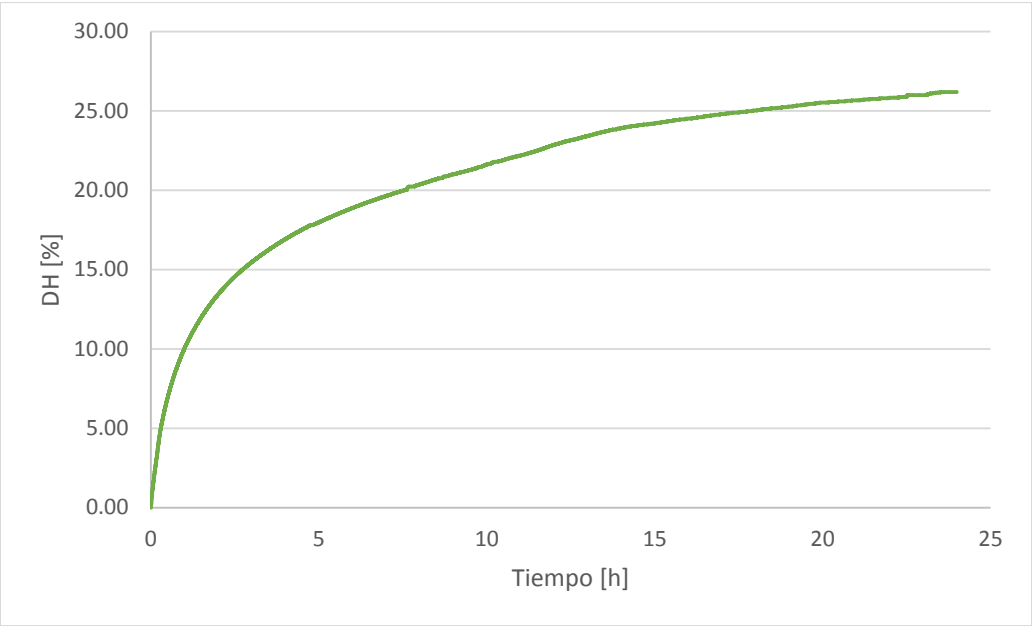

Figura 4.9: Grado de hidrólisis enzimática de proteínas de levaduras. T = 50[°C]; 40[g] de solución; 20% p/p de levaduras; pH=8; 6,75 [mAU/g] de enzima.

Se establece que para alcanzar el grado de hidrólisis de 5% son necesarios casi 20 minutos y para el grado de hidrólisis 15% se requieren entre 2,5 y 3 [h].

4.3 Seguimiento de la fermentación.

La fermentación se inició al momento de inoculación el día 1, y se terminó de medir al día 7. A continuación se muestran los resultados recopilados durante este período, registrando la cinética y comportamiento de las fermentaciones bajo distintas fuentes de nitrógeno.

- Variación de densidad

El punto inicial de la curva corresponde a la densidad del mosto, la cual fue de 1,087 [g/ml]. Luego, a medida que se produce la fermentación y se libera etanol al medio, la densidad disminuye progresivamente. Este parámetro es ampliamente usado como factor de

seguimiento de la cinética de la fermentación, donde a nivel industrial se considera que la fermentación ha terminado una vez que la densidad es de 0,990 [g/ml]. La densidad medida a lo largo del período de fermentación se muestra en la Figura 4.10:

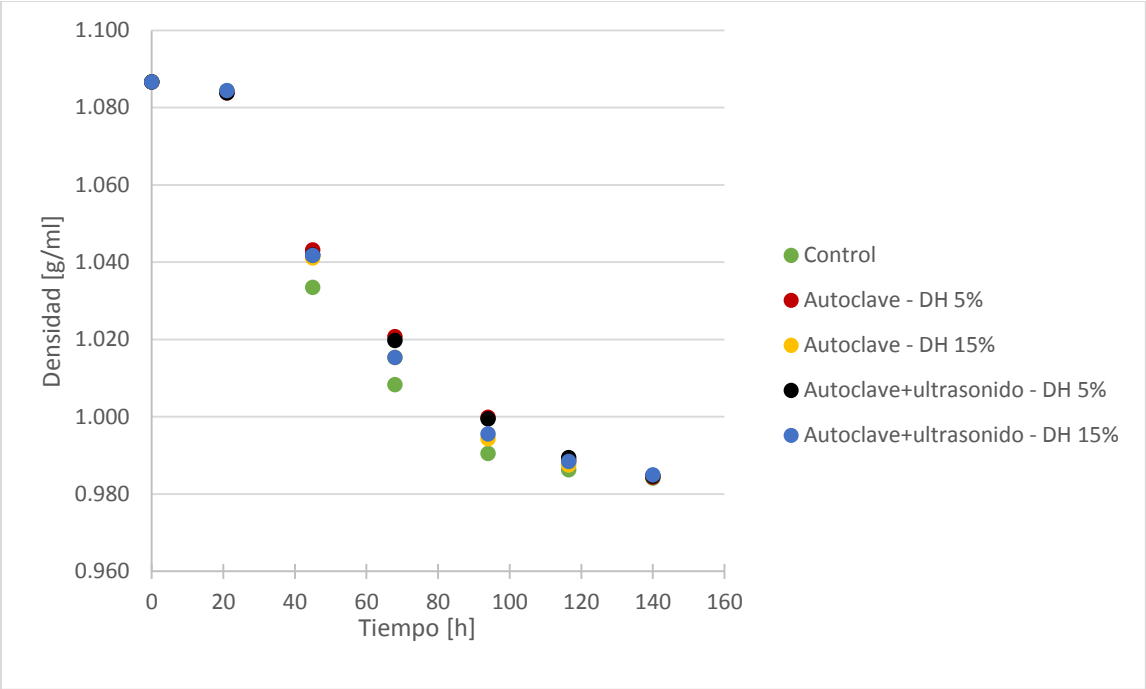

Figura 4.10: Densidad de fermentación v/s tiempo. T =28[°C]; Agitación = 120[rpm]

Se observa que la disminución de la densidad comienza a hacerse notoria a partir de la hora 45 (día 3), donde disminuye a una razón cada vez menor hasta alcanzar un valor cercano a 0,985 [g/ml].

Además, es posible apreciar que la fermentación control es la que tiene una variación mayor de densidad respecto al tiempo, al menos entre las horas 45 y 94. Esto puede ocurrir debido a que se trata de una fuente de nitrógeno inorgánica, la cual resulta mucho más fácil de asimilar que el hidrolizado, compuesto de péptidos y aminoácidos. Por consiguiente, las levaduras crecen a una mayor velocidad, lo que se traduce en una mayor tasa de consumo de azúcares. Finalmente, se tienen una mayor generación de etanol a partir del consumo de azúcar, lo que se puede observar en la variación de densidad para cada experimento. Se

espera entonces una producción más rápida de etanol, lo que queda plasmado en la mayor variación de densidad.

Para apreciar de mejor forma este fenómeno se preparó una gráfica (Figura 4.11) con la razón de cambio de la densidad respecto a la variación de tiempo, lo cual corresponde a la primera derivada de esta variable.

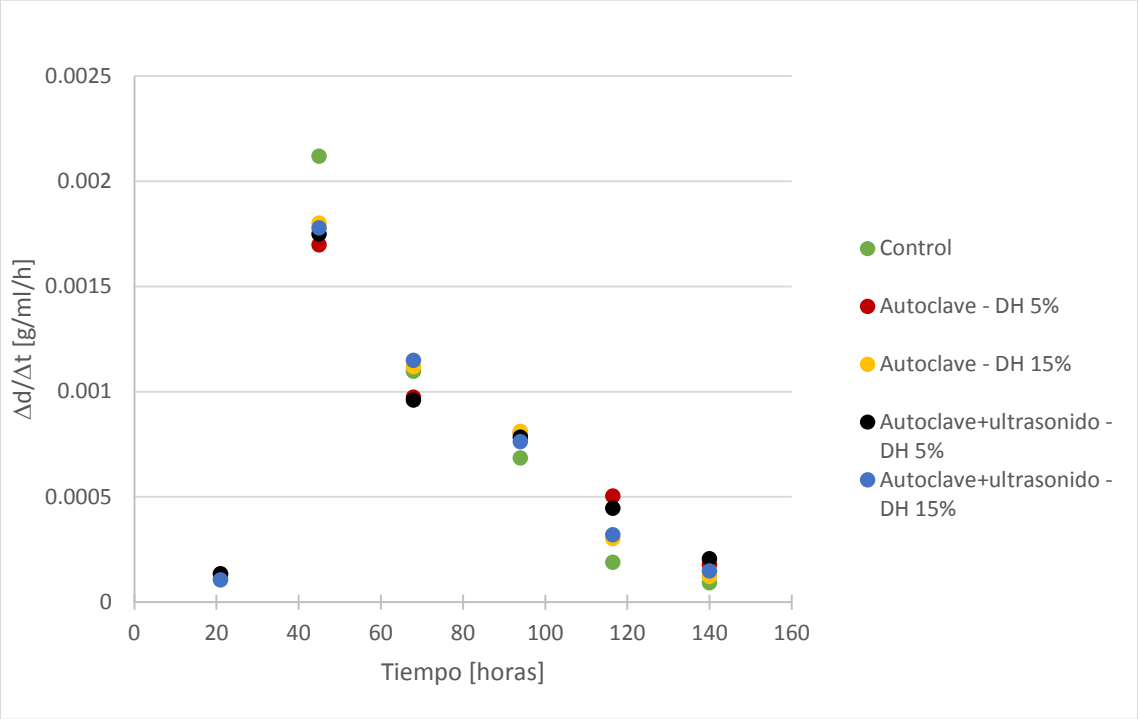

Figura 4.11: Razón de variación de densidad respecto a la variación del tiempo. T =28[°C]; Agitación = 120[rpm]

El primer punto de la gráfica corresponde a la variación entre la densidad del segundo y primer punto, la cual es pequeña y por lo tanto se ve como un valor bajo en la gráfica. El punto siguiente muestra la variación mayor, ya que es la diferencia entre el tercer y segundo punto de la curva de densidad. Se observa que la mayor tasa de disminución de densidad entre el día 2 y 3 fue en el experimento control, respecto a los otros experimentos. Posteriormente viene el punto “autoclave - DH 15%”, luego “autoclave + ultrasonido – DH 15%”, seguido de “autoclave + ultrasonido – DH 5% y finalmente “autoclave – DH 15%”. En este momento de la fermentación aún es posible asumir que las condiciones son

relativamente uniformes en todos los medios de cultivo, lo que permite establecer que la fermentación con DAP si resulta ser más rápida.

En los días siguientes, es posible apreciar que son las fermentaciones con hidrolizado como fuente de nitrógeno las que tienen una mayor velocidad de disminución de densidad, por lo que se presume que la asimilación de estos nutrientes ocurre en los días siguientes. Se destaca también el comportamiento entre las horas 68 y 117, donde se observa que las fermentaciones con hidrolizado de DH 15% tienen una velocidad mayor respecto a las de hidrolizado de 5%. Ya en la hora 117, se observa que las fermentaciones con hidrolizado de DH 5% alcanzan una mayor velocidad, lo cual permite inferir que el grado de hidrólisis tiene una mayor influencia sobre la velocidad de fermentación respecto a si existe o no pretratamiento. Este hecho encuentra su justificación en que al haber un mayor grado de hidrólisis, se tiene una mayor ruptura de enlaces peptídicos y por lo tanto péptidos más pequeños, por lo que se requiere menos etapas de reacción previas para su asimilación.

- Variación de turbidez

La turbidez tiene una directa relación con el crecimiento celular en el medio, por lo que a través de esta medición en la Figura 4.12, es posible establecer bajo qué condiciones se tiene mayor o menor biomasa.

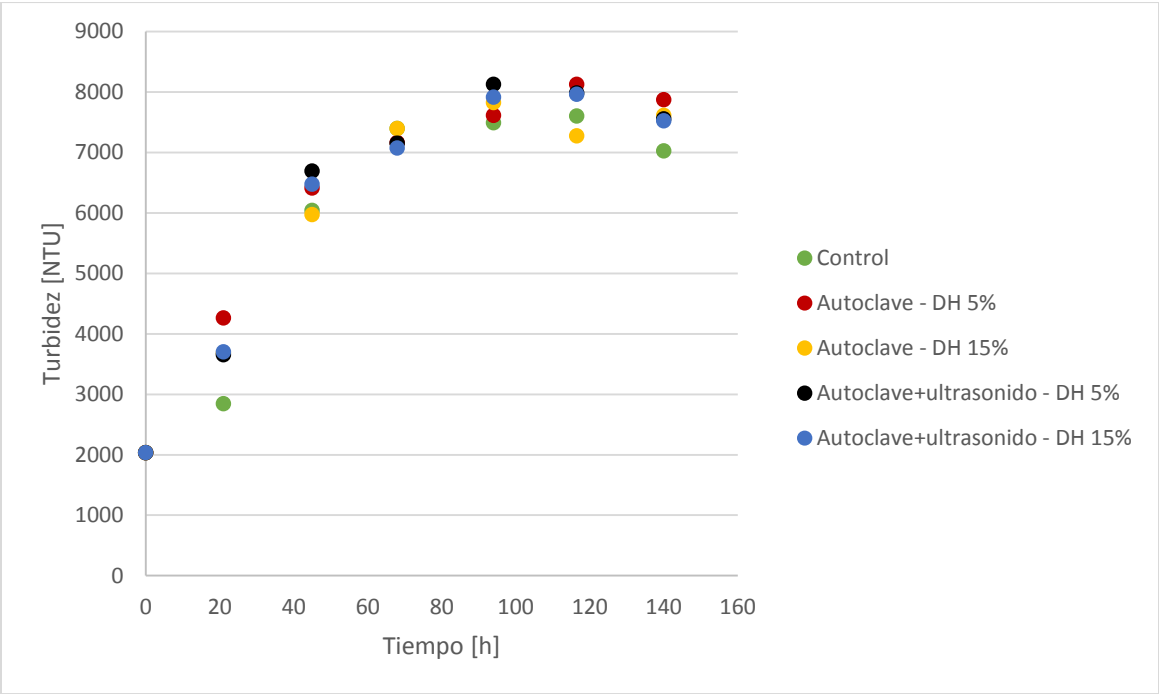

Figura 4.12: Turbidez v/s tiempo. T =28[°C]; Agitación = 120[rpm]

La turbidez inicial del mosto fue de 2030 [NTU], para luego aumentar en los días siguientes hasta la hora 117 aproximadamente, donde la turbidez comienza a disminuir. Esto ocurre debido a la muerte de las levaduras, lo cual disminuye la biomasa disponible y por lo tanto la turbidez.

De forma general, es posible observar que la turbidez es mayor para las fermentaciones con fuente de nitrógeno orgánica que para la fermentación control. Este fenómeno puede encontrar su explicación en que el hidrolizado contiene también carbono, lo cual trae consigo una mejora en las condiciones del medio de cultivo y en la disponibilidad de este nutriente. Esto permite un aumento en la población de levaduras, que a su vez aumenta la turbidez de la solución. Además, se debe considerar que el hidrolizado también aporta turbidez al mosto, a diferencia de la solución de DAP usada, que es transparente.

La mayor variación de turbidez corresponde a la registrada entre las horas 45 y 68, donde se estima que termina la fase lag y comienza la fase exponencial de crecimiento microbiano. Luego, entre las horas 68 y 117 se tiene la fase constante, donde existe un

equilibrio entre la población de levaduras que se genera y muere, para terminar con la fase de decrecimiento, entre las horas 117 y 140.

- Variación de °Brix

La variación de °Brix se muestra en la Figura 4.13, donde el valor inicial del mosto fue de 22,3 °.

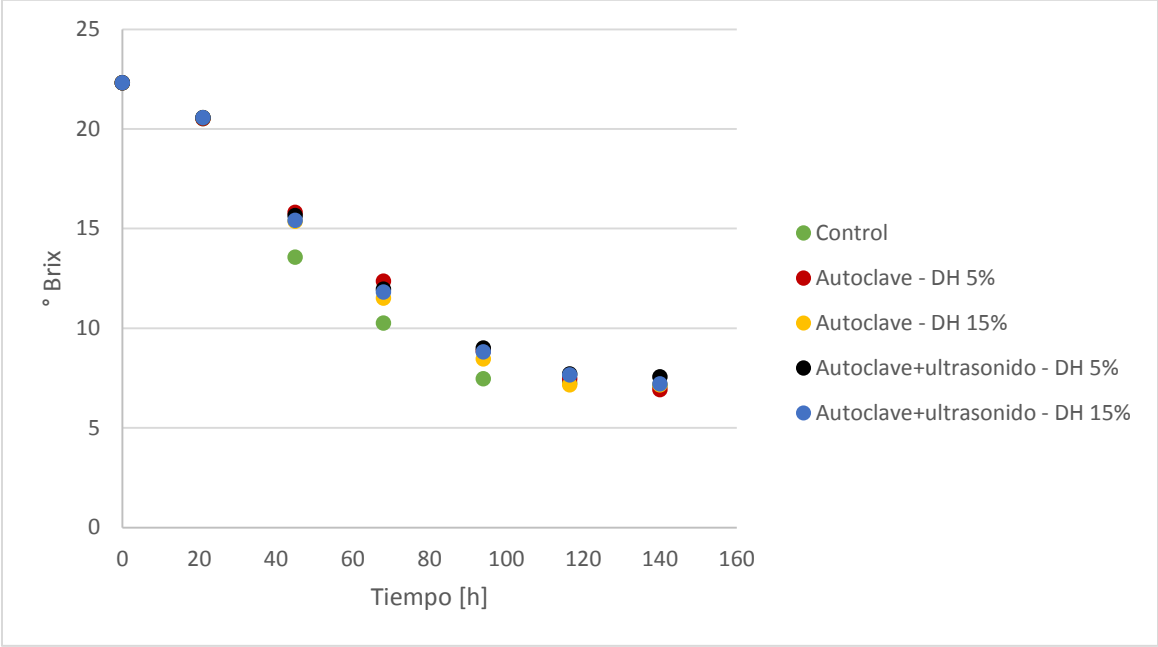

Figura 4.13: °Brix v/s tiempo. T =28[°C]; Agitación = 120[rpm]

Se observa que entre las horas 45 y 94 se tiene una mayor disminución de los °Brix para la fermentación control. Esto se condice con la rápida variación de densidad que se observó para la fermentación control durante estas horas, ya que al registrarse una disminución de los °Brix se presume que azúcares disueltos disminuyeron también. Lo anterior implica que las levaduras consumieron los azúcares del mosto para elaborar etanol, y que a su vez se cuantifica en la variación de densidad mencionada.

- Determinación de azúcares reductores finales

Se cuantificó la concentración de azúcares reductores el día 7 de la fermentación (último día de medición), para de esta forma evaluar si existe relación entre la fuente de nitrógeno utilizada y el consumo de azúcares, mediante un test de significancia. Los resultados se observan en la Figura 4.14:

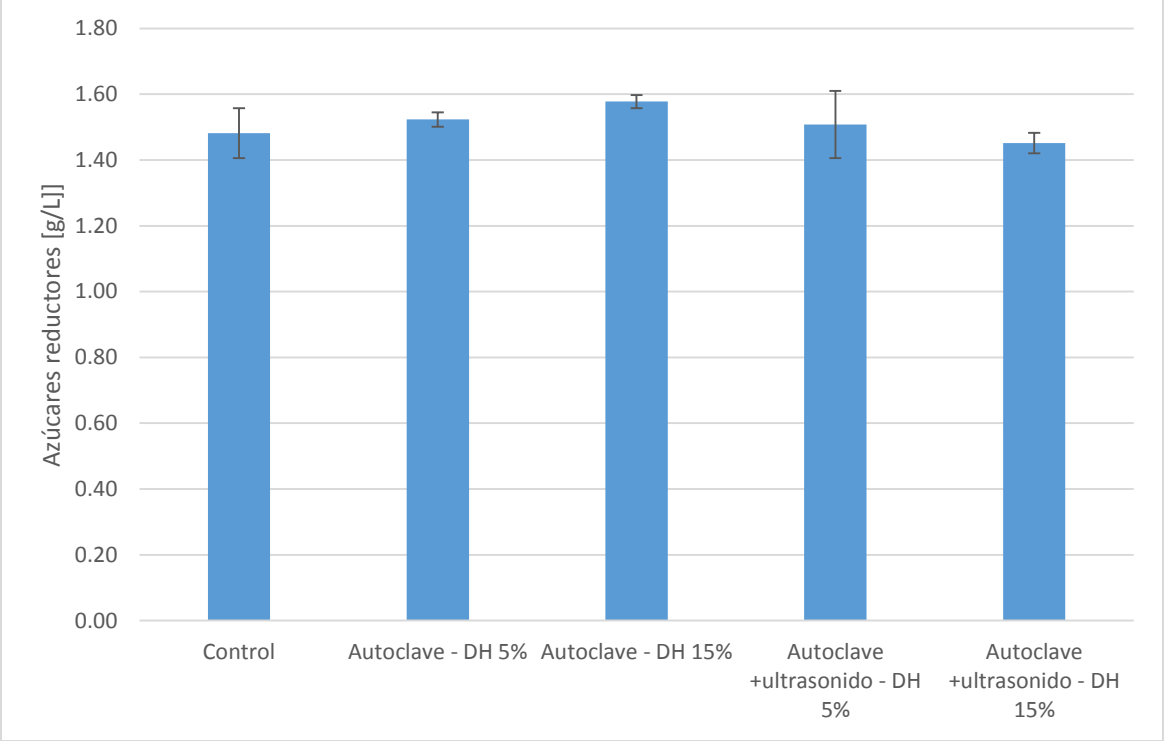

Figura 4.14: Concentración de azúcares reductores residuales al día 7 de fermentación. T =28[°C]; Agitación = 120[rpm]

Se observa que la concentración final de azúcares oscila entre los 1,45 y 1,6 [g/L] aproximadamente para los diferentes experimentos realizados, pero a simple vista no se obseva si existe alguna relación significativa entre la fuente de nitrógeno y el consumo de azúcares. La fermentación que registró una menor concentración de azúcares residual es la estéril con ultrasonido y DH 15%, es decir la fermentación con los dos factores en un nivel alto. El valor alcanzado fue de 1,452 [g/L]. Por otro lado, la fermentación que muestra la mayor concentración residual de azúcares es la solución sin tratamiento de ultrasonido, pero con DH 15%, cuyo valor fue de 1,58 [g/L].

- Determinación de °Alcohólico final

Para determinar el rendimiento de la reacción, y de si todo el azúcar del mosto fue convertido a etanol, se calcularon los valores de etanol potencial o estequiométrico a partir de los °Brix del mosto. Para 22,3 °Brix (valor inicial del mosto) corresponde a una concentración de 218,2 [g/L]. Con esto se hizo la conversión a moles, se calculó la cantidad de moles de etanol potencial para luego calcular el °Alcohólico estequiométrico.

Dentro de los supuestos para este cálculo, se considera que no existe etanol ni dióxido de carbono en el mosto antes de la fermentación, y que todos los azúcares disueltos corresponden a glucosa, además del supuesto de que la reacción tiene un rendimiento de 100%.

La reacción química para la conversión de glucosa a etanol y CO_2 en la fermentación y los cálculos realizados se especifican a continuación en la Tabla 4.1:

Tabla 4.1: Reacción de fermentación alcohólica y cálculo de moles consumidos y producidos considerando 100% de rendimiento

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2 \quad (17)$$

n_i	1,211	0	0
$n_{r/p}$	1,211	2,422	2,422
n_f	0	2,422	2,422

Los moles de etanol corresponden a 2,422 moles por litro, que a su vez corresponden a 111,6 gramos por litro. Esta concentración es equivalente a 141,4 [ml] de etanol por litro de vino, y de acuerdo al concepto de graduación alcohólica (% v/v de etanol en el vino), el grado alcohólico estequiométrico es de 14,14°.

A continuación en la Figura 4.15, se grafican tanto los resultados obtenidos experimentalmente como el resultado teórico, que corresponde al °Alcohólico estequiométrico:

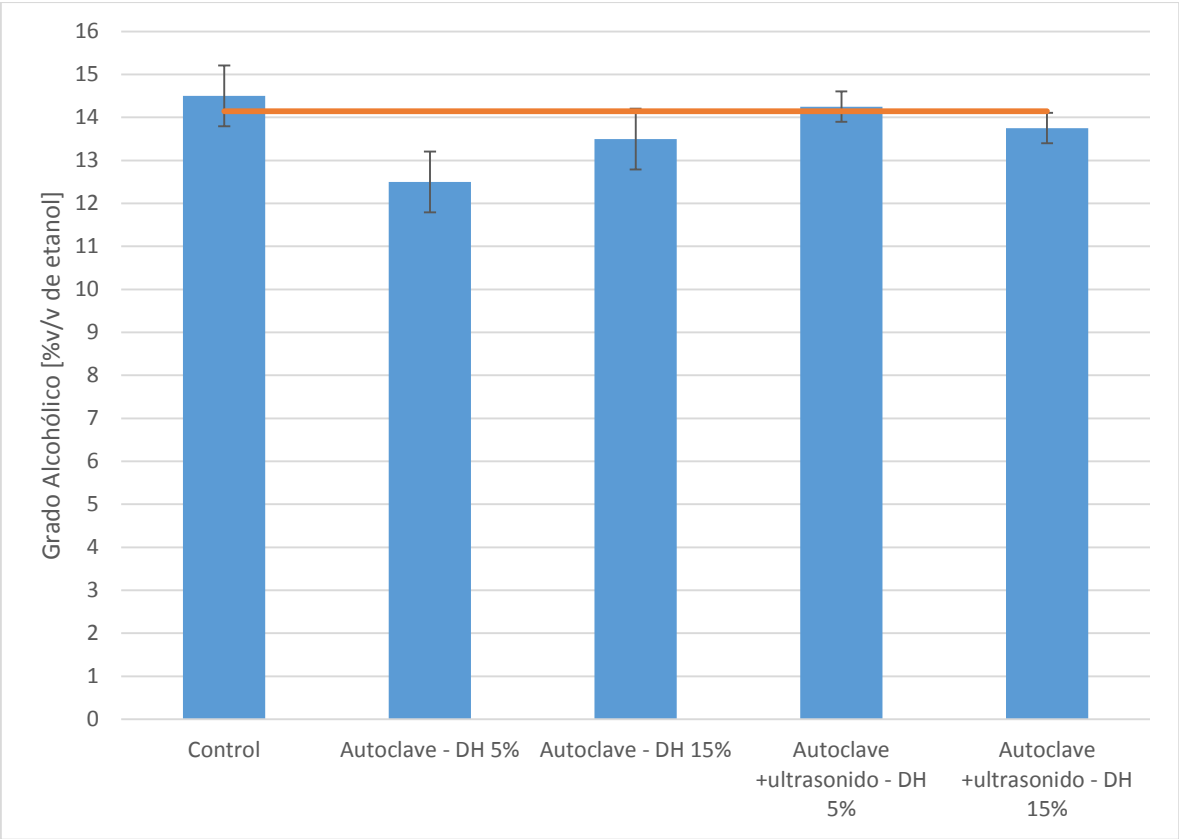

Figura 4.15: °Alcohólico día 7 en comparación al °Alcohólico estequiométrico. T =28[°C]; Agitación = 120[rpm]

En este caso, se observa que el valor más alto de graduación alcohólica fue para la fermentación control con DAP, mientras que el valor más bajo fue para la fermentación con hidrolizado sin tratamiento de ultrasonido, y con DH 5%. °Alcohólico medido en las fermentaciones control y autoclave + ultrasonido con DH 5% es superior al estequiométrico.

En la Tabla 4.2 se muestra el rendimiento de cada fermentación de acuerdo a la diferencia entre los 14,14° que debiesen registrarse, y el valor real medido.

Tabla 4.2: Comparación entre °Alcohólico medido y °Alcohólico estequiómetrico: Rendimiento de la reacción

Fermentación	***°Alcohólico medido***	***°Alcohólico estequiométrico***	***% Rendimiento***
Control	14,5 ± 0,7071	14,14	102,5
Autoclavado - DH 5%	12,5 ± 0,7071	14,14	88,4
Autoclavado - DH 15%	13,5 ± 0,7071	14,14	95,4
Autoclavado+ultrasonido - DH 5%	14,25 ± 0,3536	14,14	100,8
Autoclavado+ultrasonido - DH 15%	13,75 ± 0,3536	14,14	97,2

- Análisis de diferencias significativas

Para analizar si es que los resultados de concentración de azúcares reductores residuales y °Alcohólico poseen diferencias significativas entre los distintos experimentos, se realiza la prueba t de dos muestras, según se muestra en la Ecuación (18):

$$t_0 = \frac{\overline{y_1} - \overline{y_2}}{S_p\sqrt{\frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}}} \tag{18}$$

Donde y_1 e y_2 son los promedios de los experimentos, n_1 y n_2 son los tamaños de las muestras y S_p es una estimación de la varianza común calculada a partir de:

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \tag{19}$$

S_1^2 y S_2^2 son las varianzas muestrales individuales. Para determinar si la hipótesis $H_{0:}$ $\mu_1=\mu_2$ se compara t_0 con la distribución t con $n_1 + n_2 – 2$ grados de libertad.

Si $|t_0| > t_{\alpha/2,n1+n2-2}$, entonces se rechaza H_0 y se concluye que los promedios de las muestras son significativamente distintos. Si $|t_0| < t_{\alpha/2,n1+n2-2}$, entonces se no rechaza H_0 y se concluye que los promedios de las muestras no presentan diferencias significativas.

Los promedios de las concentraciones de azúcares reductores residuales se muestran en la Tabla 4.3, junto a las desviaciones estándar respectivas:

Tabla 4.3: Promedios de concentración de azúcares reductores residuales para cada experimento

Experimento	***Promedio***	***Desviación estándar***
Control	1,481	0,10758
Autoclave - DH 5%	1,523	0,03055
Autoclave - DH 15%	1,577	0,02789
Autoclave +ultrasonido - DH 5%	1,508	0,14477
Autoclave +ultrasonido - DH 15%	1,452	0,04383

Luego, con estos datos se realiza la prueba t. Los grados de libertad para todos los experimentos es de 1, y el valor de t extraído desde la tabla de distribución corresponde a 4,303, con un 95% de confianza y grados de libertad igual a dos (considerando ambos experimentos). Los resultados se resumen en la Tabla 4.4:

Tabla 4.4: Resultados prueba t entre dos muestras para azúcares reductores residuales

Comparación entre experimentos	t_0	***t de tabla***	***Resultado***
Control / Autoclave - DH 5%	0,523	4,303	No significativo
Control / Autoclave - DH 15%	1,219	4,303	No significativo
Control / Autoclave+ultrasonido - DH 5%	0,206	4,303	No significativo
Control / Autoclave+ultrasonido - DH 15%	0,366	4,303	No significativo

Se realiza el mismo análisis para el °Alcohólico medido. Los promedios y desviaciones estándar se muestran en la Tabla 4.5:

Tabla 4.5: Promedios de °Alcohólico final para cada experimento

Experimento	***Promedio***	***Desviación estándar***
Control	14,5	0,7071
Autoclave - DH 5%	12,5	0,7071
Autoclave - DH 15%	13,5	0,7071
Autoclave +ultrasonido - DH 5%	14,25	0,3535
Autoclave +ultrasonido - DH 15%	13,75	0,3535

Nuevamente, los grados de libertad de cada experimento es 1 y el valor t se calcula según un 95% de confianza y grado de libertad igual a 2. El valor obtenido es de 4,303, y los resultados se encuentran en la Tabla 4.6:

Tabla 4.6: Resultados prueba t entre dos muestras para °Alcohólico final

Comparación entre experimentos	***t_0***	***t de tabla***	***Resultado***
Control / Autoclave - DH 5%	2,828	4,303	No significativo
Control / Autoclave - DH 15%	1,414	4,303	No significativo
Control / Autoclave+ultrasonido - DH 5%	0,447	4,303	No significativo
Control / Autoclave+ultrasonido - DH 15%	1,342	4,303	No significativo

No se encontraron diferencias significativas entre el experimento control y los experimentos con que utilizaron el hidrolizado enzimático de proteínas de levadura como fuente de nitrógeno, tanto en la concentración de azúcares reductores residuales como para el °Alcohólico registrado el día 7 de la fermentación. Sin embargo, estos valores corresponden a la medición del último día del experimento, por lo que no significa que durante la fermentación no existan diferencias en la dinámica del proceso, particularmente respecto a la velocidad de asimilación del nutriente.

4.4 Hidrólisis enzimática de la borra de fermentaciones

Se realizó también la hidrólisis enzimática de la borra recuperada desde las fermentaciones, para establecer si es posible o no llevar a cabo este proceso. La curva de hidrólisis se muestra en la Figura 4.16.

En este experimento no se conoce la concentración real de levaduras en la solución a hidrolizar, pero que para este caso no es relevante ya que solo se busca establecer la factibilidad de la hidrólisis enzimática de proteínas sobre la borra del vino. Por esta misma razón, no es posible especificar el grado de hidrólisis alcanzado, ya que se desconoce la cantidad de enlaces peptídicos totales.

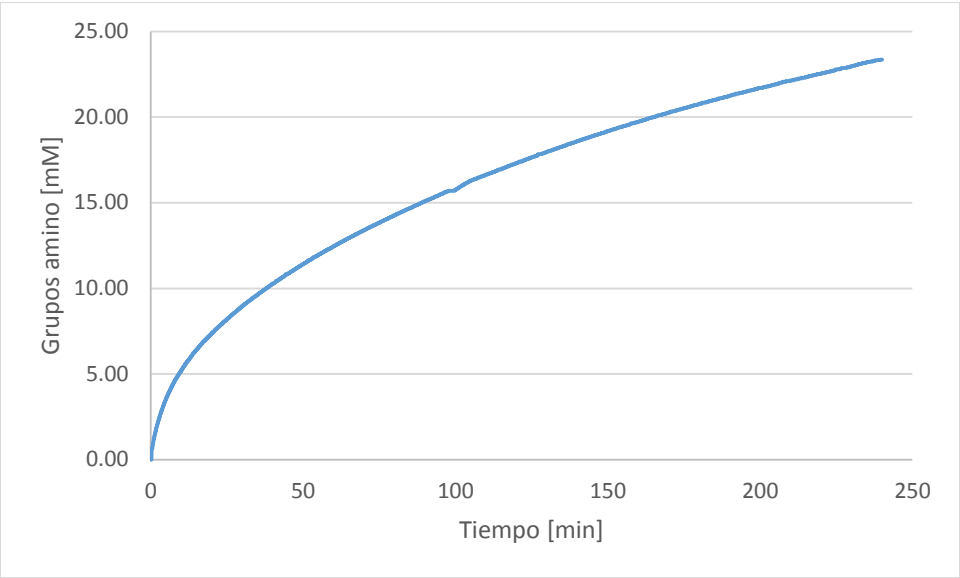

Figura 4.16: Hidrólisis enzimática de proteínas de borra de vino recuperada desde las fermentaciones realizadas. T = 50[°C]; 40[g] de solución; 50% p/p de borra; pH=8; 6,75 [mAU/g] de enzima.

Con esto es posible afirmar que es posible llevar a cabo la hidrólisis enzimática con la borra del vino, donde la formación de producto al cabo de 4 horas fue de aproximadamente 24 [mM]. Sin embargo, dado que la borra contiene sales de tartrato, trazas de vino y sus componentes y ácido tartárico, fue necesario aplicar un gran volumen de NaOH para alcanzar el pH 8 y así comenzar la hidrólisis. Por otro lado, al retirar el producto final se observó una coloración café oscura, además se percibió un olor desagradable. Se presume que esto puede deberse a los numerosos componentes ya mencionados y a la descomposición de las levaduras ya muertas, en conjunto con la aplicación de temperaturas superiores a la del ambiente.

Capítulo 5

Conclusiones y Proyecciones

5 Conclusiones y Proyecciones

Se estableció que el pretratamiento de autoclave y ultrasonido si tienen un efecto sobre la hidrólisis enzimática de proteínas de levadura, ya que permite la liberación de las proteínas contenidas dentro de la matriz celular. Esto hace que haya una mayor disponibilidad de proteínas para ser hidrolizadas por la enzima, y por lo tanto aumentar la eficiencia de la hidrólisis enzimática.

Se pudo determinar que es posible utilizar el hidrolizado enzimático de levaduras como fuente de nitrógeno en la fermentación del vino, demostrando que este producto posee la formulación necesaria para llevar a cabo la fermentación, sin diferencias significativas respecto al control con una fuente de nitrógeno inorgánica. Sin embargo, se pudo apreciar que la fermentación que usó DAP como fuente de nitrógeno fue más rápida que las fermentaciones con hidrolizado. No se observaron diferencias significativas entre la fermentación con DAP y las fermentaciones que usaron el hidrolizado como fuente de nitrógeno en los resultados de °Alcohólico y azúcares reductores residuales al día 7 de fermentación.

Se recomienda estudiar más a fondo la cinética de liberación de proteínas con ultrasonido, y así establecer las condiciones de operación óptimas para lograr la liberación máxima de proteínas al medio, para poder prescindir de otros métodos de inactivación total de las células, como fue el caso de la esterilización para este trabajo.

Por otro lado, se incita a realizar estudios asociados a la calidad del vino según el uso de estas fuentes de nitrógeno, para así establecer si es que es posible obtener un producto con mejores características aromáticas y de sabor al aplicar el hidrolizado de levaduras como fuente de nitrógeno.

Otro punto importante es la factibilidad de producir un hidrolizado proteico de levaduras desde la borra del vino, lo cual permite sentar las bases para poder reutilizar este subproducto dentro del mismo proceso del vino, lo cual va en pos de una tecnología con menos residuos y costos, así como en la posibilidad de elaborar un vino de mejor calidad

gracias al carácter orgánico del hidrolizado. Sin embargo, es necesario considerar una forma de inactivación de las levaduras, para que así no intervengan en el proceso de inoculación del mosto.

Finalmente, se recomienda utilizar otros pretratamientos y condiciones de hidrólisis enzimática de proteínas de levadura para ser usada como fuente de nitrógeno, y el estudio de sus efectos en otros parámetros, como por ejemplo acidez, ácidos volátiles, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, entre otros. Asimismo, resultaría interesante levantar información respecto a la elaboración de vino con la misma levadura extraída de la borra, y los efectos que esto pudiese tener en las propiedades organolépticas del producto final.

Capítulo 6

Referencias

6 Referencias

[1] S. Almonacid, R. Simpson, A. Teixeira, Rethinking Food Waste Management and Utilization, Food Technology. 160 (2009) 63.

[2] ODEPA, Estadísticas productivas ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias) - Ministerio de Agricultura de Chile, Http://www.odepa.cl/estadisticas/productivas/. Visitado El 1/08/2016. (2016).

[3] E. Young, J. Ph, M. Kyoung, Y.H.P. D, J. Hwan, K. Ph, et al., Yeast hydrolysate can reduce body weight and abdominal fat accumulation in obese adults, Nutrition. 30 (2014) 25–32.

[4] H.G. Kristinsson, B.A. Rasco, R.G.M. Pigott, S. Resources, Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties, Food Science and Nutrition. 40 (2000) 43–81.

[5] C. Barbosa, A. Mendes-faia, A. Mendes-ferreira, The nitrogen source impacts major volatile compounds released by Saccharomyces cerevisiae during alcoholic fermentation, International Journal of Food Microbiology. 160 (2012) 87–93.

[6] D. Torrea, C. Varela, M. Ugliano, C. Ancin-azpilicueta, I.L. Francis, P.A. Henschke, Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with Saccharomyces cerevisiae yeast, Food Chemistry. 127 (2011) 1072–1083.

[7] S. Bell, P.A. Henschke, Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine, Australian Journal of Grape and Wine Research. 11 (2005) 242–295.

[8] E.V.A. Albers, C. Larsson, G. Lide, S.- Niklasson, ClaesGo, Influence of the Nitrogen Source on Saccharomyces cerevisiae Anaerobic Growth and Product Formation, Applied and Enviromental Microbiology. 62 (1996) 3187–3195.

[9] Banco Central de Chile, PIB nominal por actividad a precios corrientes, (2015).

[10] C. Furche, ODEPA, Análisis macrosectorial, (2015) 1–5.

[11] European Enviromental Agency, What are the sources of food waste in Europe, Http://www.eea.europa.eu/media/infographics/wasting-Food-1/view. Visitado El 13/07/2016. (2015).

[12] Food and Agriculture Organization (FAO), Food wastage footprint: Impacts on natural resources, 2013.

[13] ODEPA, Vides superficie y producción, (2014).

[14] Observatorio Español del Mercado del Vino, Principales exportadores de vino, (2014).

[15] ODEPA, El sector vitivinícola nacional: una visualización de la situación mundial ,

la estructura productiva y la evolución de las exportaciones., 2015.

[16] Ministerio de Agricultura, Ley 18.455: Fija normas sobre producción, elaboración y comercialización de alcoholes etílicos, bebidas alcohólicas y vinagres, (2009).

[17] Proceso de elaboración del vino de Rioja., http://santalba.blogspot.cl/2013/01/proceso-de-Elaboracion-Del-Vino-De.html, Visitado El 13/07/2016. (2013).

[18] B. Pérez-bibbins, A. Torrado-agrasar, J.M. Salgado, R.P. De Souza, J.M. Domínguez, Potential of lees from wine , beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients : An overview, Waste Management. 40 (2015) 72–81.

[19] Ministerio de Agricultura, Decreto n° 78 de la Ley 18.455, (1986) 5.

[20] K.R. Corbin, Y.S.Y. Hsieh, N.S. Betts, C.S. Byrt, M. Henderson, J. Stork, et al., Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol : Chemical composition , pre-treatment and saccharification, Bioresource Technology. 193 (2015) 76–83.

[21] A.B. Moldes, F. Dı, M. Va, Negative effect of discharging vinification lees on soils, Bioresource Technology. 99 (2008) 5991–5996.

[22] M.A. Bustamante, R. Moral, C. Paredes, A. Pe, M.D. Pe, Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry, Waste Management. 28 (2008) 372–380.

[23] C.A. Batt, M.-L. Tortorello, Encyclopedia of Food Microbiology, Second Edi, Elsevier, 2014.

[24] P. Morales, R. Gonzalez, A. Mas, G. Beltran, R. Martı, Biomass production and alcoholic fermentation performance of Saccharomyces cerevisiae as a function of nitrogen source, Federation of European Microbiological Society. 1 (2012) 477–485.

[25] H. Tanguler, H. Erten, Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature, Food and Bioproducts Processing. 86 (2008) 317–321.

[26] D. Liu, L. Ding, J. Sun, N. Boussetta, E. Vorobiev, Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds — A review, Innovative Food Science and Emerging Technologies. 36 (2016) 181–192.

[27] J. Geciova, D. Bury, P. Jelen, Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review, International Dairy Journal. 12 (2002) 541–553.

[28] M.S. Doulah, C. Engineering, T. Poly-, Mechanism of Disintegration of Biological Cells in Ultrasonic Cavitation, Biotechnology and Bioengineering. XIX (1977) 649–660.

[29] D.K. Apar, B. Özbek, Protein Releasing Kinetics of Bakers Yeast Cells by Ultrasound, Chemical and Biochemical Quarterly. 22 (2008) 113–118.

[30] J. Francisco, G. Martín, L. Guillemet, C. Feng, D. Sun, Cell Viability and Proteins Release during Ultrasound-Assisted Yeast Lysis of Light Lees in Model Wine, Food

Chemistry. 141 (2013) 934–939.

[31] V.K. Pasupuleti, A.L. Demian, Protein Hydrolysates in Biotechnology, First Edit, Springer, 2010.

[32] ILSI Europe, Conceptos sobre los alimentos funcionales, 2002.

[33] A.L. Mccarthy, Y.C.O. Callaghan, N.M.O. Brien, Protein Hydrolysates from Agricultural Crops—Bioactivity and Potential for Functional Food Development, Agriculture. 3 (2013) 112–130.

[34] R. Benítez, A. Ibarz, J. Pagan, Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones, Química Biológica. 42 (2008) 227–237.

[35] Q. Wei, H. Zhimin, Enzymatic hydrolysis of protein: mechanism and kinetic model, Frontiers of Chemistry in China. 38 (2006) 308–314.

[36] P.M. Nielsen, D. Petersen, C. Dambmann, Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis, Food Chemistry and Toxicology. 66 (2001) 642–646.

[37] J. Adler-Nissen, Enzymic hydrolysis of food proteins, Elsevier Applied Science Publishers, New York, 1986.

[38] Sonics & Materials Inc., Ultrasonic processors for small volume applications 130, (n.d.).

[39] R.B. Boulton, V.L. Singleton, L.F. Bisson, R.E. Kunkee, Principles and Practices of Winemaking, 1st Editio, Chapman & Hall, New York, 1996.

Capítulo 7

Anexos

7 Anexos

7.1 Análisis de Lowry para cuantificación de concentración de proteínas

El método de Lowry es un método colorimétrico para la cuantificación de las proteínas presentes en la solución. A la muestra se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad del color proporcional a la concentración de ellas.

El método consta de dos etapas: primero, los iones Cu^{+2} en medio alcalino se unen a las proteínas formando complejos con los nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos poseen un color azul claro, y además provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo los residuos fenólicos de tirosina que participan en la segunda etapa de la reacción. Finalmente, la reducción en medio básico del reactivo Follin-Ciocalteau ocurre gracias a los residuos fenólicos (los cuales están presentes en la mayoría de las proteínas) y con el cobre como catalizador. El reactivo Follin está constituido principalmente por ácido fosfomolibdotúngstico, el cual tiene un color amarillo pero al ocurrir la reducción debido a la presencia de los grupos fenólicos, cambia a un color azul intenso.

La curva de calibración se construyó con albúmina (BSA) a distintas concentraciones, las cuales fueron 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 [mg/ml]. El procedimiento experimental se especifica a continuación:

1) Preparación de reactivos:

- Reactivo Lowry: Se preparó una solución (A) de 200 [ml] NaOH 0,1 [M], en donde se disolvieron 4 [g] de Carbonato de sodio (Na_2CO_3). Por otro lado, se preparó la solución B, la cual corresponde a sulfato de cobre (II) pentahidratado ($CuSO_4*5H_2O$) al 1% en peso. Finalmente, se preparó la solución C, que es tartrato

sodio-potásico ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) al 2% en peso. El reactivo Lowry se compone de la mezcla de los reactivos A, B y C en proporción de 50:0,5:0,5 respectivamente.

- Reactivo Follin: Se utilizó el reactivo comercial de Follin-Ciocalteau diluido 4 veces.

2) Procedimiento experimental:

- Se toman 0,1 [ml] de muestra en un tubo eppendorf. Se le añade 1 [ml] del reactivo Lowry, se agita y se deja reposar en oscuridad durante 15 [min]
- Lugo se agrega 0,1 [ml] del reactivo Follin diluido a cada tubo eppendorf, donde se aprecia de inmediato la coloración azul en las muestras. Nuevamente, se agita y se almacena en oscuridad durante 30[min].
- Una vez terminado el tiempo, se trasvasija la solución a celdas para su lectura en el espectrofotómetro, a 580 [nm].

La curva de calibración de albúmina se muestra en la Figura 7.1.

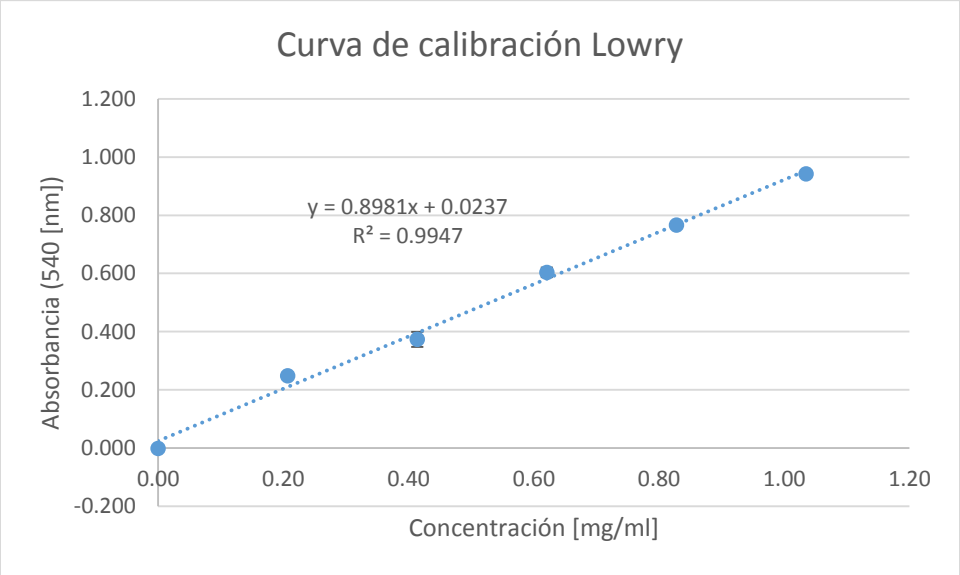

Figura 7.1: Curva de calibración de albúmina para método Lowry

7.2 Análisis de DNS para cuantificación de concentración de azúcares reductores

El método analiza la presencia de grupos carbonilos libres (C=O), los cuales se encuentran en los azúcares reductores. Al añadir los reactivos, ocurre la oxidación de este enlace, presente por ejemplo como aldehído en glucosa y como cetona en la fructosa. Simultáneamente, el compuesto ácido 3,5-dinitrosalicilico (DNS) se reduce a ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico bajo condiciones alcalinas, lo cual genera una coloración rojiza – café que es proporcional a la concentración de azúcares en la solución, lo que permite su análisis según colorimetría.

La curva de calibración se realizó con glucosa (Figura 7.2), cuyas concentraciones fueron 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 y 2,0 [g/L]. Las muestras deben diluirse de acuerdo a su concentración, tal que su absorbancia esté dentro de los rangos de la curva de calibración. Tanto la curva como las muestras fueron tratadas con el procedimiento que se detalla a continuación:

1) Preparación de reactivo DNS:
   - Disolver 8 [g] de NaOH en 200 [ml] de agua destilada. Se agita hasta que se disuelva completamente
   - Añadir 250 [g] de tartrato de sodio potasio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) paulatinamente, manteniendo la agitación de la solución y aumentar la temperatura (entre 30 y 40 [°C]). Añadir además agua de a poco hasta los 400 [ml] aproximadamente junto con el tartrato, y seguir agitando hasta su disolución.
   - Agregar 5 [g] de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) lentamente hasta su completa disolución. En este punto la solución toma un color naranja debido al color del DNS. Una vez disuelto, trasvasijar y enrasar hasta 500 [ml] con agua destilada.

2) Procedimiento experimental:

- Se añade 0,5 [ml] de muestra a tubos falcon de 15[ml], posteriormente añadir 0,5[ml] del reactivo DNS.
- Llevar los tubos a bañomaría a 95 [°C] durante 5 minutos
- Sacar los tubos del baño y enfriar en agua con hielo. Agregar 5 [ml] de agua destilada
- Trasvasijar la muestra a celdas de vidrio para su lectura a 540 [nm].

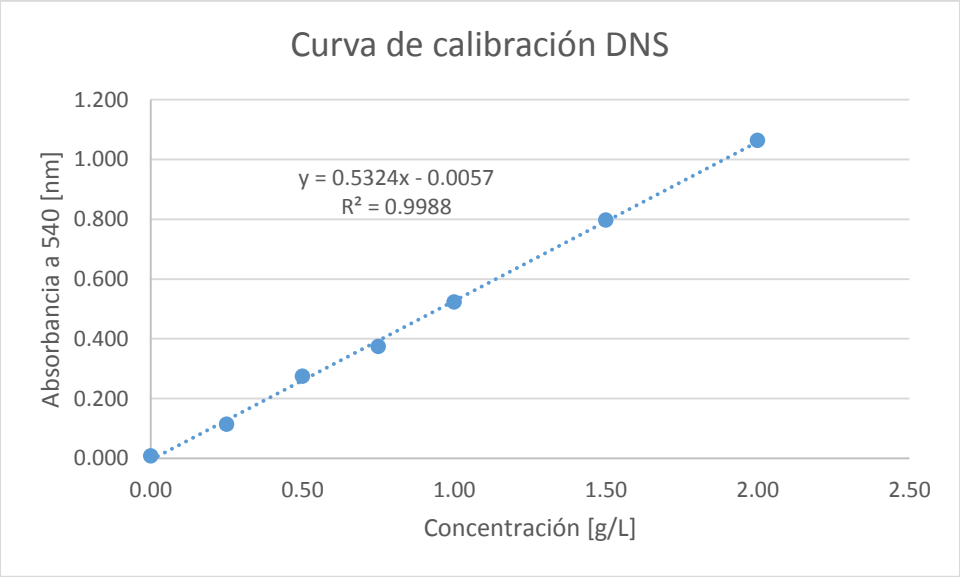

Figura 7.2: Curva de calibración de glucosa para método DNS

7.3 Resultados experimentales

7.3.1 Lisis celular

Para este experimento, se realizaron dos réplicas del experimento, y las muestras se leyeron en duplicado.

Tabla 7.1: Resultados experimentales para Lisis celular, réplica I

Muestras	***A1***	***A2***	***Dilución***	***Concentración [mg/ml]***	***Tiempo [min]***	***Error***
0,000	0,365	0,394	2	0,792	0	0,0143
1,000	0,5085	0,5163	2	1,088	27,5	0,0039
2,000	0,577	0,555	2	1,208	32,5	0,0113
3,000	0,603	0,587	2	1,272	37,5	0,0079
4,000	0,700	0,729	2	1,538	47,5	0,0149
5,000	0,714	0,746	2	1,573	57,5	0,01605
6,000	0,836	0,787	2	1,755	72,5	0,02455
7,000	0,777	0,819	2	1,725	87,5	0,02095
8,000	0,803	0,828	2	1,763	107,5	0,0123
9,000	0,804	0,822	2	1,758	127,5	0,00905

Tabla 7.2: Resultados experimentales para Lisis celular, réplica II

Muestras	***A1***	***A2***	***Dilución***	***Concentración [mg/ml]***	***Tiempo [min]***	***Error***
0,000	0,371	0,377	2	0,780	0	0,0027
1,000	0,5134	0,4819	2	1,055	27,5	0,01575
2,000	0,575	0,593	2	1,248	32,5	0,0092
3,000	0,642	0,643	2	1,378	37,5	0,00085
4,000	0,735	0,798	2	1,654	47,5	0,0312
5,000	0,764	0,780	2	1,666	57,5	0,00805
6,000	0,790	0,856	2	1,780	72,5	0,03305
7,000	0,822	0,794	2	1,746	87,5	0,0142
8,000	0,810	0,848	2	1,794	107,5	0,01895
9,000	0,802	0,868	2	1,807	127,5	0,033

7.3.2 Cinética de ultrasonido

Se realizaron dos experimentos, uno con tiempo de ciclo de 10% (1[s] operando, 9[s] en reposo) y de 80% (8[s] operando, 2[s] en reposo).

Tabla 7.3: Resultados experimentales para Cinética de ultrasonido, régimen 10%

Muestras	***A1***	***A2***	***Dilución***	***Concentración [mg/ml]***	***Tiempo [min]***	***Error***
0,000	0,343	0,378	25	9,375	0	0,0175
1,000	0,330	0,391	25	9,375	0,167	0,0305
2,000	0,343	0,362	25	9,153	0,5	0,0095
3,000	0,335	0,346	25	8,819	1	0,0055
4,000	0,326	0,363	25	8,930	2	0,0185
5,000	0,299	0,309	25	7,803	5	0,0050
6,000	0,310	0,264	25	7,329	10	0,0230
7,000	0,353	0,376	25	9,487	15	0,0115
8,000	0,323	0,359	25	8,833	22	0,0180
9,000	0,343	0,382	25	9,431	30	0,0195
10,000	0,401	0,403	25	10,531	40	0,0010
11,000	0,303	0,371	25	8,721	50	0,0340
12,000	0,430	0,396	25	10,837	60	0,0170
13,000	0,445	0,415	25	11,310	75	0,0150
14,000	0,374	0,390	25	9,974	90	0,0080

Tabla 7.4: Resultados experimentales para cinética de ultrasonido, régimen 80%

Muestras	***A1***	***A2***	***Dilución***	***Concentración [mg/ml]***	***Tiempo [min]***	***Error***
0,000	0,352	0,373	25	9,431	0	0,0105
1,000	0,323	0,321	25	8,304	0,167	0,001
2,000	0,337	0,360	25	9,041	0,5	0,0115
3,000	0,319	0,314	25	8,151	1	0,0025
4,000	0,329	0,300	25	8,095	2	0,0145
5,000	0,311	0,347	25	8,498	5	0,018
6,000	0,252	0,303	25	7,065	10	0,0255
7,000	0,353	0,390	25	9,682	15	0,0185
8,000	0,381	0,260	25	8,262	22	0,0605
9,000	0,413	0,380	25	10,377	30	0,0165
10,000	0,398	0,441	25	11,018	40	0,0215
11,000	0,236	0,331	25	7,232	50	0,0475
12,000	0,415	0,416	25	10,906	60	0,0005
13,000	0,466	0,458	25	12,201	**75**	0,004

14,000	0,469	0,490	25	12,688	90	0,0105

7.3.3 Fermentación: densidad

Tabla 7.5: Resultados experimentales para densidad de fermentaciones

Fermentación \ horas	***21***	***45***	***68***	***94***	***116,5***	***140***
C1	1,086	1,033	1,008	0,990	0,986	0,984
C2	1,083	1,034	1,009	0,991	0,987	0,984
F1	1,083	1,043	1,021	1,000	0,989	0,985
F2	1,085	1,043	1,020	1,000	0,989	0,984
F3	1,085	1,042	1,015	0,994	0,987	0,985
F4	1,084	1,040	1,016	0,995	0,988	0,985
F5	1,084	1,042	1,020	1,001	0,990	0,985
F6	1,083	1,042	1,020	0,998	0,989	0,984
F7	1,083	1,042	1,014	0,995	0,988	0,985
F8	1,086	1,043	1,016	0,996	0,989	0,985

7.3.4 Fermentación: Turbidez

Tabla 7.6: Resultados experimentales para turbidez de fermentaciones

Fermentación \ horas	***21***	***45***	***68***	***94***	***116,5***	***140***
C1	2740	6060	7800	7640	7240	7020
C2	2940	6020	6980	7340	7960	7020
F1	4160	6240	6920	7500	8720	7920
F2	4360	6580	7400	7720	7520	7820
F3	3640	6040	7320	7900	7040	7700
F4	3720	5900	7460	7740	7500	7520
F5	3700	6780	7180	8440	7780	7520
F6	3600	6600	7120	7800	8180	7580
F7	3700	6340	6940	7880	7720	7140
F8	3700	6580	7200	7940	8200	7900

7.3.5 Fermentación: °Brix

Tabla 7.7: Resultados experimentales para °Brix de fermentaciones

Fermentación \ horas	***21***	***45***	***68***	***94***	***116,5***	***140***
C1	20,5	13,7	10,2	7,4	7,4	7,1
C2	20,5	13,4	10,3	7,5	7,1	7,1
F1	20,4	15,8	12,3	8,9	7,4	6,9
F2	20,6	15,8	12,4	8,8	7,5	6,9
F3	20,6	15,4	11,5	8,2	7,2	7,4
F4	20,5	15,3	11,5	8,7	7,1	6,9
F5	20,5	15,7	12	9,2	7,8	7,5
F6	20,6	15,6	11,9	8,8	7,6	7,6
F7	20,2	15,2	11,4	8,4	7,6	7,1
F8	20,9	16,1	12,2	9,2	7,7	7,3

7.3.6 Fermentación: Azúcares reductores residuales

Para este experimento, se extrajo una muestra el último día de la fermentación, y se realizaron dos diluciones por cada una, las cuales fueron analizadas por el método de DNS.

Tabla 7.8: Resultados experimentales para azúcares reductores de fermentaciones mediante método DNS

Muestras	***A1***	***A2***	***Dilución***	***Concentración [g/L]***	***Error***
C1	0,394	0,424	2	1,558	0,015
C2	0,363	0,374	2	1,406	0,0055
F1	0,389	0,399	2	1,502	0,005
F2	0,406	0,405	2	1,545	0,0005
F3	0,404	0,414	2	1,558	0,005
F4	0,424	0,415	2	1,597	0,0045
F5	0,382	0,355	2	1,406	0,0135
F6	0,422	0,424	2	1,610	0,001
F7	0,382	0,396	2	1,483	0,007
F8	0,413	0,332	2	1,421	0,0405

7.3.7 Fermentación: ° Alcohólico final

Tabla 7.9: Resultados experimentales para °Alcohólico medido el último día de la fermentación (día 7)

Fermentación	***Hora 140***
C1	14
C2	15
F1	13
F2	12
F3	13
F4	14
F5	14,5
F6	14
F7	13,5
F8	14