

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAÍSO – CHILE



**“INOCULACIÓN SECUENCIA DE *PICHIA SP.* CON
SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y SU EFECTO EN LA
PRODUCCIÓN DE ETANOL Y COMPUESTOS VOLÁTILES”**

VALENTINA ALEJANDRA TORRES ORTIZ

MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
INGENIERO CIVIL QUÍMICO

PROFESOR GUÍA: DRA. ALEJANDRA URTUBIA

PROFESOR CORREFERENTE: DRA. WENDY FRANCO

julio de 2019, Valparaíso

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mis padres, quienes a pesar de todas las dificultades decidieron traerme al mundo amarme cuidarme y educarme. Esto no hubiera sido posible sin la constante presencia y amor de mis 4 abuelos, quienes han sido unos padres para mí.

En segundo lugar, quisiera agradecer a mi amada hermana Cata, tu ejemplo de esfuerzo, constancia y superación han sido mi inspiración y fuerza durante estos años.

Franco, sin tu amor y compañía de estos últimos años nada hubiera sido igual, haces que mis días estén llenos de luz y alegría.

A Alejandra Urtubia por compartir sus conocimientos conmigo y guiarme en este proceso

Finalmente, y no menos importante quisiera agradecer a mis ñañas, por transformarse en mi familia en valpo, mi hicieron sentir como en casa, en momentos en que lo único que quería era volver al sur

RESUMEN

En este trabajo se estudia una cepa particular del género *Pichia* sp., en monocultivo e inoculada secuencialmente con *Saccharomyces cerevisiae*, para evaluar su capacidad en la reducción de etanol y el efecto que posee en la composición volátil final del producto.

Para esto se realizan fermentaciones por lotes en ambas modalidades (monocultivo y secuencial) en iguales condiciones operacionales, es decir, a 25°C de temperatura, pH inicial de 3,55 y agitación de 100 RPM, en volúmenes de 500 ml, 2,5 l y 4 l. En el caso de las inoculaciones secuenciales se comienza la fermentación con *Pichia* sp., y luego de transcurridas 80 horas se procede a añadir *S. cerevisiae*, además se utilizan fermentaciones monocultivo de *S. cerevisiae* como control durante la experimentación.

Las fermentaciones son realizadas con mosto real del tipo Syrah, el cual es acondicionado previo a cada fermentación con el fin de que todas posean los mismos parámetros iniciales, además no se realizan ajuste de pH ni de nitrógeno disponible durante toda la fermentación.

Dentro de los principales resultados obtenidos destaca la capacidad de *Pichia* sp., para terminar la fermentación monocultivo logrando concentraciones finales de azúcar de 2,66 g/L y su alta tolerancia al etanol, alcanzando una concentración final del 9,57%v/v ambos valores no poseen diferencias significativas con la fermentación de *S. cerevisiae* realizada de forma paralela. La mayor diferencia radica en el tiempo de fermentación en donde *Pichia* sp., tarda 40 horas más que *S. cerevisiae*. Por otra parte, en las fermentaciones secuenciales tardaron 100 horas más en terminar el proceso fermentativo, pero de igual forma lograron concentraciones de azúcares finales inferiores a 5 g/L y etanol cercano a los 11,5%v/v en todos los volúmenes de control.

Finalmente, en las fermentaciones secuenciales de mayor volumen se obtienen 35 compuestos volátiles diferentes, en su mayoría ésteres, los cuales se asocian principalmente a aromas frutales, dulces y cerosos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	2
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	8
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	10
1.1 INTRODUCCIÓN	10
1.2 OBJETIVOS	11
1.2.1 Objetivo general.....	11
1.2.2 Objetivos específicos.....	11
CAPITULO 2. ANTECEDENTES GENERALES	12
2.1 INDUSTRIA VITIVINÍCOLA EN CHILE	12
2.2 POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO MUNDIAL.....	13
2.3 VINIFICACIÓN	15
2.4 VINO REDUCIDO EN ALCOHOL	22
2.5 USO DE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES	23
2.6 COMPUESTOS VOLÁTILES	27
CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 METODOLOGÍA GENERAL	29
3.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	30
3.2.1 Microorganismos	30
3.2.2 Medio de cultivo.....	32
3.2.3 Otros materiales y reactivos	32
3.2.4 Equipos.....	33
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	41

3.3.1	Acondicionamiento del mosto	42
3.3.2	Preparación de inóculo	42
3.3.3	Seguimiento de las fermentaciones.....	43
3.3.4	Medición de compuestos volátiles	43
3.3.5	Medición de compuestos por HPLC	44
3.3.6	Análisis estadístico	44
3.3.7	Cálculo de velocidad específica de crecimiento	44
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		46
4.1	FERMENTACIÓN MONOCULTIVO	46
4.1.1	Seguimiento de fermentación	46
4.1.2	Mediciones de HPLC	50
4.2	FERMENTACIÓN CON INOCULACIÓN SECUENCIAL	51
4.2.1	Seguimiento de la fermentación	51
4.2.2	Mediciones de HPLC	55
4.2.3	Mediciones de compuestos volátiles	58
4.3	FERMENTACIÓN DE ESCALAMIENTO.....	61
4.3.1	Seguimiento de fermentación	61
4.3.2	Mediciones de HPLC	65
4.3.3	Medición de compuestos volátiles	67
CAPITULO 5. CONCLUSIONES		72
CAPITULO 6. RECOMENDACIONES		74
CAPITULO 7. REFERENCIAS.....		75
CAPITULO 8. ANEXOS		80
8.1	TABLA DE PRINCIPALES COMPUESTOS AROMÁTICOS.....	80
8.2	PROTOCOLO GENERAL DE FERMENTACIÓN.....	81
8.2.1	Esterilización de materiales	82

8.2.2	Acondicionamiento del mosto	82
8.2.3	Preparación del inóculo	83
8.2.4	Preparación del fermentador y condiciones operacionales	84
8.2.5	Seguimiento de la fermentación	84
8.3	ANÁLISIS EXPERIMENTALES.....	85
8.3.1	Determinación de densidad	85
8.3.2	Determinación de sólidos solubles	85
8.3.3	Determinación de pH	86
8.3.4	Determinación de acidez total (con potenciómetro).....	86
8.3.5	Determinación de nitrógeno disponible (con potenciómetro).....	87
8.3.6	Determinación de turbidez.....	88
8.3.7	Determinación de células viables	88
8.4	VALORES DE T-STUDENT UTILIZADOS	89
8.5	RESULTADOS DE FERMENTACIONES.....	90
8.5.1	Fermentación monocultivo.....	90
8.5.2	Fermentación secuencial.....	91
8.6	CÁLCULOS DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO	91
8.6.1	Fermentación monocultivo.....	92
8.6.2	Fermentación secuencial.....	94
8.6.3	Fermentación de escalamiento.....	96
8.7	TABLA DE RELACIÓN DENSIDAD CON AZUCAR (G/L)	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Volúmenes de producción de vino en Chile. Fuente: Elaboración propia en base al informe publicado por la OIV en abril del 2019	12
--	----

Figura 2.2: Gráfico de exportaciones anuales de Chile. Fuente: Elaboración propia con información del servicio nacional de aduanas.	13
Figura 2.3: Exportaciones mundial del vino año 2018 en volumen. Fuente: Elaboración propia en base al informe publicado por la OIV en abril del 2019	14
Figura 2.4: Valores de exportación de vinos durante el 2018. Fuente: Elaboración propia en base al informe publicado por la OIV en abril del 2019	15
Figura 2.5 Diagrama de flujo del proceso de vinificación. Fuente: Elaboración propia a partir de Jackson, 2018	16
Figura 2.6: Síntesis de compuestos aromáticos a partir del metabolismo de <i>S. cerevisiae</i> . Fuente: (Zumárraga & Barbero, n.d.)	18
Figura 2.7: Curva típica de crecimiento de una población de microorganismos. Fuente: (Garay, 2015)	18
Figura 2.8: Curva característica del consumo de sustrato en fermentación alcohólica. Fuente: (Garay, 2015)	20
Figura 3.1: Esquema de metodología general.....	29
Figura 3.2: Fotografía en microscopio (100X) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Figura 3.3: Fotografía en microscopio (100X) de <i>Pichia kluyveri</i>	31
Figura 3.4: Imagen del equipo autoclave	33
Figura 3.5: Imagen de medidor de pH.....	34
Figura 3.6: Imagen del Refractómetro.....	34
Figura 3.7: Imagen de mini titulador de dióxido de sulfuro	35
Figura 3.8: Imagen del turbidímetro	36
Figura 3.9: Imagen de microscopio óptico.....	36
Figura 3.10: Imagen de potenciómetro.....	37
Figura 3.11: Imagen de Shaker	38
Figura 3.12: Imagen de matraz de fermentación.....	38
Figura 3.13: Imagen biorreactor	39
Figura 3.14: Imagen del cromatógrafo de gases	40
Figura 3.15: Imagen de cromatógrafo líquido de alta eficacia	40
Figura 4.1: Gráfico densidad en el tiempo de fermentaciones monocultivo con intervalos de confianza.	46

Figura 4.2: Sólidos solubles en el tiempo de fermentaciones monocultivo con intervalos de confianza	47
Figura 4.3: Gráfico en escala logarítmica de crecimiento celular durante las fermentaciones monocultivo, con las desviaciones estándar.	48
Figura 4.4: Gráfico de turbidez en el tiempo de fermentación monocultivo con intervalos de confianza.	49
Figura 4.5: Gráfico de densidad en el tiempo de fermentación secuencial con intervalos de confianza	52
Figura 4.6: Gráfico de sólidos solubles en el tiempo de fermentación secuencial con intervalos de confianza.....	52
Figura 4.7: Gráfico en escala logarítmica de crecimiento celular en el tiempo de fermentación secuencial con desviaciones estándar	53
Figura 4.8: Gráfico de turbidez en el tiempo de fermentación secuencial con intervalos de confianza	54
Figura 4.9: Gráfico de densidad y etanol en el tiempo de fermentación secuencial	55
Figura 4.10: Gráfico de densidad en el tiempo de fermentaciones de escalamiento con intervalos de confianza.....	62
Figura 4.11: Gráfico de sólidos solubles en el tiempo de fermentaciones de escalamiento	62
Figura 4.12: Gráfico de crecimiento celular en fermentación de escalamiento	63
Figura 4.13: Gráfico de turbidez en el tiempo de fermentación de escalamiento	64
Figura 4.14: Gráfico de densidad y etanol en el tiempo de fermentaciones de escalamiento	65
Figura 8.1: Gráfico de densidad en el tiempo de las 4 fermentaciones realizadas en F1	90
Figura 8.2: Gráfico de densidad en el tiempo de las 4 fermentaciones realizadas en F2	91
Figura 8.3: Obtención de velocidad específica de P1.1 en F1	92
Figura 8.4: Obtención de velocidad específica de P1.2 en F1	92
Figura 8.5: Obtención de velocidad específica de S.C 2.1 en F1.....	93
Figura 8.6: Obtención de velocidad específica de S.C 2.2 en F1.....	93
Figura 8.7: Obtención de velocidad específica de P1.1 en F2	94

Figura 8.8: Obtención de velocidad específica de P1.2 en F2	94
Figura 8.9: Obtención de velocidad específica de S.C 2.1 en F2.....	95
Figura 8.10: Obtención de velocidad específica de S.C 2.2 en F2.....	95
Figura 8.11: Obtención de velocidad específica de R2L en F3	96
Figura 8.12: Obtención de velocidad específica de R4L en F3	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Efectos en la fermentación a partir de modificaciones en las variables críticas	21
Tabla 2.2: Comparación de estudios previos sobre utilización de levaduras NS en vinos tintos.....	25
Tabla 3.1: Caracterización del medio a utilizar en fermentaciones	32
Tabla 3.2: Diseño de experimentos.....	41
Tabla 3.3: Parámetros operacionales constantes para todo el estudio.	42
Tabla 3.4: Parámetros ajustados en el medio de cultivo	42
Tabla 3.5: Resumen de seguimiento de fermentaciones	43
Tabla 4.1: Valores de velocidad específica experimental de fermentaciones monocultivo	49
Tabla 4.2: Datos de etanol, glicerol y azúcares totales en fermentaciones monocultivo	50
Tabla 4.3: Resultados de rendimiento de producto por sustrato consumido en fermentaciones monocultivo.....	51
Tabla 4.4: Velocidades específicas de crecimiento experimentales en fermentación secuencial	54
Tabla 4.5: Datos de etanol, glicerol y azúcares totales en fermentación secuencial.....	56
Tabla 4.6: Resultados de rendimiento de producto por sustrato en fermentación secuencial	57
Tabla 4.7: Compuestos volátiles comunes entre fermentación secuencial y fermentación de control.....	58
Tabla 4.8: Compuestos volátiles presentes en solo una de las fermentaciones realizadas durante la segunda etapa experimental	60

Tabla 4.9: Valores de velocidad específica experimental en fermentación de escalamiento	64
Tabla 4.10: Datos de etanol, glicerol y azúcares totales en fermentación de escalamiento	66
Tabla 4.11: Resultados de rendimiento de sustrato por producto en fermentación de escalamiento	67
Tabla 4.12: Compuestos volátiles comunes en fermentaciones secuenciales de fermentaciones secuenciales a distintos volúmenes realizadas en la etapas 2 y 3	68
Tabla 4.13: Compuestos volátiles comunes en sólo en las fermentaciones de la tercera etapa	70
Tabla 8.1: Principales compuestos aromáticos del vino. Fuente: Adaptado de (Swiegers, Bartowsky, Henschke, & Pretorius, 2005)	80
Tabla 8.2: Valores de t - student con diferentes grados de libertad	89
Tabla 8.3: Relación densidad con g/L de azúcar en mosto y grado alcohólico probable (GAP). Fuente: (Pszczółkowski & Ceppi de Lecco, 2011).....	97

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años ha aumentado el interés en Chile por mejorar la industria vitivinícola, ya que a pesar de ser el cuarto mayor exportador de vinos en el mundo el precio de este se encuentra por debajo de las grandes potencias como lo son Francia e Italia (OIV, 2019a). Por otra parte, se ha observado un aumento en las concentraciones de alcohol de los vinos lo cual se asocia al cambio climático que afecta a las distintas zonas productoras de uvas, este aumento de alcohol afecta al perfil sensorial del vino alterando la distribución y percepción de compuestos volátiles presentes (Longo et al., 2018).

En este sentido, una de las principales líneas investigativas se enfoca en el uso de levaduras nativas, del tipo no-*Saccharomyces* para el proceso de fermentación alcohólica ya que se ha descubierto su potencial en mejorar las calidades organolépticas del vino aumentando y diversificando los compuestos volátiles producidos e incluso se reporta una disminución en el grado alcohólico final obtenido (Benito, 2018).

El mosto de uva natural contiene varias especies de levaduras, principalmente de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hanseniospora*, *Metschnikowia* *Torulaspora*, entre otras. Estas levaduras son las encargadas de comenzar el proceso de fermentación alcohólica, pero son reemplazadas rápidamente por *Saccharomyces cerevisiae* la cual es ampliamente usada en la industria por su alta tolerancia al etanol, y rapidez de fermentación (Capozzi, Garofalo, Chiriatti, Grieco, & Spano, 2015).

Por todo lo mencionado anteriormente es que se hace el estudio del comportamiento de esta levadura nativa de la especie *Pichia sp.* la cual no posee estudios anteriores, en donde se realiza el seguimiento de fermentaciones monocultivos y de inoculación secuencial con *Saccharomyces cerevisiae*, con el fin de determinar las concentraciones finales tanto de etanol como la composición de compuestos volátiles presentes.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Estudiar el potencial fermentativo de la levadura *Pichia sp.* mediante monocultivos e inoculaciones secuenciales con *Saccharomyces cerevisiae* para determinar las diferencias existentes tanto en la producción de etanol como en la composición de compuestos volátiles.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la concentración de etanol producida en fermentaciones monocultivo de *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae* e inoculación secuencial con *Pichia sp.*-*Saccharomyces Cerevisiae*.
2. Comparar la composición volátil producida en fermentaciones monocultivo de *Saccharomyces cerevisiae* con fermentaciones de inoculación secuencial *Pichia sp* - *Saccharomyces cerevisiae*.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 INDUSTRIA VITIVINÍCOLA EN CHILE

La actividad vitivinícola comienza en Chile con la llegada de los conquistadores españoles, los primeros viñedos fueron plantados a principios del siglo XVI, las parras lograron una rápida adaptación en este país debido al clima “templado-cálido con régimen del tipo mediterráneo de lluvias” (Müller, 2004).

Históricamente la variedad de uva más plantada en Chile era la cepa País, pero con el paso del tiempo esto se fue diversificando. Actualmente, el viñedo se encuentra repartido en un 74% por cepas tintas y un 26% por las cepas blancas, en donde predominan las Cabernet Sauvignon, Merlot, Carmenere y Syrah para los tintos y Sauvignon Blanc, Chardonnay en el caso de los blancos. Existe un creciente interés en diseñar los viñedos en las mejores ubicaciones posibles para cada una de las variedades dependiendo de las necesidades de luz, agua, temperatura, calidad del suelo entre otros factores que son específicas para cada una de ellas. (Aprender de vino, 2019). La producción nacional de los últimos años se muestra en Figura 2.1, en donde se observa un crecimiento en la producción del 36% durante los últimos 2 años.

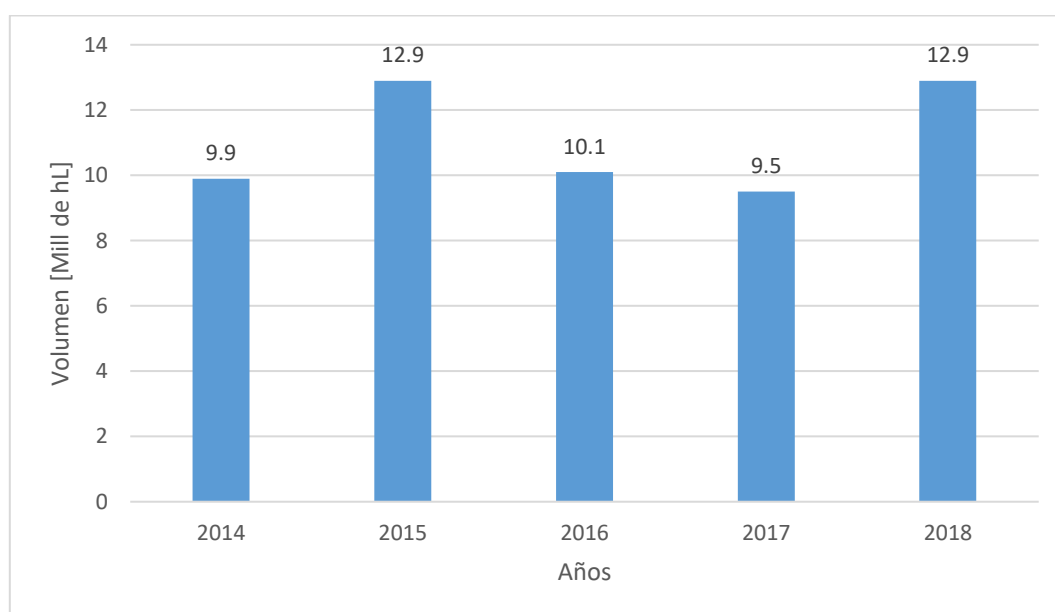


Figura 2.1: Volúmenes de producción de vino en Chile. Fuente: Elaboración propia en base al informe publicado por la OIV en abril del 2019

Las viñas con la mayor participación del mercado exterior son la viña Concha y Toro con un 33,3%, seguido por la viña San Pedro que posee un 13,4% del mercado, el otro gran grupo son las viñas pequeñas que en conjunto representan un 39,5% de las exportaciones (America retail, 2016).

2.2 POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO MUNDIAL

Chile es el principal país exportador de vino de América cuyos volúmenes han ido en un constante aumento durante los últimos 10 años, llegando a un 25% de crecimiento a pesar de la disminución existente durante el último año, sin embargo las ganancias asociadas a los mismos son variables, ya que presentan caídas en los precios durante los años 2011, 2014 y 2018 como se muestra en la Figura 2.2.

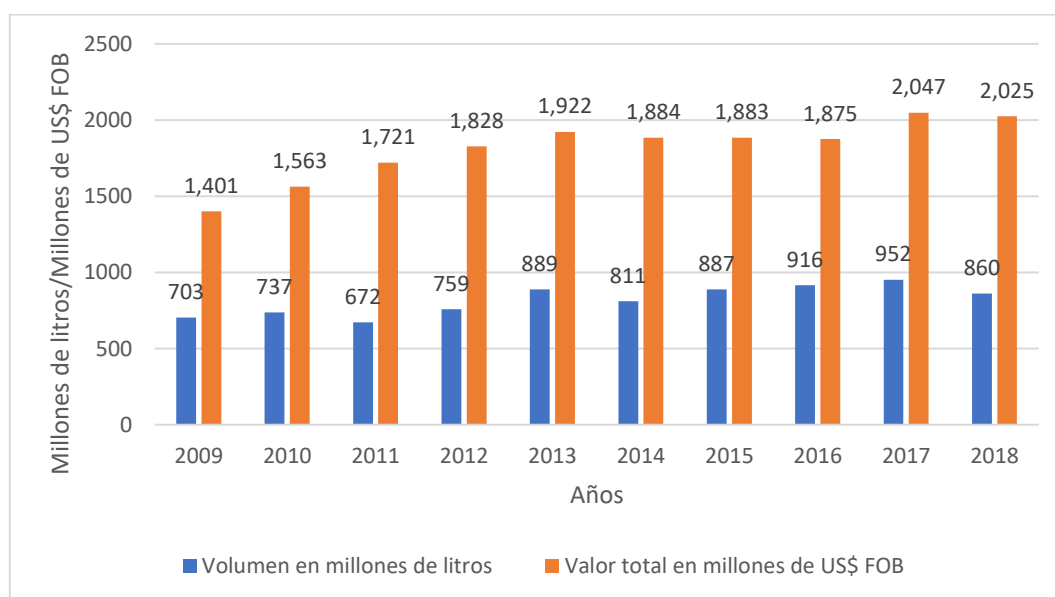


Figura 2.2: Gráfico de exportaciones anuales de Chile. Fuente: Elaboración propia con información del servicio nacional de aduanas.

Por otra parte, Chile posee el 10% del mercado mundial antecedido solo por países europeos con gran trayectoria vitivinícola como lo son Francia, España e Italia quienes poseen el 50,7% de participación como se observa en la Figura 2.3 (OIV, 2019a). El país cuenta con 141 mil hectáreas de viñas, la cual se encuentra concentrada principalmente en las regiones de O'Higgins y del Maule quienes poseen el 72% de la superficie nacional (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, 2019).

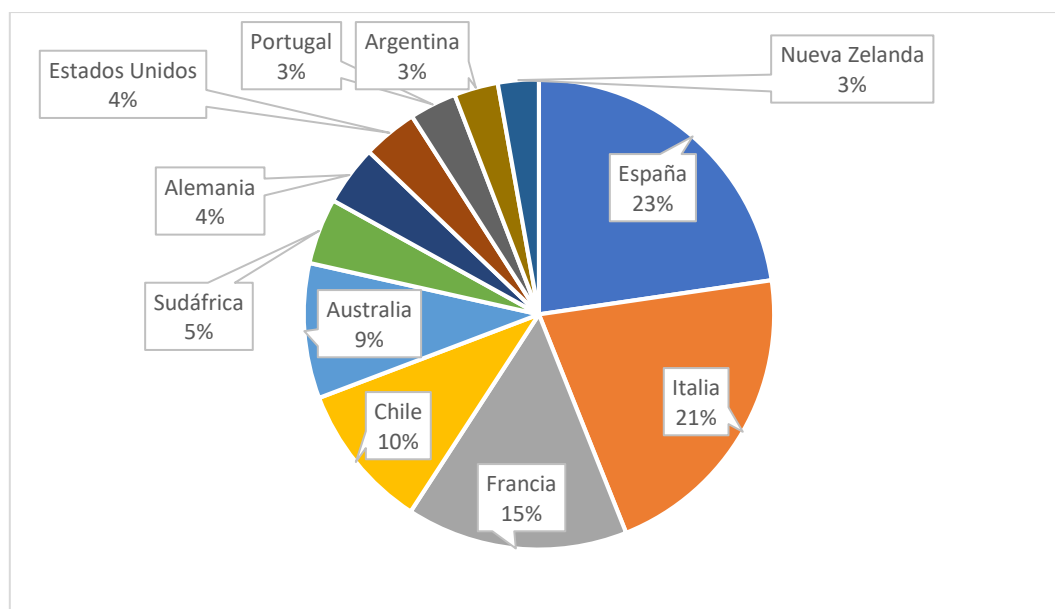


Figura 2.3: Exportaciones mundial del vino año 2018 en volumen. Fuente: Elaboración propia en base al informe publicado por la OIV en abril del 2019

El volumen de exportaciones durante el año 2018 llegó a 92,6 Mill. hL, en donde se destaca un aumento en Argentina (23,5%) y Australia (10,2%) con respecto al año 2017, Por otra parte, se presentó una reducción de los tres mayores exportadores de Europa: España (8,8 %), Italia (8,2 %) y Francia (5,2 %) (OIV, 2019a).

Si bien Chile muestra un alto posicionamiento en el mercado mundial el vino chileno presenta una gran diferencia en el precio de los productos ofrecidos, como se muestra en la Figura 2.4 Francia e Italia dominan el mercado con cuotas del 19,6% y 9,3% respectivamente. Existe un aumento en los valores de Francia (2,8%), Italia (3,3%) y España (1,9%), Alemania (2,6%) y Portugal (3,1%) respecto a los valores observados durante el año 2017, por otra parte los países como Chile, Estados Unidos, Argentina y Nueva Zelanda muestran valores que van a la baja durante el mismo periodo (OIV, 2019a).

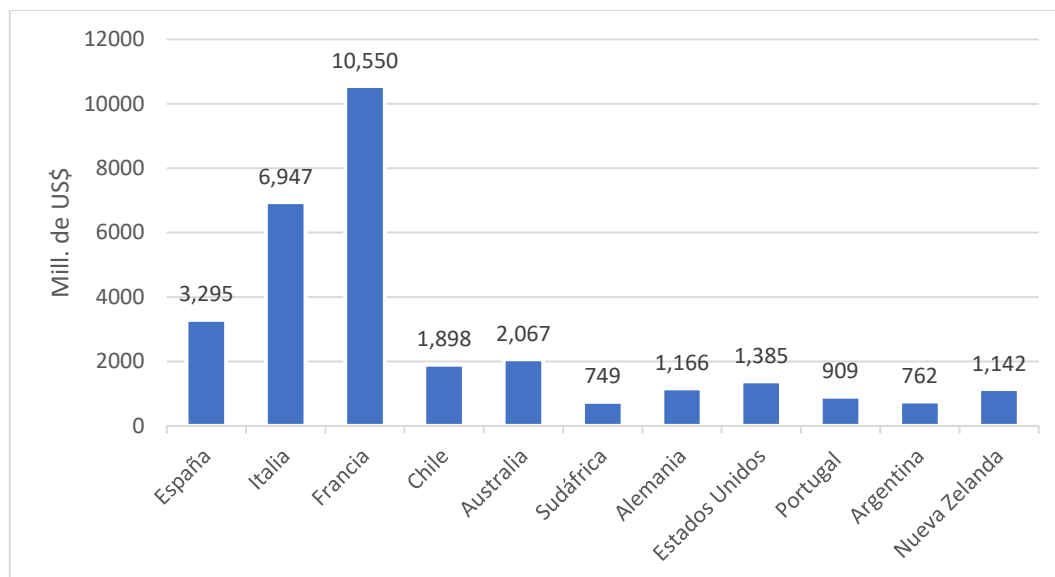


Figura 2.4: Valores de exportación de vinos durante el 2018. Fuente: Elaboración propia en base al informe publicado por la OIV en abril del 2019

Wines of Chile es una entidad gremial sin fines de lucro la representa a los productores vitivinícolas de Chile la cual posee más de 70 viñas asociadas en la actualidad. Ellos poseen como objetivo principal llegar al año 2025 con un aumento en el consumo y precio del vino en un 3,2% y 6% respectivamente, esto también alineado con la estrategia que consiste en llegar a un valor de los vinos chilenos por sobre los 60 dólares FOB, mediante un mayor posicionamiento de los vinos premium, diversos y sustentables producidos en Chile.

2.3 VINIFICACIÓN

El proceso de vinificación comienza cuando las uvas llegan a la bodega, los pasos que siguen en este proceso se detallan en la Figura 2.5. La primera etapa corresponde a la selección en donde se eliminan las hojas y tallos de los racimos de uva para luego pasar a la molienda y posteriormente a fermentación en el caso de los vinos tintos, durante este tiempo también se macera el vino ya que el alcohol generado por las levaduras mejora la extracción de antocianinas y la captación de taninos de las semillas y pieles (orujo) de las mismas. Luego se da lugar a la segunda fermentación conocida como la fermentación maloláctica en donde bacterias propias de la uva transforman el ácido málico en ácido láctico, reduciendo de esta forma la acidez y mejorando las características del sabor del vino (Jackson, 2008).

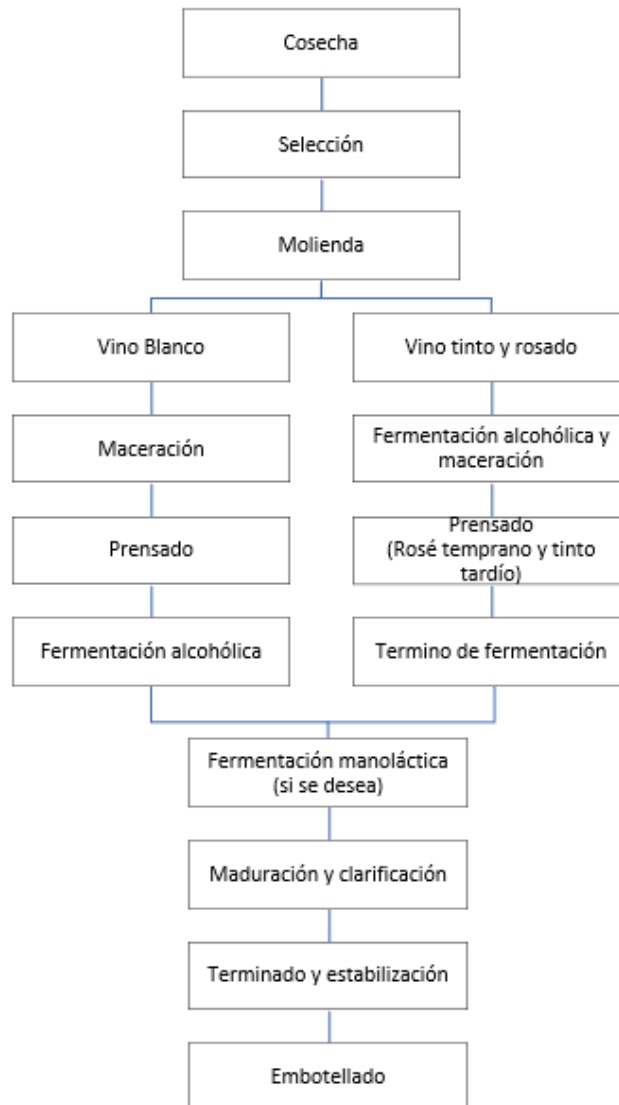


Figura 2.5 Diagrama de flujo del proceso de vinificación. Fuente: Elaboración propia a partir de Jackson, 2018

Dentro de los múltiples factores que afectan a la calidad del vino se encuentra por un parte el clima, suelo, la variedad de la uva, considerando que el manejo vitícolas y enológicos juega un rol primordial ya que se definen los sistemas de conducción, poda, manejo del suelo, riego, fertilización, entre otros. Por otra parte se encuentra lo relativo a la vinificación como son las maquinarias a usar, las practicas pre-fermentativas, manejo de la fermentación alcohólica y por último la conservación de los vinos en donde se define el tipo de vasija a utilizar, el tiempo de guarda, etc. (Pszczółkowski & Ceppi de Lecco, 2011).

La fermentación alcohólica es llevada a cabo por levaduras en un medio anaeróbico y corresponde al proceso de mayor complejidad dentro de la elaboración del vino ya que ocurre la degradación de los azúcares presentes en etanol que es el principal subproducto de la glucólisis (Jackson, 2008).

Durante los últimos 30 años la industria vitivinícola ha tratado de eliminar las fermentaciones espontáneas en donde distintas especies de levaduras llevan a cabo el proceso de fermentación, pero los efectos de estas son muy variables y difíciles de predecir, es por esto que se ha privilegiado tener fermentaciones controladas e iniciadas por inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* como principal levadura, ya que posee una alta capacidad de fermentación. En Francia el 70-80% de las fermentaciones se inician de esta forma. Existen más de 200 cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* disponibles de forma comercial con distintas propiedades fermentativas (Sablayrolles, 2009).

El mosto de uva se caracteriza por tener altas concentraciones de azúcares fermentables (entre 160 y 240 g/L) esto se encuentra repartido entre glucosa y fructosa en cantidades equivalentes. El metabolismo de los azúcares presentes en el mosto se muestra en la Figura 2.6 en donde se observan las rutas secundarias que utilizan intermediarios de la degradación de azúcares como el glicerol, acetaldehído, ácido acético, ácido succínico y compuestos volátiles como monoterpenos y los ésteres que contribuyen a los aromas frutales y florales o los compuestos no volátiles como los ácidos grasos y los alcoholes superiores que contribuyen al cuerpo y volumen del vino (Zumárraga & Barbero, n.d.).

- Fase de latencia: También conocida como fase lag, corresponde al primer periodo en donde el microorganismo se comienza a adaptar al nuevo medio y condiciones medioambientales del medio de cultivo seleccionado.
- Fase exponencial: Periodo en donde las células con mejor adaptación comienzan su reproducción (gemación en el caso de las levaduras) por lo que la población comienza a duplicarse en intervalos definidos de tiempo. Se dice que las células hijas son fisiológicamente iguales y el tiempo de generación es constante durante toda la etapa.
- Fase estacionaria: Es un periodo de equilibrio en donde se comienzan a acabar los nutrientes presentes en el medio por lo que el crecimiento disminuye, se considera que en esta etapa la tasa de reproducción celular se iguala a la tasa de muerte celular.
- Fase de muerte: Etapa en la cual los nutrientes disponibles son mínimos en el medio de cultivo por lo que la cantidad de células que mueren es mayor a número d células que se dividen.

Durante el proceso de fermentación se puede realizar un seguimiento y control del proceso viendo el comportamiento del sustrato en el tiempo, esto se puede medir de forma indirecta mediante refractometría o densidad. Además, se deben controlar parámetros como la temperatura, pH, entre otros (OIV, 2019b).

En general, la densidad de un mosto suele estar en 1100 kg/m³ y una fermentación alcohólica se dará por finalizada cuando la densidad alcance entre 990 y 993 kg/m³, y que este valor se mantenga constante durante dos días consecutivos como se muestra en la Figura 2.8, otra forma de determinarlo es medir el contenido de azúcares residuales el cual debe estar por debajo de 2 g/L (Pszczółkowski & Ceppi de Lecco, 2011).

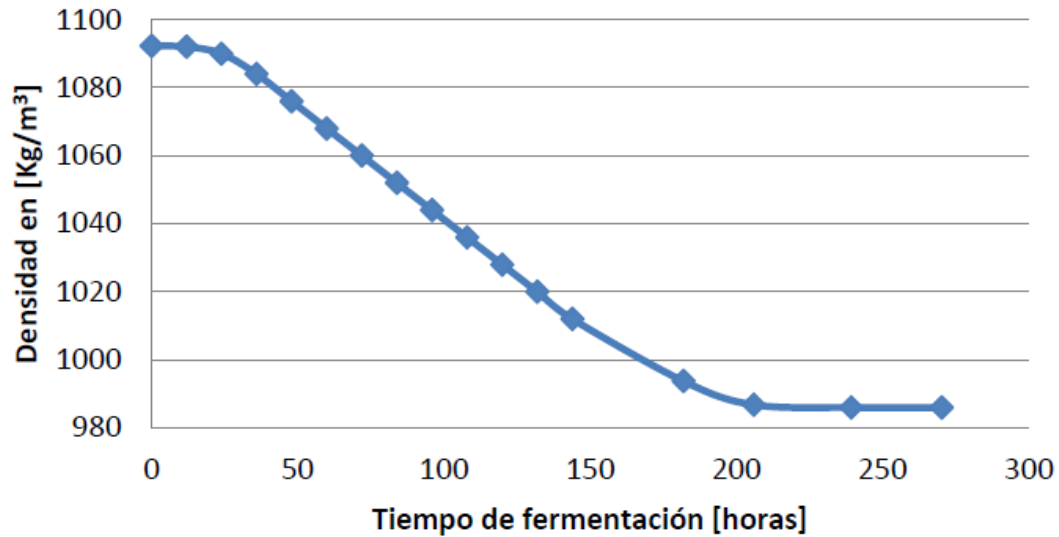


Figura 2.8: Curva característica del consumo de sustrato en fermentación alcohólica. Fuente: (Garay, 2015)

Al igual que en la curva de crecimiento microbiano, en esta curva que puede ser representada tanto en densidad, como °Brix o bien en g/L, se pueden identificar distintas etapas del consumo de sustrato, la primera corresponde a la etapa de latencia en donde no existe degradación de azúcares en el mosto por lo que la densidad se mantiene constante, luego viene la etapa de velocidad de cambio constante en donde el microorganismo está en crecimiento exponencial y finalmente, una etapa de reducción de la velocidad de cambio que se explicó anteriormente en la fase de muerte celular esto se debe al agotamiento de los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos, por lo que se mantiene constante el valor de la densidad (°Brix, o g/L) (Pszczółkowski & Ceppi de Lecco, 2011).

El comportamiento normal de las levaduras durante la fermentación alcohólica se puede ver afectado por distintos factores como la temperatura, azúcar inicial, nitrógeno disponible (YAN, por sus siglas en inglés), pH, entre otros. La principal de estas variables corresponde al control de temperatura, pero mantener dentro de los valores deseados no genera una mayor dificultad. En la Tabla 2.1 se muestran los principales efectos causados por la falta de control en alguna de estas variables, que en algunos de los casos pueden llevar a la pérdida de la producción.

Tabla 2.1: Efectos en la fermentación a partir de modificaciones en las variables críticas

Variable	Condición	Efecto	Referencia
Temperatura	Alta	Aumenta la producción de compuestos indeseables	(Sablayrolles, 2009)
	Baja	Aumenta el tiempo de fermentación y la probabilidad de una paralización de fermentación	(Sablayrolles, 2009)
Azúcar reductor	Alto	Aumenta la presión osmótica del mosto por lo que dificulta el inicio de la fermentación. Se puede paralizar debido a la alta concentración de etanol que se produce.	(Jackson, 2008)
pH	Bajo	Un pH menor a 3 permite la proliferación de otros microorganismos indeseados durante la fermentación. Cualquier cambio brusco puede inhibir a la levadura	(Jackson, 2008)
YAN	Bajo	Se reduce la velocidad de fermentación, además se aumenta la producción de compuestos sulfurados	(Coleman, Fish, & Block, 2007) (Jackson, 2008)
Competencia microbiana	Alta	Se produce una extensión de las etapas de latencia y de crecimiento exponencial. Se puede generar contaminación y pérdida del producto.	(Paterson, Venâncio, Lima, Guilloux-Bénatier, & Rousseaux, 2018)

2.4 VINO REDUCIDO EN ALCOHOL

En la actualidad se busca producir vinos que posean una menor graduación alcohólica, esto debido a que existe gran parte de la población que desea disminuir el consumo de alcohol, ya que están comprobados varios de los efectos nocivos que posee, incluso el alto de contenido de alcohol en algunos países puede estar sujeto a impuestos mayores (Longo et al., 2018).

Además, con el aumento de las temperaturas, debido al cambio climático conduce a que las uvas producidas posean una mayor concentración de azúcar lo cual implica que luego de la fermentación los vinos posean una mayor concentración de etanol, incluso superior al 15% (v/v) (Ruiz et al., 2018).

En resumen, existe la constante preocupación por autoridades de disminuir el consumo de alcohol en la población y por otro lado, está el cambio climático, lo cual ha producido grandes sequías constantes en terrenos, disminuyendo los recursos hídricos que poseen los viñedos, esto ha inducido a que las uvas presenten un aumento su concentración de azúcar con los años (Contreras, Curtin, & Varela, 2014).

En la actualidad existen vinos sin alcohol, los cuales son sometidos a procesos post o pre fermentativos para eliminar o reducir la concentración final de etanol. Entre las técnicas más antiguas se encuentran las que son realizadas previo a la fermentación alcohólica como diluir el mosto en agua, cosecha temprana de uvas o la mezcla de vinos (Pérez-Magariño et al., 2008). Además, los procesos de desalcoholización se describen a continuación los cuales se dividen en 2 grandes grupos.

El primero corresponde a los distintos tipos de destilación utilizados el primero es en columna con recuperación de aromas, este fue una de las primeras técnicas, permite tratar grandes volúmenes de vinos con altos rendimientos de extracción del etanol, pero el producto final se ve afectado debido en gran parte a la transferencia de calor directa existente, por otra parte está la destilación a bajas temperaturas y en vacío, permite la desalcoholización total o parcial y el sistema asegura una recuperación de las fracciones aromáticas (Corrales Bayón, 2016). En este grupo igual se incluye la columna de conos rotatorios, que posee buenos resultados para la disminución de 1 o 2° alcohólicos pero

al eliminar todo el etanol varían la composición aromática en un 10 % (Pérez-Magariño et al., 2008).

El segundo grupo de técnicas que permiten la reducción alcohólica es el uso de membranas de diferentes formas, mediante osmosis inversa que elimina el alcohol por una membrana semipermeable, ultrafiltración seguido de membrana de nanofiltración que permite disminuir la concentración de azúcar del mosto inicial (previo a la fermentación), estos métodos en general presentan el inconveniente que poseen un alto consumo energético y la pérdida de compuestos aromáticos junto con el etanol (Corrales Bayón, 2016), por último la pervaporación en donde se usan membranas no porosas para separación de compuestos líquidos miscibles que se utiliza en conjunto con la nanofiltración presenta problemas cuando la temperatura aumenta ya que favorece la pérdida de aromas y no se logra mantener las propiedades organolépticas del producto final (Sainz, Calvo, & Fernández, 2017).

Los dos procesos post fermentativos explicados implican un gasto considerable para las viñas, además que al añadir una etapa más al proceso productivo actual implica una modificación de las líneas productivas actuales.

Por todo lo mencionado anteriormente es que se genera el interés por producir vino reducido en alcohol y en este sentido es que se han realizado estudios donde se comprueba que la utilización de levaduras no-*Saccharomyces*, mediante fermentaciones con inoculación secuencial con *Saccharomyces cerevisiae*, disminuye la graduación alcohólica en distintas cepas de uvas.

Existen cepas que además han mostrado un aumento en la producción de metabolitos que influyen positivamente en el perfil analítico y sensorial de un vino, como lo son el glicerol y otros compuestos volátiles, y una acidez volátil reducida (Canonico, Comitini, & Ciani, 2018).

2.5 USO DE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES

Las levaduras existentes al comienzo de las fermentaciones de vino pueden ser divididas principalmente en dos grupos, las levaduras *Saccharomyces Cerevisiae* y las levaduras no-*Saccharomyces* (NS). En la actualidad existe una gran variedad de *S. cerevisiae*

comerciales las cuales han sido escogidas para el proceso de vinificación ya que son capaces de asegurar el consumo completo del azúcar presente en los mostos (Medina, Boido, Dellacassa, & Carrau, 2012). Algunas de las cepas de levaduras comerciales más comunes son la EC1118, Uvaferm BDX de Lallemant, RX-60 de Laffort, entre otras.

Sin embargo, las fermentaciones espontáneas es el método más antiguo y tradicional de fermentación en este proceso interactúan una gran variedad de levaduras nativas (*Saccharomyces* y NS) entregando vinos con perfiles de alta complejidad. No obstante, esto hace que el producto final sea impredecible y en muchos casos presente aromas no deseados, es por esto que el uso de *S. cerevisiae* se ha masificado en la industria vitivinícola (Escribano-Viana et al., 2018).

Actualmente, se sabe que el uso de NS poseen un rol importante en el impacto metabólico y complejidad del aroma en los productos finales. Es por esto que ha aumentado la demanda de nuevas y mejoradas levaduras vinificadoras que sean adaptables a distintos tipos de fermentaciones, y a su vez que puedan mejorar la composición química y las propiedades sensoriales del vino tinto (Chen et al., 2018).

Por otra parte, las preferencias de los consumidores han cambiado durante los últimos años aumentando el interés por disminuir el contenido de alcohol en los vinos (C. Varela et al., 2012). Se debe tener presente que el exceso de etanol en el vino posee un impacto negativo tanto en la percepción del sabor y olor del producto como en los costos, ya que existen mercados donde se aplican impuestos sobre las concentraciones de alcohol, además de tener efectos negativos para la salud (Ballester-Tomás, Prieto, Gil, Baeza, & Randez-Gil, 2017) .

Existe una gran variedad de estudios en donde se muestra el comportamiento de distintas especies de levaduras NS y su impacto en la concentración de etanol y/o en las propiedades sensoriales del vino. Algunas de las más estudiadas se presentan en la Tabla 2.2. En general estas levaduras no son capaces de completar la fermentación del vino por sí mismas, esto debe principalmente a que los productos finales habituales de la fermentación son tóxicos para los mismos microorganismo (Jackson, 2008), es por esto que se utilizan acompañadas de *Saccharomyces cerevisiae* la cual además de poseer una alta tolerancia al etanol, es capaz de fermentar incluso en presencia de oxígeno, la

forma de uso usual es de forma secuencial (se inocula primero la levadura NS y luego se inocula *S. cerevisiae*) o bien se puede inocular de forma simultánea ambas especies al mismo tiempo (co - inoculación) (J. Varela & Varela, 2019).

Tabla 2.2: Comparación de estudios previos sobre utilización de levaduras NS en vinos tintos

Cepa de levadura	Tipo de uva, escala y condiciones	Reducción en etanol	Impacto en composición química o atributos sensoriales	Referencia
<i>Candida sake</i>	Tempranillo Escala laboratorio	2,4 %v/v	Incrementa el sorbitol y alcoholes superiores, disminuye la producción de etil-esteres y glicerol. No hay reportes de análisis sensoriales.	(Ballester-Tomás et al., 2017)
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Pinotage Escala mediana	0,8 %v/v	Aumento de los descriptores sensoriales de 'avellana', 'café', 'caramelo', 'cereza' y 'acetona'	(Rossouw & Bauer, 2016)
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Tempranillo Escala laboratorio	1,2%	Reduce la intensidad y calidad aromática, y aumenta el carácter herbáceo	(Del Fresno et al., 2017)
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Sangiovese Escala industrial	0,7%	Incrementa los atributos sensoriales de acidez y condimentos.	(Gobbi et al., 2013)

<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Syrah Escala laboratorio	1,6% v/v	Aumenta la concentración de alcoholes mayores y disminuye el contenido de acidez volátil (no hay reportes sensoriales)	(Contreras, Hidalgo, et al., 2014)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Merlot Escala piloto	1,0% v/v	Disminución del atributo sensorial “tinte café” y aumento del “aroma de fruta roja”	(C. Varela, Barker, Tran, Borneman, & Curtin, 2017)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Riesling Escala piloto Aireación	3,8% v/v	Disminuye los atributos sensoriales de “pureza” y frutales, aumentan los de vinagre, oxidación y solventes.	(Röcker, Strub, Ebert, & Grossmann, 2016)
<i>Pichia guilliermodii</i>	Riesling Escala piloto Aireación	2,0% v/v	Disminuye los atributos sensoriales de “pureza” y frutales, aumentan los de vinagre y reducción.	(Röcker et al., 2016)
<i>Pichia kluyveri</i>	Syrah Escala laboratorio	No se presentan diferencias.	Incremento de compuestos como acetaldehído, acetato de 2-fenetilo y algunos otros ésteres frutales fuertes (no hay reportes sensoriales)	(Whitener et al., 2017)

<i>Pichia kluyveri</i>	Riesling Escala piloto aireación	3,0% v/v	Disminuye los atributos sensoriales de “pureza” y frutales, aumentan los de vinagre, oxidación y solventes.	(Röcker et al., 2016)
<i>Starmerella bacillaris</i>	Barbera Escala laboratorio	0,7% v/v	Aumenta el contenido de glicerol. (no hay reportes sensoriales ni de composición)	(Englezos et al., 2016)
<i>Starmerella bacillaris</i>	Barbera Escala piloto	0,5%v/v	Aumenta el contenido de glicerol. (no hay reportes sensoriales ni de composición)	(Englezos et al., 2016)

2.6 COMPUESTOS VOLÁTILES

El vino está compuesto principalmente de dos ingredientes que son el agua y etanol, sin embargo, el sabor del vino depende de 20 o más compuestos adicionales, estas diferencias sutiles son las que distinguen a un vino varietal de otro, entre más complejo el vino mayor será la cantidad de compuestos presentes (Jackson, 2008).

Como se explica en puntos anteriores el proceso de vinificación es complejo ya que implica interacciones entre microorganismo y el mosto de uva, en este sentido las levaduras fermentativas logran transformar un mosto de uva ácido y dulce en una bebida alcohólica de gran sabor. Si bien la ruta glucolítica central de las levaduras consiste en la conversión de azúcares a etanol y dióxido de carbono, existen otras asociadas que forman compuestos volátiles y no volátiles que contribuyen al sabor del vino. La especie de levadura, condiciones de fermentación y contenido de nutrientes del mosto son los factores que modulan la producción de estos compuestos y en consecuencia el perfil de sabor del vino (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Durante las últimas décadas, la investigación sobre el papel de la levadura en el desarrollo del sabor del vino ha revelado complejas interacciones entre este microbio y los compuestos de uva; Muchas de estas interacciones contribuyen a la apariencia, aroma, sabor y textura del vino. Las levaduras silvestres, aunque representan una mezcla indefinida de especies y cepas, producen perfiles de sabor, que no se pueden lograr fácilmente con otras técnicas (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Los principales compuestos volátiles producidos durante la fermentación anaerobia incluyen ésteres, alcoholes superiores, ácidos grasos volátiles, carbonilos y compuestos de azufre volátiles. En la Tabla 8.1 presente en el anexo 8.1 se muestran los principales descriptores de aromas, junto con la concentración habitual en el vino y los umbrales de aroma.

CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 METODOLOGÍA GENERAL

La metodología experimental utilizada para la investigación consistió en realizar micro vinificaciones a escala de laboratorio, bajo las mismas condiciones operacionales, es decir, 25 °C, 100 RPM en medio anaerobio y utilizando mosto real syrah, lo cual siguió la metodología que se describe en la Figura 3.1.

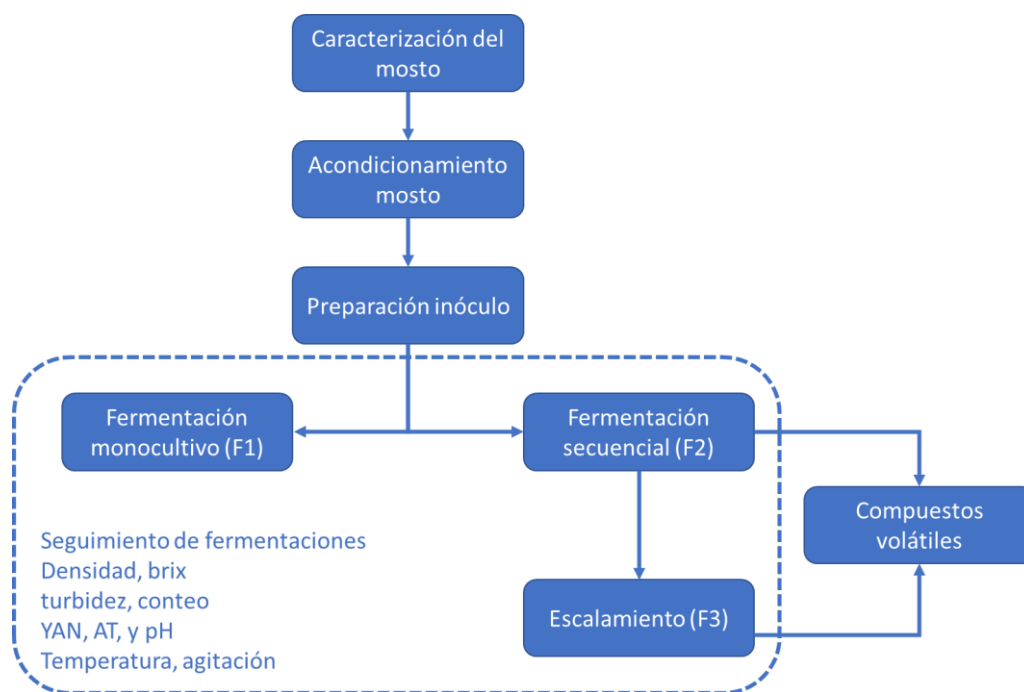


Figura 3.1: Esquema de metodología general

La primera etapa o F1 correspondió a las fermentaciones monocultivos realizadas en matraces de 500 mL, con el fin de apreciar el comportamiento de la *Pichia sp.* y e compararla con las fermentaciones de control realizadas de manera simultánea con *Saccharomyces cerevisiae*. Se realizaron fermentaciones en duplicado para ambos microorganismos.

En la segunda etapa o F2 se realizaron fermentaciones de inoculaciones secuenciales, es decir, se utiliza levadura nativa al comienzo y luego se inocula *S. cerevisiae* con el fin de finalizar la fermentación por completo. Estas se realizaron en matraces de 500 mL al mismo tiempo de las fermentaciones de control ambas en duplicado.

Finalmente, la tercera etapa o F3 consistió en un escalamiento del proceso de inoculación secuencial en donde se utilizaron biorreactores 2,5 L y 4 L con el fin de observar el comportamiento de los microorganismos y su replicabilidad al aumentar el volumen de control.

Para la reducción de etanol se realizaron mediciones por HPLC (high performance liquid chromatography) en el punto final de cada una de las fermentaciones y de esta forma poder comparar los valores obtenidos, además para el análisis composición de compuestos volátiles se realiza una medición cualitativa mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectro de masas, en donde se obtendrán los principales compuestos presentes en las fermentaciones secuenciales, es decir, F2 y F3.

3.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

3.2.1 Microorganismos

3.2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura utilizada es de la marca LAFFORT específicamente del tipo ACTIFLORE “BO213”, la cual viene en envases de 500 g sellados al vacío, son levaduras secas activas seleccionadas no modificadas genéticamente, luego de abrir el envase es almacenada sellada bajo refrigeración. Posee una humedad del 8% y más de $1,2 \times 10^{10}$ UFC/g, por recomendación del proveedor se recomienda una dosis de empleo de 20-30 g/hL, además posee una duración de 4 años. En la Figura 3.2 se observa una imagen de la levadura descrita con lente de 100X y tinte azul de metileno.

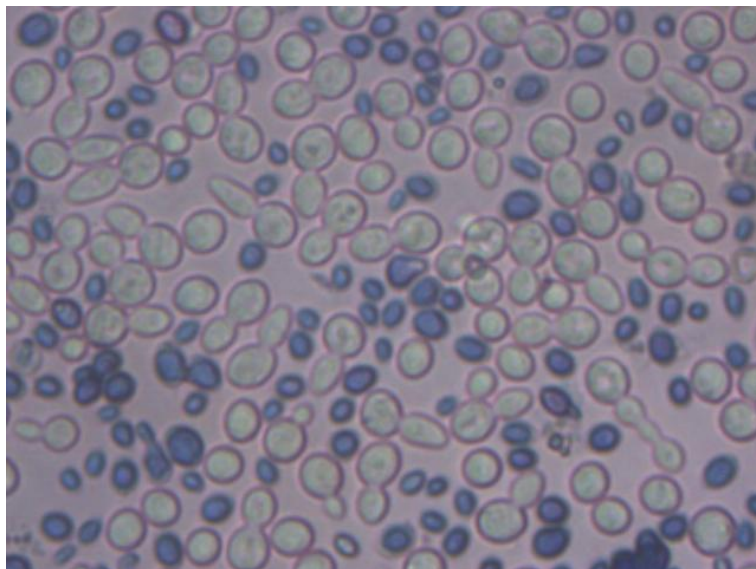


Figura 3.2: Fotografía en microscopio (100X) de *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1.2 *Pichia sp.*:

La levadura nativa utilizada corresponde a *Pichia kluyveri* comercializada por CHR HANSEN, con el nombre de Viniflora FrootZen. Esta levadura se encuentra en un formato líquido, por lo que su almacenamiento debe ser a -45°C , y posee una duración de solo 12 meses. Su formato de comercialización es en bolsas de 500 g. En la Figura 3.3 se observa la morfología de esta levadura en donde destaca su diferencia con *S. cerevisiae* ya que la levadura nativa posee una forma más ovalada.

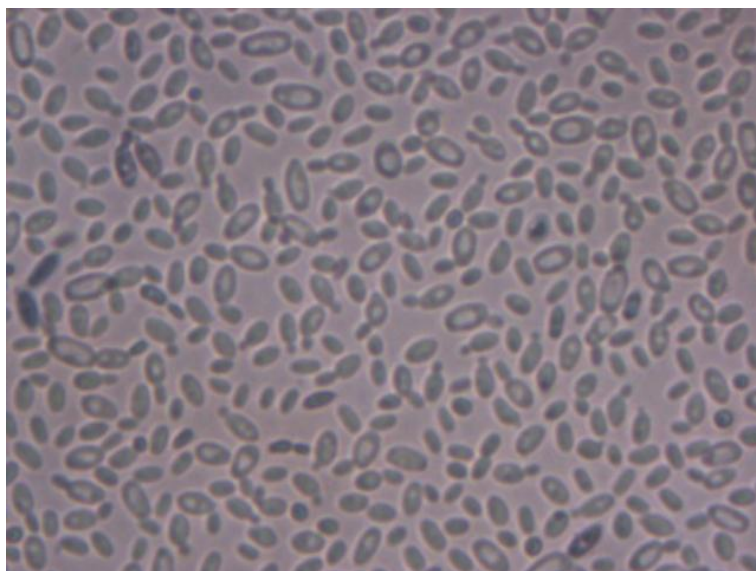


Figura 3.3: Fotografía en microscopio (100X) de *Pichia kluyveri*

3.2.2 Medio de cultivo

Para llevar a cabo esta investigación se trabajó con un mosto real de la cepa syrah cosecha 2018, del valle de Casa Blanca, Chile, el cual fue previamente sulfitado industrialmente para disminuir su carga microbiológica y de esta forma evitar que comience una fermentación temprana al ser transportado hasta Valparaíso, luego es almacenado a -20°C hasta el momento de ser utilizado en cada una de las etapas.

Las condiciones iniciales del mosto se adjuntan en la Tabla 2.1, cabe destacar que estos valores son el promedio de los obtenidos en baldes de 5L los cuales fueron utilizados para su almacenamiento, y las diferencias existentes se deben principalmente a la falta de homogeneidad del medio, es por esto que los parámetros principales fueron ajustados de forma previa a cada una de las fermentaciones realizadas.

Tabla 3.1: Caracterización del medio a utilizar en fermentaciones

YAN	100 mg/L
Acidez total	3,81 g/L
Brix	21,9
Densidad	1,092 g/L (215 g azúcar/L de mosto)
Grado alcohólico probable (GAP)	12,6
SO2 libre	35 ppm

3.2.3 Otros materiales y reactivos

- Metabisulfito de potasio ($K_2S_2O_5$) en soluciones de 100 g/L y 2 g/L.
- Bicarbonato potásico (K_2CO_3) en solución de 200 g/L.
- Ácido tartárico ($C_4H_6O_6$) en solución de 200 g/L.
- Fosfato de amonio ($(NH_4)_2HPO_4$) en solución de 200 g/L.
- Formaldehído (H_2CO) en solución al 37% y pH ajustado a 8.
- Hidróxido de sodio (NaOH) en solución de 4 g/L (0,1 M).
- Azul de metileno ($C_{16}H_{18}N_3SCl \cdot 3H_2O$) diluido en agua
- Wineferm, nutriente en polvo que posee fosfato diamónico, vitaminas, y minerales (Vinotec, 2019).

3.2.4 Equipos

3.2.4.1 Autoclave:

Equipo de marca AMILAB, que posee 21 L de volumen, el cual resiste una presión máxima de 20 PSI, para realizar una esterilización se debe programar su funcionamiento 121 °C durante 15 minutos. En la Figura 3.4 se muestra el equipo.



Figura 3.4: Imagen del equipo autoclave

Las principales precauciones que se deben tener para su correcto funcionamiento son, revisar el nivel de agua previamente y rellenar en caso de ser necesario (con agua desionizada o destilada), no sobrepasar la capacidad del equipo ni dejar el material forzado o bajo presión ya sea entre ellos o con el mismo equipo, verificar el cerrado hermético y la válvula de seguridad y finalmente utilizar guantes térmicos para la apertura y retiro del material dentro del autoclave.

3.2.4.2 pH-metro:

Equipo de marca Hanna modelo HI 2002 posee un rango de -2,00 a 16,00 pH con una resolución de 0,01 pH y precisión de $\pm 0,01$ pH a 25 °C, posee calibración automática mediante 3 puntos de pH (4, 7 y 10) y compensación de temperatura automática integrado, este equipo se muestra en Figura 3.5.



Figura 3.5: Imagen de medidor de pH

3.2.4.3 Refractómetro:

El refractómetro utilizado corresponde al modelo HI 96801 de marca Hanna, el cual se encuentra en la Figura 3.6. Posee una compensación automática para la temperatura para rangos entre 0°C y 80°C. Es calibrado para cada uso con agua desionizada y posee una resolución de 0,1 % Brix y una precisión de $\pm 0,2\%$ Brix.



Figura 3.6: Imagen del Refractómetro

Los grados brix al igual que la densidad corresponde a una medición indirecta de la concentración de azúcar presente en el mosto.

3.2.4.4 Mini titulador de dióxido de sulfuro

El equipo es de marca Hanna modelo HI 84500, posee dos rangos de medición el bajo va de 1,0 a 40, 0 ppm de SO_2 y el rango alto va de 30 a 400 ppm de SO_2 . En este caso fue utilizado solo el rango bajo que posee una resolución de 0,1 ppm y una precisión de 3% de la lectura o $\pm 0,5$ ppm. El equipo que se observa en la Figura 3.7 utiliza método Ripper que trabaja bajo el principio de titulación de punto equivalente de redox para la determinación de concentración de sulfurosos.



Figura 3.7: Imagen de mini titulador de dióxido de sulfuro

3.2.4.5 Turbidímetro:

El equipo corresponde a un HI 83749 de la marca Hanna, el cual mide la turbidez de la muestra introducida, un grado de precisión de $\pm 0,05$ NTU, y posee una resolución de 0,01 a 1200 NTU, es calibrado con 4 puntos previo a cada utilización, posee una fuente luminosa que consiste en una lámpara de tungsteno y el sensor de fotocélula de silicio. Esta medición permite tener conocimiento de forma indirecta sobre el crecimiento microbiano durante la fermentación. Este equipo se muestra en la Figura 3.8 y entrega los resultados en valores de Nephelometric Turbidity Unit (NTU).



Figura 3.8: Imagen del turbidímetro

3.2.4.6 Microscopio óptico:

El microscopio óptico marca Motic modelo BA 310 permite realizar el conteo celular, utilizando cámaras neubauer, además se encuentra conectado a una cámara que permite guardar fotografías de alta calidad de los microorganismos utilizados. Como se observa en la Figura 3.9 posee 4 objetivos de 4X, 10X, 40X y 100X.



Figura 3.9: Imagen de microscopio óptico

3.2.4.7 Titulador automático:

El titulador utilizado corresponde al titroline easy, posee un rango de medición de 0 a 14 pH, con una exactitud de $0,05 \pm 1$, además posee 10 métodos de titulación preinstalados. Se utiliza para las mediciones de acidez total y nitrógeno disponible. El equipo utilizado se observa en Figura 3.10.



Figura 3.10: Imagen de potenciómetro

3.2.4.8 Shaker:

Equipo marca MRC modelo TU-400 (orbital shaker motion) es utilizado para las fermentaciones de 500 mL, en donde se mantiene la temperatura y agitación constante durante toda la fermentación. Posee un rango de temperatura de 5 a 60 °C, y agitación desde 0 a 250 RPM. Como se muestra en la Figura 3.11, este posee 6 pinzas para matraces de 500 mL.



Figura 3.11: Imagen de Shaker

3.2.4.9 Matrazes de fermentación:

Para las fermentaciones de 500 mL se fabricaron matraces especiales con una salida para tomar muestra desde una sonda sin tener que abrir el fermentador y de esta forma mantener la anaerobiosis estricta durante todo el proceso, se pueden observar en la Figura 3.12.



Figura 3.12: Imagen de matraz de fermentación

3.2.4.10 Biorreactores:

En la etapa de escalamiento se utilizaron 2 biorreactores de la marca Applikon, Biotechnology que se encuentran en la Figura 3.13, cada uno con un volumen disponible de 2 y 5 L respectivamente, estos son autoclavables al igual que los sensores que pueden ser utilizados en este equipo. En este estudio no se utilizaron mayores funciones del equipo ya que solo se realizaba control de temperatura, y se mantiene agitación constante.



Figura 3.13: Imagen biorreactor

3.2.4.11 Cromatógrafo de gases con espectrometría de masas (GC-MS)

Esta medición se realiza para la separación y análisis de sustancias volátiles en distintas sustancias, en este caso para obtener los compuestos volátiles mayoritarios en el vino. El equipo cromatográfico de gases es de marca Thermo, modelo Trace 1310 y se encuentra acoplado a un detector de masas modelo Iso LT. Además, se utiliza el software de análisis Chromeleon 7 con la librería NIST 2014 para la identificación de los compuestos. El cromatógrafo de gases se muestra en la Figura 3.14 solo identifica la presencia de los compuestos, pero no es capaz de cuantificarlos.



Figura 3.14: Imagen del cromatógrafo de gases

3.2.4.12 Cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC)

Para la medición de etanol, glicerol, azúcares finales entre otros compuestos se utilizó un cromatógrafo líquido de marca Agilent Technologies modelo infinity 1260 con una columna cromatográfica Aminex HPX-87H 300 mm*7.8mm de marca BIORAD y una precolumna de cation H+.



Figura 3.15: Imagen de cromatógrafo líquido de alta eficacia

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental se planteó de forma explicativa en la Figura 3.1, es importante destacar que en esta investigación el fin es observar las diferencias obtenidas en la concentración de etanol y compuestos volátiles al realizar fermentaciones alcohólicas utilizando distintos tipos de levaduras y técnicas de inoculación (monocultivo y secuencial). A continuación, en la Tabla 3.2 se especifica lo realizado en cada una de las 3 etapas principales, además de especificar la nomenclatura utilizada para los resultados.

Tabla 3.2: Diseño de experimentos

Etap	Tipo fermentación	Volumen	Cantidad matraces	Nomenclatura
F1	Monocultivo	500 mL	2 <i>Pichia sp.</i>	P1.1 / P1.2
	Control		2 <i>S. cerevisiae</i>	S.C 2.1 / S.C 2.2
F2	Secuencial	500 mL	2 <i>Pichia sp.</i> - <i>S. cerevisiae</i>	P1.1 / P1.2
	Control		2 <i>S. cerevisiae</i>	S.C 2.1 / S.C 2.2
F3	Secuencial	2,5 L	1 <i>Pichia sp.</i> - <i>S. cerevisiae</i>	R2L
		4 L	1 <i>Pichia sp.</i> - <i>S. cerevisiae</i>	R4L

Como se detalla en la Tabla 3.2 se realizaron 3 etapas, en las dos primeras se realizan 4 fermentaciones, ya que se realizan en duplicado con el fin de aumentar el grado de confianza de los resultados obtenidos, mientras que en la tercera solo se realizan 2 fermentaciones. El protocolo completo de fermentación se encuentra detallado en el anexo punto 8.2, en las cuales se comparan distintos tipos de fermentación, en las dos primeras se utiliza una fermentación de control con *S. cerevisiae* para ver las diferencias en la fermentación. En el caso de F3 al ser una etapa de escalamiento se realiza una comparación con las fermentaciones secuenciales de la segunda etapa, es decir con F2 P1.1 y F2 P1.2.

En la Tabla 3.3 se muestran los parámetros operacionales que son constantes durante toda la fermentación y en cada etapa, por otra parte, el pH y el YAN solo son modificados al inicio de la fermentación, y luego no se realiza ningún ajuste manual de estos parámetros durante el resto de la fermentación,

Tabla 3.3: Parámetros operacionales constantes para todo el estudio.

Parámetros operacionales	Valor
Temperatura	25 °C
Agitación	100 RPM
Condición de oxígeno	Anaerobio

3.3.1 Acondicionamiento del mosto

Previo a la realización de cada una de las fermentaciones se acondiciona el mosto de forma de que el medio presente las mismas características en cada una de las etapas, es por esto que es de suma importancia realizar una caracterización previa con el fin de conocer las concentraciones iniciales de azúcar, YAN, SO₂ libre y pH. En la Tabla 3.4 se presentan los valores a los cuales se debe llegar en el mosto esto se realiza siguiendo el procedimiento explicado en el anexo punto 8.2.2. Se debe tener presente que solo en esta etapa de las fermentaciones se realiza un ajuste de pH, durante el proceso fermentativo solo se lleva el monitoreo de este.

Tabla 3.4: Parámetros ajustados en el medio de cultivo

YAN	250 mg/L
SO ₂ libre	35 ppm
pH	3,5 – 3,6
Wineferm	3 g/L

3.3.2 Preparación de inóculo

En la preparación de inóculo fueron utilizados dos métodos, por una parte, la preparación prolongada (“overnight culture”) la cual fue utilizada en las tres etapas de fermentación, para los inóculos iniciales de cada matraz tanto para las de *Pichia sp.* como para las de control. Por otra parte, la preparación rápida se realizó específicamente para la segunda inoculación en las fermentaciones secuenciales en donde se añade *Saccharomyces cerevisiae* a los matraces que posee *Pichia sp.* lo cual ocurre en las etapas F2 y F3.

En ambos casos la dosis utilizada se basa en lo recomendado por el fabricante de forma que la concentración inicial sea de 10⁶ células/mL de mosto a fermentar, sin embargo se realiza conteo celular previo a cada inoculación con el fin de asegurar el volumen a añadir

a cada reactor, el procedimiento de cada tipo de preparación se detalla en el anexo punto 8.2.3.

3.3.3 Seguimiento de las fermentaciones

Para cada fermentación se realiza el mismo procedimiento de seguimiento. Se toman muestras de 15 mL cada 12 horas durante las primeras 48 horas, en las cuales se mide sólidos solubles, densidad, turbidez, estas últimas dos en triplicado, y cada 24 horas se mide además la acidez total (AT), nitrógeno asimilable, pH y se realiza conteo celular todo este seguimiento del proceso continúa hasta la finalización de la fermentación, o cuando la densidad se mantenga constante durante 2 días. En la Tabla 3.5 se muestra un resumen de las mediciones realizadas.

Tabla 3.5: Resumen de seguimiento de fermentaciones

Medición	Método	Replicas	Nº de anexo con metodología
Densidad	Picnómetro	3	8.3.1
Sólidos solubles	Refractometría	1	8.3.2
Conteo celular	Microscopía (cámara neubauer)	1	8.3.7
Crecimiento celular	Turbidez	3	8.3.6
YAN	Titulación con NaOH	1	8.3.5
Acidez total	Titulación con NaOH	1	8.3.4
pH	pH-metro	1	8.3.3

3.3.4 Medición de compuestos volátiles

Para las etapas F2 y F3 se realizó un análisis de compuestos volátiles con la técnica de micro extracción en fase sólida (SPME), acoplada a cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS). Para la medición se utilizaron muestras de 5 mL en constante agitación con una barra magnética a 100 RPM, el tiempo de extracción fue de 30 minutos a 35 °C. Los compuestos no pudieron ser cuantificados por lo que el análisis será solo cualitativo.

3.3.5 Medición de compuestos por HPLC

En las tres etapas de fermentación se midieron los puntos finales de cada una de las fermentaciones, además en las con inoculación secuencial se tomó muestra del punto previo a la inoculación de *S. cerevisiae*.

Las mediciones de HPLC se realizaron con un tiempo de corrida de 30 minutos y un volumen de inyección de muestra de 20 µL, además se posee una fase móvil de H₂SO₄ al 0,005mMol con un flujo de 0,6 mL/min. Los detectores usados son DAD e IR con una temperatura de 55 °C, el detector DAD trabaja a una longitud de onda de 210 nm.

3.3.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos y también para la comparación de los distintos tratamientos fermentativos se utilizaron los intervalos de confianza de cada dato para determinar si existen diferencias significativas. Al no tener los datos poblacionales se utiliza la distribución de probabilidad t (t-student). El valor de t utilizado para cada análisis se presenta en los anexos en el punto 8.4.

3.3.7 Cálculo de velocidad específica de crecimiento

Para esto es necesario graficar el tiempo v/s logaritmo natural de la concentración celular esto se debe al siguiente balance. Se sabe que en un reactor batch la fase de crecimiento exponencial se describe de la forma:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

Reordenando:

$$\frac{dX}{X} = \mu dt$$

Integrando:

$$\int_{X_0}^{X_t} \frac{dX}{X} = \mu \int_0^t dt$$

$$\ln X = \mu \cdot t + \ln X_0 \quad \text{o bien,} \quad X = X_0 \cdot e^{\mu t}$$

A partir de la resolución de la integral tenemos que la pendiente de un gráfico de $\ln(X)$ v/s tiempo corresponde al valor de la velocidad específica, además se debe tener presente que para realizar esto se consideran solo los puntos en los cuales μ es constante e igual a μ máximo, es decir, durante la etapa de crecimiento exponencial (Raina M.Maier, 2009).

CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 FERMENTACIÓN MONOCULTIVO

4.1.1 Seguimiento de fermentación

El seguimiento de la fermentación se realizaron dos mediciones que son más representativas a la hora de determinar el final de la fermentación, por una parte, el consumo de sustrato y por otra el crecimiento de levaduras. Para el consumo de sustrato se realizan mediciones indirectas en donde se miden los sólidos solubles (°Brix) y la densidad del mosto, esta última se mide en triplicado para cada uno de los matraces en el anexo número 8.5.1 se muestra el comportamiento de los matraces en duplicado de *Pichia sp.* y de la fermentación de control, en ambos casos se muestran los intervalos de confiabilidad de los datos. Al no existir diferencias significativas entre los resultados obtenidos de los matraces en duplicado los análisis se realizan a partir del promedio de sus datos. En la Figura 4.1 se adjunta la comparación entre los duplicados de ambas fermentaciones (*Pichia sp.* y control).

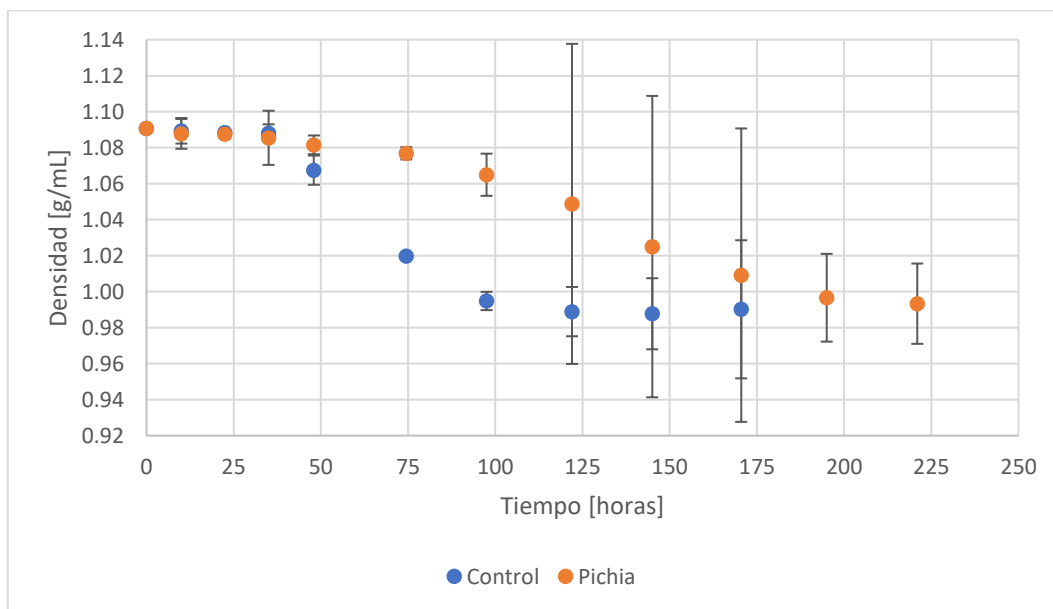


Figura 4.1: Gráfico densidad en el tiempo de fermentaciones monocultivo con intervalos de confianza.

En la Figura 4.1 se observa que los puntos presentes en el comienzo y final de la fermentación no poseen diferencias significativas, sin embargo, durante la etapa exponencial de crecimiento correspondiente a la hora 50 hasta la 100 del experimento se

presentan diferencias significativas en el consumo de azúcares. Esto es de gran importancia ya que confirma lo esperado, es decir, que la levadura nativa tenga un crecimiento ralentizado y una fase lag mayor que *Saccharomyces cerevisiae*. Para confirmar lo anteriormente mencionado se muestra en la Figura 4.2 el comportamiento de la fermentación, pero esta vez utilizado los sólidos solubles para apreciar la diferencia existente.

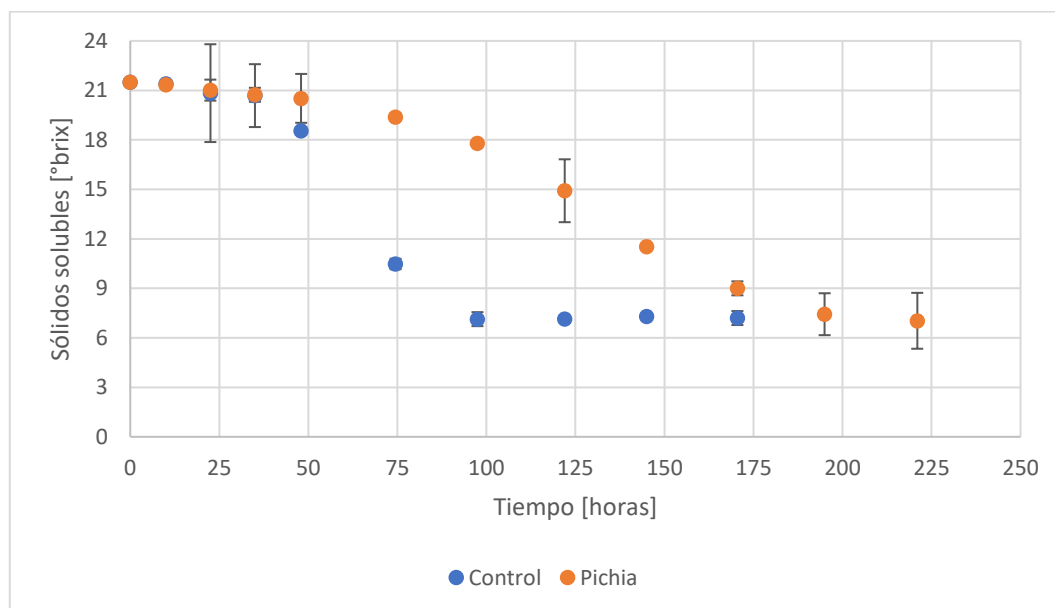


Figura 4.2: Sólidos solubles en el tiempo de fermentaciones monocultivo con intervalos de confianza

En esta última figura se puede comprobar las diferencias significativas existentes en el comportamiento de ambos microorganismos a la hora de utilizarlas en fermentaciones alcohólicas, también se observan los intervalos de confiabilidad de cada dato.

A partir de los datos observados sobre el consumo de sustrato para F1 (monocultivo) queda en evidencia que la levadura nativa tarda al menos 40 horas más que la fermentación control en terminar el proceso, por otra parte, no existe una diferencia significativa en el punto final esto se observa tanto para la medición de densidad como para la de sólidos solubles. Esto último es alta importancia ya que se observa que esta levadura posee una alta tolerancia al etanol y es capaz de realizar una fermentación completa por sí misma, lo cual discrepa de lo planteado por el fabricante.

A continuación, en la Figura 4.3 se presentan el gráfico de conteo celular realizado, en este caso se presenta el promedio de los datos obtenidos de los matraces en duplicado

para cada tratamiento. Debido a que las magnitudes son grandes sólo en este caso de las concentraciones celulares (células/mL) los gráficos se presentan con las desviaciones estándar correspondientes en cada punto y no con los intervalos de confianza.

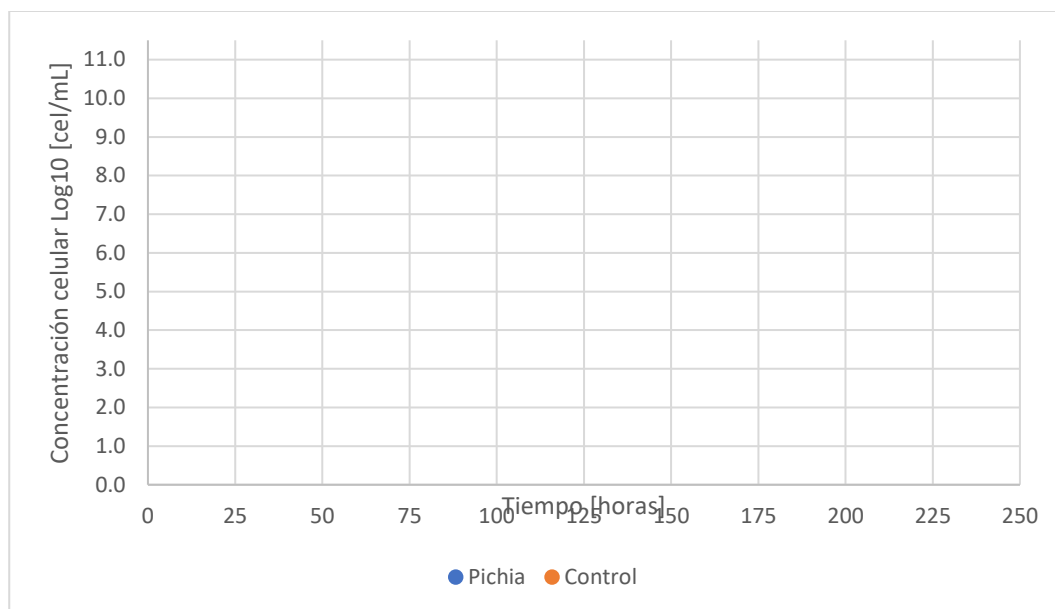


Figura 4.3: Gráfico en escala logarítmica de crecimiento celular durante las fermentaciones monocultivo, con las desviaciones estándar.

El dato presente a las 75 horas de fermentación de *Pichia sp.* no sigue el comportamiento de crecimiento normal de microorganismos, esto se puede deber a que la muestra tomada durante ese día no haya sido homogénea, y por lo tanto no sea representativa.

Además, se muestra el crecimiento medido indirectamente mediante turbidez en la Figura 4.4, en donde es posible observar de manera clara la diferencia en el comportamiento de los microorganismos, comprobando que *Pichia sp.* posee un crecimiento menor que la fermentación control. Existen diferencias significativas en la etapa de crecimiento exponencial, y se aprecia un aumento en los intervalos de confianza en la fase de muerte celular de *Pichia sp.* esto se puede deber a errores humanos como la falta de homogenización de la muestra previo a la medición, entre otros.

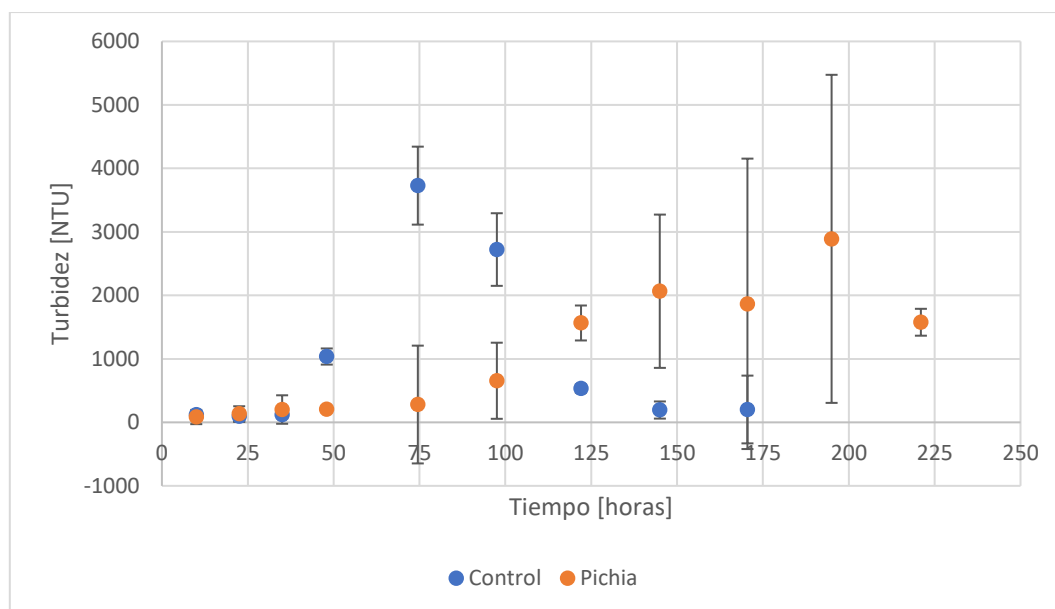


Figura 4.4: Gráfico de turbidez en el tiempo de fermentación monocultivo con intervalos de confianza.

En el anexo 8.6 se muestran los gráficos de conteo obtenidos para cada matraz, de estos es posible obtener las velocidades específicas máxima (μ máx) experimental correspondiente a cada uno (procedimiento se explica en el mismo anexo), los valores obtenidos se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Valores de velocidad específica experimental de fermentaciones monocultivo

Fermentador	μ máx [1/h]	Promedios
P 1.1	0,0155	<i>Pichia sp.</i> 0,0166±0,0015 A [1/h]
P 1.2	0,0176	
S.C 2.1	0,0763	<i>S. cerevisiae</i> 0,0777±0,0020 B [1/h]
S.C 2.2	0,0791	

*Los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar. Datos con diferentes letras en las columnas representan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Los valores presentados poseen diferencias significativas, por lo tanto, se comprueba que el crecimiento de las fermentaciones con *S. cerevisiae* son 80% más rápidas en su etapa exponencial que las realizadas con *Pichia sp.*, sin embargo, llama la atención lo bajo de los valores obtenidos ya que en general los valores reportados para la velocidad específica de *Saccharomyces cerevisiae* en cultivos batch varía entre 0,32 [1/h] y 0,54 [1/h] (De Martin, 2005).

4.1.2 Mediciones de HPLC

Se miden solo tres puntos en esta fermentación, a las horas 122, 170 y 240, las últimas dos corresponden a cuando finaliza la fermentación de control y de *Pichia sp.* respectivamente. Todos los datos obtenidos en estos 3 puntos se muestran en la Tabla 4.2,

Tabla 4.2: Datos de etanol, glicerol y azúcares totales en fermentaciones monocultivo

Compuesto	Hora	<i>Pichia</i>	Control
Etanol %v/v	122	5,23±0,16A	11,49±0,02B
	170	11,01±0,16A	11,63±0,09A
	221	9,57±0,18	
Glicerol	122	5,21±0,18A	8,46±0,09B
	170	7,08±0,59A	8,63±0,05A
	221	6,78±0,04	
Azúcares reductores	122	89,96±1,98A	2,24±1,11B
	170	8,30±0,95A	3,11±0,00A
	221	2,66±0,20	

*Los datos representan el promedio ± desviación estándar calculada de los matraces en duplicado para cada caso. Datos con diferentes letras en las columnas representan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Si bien la concentración de etanol a las 122 horas en *Pichia sp.* es al menos 5 %v/v menor a la de control, al finalizar la fermentación no se observan diferencias significativas entre ambas fermentaciones.

Solo los datos correspondientes a las 122 horas presentan diferencias significativas tanto para la concentración de etanol, como para glicerol y los azúcares totales. Cuando finaliza la fermentación de control a las 170 horas las concentraciones de ambos compuestos se igualan en los distintos tratamientos.

Con los valores de azúcares totales al final de cada fermentación es posible obtener los rendimientos por producto, es decir los gramos de etanol producidos por gramo de azúcar consumido (Y_p/s) por cada matraz, para esto se considera como punto inicial lo presentado en la Tabla 3.1, es decir el azúcar inicial del mosto corresponde a 215 g/L.

Por otra parte, la concentración final de etanol y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Resultados de rendimiento de producto por sustrato consumido en fermentaciones monocultivo

	Azúcar final g/L	Etanol g/L	Yp/s	Promedio Yp/s
P1.1	2,515	83,006	0,391	0,396±0,008 A
P1.2	2,804	85,266	0,402	
S.C2.1	3,107	101,638	0,480	0,482±0,004 A
S.C2.2	3,114	102,768	0,485	

*Los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar. Datos con diferentes letras en las columnas representan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

El rendimiento de la fermentación para el producto de etanol es menor para *Pichia sp.* que, para la fermentación de control, sin embargo, estas no presentan diferencias significativas, lo cual concuerda con los valores obtenidos de la concentración final de etanol ya que estos tampoco presentaban diferencias significativas. No se encontraron estudios previos de *Pichia sp.* inoculada de forma monocultivo, por lo que no es posible contrastar los datos obtenidos, en esta etapa.

4.2 FERMENTACIÓN CON INOCULACIÓN SECUENCIAL

4.2.1 Seguimiento de la fermentación

Esta etapa se caracteriza por utilizar dos cepas de levadura para la fermentación ya que como se menciona anteriormente se prepara un inóculo lento para *Pichia sp.* y al comenzar la etapa exponencial se inocula con *Saccharomyces cerevisiae*, al mismo tiempo se realiza una fermentación en paralelo de control con *S. cerevisiae* ambas en duplicado.

Para esta etapa se comparan los matraces en duplicado mediante los intervalos de confianza de los datos de densidad los cuales se encuentran en triplicado. Al igual que en la fermentación monocultivo estos se muestran en el anexo número 8.5.2, en ambos (fermentación secuencial y control) no se observan diferencias significativas entre los datos de los matraces en duplicado por lo que en la Figura 4.5 se muestra el promedio

de los valores del comportamiento frente al consumo de sustrato de ambos con sus respectivos intervalos de confianza.

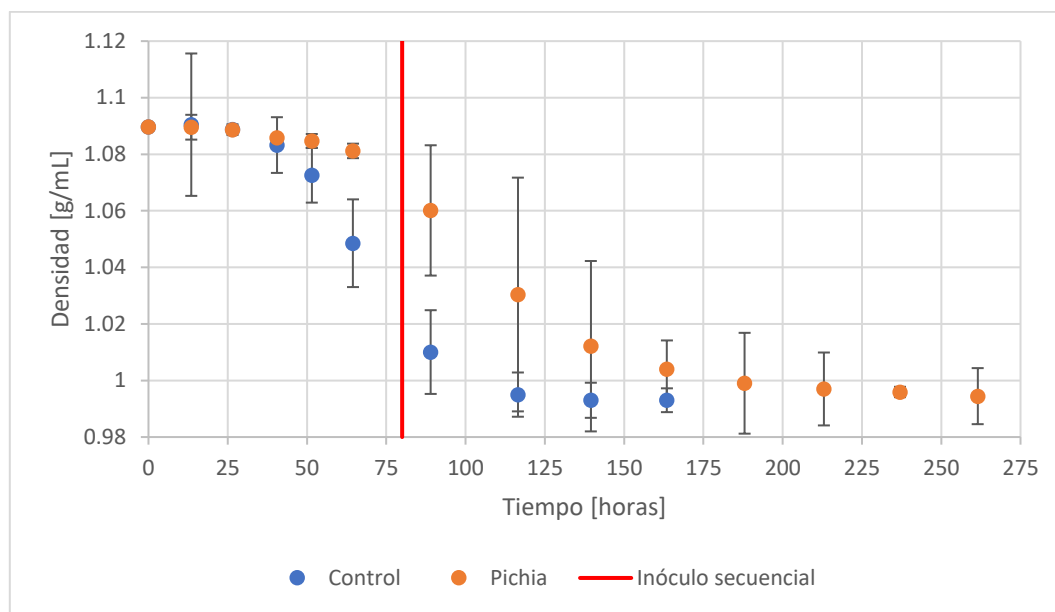


Figura 4.5: Gráfico de densidad en el tiempo de fermentación secuencial con intervalos de confianza

Para el consumo de sustrato igual se miden los sólidos solubles con ayuda del refractómetro estos datos se presentan en la Figura 4.6.

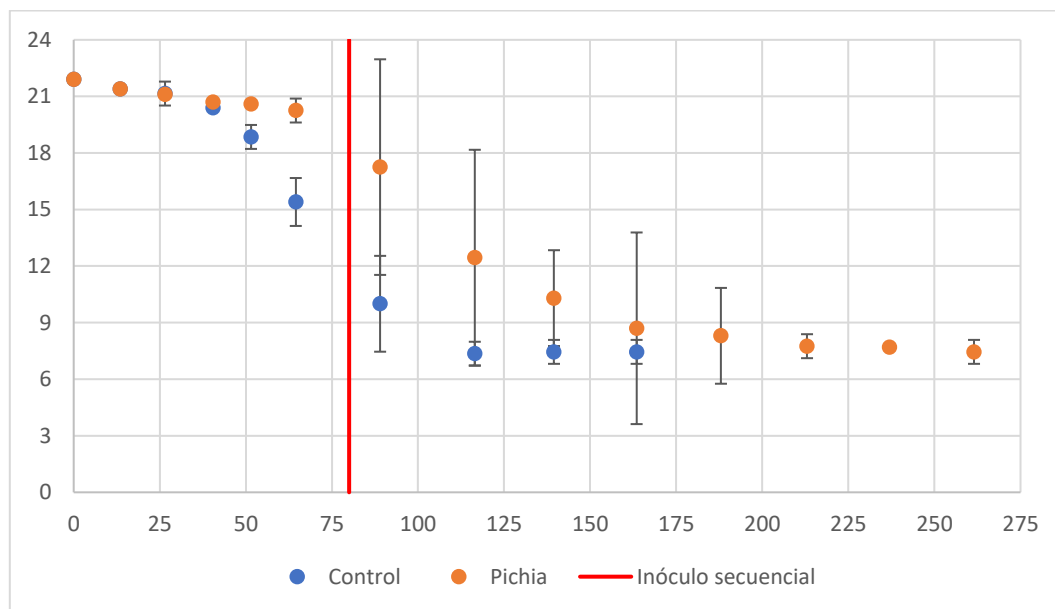


Figura 4.6: Gráfico de sólidos solubles en el tiempo de fermentación secuencial con intervalos de confianza

En esta fermentación se realizó la inoculación *Saccharomyces cerevisiae* 80 horas después de la inoculación de *Pichia sp.*, sin embargo, esta finalizo 100 horas más tarde

que la fermentación control, en el gráfico de densidad se observan diferencias significativas en la etapa exponencial de ambas fermentaciones, pero al igual que en la etapa anterior al finalizar las fermentaciones se estabilizan en los mismos valores.

En el caso del crecimiento celular se observan diferencias en el comportamiento de las fermentaciones como se observa en la Figura 4.7, en este gráfico al igual en la F1 sólo se muestran las desviaciones estándar.

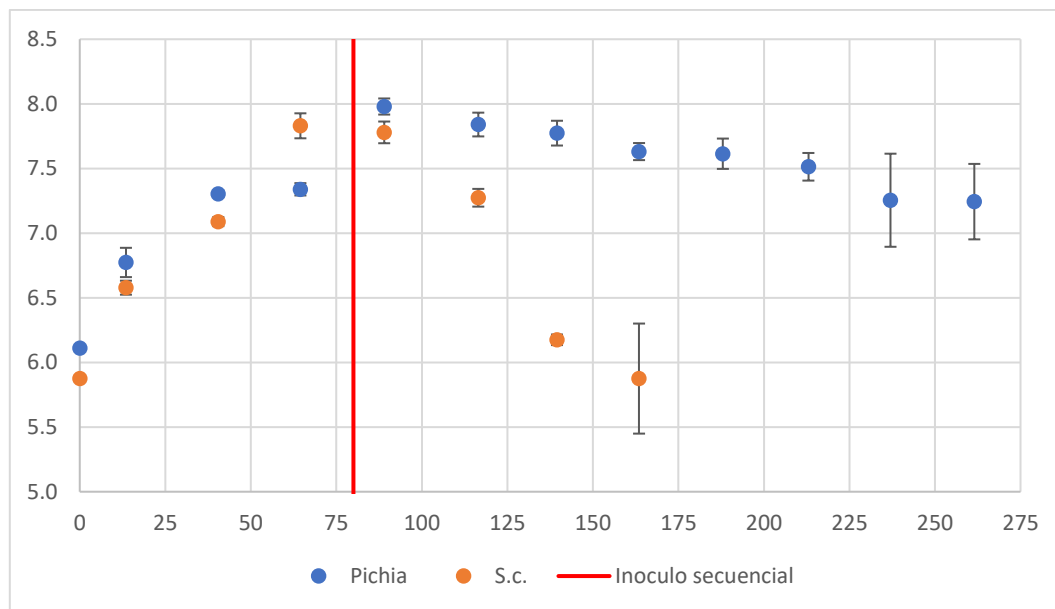


Figura 4.7: Gráfico en escala logarítmica de crecimiento celular en el tiempo de fermentación secuencial con desviaciones estándar

El punto máximo de crecimiento ocurre a las 65 horas en el caso de la fermentación control, y para la secuencial se observa un gran crecimiento luego de la segunda inoculación alcanzando el punto máximo 30 horas más tarde. En la Figura 4.8 se presenta el crecimiento según las mediciones de turbidez.

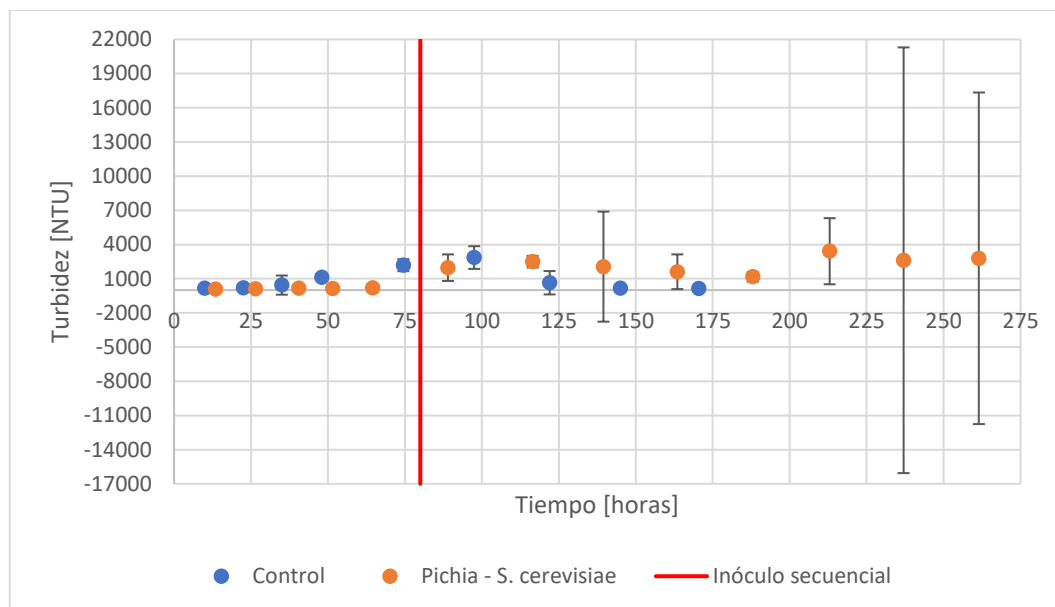


Figura 4.8: Gráfico de turbidez en el tiempo de fermentación secuencial con intervalos de confianza

Este gráfico presenta mayores intervalos de confianza, este aumento en la dispersión de los últimos puntos se debe a que las muestras fueron congeladas previo a realizar las mediciones, es por esto que se presenta una distorsión de los datos presentados desde la hora 200 en adelante. Por lo mencionado anteriormente estos no serán considerados en los análisis posteriores.

A partir de los datos de conteo celular se obtienen los datos de velocidad específica para cada uno de los matraces los cuales se muestran en la Tabla 4.4, los curvas de donde se extraen estos valores se presentan en el anexo número 8.6.

Tabla 4.4: Velocidades específicas de crecimiento experimentales en fermentación secuencial

Fermentador	μ máx [1/h]	Promedios
P 1.1	0,0304	<i>Pichia sp.</i> 0,0337±0,0046 A [1/h]
P 1.2	0,0369	
S.C 2.1	0,0576	<i>S. cerevisiae</i> 0,0563±0,0018 A [1/h]
S.C 2.2	0,0550	

*Los datos representan el promedio ± desviación estándar. Datos con diferentes letras en las columnas representan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Si bien la fermentación de control posee un valor mayor que la secuencial, en este caso no presentan diferencias significativas las velocidades específicas de ambas fermentaciones. El aumento de la velocidad en las fermentaciones secuenciales se ve influenciado por el efecto de *S. cerevisiae*.

4.2.2 Mediciones de HPLC

Para esta fermentación se realizaron mediciones en 4 puntos distintos, uno antes de comenzar la fase exponencial de ambas fermentaciones, durante la fase de crecimiento justo antes de realizar la inoculación secuencial y por último, en los puntos finales de cada una de las fermentaciones, los valores obtenidos para etanol en %v/v se muestran en la Figura 4.9 junto con las curvas de consumo de sustrato de cada una para tener la referencia de la etapa fermentativa en la cual son tomadas las muestras.

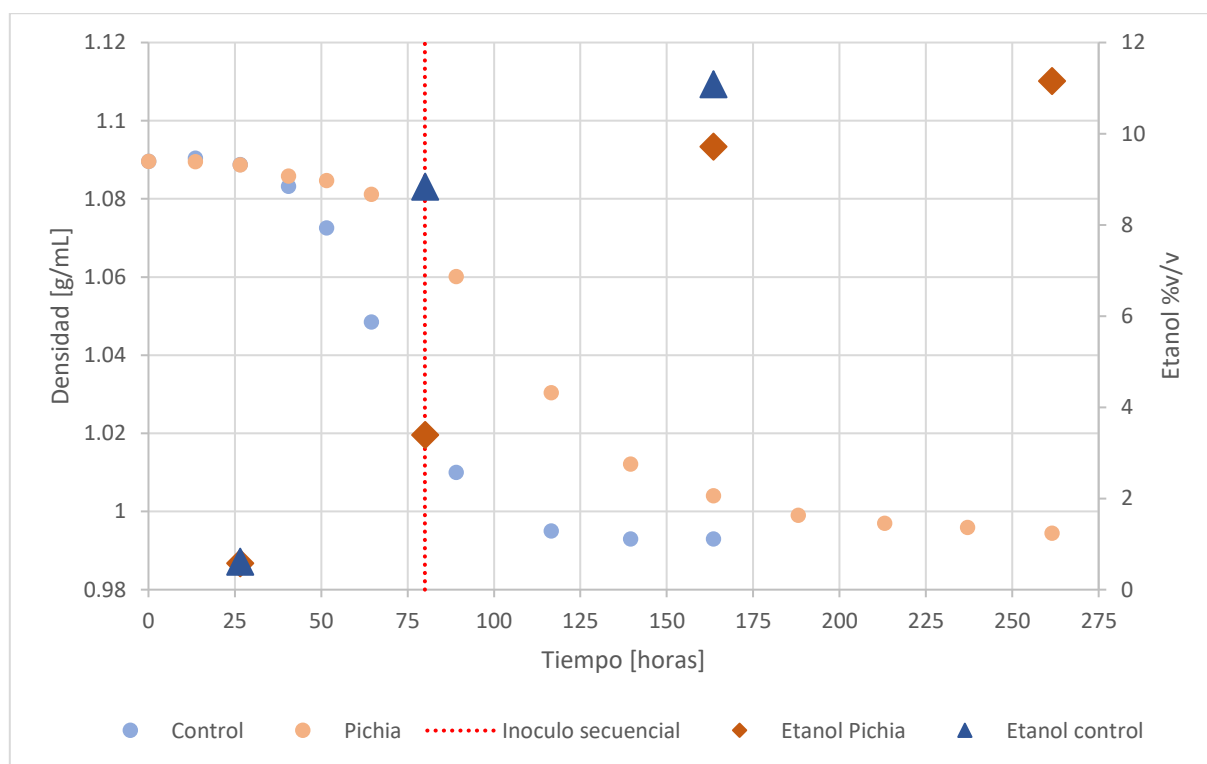


Figura 4.9: Gráfico de densidad y etanol en el tiempo de fermentación secuencial

Como se aprecia en la Figura 4.9 el % de etanol a las 25 horas es el mismo para ambas fermentaciones, pero una vez iniciada la etapa exponencial esto cambia radicalmente por una parte la fermentación control llega a los 8,8 %v/v de etanol mientras que la fermentación de *Pichia sp.* tan solo alcanza los 3,4 %v/v previo a la inoculación de *S. cerevisiae*. Finalmente, al terminar las fermentaciones ambas llegan a obtener una

concentración de etanol por sobre los 11 %v/v sin diferencias significativas desde el momento en que termina el proceso fermentativo los matraces de control. Es decir, que no se logra una disminución en el grado alcohólico final al utilizar una fermentación del tipo secuencial, esto discrepa de lo presentado en Röcker et al., (2016) quien logra una disminución de 3 %v/v de etanol, esto se puede explicar ya que en dicho estudio se trabaja con aireación, durante la primera etapa.

Al contrastar, estos resultados con estudios anteriores, se aprecian diferencias en el tiempo de fermentaciones ya que según lo presentado por Whitener et al., (2017) en donde realizan fermentaciones de control con *S. cerevisiae* y *Pichia sp.* inoculada secuencialmente con *S. cerevisiae* tardan 17 días ambas en finalizar la fermentación, esto se puede deber a diversos factores como lo son los volúmenes de fermentación, condiciones iniciales y la metodología de trabajo.

Además, se muestran en la Tabla 4.5, los resultados obtenidos para cada uno de estos puntos respecto a la concentración de glicerol y azúcares totales, en general no existen diferencias significativas los puntos finales, sin embargo, la concentración de glicerol es menor en *Pichia sp.* previo a la inoculación secuencial.

Tabla 4.5: Datos de etanol, glicerol y azúcares totales en fermentación secuencial

	Hora	<i>Pichia</i>	Control
Etanol %v/v	26,5	0,58±0,00 A	0,61±0,01 A
	80	3,40±0,31 A	8,84±0,18 B
	163,5	9,72±0,53 A	11,09±0,15 A
	261,5	11,15±0,04	
Glicerol	26,5	0,44±0,01 A	0,77±0,06 A
	80	4,67±0,24 A	9,69±0,25 B
	163,5	9,76±0,40 A	10,54±0,06 A
	261,5	10,32±0,03	
Azúcares totales	26,5	152,41±1,30 A	155,70±1,00 A
	80	108,23±7,47 A	28,24±3,13 A
	163,5	21,46±2,81 A	3,14±0,00 A
	261,5	4,04±0,49	

Razón glucosa/fructosa	26,5	0,67±0,00 A	0,74±0,00 B
	80	0,49±0,02 A	0,23±0,01 A
	163,5	0,07±0,01	

*Los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar calculada de los matraces en duplicado para cada caso. Datos con diferentes letras en las columnas representan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Las únicas diferencias significativas se observan en los valores de etanol y glicerol previo al inóculo secuencial y en la razón glucosa/fructosa en el primer punto de medición previo al comienzo de la etapa exponencial de ambas fermentaciones, en donde se concluye que la fermentación de control posee un mayor consumo de glucosa durante la primera etapa fermentativa. Se debe tener presente que en este caso todos los matraces alcanzaron concentraciones de azúcares totales finales menores a 5 g/L, si bien se considera terminada la fermentación al tener menos de 2 g/L de azúcares residuales (Pszczółkowski & Ceppi de Lecco, 2011), los valores obtenidos son cercanos a este por lo que se puede decir que en ambas fermentaciones las levaduras fueron capaces de consumir prácticamente la totalidad del azúcar presente en el mosto.

Los rendimientos de consumo de sustrato para la producción de etanol se presentan en la Tabla 4.6, en donde se muestran tanto los valores obtenidos para el punto final, como los resultados tomando los valores previos a la inoculación secuencial realizada a las 80 horas de fermentación.

Tabla 4.6: Resultados de rendimiento de producto por sustrato en fermentación secuencial

Hora		Azúcar g/L	Etanol g/L	Yp/s	Promedio Yp/s
80 (previo inoculo secuencial)	P1.1	102,948	31,790	0,284	0,279±0,006
	P1.2	113,513	27,903	0,275	
	S.C2.1	30,460	78,828	0,427	0,416±0,016
	S.C2.2	26,029	76,558	0,405	
261,5 (final)	P1.1	4,380	98,258	0,467	0,465±0,003
	P1.2	3,693	97,818	0,463	
163,5 (final)	S.C2.1	3,136	96,556	0,456	0,460±0,006
	S.C2.2	3,135	98,376	0,464	

*Los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar.

Finalmente, se tiene una diferencia en el rendimiento previo a la inoculación secuencial, no obstante, estas no presentan diferencias significativas y sólo se puede concluir que al realizar una fermentación secuencial el rendimiento de consumo de sustrato para la producción de etanol se iguala a la fermentación de control cuando tomamos el punto final del proceso, en donde los valores de las concentraciones azúcares totales son menores a 5 g/L en todos los casos, lo cual asegura el consumo total de azúcar presente en el mosto.

4.2.3 Mediciones de compuestos volátiles

En la medición de compuestos volátiles se encontraron 20 compuestos distintos para el caso de la fermentación secuencial y 22 compuestos para la fermentación de control en su mayoría son alcoholes y esterés los cuales son responsables de la mayor parte del aroma del vino (Whitener et al., 2017). De todos los compuestos encontrados solo 14 compuestos son comunes en ambas fermentaciones, los cuales se detallan en la Tabla 4.7, los valores mostrados representan el promedio porcentaje de área relativa correspondiente a cada pico obtenido en las mediciones.

Tabla 4.7: Compuestos volátiles comunes entre fermentación secuencial y fermentación de control

Cas	Tipo	Nombre compuesto	Aroma	<i>Pichia</i>	Control
124-07-2*	Ácido	Ácido octanoico	Grasoso, ceroso, rancio, aceitoso, vegetal, queso	0,35 $\pm$ 0,02A	0,60 $\pm$ 0,10B
334-48-5*	Ácido	Ácido decanoico	Rancio desagradable, grasoso, agrio, cítrico	0,35 $\pm$ 0,04A	0,21 $\pm$ 0,12A
60-12-8	Alcohol	Alcohol fenetílico	Floral, rosas secas, flores de rosas, agua de rosas	3,19 $\pm$ 0,27A	1,08 $\pm$ 0,07B
2198-61-0	Ester	Hexanoato de isoamilo	Frutal, banana, manzana, piña, acre, agrio, queso	0,18 $\pm$ 0,03A	0,06 $\pm$ 0,01B
54546-22-4	Ester	Etil 9-hexadecenoate	Sin información	0,17 $\pm$ 0,02A	0,15 $\pm$ 0,03A
2035-99-6	Ester	Octanoato de isoamilo	Dulce, aceitoso, frutal, jabón, piña, coco, cera	0,27 $\pm$ 0,02A	0,20 $\pm$ 0,09A

124-06-1	Ester	Tetradecanoato de etilo	Dulce, ceroso, violeta, orris	1,10±0,84A	0,69±0,10A
123-66-0	Ester	Hexanoato de etilo	Dulce, frutal, piña, ceroso, banana verde	4,35±0,21A	6,45±0,73B
103-45-7*	Ester	Acetato de feniletilo	Floral, rosas, dulce, miel, frutal, tropical.	7,32±0,19A	2,31±0,09B
142-92-7	Ester	Etanoato de etilo	Frutal, manzana verde, banana, dulce	8,55±0,42A	6,49±0,75B
106-32-1*	Ester	Octanoato de etilo	Frutal, vino, ceroso, dulce, damasco, banana, brandy, pera	14,84±0,55A	13,85±0,44A
110-38-3	Ester	Decanoato de etilo	Dulce, ceroso, frutal, manzana, uva, aceitoso, brandy	17,88±0,30A	13,57±1,49B
123-92-2	Ester	Acetato de isoamilo	Dulce, frutal, banana, solvente	21,17±1,46A	31,00±2,76B
629-82-3	Eter	Dioctil eter	Sin información	0,75±0,74A	1,31±0,78A

*Los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar de matraces idénticos medidos en duplicado para cada caso. Datos con diferentes letras en las columnas representan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

De los 14 compuestos se observan diferencias significativas en solo 8 de ellos, de los cuales en 5 es mayor el área obtenida para fermentación de *Pichia sp.*, estos compuestos corresponden a 4 esterres y un alcohol, y los con mayor área en la fermentación control son 1 ácido y 2 esterres. De los mayoritarios en *Pichia sp.* destacan los asociados a flores, frutales, dulces, estos corresponden a aromas esperados para el vino final, por otra parte, los mayoritarios en la fermentación de control corresponden a aromas dulces, frutales y a su vez aromas cerosos, grasoso y queso los cuales en altas concentraciones no son beneficiosos para el producto final.

Además, en la Tabla 4.8 se presentan los compuestos que solo son apreciados en una de las fermentaciones, ya sea la de control o la secuencial.

Tabla 4.8: Compuestos volátiles presentes en solo una de las fermentaciones realizadas durante la segunda etapa experimental

Fermentación	Cas	Tipo	Nombre compuesto	Aroma	Promedio
Pichia	123-29-5	Ester	Nonanoato de etilo	Frutal, rosas, ceroso, ron, vino, tropical	0,11±0,01
	5444-75-7	Ester	Benzoato de etilhexilo	Etéreo suave	0,11±0,01
	112-06-1	Ester	Acetato de heptilo	Fresco, ron, fruta madura, pera, damasco, leñoso	0,16±0,03
	628-97-7	Ester	Hexadecanoato de etilo	Ceroso suave, frutal, cremoso, lechoso, balsamo	0,20±0,04
	112-14-1	Ester	Acetate de heptilo	Terroso, hongo, herbaceo, ceroso	0,28±0,01
	106-33-2	Ester	Laurato de etilo	Dulce, ceroso, floral, jabonoso	8,82±1,02
Control	123-51-3	Alcohol	Alcohol isoamilico	Fusel, aceitoso, alcohol, frutal, banana, whiskey	5,51±0,60
	106-30-9	Ester	Heptanoato de etilo	Frutal, piña, cognac, ron, vino	0,05±0,01
	150-84-5*	Ester	Acetato de citronelilo	Floral, rosa, frutal, citrico, leñoso, fruta tropical	0,05±0,02
	35897-13-3	Ester	1-pentanol, 3-metil-, acetato	Sin información	0,12±0,03
	110-27-0	Ester	Miristato de isopropilo	Aceitoso debil, grasoso	0,27±0,13
	67233-91-4	Ester	Etil 9-decenoate	Frutal, grasoso	3,22±0,38
	141-78-6	Ester	Acetato de etilo	Frutal etéreo, dulce, mala hierba	5,45±1,51
	80-54-6	Aldehído	Lilial	Floral, muguete, aguado, comino en polvo	0,07±0,03

*Los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar de matraces idénticos medidos en duplicado para cada caso.

En este caso se observan 6 compuestos solo en *Pichia sp.*, todos del tipo éster, asociados en su mayoría a aromas frutales y florales, pero igualmente existe un perfil ceroso, por otra parte, se muestran los 8 compuestos presentes solo en la fermentación de control de los cuales se encuentran 1 alcohol, 6 éster y por último un aldehído, de todos estos 6 se asocian a aromas frutales y/o florales, pero al mismo tiempo se presenta un perfil grasoso y aceitoso.

De todos los compuestos presentados existen 4 que coinciden con los presentados en un estudio anterior realizado a esta levadura en fermentación secuencial estos son Acetato de feniletilo, octanoato de etilo, ácido decanoico, ácido octanoico (Whitener et al., 2017).

4.3 FERMENTACIÓN DE ESCALAMIENTO

4.3.1 Seguimiento de fermentación

Las fermentaciones de 2,5 y 4 L fueron realizadas en biorreactores únicos por lo que no fue posible obtener fermentaciones control en esta etapa, es por esto que las comparaciones se realizan a partir de los datos presentados en las fermentaciones secuenciales de 500 L durante la F2, con esto se puede determinar si el comportamiento del microorganismo utilizado sufre alguna alteración al aumentar el volumen de control. Por tema de nomenclatura en esta etapa llamaremos a la fermentación realizada en la fermentación secuencial inicial (F2) como “R0,5L”. En la Figura 4.10 se presentan las tres fermentaciones secuenciales realizadas durante el estudio.

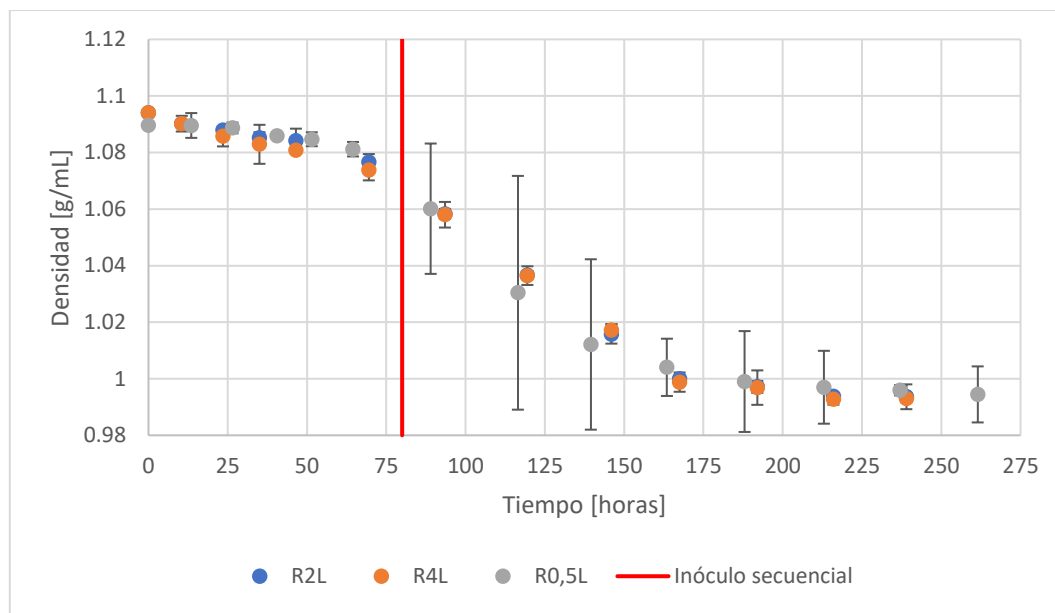


Figura 4.10: Gráfico de densidad en el tiempo de fermentaciones de escalamiento con intervalos de confianza

Los datos de densidad son presentados con sus respectivos intervalos de confianza, permiten afirmar que no existen diferencias significativas en el comportamiento para ambos volúmenes se debe tener presente que en este caso la inoculación secuencial con *S. cerevisiae* se realiza a las 80 horas después de la inoculación de *Pichia sp.* al igual que en la etapa anterior. En la Figura 4.11 se muestran los datos de sólidos solubles para la misma fermentación los cuales son concordantes con lo observado en gráfico de densidad.

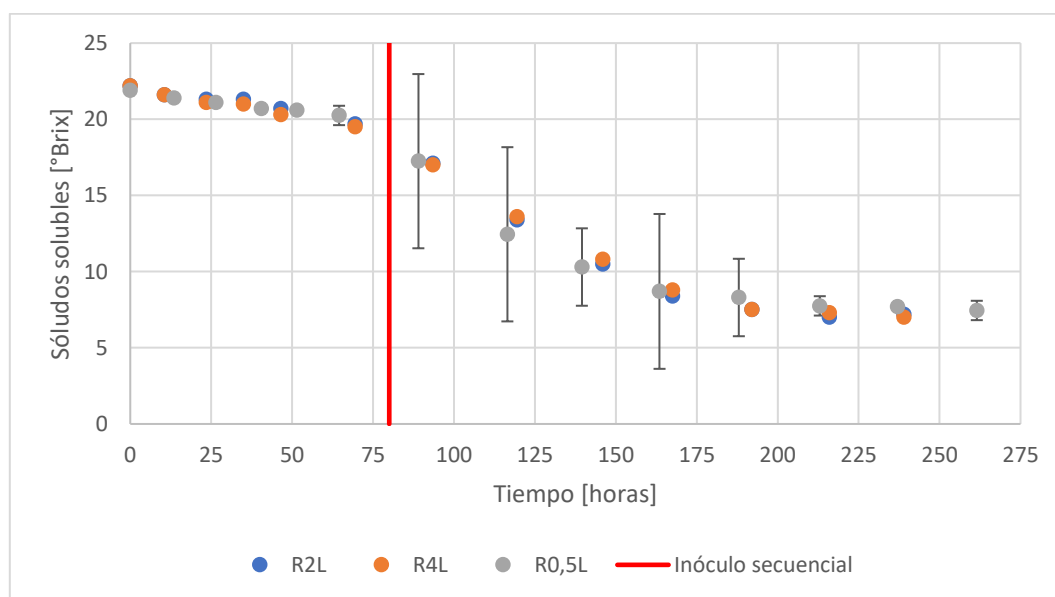


Figura 4.11: Gráfico de sólidos solubles en el tiempo de fermentaciones de escalamiento

Se concluye que al aumentar el volumen de control desde 0,5 L hasta 4L no existen diferencias significativas en el comportamiento del consumo de sustrato de la fermentación secuencial de *Pichia sp* – *S. cerevisiae*. A pesar de lo observado la fermentación a 0,5 L se encuentra finaliza 24 horas después que ambos biorreactores.

En el caso del conteo celular se muestran los resultados obtenidos en la Figura 4.12, en donde se comparan los valores de las 3 fermentaciones secuenciales realizadas, se debe tener presente que para el caso del escalamiento no fue posible realizar fermentaciones en duplicado por lo tanto no se posee la desviación estándar de dichos puntos.

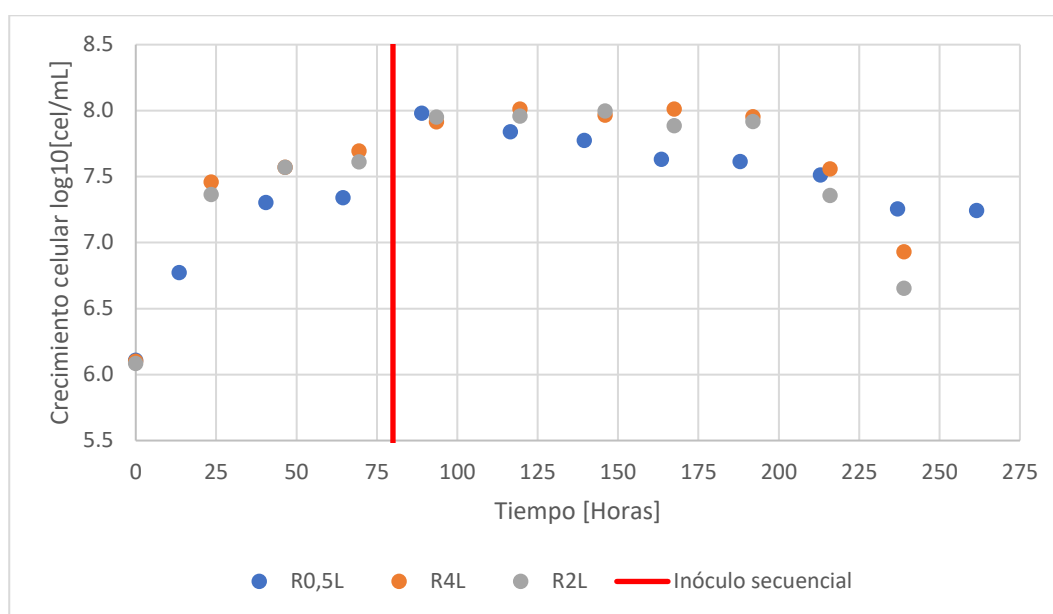


Figura 4.12: Gráfico de crecimiento celular en fermentación de escalamiento

En el conteo se observa una fase estacionaria mayor en los biorreactores que en el matraz de 0,5 L, ya que en este último caso solo posee un punto máximo y luego comienza a descender la concentración mientras que en los reactores de mayor volumen la concentración celular se mantiene constante por al menos 100 horas previo a su fase de muerte celular.

En la Figura 4.13 se muestran los valores de turbidez obtenidos en triplicado para la fermentación de escalamiento, en este gráfico no se incluyeron los valores de la fermentación de 0,5 L ya que como se mencionó anteriormente estos presentan una gran dispersión y no son representativos del proceso ya que las muestras no fueron utilizadas de forma inmediata si no que se congelaron y luego fueron medidas días después.

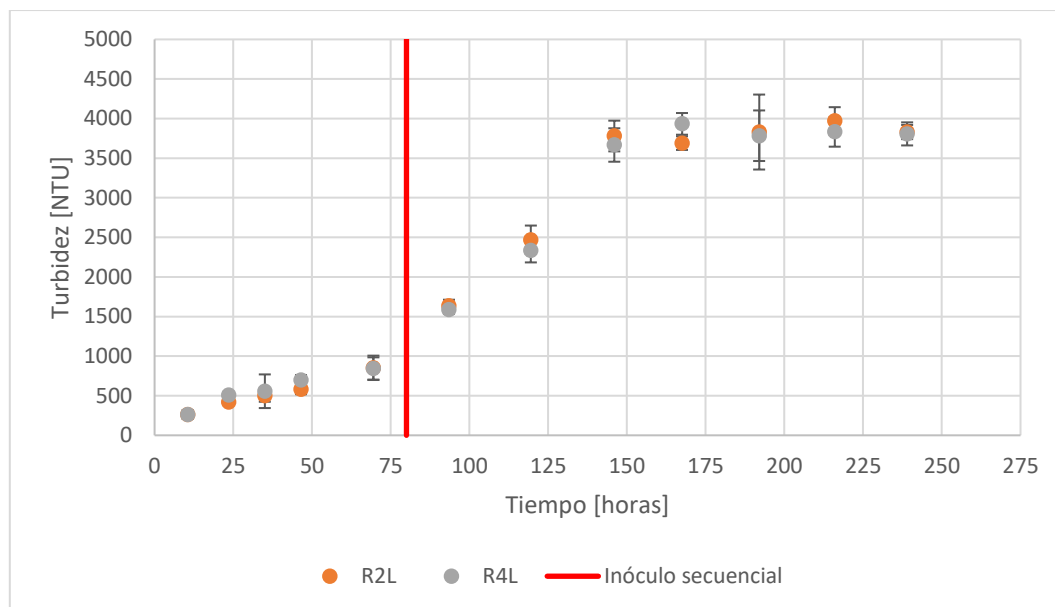


Figura 4.13: Gráfico de turbidez en el tiempo de fermentación de escalamiento

Lo observado en este gráfico representa un comportamiento similar para ambos reactores en el tiempo, en donde el punto máximo de turbidez obtenido es en 4000 NTU. Con el gráfico de conteo celular se obtienen los valores de la velocidad específica de crecimiento para cada biorreactor, los cálculos se encuentran en el anexo número 8.6, y los resultados están resumidos en la Tabla 4.9

Tabla 4.9: Valores de velocidad específica experimental en fermentación de escalamiento

Fermentador	μ máx [1/h]
R0,5L	0,0337
R2L	0,0125
R4L	0,0140

Si bien el comportamiento de ambos no presenta diferencias significativas en los gráficos de consumo de sustrato (densidad o sólidos solubles) a la hora de ver el crecimiento celular mediante el conteo realizado se presentan diferencias significativas las cuales se reflejan en los valores de velocidad específica de crecimiento obtenidos, en este caso se tiene que los biorreactores de 2 y 4 litros poseen un crecimiento de microbiano enlentecido en un 60% en comparación al de 0,5L.

4.3.2 Mediciones de HPLC

Las mediciones de HPLC en esta tercera fermentación se realizaron en 5 puntos diferentes, en la fase lag, otro al comenzar la fase exponencial (antes de realizar la inoculación secuencial) luego durante la fase de crecimiento exponencial, al comenzar la fase de muerte y finalmente en el punto final, los cuales se muestran en la Figura 4.14

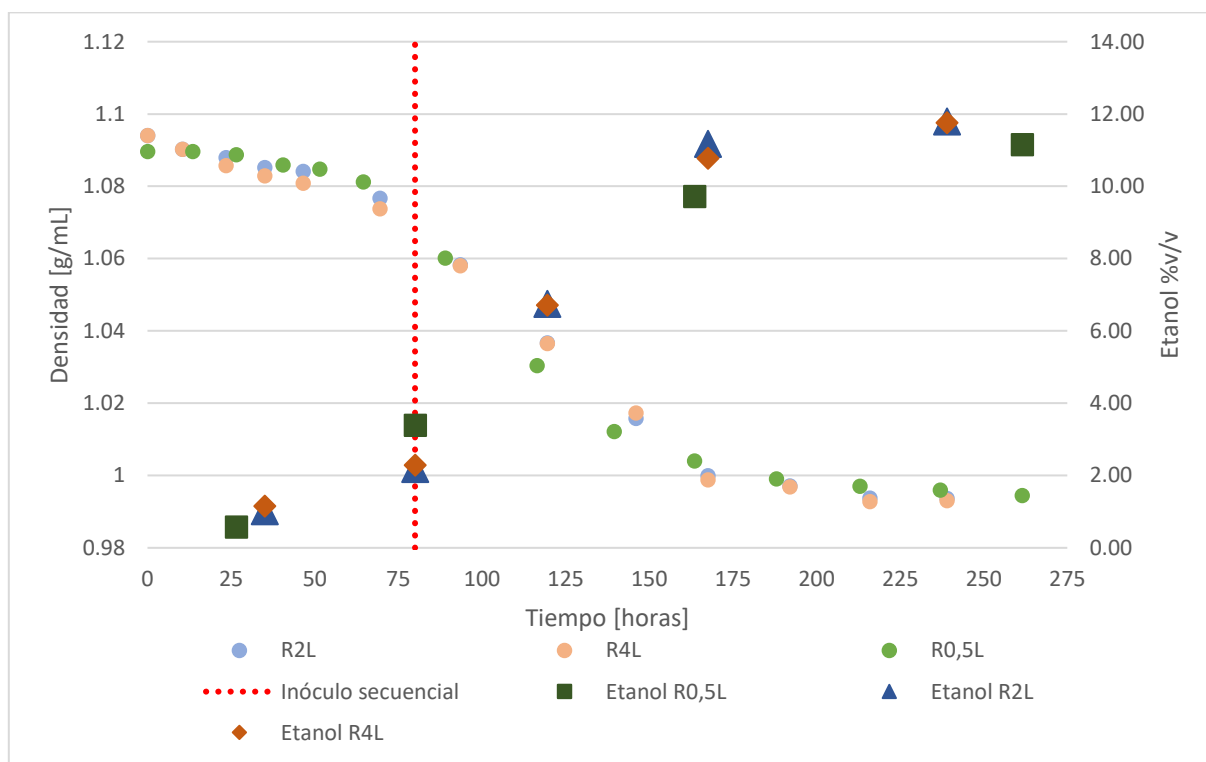


Figura 4.14: Gráfico de densidad y etanol en el tiempo de fermentaciones de escalamiento

El comportamiento del etanol es similar en todos los puntos, sin embargo, antes de realizar el inóculo secuencial existe una diferencia de 1 %v/v en la concentración de etanol, entre los biorreactores y el matraz de 0,5L, esto se puede deber a que las fermentaciones realizadas a mayor escala presentaron un crecimiento más enlentecido, lo cual se sabe a partir de los valores de velocidad específica de crecimiento presentados anteriormente.

En la Tabla 4.10 se presentan los datos de concentración de etanol glicerol y azúcares totales obtenidos en las fermentaciones realizadas en la etapa de escalamiento, como se menciona anteriormente estas fermentaciones no fueron realizadas en duplicado por lo que no es posible obtener intervalos de confianza para la comparación de los tratamientos.

Tabla 4.10: Datos de etanol, glicerol y azúcares totales en fermentación de escalamiento

Compuesto	Hora	R2L	R4L
Etanol %v/v	35	1,02	1,15
	80	2,18	2,29
	119,5	6,75	6,71
	167,5	11,17	10,77
	239	11,79	11,76
Glicerol	35	1,36	1,63
	80	3,17	3,53
	119,5	7,43	7,42
	167,5	8,91	8,86
	239	9,02	9,04
Azúcares totales	35	144,25	144,92
	80	130,28	127,79
	119,5	73,96	76,96
	167,5	16,29	19,44
	239	3,17	10,70
Razón glucosa/fructosa	35	0,64	0,64
	80	0,58	0,56
	120	0,40	0,40
	168	0,12	0,10

El comportamiento observado tanto para la formación de glicerol como de consumo de azúcar es similar para ambos biorreactores, y siguen la tendencia esperada para ambos compuestos durante la fermentación. La concentración final de azúcar presentada en el R4L no es concordante con lo esperado ni con el resto de los resultados observados, se cree que el valor informado no es el correcto lo cual se puede deber un error de medición.

A continuación, se informan los rendimientos de producción de etanol a partir de azúcares para la fermentación 3, y un promedio de los valores obtenidos para R0,5L en la etapa anterior, los cuales se muestran en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11: Resultados de rendimiento de sustrato por producto en fermentación de escalamiento

Hora		Azúcar g/L	Etanol g/L	Yp/s
80 (antes inóculo secuencial)	R0,5L	108,231	29,846	0,279
	R2L	130,277	19,131	0,226
	R4L	127,793	20,130	0,231
261,5 (final)	R0,5L	4,037	98,038	0,465
239 (final)	R2L	3,174	103,638	0,489
	R4L	10,699	103,332	0,506

Estos datos son concordantes con los mostrados anteriormente de la velocidad específica de crecimiento, ya que previo a la inoculación secuencial el reactor de 0,5L posee 10 g/L más de etanol y al mismo tiempo ha consumido 10 g/L más azúcar que los biorreactores, comprobando que las fermentaciones realizadas para el escalamiento poseen una menor velocidad de crecimiento. Los datos presentados para el último punto del R4L, también dan a entender que existe un problema de medición en la concentración de etanol final ya que la concentración de etanol producida es similar a la del R2L e incluso mayor que la reportada para R0,5L, por lo que no es posible que este fermentador presente más de 10 g/L de azúcares totales al terminar la fermentación alcohólica.

4.3.3 Medición de compuestos volátiles

Se realiza la medición de compuestos volátiles para cada uno de los biorreactores en duplicado se encuentran 35 diferentes para cada fermentador, sin embargo, al comparar los compuestos obtenidos con la fermentación secuencial de la etapa anterior se encuentran 13 en común, los cuales se presentan en la Tabla 4.12. Los valores presentados corresponden al promedio de las áreas de los picos obtenidos en cada medición.

Tabla 4.12: Compuestos volátiles comunes en fermentaciones secuenciales de fermentaciones secuenciales a distintos volúmenes realizadas en la etapas 2 y 3

Cas	Tipo	Nombre compuesto	Aroma	R0,5L	R2L	R4L
60-12-8	Alcohol	Alcohol fenetílico	Floral, flores de rosas secas	3,19±0,08A	1,03±0,04B	1,17±0,01B
123-92-2	Ester	Acetato de isoamilo	Dulce, frutal, banana, solvente	21,17±0,64A	11,25±0,18B	12,22±0,52 B
123-66-0	Ester	Hexanoato de etilo	Dulce, frutal, piña, ceroso, banana	4,35±0,37A	6,35±0,04A	6,92±0,29A
142-92-7	Ester	Etanoato de etilo	Frutal, manzana, banana, dulce	8,55±0,44A	3,84±0,17B	4,55±1,17B
106-32-1	Ester	Octanoato de etilo	Frutal, vino, ceroso, dulce, damasco, banana, brandy, pera	14,84±0,32A	19,88±0,52A B	20,08±0,07 B
112-14-1	Ester	Acetate de heptil	Terroso, hongo, herbaceo, ceroso	0,28±0,01A	0,14±0,01AB	0,16±0,01B
2198-61-0	Ester	Hexanoato de isoamilo	Frutal, banana, manzana, piña, acre, agrio, queso	0,18±0,01A	0,20±0,01A	0,18±0,01A
103-45-7	Ester	Acetato de feniletilo	Floral, rosas, dulce, miel, frutal, tropical	7,32±0,79A	5,46±0,25A	6,81±0,06A

123-29-5	Ester	Nonanoato de etilo	Frutal, rosas, ceroso, ron, vino, tropical	0,11±0,02A	0,20±0,01AB	0,23±0,01B
110-38-3	Ester	Decanoato de etilo	Dulce, ceroso, frutal, manzana, uva, aceitoso, brandy	17,88±2,03A	23,30±1,66A	21,34±2,41A
2035-99-6	Ester	Octanoato de isoamilo	Dulce, aceitoso, frutal, jabón, piña, coco, cera	0,27±0,08A	0,63±0,01B	0,50±0,04AB
106-33-2	Ester	Laurato de etilo	Dulce, ceroso, floral, jabonoso	8,82±0,48A	6,83±0,53AB	6,26±0,28B
628-97-7	Ester	Hexadecanoato de etilo	Ceroso suave, frutal, cremoso, lechoso, balsamo	0,20±0,04A	0,09±0,01A	0,13±0,06A

*Los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar de matraces idénticos medidos en duplicado para cada caso. Datos con diferentes letras en las columnas representan diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

De los datos presentados se puede destacar que no existen diferencias significativas en ninguno de los compuestos para los reactores de R2L y R4L, sin embargo, existen 8 datos con diferencias significativas con R0,5L, esto da a entender que si bien en el comportamiento general de la fermentación secuencial fue similar para los 3 volúmenes de control estudiados la producción de compuestos volátiles aumento en la de mayor volumen y las áreas promedios de los picos presentados también muestran diferencias significativas en la mayoría de los compuestos comunes.

A continuación, en la Tabla 4.13 se presentan los 15 compuestos extras que son solo comunes entre ambos fermentadores usados en la etapa de escalamiento, es importante mencionar que no existen diferencias significativas entre los biorreactores de 2,5 y 4L para ninguno de los compuestos.

Tabla 4.13: Compuestos volátiles comunes en sólo en las fermentaciones de la tercera etapa

Cas	Tipo	Nombre compuesto	Aroma	R2L	R4L
123-51-3	Alcohol	Alcohol isoamílico	Fusel, aceitoso, alcohólico, frutal, banana, whiskey	4,90±0,54	5,19±0,40
137-32-6	Alcohol	2-metil 1-butanol	Tostado, vino, frutal, fusel, alcohol, cebolla, whiskey	1,27±0,31	1,44±0,03
78-83-1	Alcohol	Alcohol isobutilico	Etéreo, vinoso	1,12±0,33	1,84±0,18
3299-32-9	Carboxila -to	1, 3- Dixolan, 2,4,5-trimetil-	Sin información	0,12±0,01	0,15±0,02
105-54-4	Ester	Butirato de etilo	Frutal, jugo frutal, piña, cognac	0,41±0,02	0,44±0,01
141-78-6	Ester	Acetato de etilo	Etéreo, frutal, dulce, mala hierba	3,33±0,25	3,60±0,16
110-19-0	Ester*	Acetato de isobutilo	Etéreo, frutal, dulce, banana, mala hierba	0,32±0,05	0,38±0,03
35897-13-3	Ester	1-pentanol, 3-metil-, acetato	Sin información	0,12±0,02	0,11±0,01
42125-17-7	Ester	4-Hexen-1-ol, acetate, (Z)-	Sin información	0,30±0,05	0,37±0,01
106-30-9	Ester	Heptanoato de etilo	Frutal, piña, ron, vino, cognac	0,08±0,01	0,08±0,01
624-13-5	Ester	Octanoato de propilo	Coco, gin	0,12±0,01	0,09±0,00
110-42-9	Ester	Decanoato de metilo	Aceitoso, vino, frutal, floral	0,40±0,01	0,38±0,00

150-84-5	Ester*	Acetato de citronelilo	Floral, rosas, frutal, citrico, leñoso, tropical	0,18±0,04	0,17±0,03
112-17-4	Ester	Acetato de decilo	Ceroso, fresco, citrico, jabonoso	0,11±0,01	0,10±0,00
30673-38-2	Ester	Decanoato de isobutilo	Aceitoso, dulce, brandy, damasco, fermental, cognanc	0,09±0,01	0,09±0,01

*Los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar de matraces idénticos medidos en duplicado para cada caso.

Al presentarse más de 30 compuestos volátiles presentes luego de la fermentación secuencial realizada en la etapa de escalamiento, se comprueba que el uso de *Pichia sp.*, aumenta la complejidad del perfil aromático del producto final. Los compuestos que en su mayoría son esteres se asocian a aromas deseados en el vino resaltando el carácter frutal, floral y dulce.

De todos los compuestos presentados solo coinciden 1, 3- Dixolan, 2,4,5-trimetil-, Acetato de isobutilo Acetato de citronelilo con los compuestos asociados para este tipo de fermentación en el único estudio encontrado con esta levadura (Whitener et al., 2017).

Según lo expuesto en esta última fermentación se puede presumir que el escalamiento de las fermentaciones secuencial si bien, no presentan diferencias significativas en el proceso fermentativo, si las posee a la hora de evaluar la composición volátil aumentando la variedad de compuestos aromáticos que en su mayoría deseados en el vino.

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

En este estudio se realizaron fermentaciones monocultivo de *Pichia sp.* y de *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales presentan diferencias significativas en el tiempo de fermentación en donde *Pichia sp.*, tarda 40 horas más, lo cual se debe a que presenta una fermentación ralentizada, presentando una velocidad específica de crecimiento un 78% menor al control.

No se presentaron diferencias en las concentraciones finales de azúcar, glicerol y etanol, es decir, *Pichia sp.* en fermentación monocultivo logra una concentración final de etanol 9,57%v/v, demostrando su alta tolerancia a dicho compuesto, y al no presentar diferencias significativas con la fermentación control no se puede asegurar que su uso permita una reducción en el grado alcohólico. No es posible contrastar estos resultados ya que no existen estudios previos donde realicen fermentaciones monocultivos de *Pichia sp.*

En la segunda etapa del estudio se realiza una fermentación secuencial, en esta se inocula *S. cerevisiae* 80 horas después de haber iniciado la fermentación con *Pichia sp.*, la cual tarda 100 horas más que la fermentación de control en terminar el proceso, ambas se logran concentraciones de azúcar finales inferiores a los 5 g/L, y no se observan diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos como lo son la velocidad específica, rendimiento ni etanol.

Se concluye que *Pichia sp.* inoculada secuencialmente no posee efectos en la producción de etanol durante la fermentación alcohólica las concentraciones finales obtenidas son de 11,15 y 11,09%v/v para *Pichia sp.* (secuencial), y fermentación de control respectivamente, esto concuerda con estudios previos realizados a dicho microorganismo.

No obstante, lo anterior en el análisis de compuestos volátiles se encontraron 14 compuestos comunes para ambas fermentaciones, de los cuales 8 presentan diferencias significativas en el promedio de las áreas obtenidas, el perfil aromático para la fermentación secuencial posee en su mayoría aromas asociados a flores, rosas, y frutas, pero a su vez la fermentación de control posee un perfil más amplio de compuestos ya que además de los comunes existen 8 que no posee *Pichia sp.*

Por último, en la tercera etapa de escalamiento se comprueba que las fermentaciones con inoculación secuencial de *Pichia sp* - *S. cerevisiae* posee un comportamiento similar en 3 volúmenes de control diferentes, con esto se espera que al seguir aumentando el volumen de fermentación el comportamiento siga la misma tendencia. La concentración de etanol final obtenida es de 11,15 %v/v para el reactor de 0,5L y de 11,79 y 11,76%v/v para los de 2,5 y 4L respectivamente, con estos resultados se confirma que la metodología planteada no posee efecto en la producción de etanol.

Además, se realiza la comparación de compuestos volátiles obtenidos, dentro de los resultados más interesantes destaca el aumento de variedad en la composición volátil, ya que solo existen 13 compuestos que sean comunes entre las 3 fermentaciones secuenciales, y en la fermentación de 0,5L solo se presentan 20 compuestos diferentes, pero en las fermentaciones de mayor escala se obtuvieron 35 compuestos comunes para las fermentaciones en donde destacan los compuestos precursores de aromas frutales y dulces con 17 y 11 subproductos de la fermentación asociados a estos aromas respectivamente que en su mayoría corresponden a esteres.

Esto último concuerda con lo presentado por Röcker et al., (2016), ya que en dicho estudio concluyen que los vinos que presentan mejor perfil aromático son aquellos en los que se logra una menor reducción de etanol, en este estudio si bien no se obtuvieron diferencias en las concentraciones de etanol final, los compuestos aromáticos son interesantes y diversos por lo que se puede esperar un producto diferenciador y de interés para el consumidor.

CAPITULO 6. RECOMENDACIONES

En primer lugar, se recomienda realizar más fermentaciones de la forma monocultivo, para comprobar la resistencia de *Pichia sp.* al etanol y su capacidad de consumir el total de azúcar fermentable, además se sugiere hacer medición de compuestos volátiles de estas fermentaciones con el fin de asegurar que no presente aromas que sean defectuosos. De tener resultado favorables sería interesante realizar fermentaciones a mayor volumen con esta técnica, ya que en caso de que pueda ser utilizada en la industria permitiría un ahorro en insumos de levaduras.

Por otra parte, se obtienen buenos resultados de las fermentaciones con inoculación secuencial, si bien aumentan los compuestos volátiles se desconoce el comportamiento de una fermentación control, por lo que se podría aumentar el volumen de control y comprobar si el comportamiento sigue la tendencia demostrada en el presente estudio, y comprobar las diferencias existentes con la composición volátil de una fermentación control al mismo volumen.

Se recomienda probar nuevas configuraciones de aireación y adiciones de nitrógeno para ver su efecto en la producción de etanol, además de modificar el protocolo de fermentación con el fin comprobar si al modificar el tiempo al cual se inocula *S. cerevisiae* afecta a los resultados finales.

Finalmente, al tener fermentaciones alcohólicas de mayor volumen, se recomienda continuar con la fermentación manoláctica, y estabilización del producto para realizar un panel sensorial a ciegas con el fin de tener resultados en donde se pueda apreciar si el consumidor final es capaz de captar las diferencias existentes entre los productos y si los aromas y sabores detectados son preferidos por sobre un vino producido solo con *S. cerevisiae*.

CAPITULO 7. REFERENCIAS

- America retail. (2016). Chile: Pioneros con el 88% del mercado local Concha y Toro, San Pedro y Santa Rita. Retrieved from <https://www.america-retail.com/chile/chile-pioneros-con-el-88-del-mercado-local-concha-y-toro-san-pedro-y-santa-rita/>
- Aprender de vino. (2019). Vinos de Chile: Clima, Viñedo y Variedades. Retrieved from <https://www.aprenderdevino.es/chile-variedades-clima/>
- Ballester-Tomás, L., Prieto, J. A., Gil, J. V., Baeza, M., & Randez-Gil, F. (2017). The Antarctic yeast *Candida sake*: Understanding cold metabolism impact on wine. *International Journal of Food Microbiology*, 245, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.009>
- Benito, S. (2018). The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>
- Canonico, L., Comitini, F., & Ciani, M. (2018). *Torulaspora delbrueckii* for secondary fermentation in sparkling wine production. *Food Microbiology*, 74, 100–106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.009>
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., & Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research*, 181, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005>
- Chen, K., Escott, C., Loira, I., del Fresno, J. M., Morata, A., Tesfaye, W., ... Benito, S. (2018). Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiology*, 69, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.018>
- Coleman, M. C., Fish, R., & Block, D. E. (2007). Temperature-dependent kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5875–5884. <https://doi.org/10.1128/AEM.00670-07>
- Contreras, A., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Yeast population dynamics reveal a potential ‘collaboration’ between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation.

Applied Microbiology and Biotechnology, 99(4), 1885–1895.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6193-6>

Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Evaluation of Non-Saccharomyces Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1670–1678. <https://doi.org/10.1128/aem.03780-13>

Corrales Bayón, J. (2016). *Desalcoholización en vinos*. Universidad de Valladolid. Retrieved from <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/19990>

De Martin, A. M. (2005). *Control del metabolismo de Saccharomyces cerevisiae en la síntesis de glutatión*. (Editorial de la Universidad de Granada, Ed.). UNIVERSIDAD DE GRANADA.

Del Fresno, J. M., Morata, A., Loira, I., Bañuelos, M. A., Escott, C., Benito, S., ... Suárez-Lepe, J. A. (2017). Use of non-Saccharomyces in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality. *European Food Research and Technology*, 243(12), 2175–2185. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2920-4>

Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Ortiz-Julien, A., Gerbi, V., ... Cocolin, L. (2016). Starmerella bacillaris and Saccharomyces cerevisiae mixed fermentations to reduce ethanol content in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5515–5526. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7413-z>

Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., ... Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non- Saccharomyces/Saccharomyces yeasts. *Food Research International*, 112, 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.06.018>

Garay, G. (2015). *EVALUACIÓN DEL USO DE UN SENSOR DE DIÓXIDO DE CARBONO DISUELTO (DCO2) PARA EL MONITOREO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA EN LA FASE EXPONENCIAL*. UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA.

Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M.

- (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, 33(2), 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- Jackson, R. (2008). *Wine Science*. (ELSEVIER, Ed.) (Third Edit). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373646-8.50004-4>
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma: a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(1), 97–129.
- Longo, R., Blackman, J. W., Antalick, G., Torley, P. J., Rogiers, S. Y., & Schmidtke, L. M. (2018). A comparative study of partial dealcoholisation versus early harvest: Effects on wine volatile and sensory profiles. *Food Chemistry*, 261(December 2017), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.013>
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2012). Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012>
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. (M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo, Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>
- Müller, K. (2004). Chile vitivinícola en pocas palabras. *Revista de Enología*. Retrieved from http://www.acenologia.com/ciencia69_01.htm
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. (2019). No Title. Retrieved from <https://www.odepa.gob.cl/rubros/vinos-y-alcoholes>
- OIV. (2019a). *Aspectos de la coyuntura mundial*.
- OIV. (2019b). *Compendium of international Methods of Wine and must Analysis*. *International Organisation of vine and wine*.
- Paterson, R. R. M., Venâncio, A., Lima, N., Guilloux-Bénatier, M., & Rousseaux, S. (2018). Predominant mycotoxins, mycotoxigenic fungi and climate change related to wine.

- Food Research International*, 103(September 2017), 478–491.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.080>
- Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Rodríguez-Bencomo, J., Cano-Mozo, E., González-Huerta, C., & Herrera, P. (2008). Estudio de desalcoholización parcial en vinos blancos y tintos. *Bulletin de l' OIV*, 81(932–934), 541–549.
- Pszczółkowski, P., & Ceppi de Lecco, C. (2011). *Manual de vinificación*. (Ediciones Universidad Católica de Chile, Ed.) (Primera Ed).
- Raina M.Maier. (2009). Bacterial Growth. *Environmental Microbiology*, 37–54.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00003-1>
- Röcker, J., Strub, S., Ebert, K., & Grossmann, M. (2016). Usage of different aerobic non-Saccharomyces yeasts and experimental conditions as a tool for reducing the potential ethanol content in wines. *European Food Research and Technology*, 242(12), 2051–2070. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2703-3>
- Rossouw, D., & Bauer, F. F. (2016). Exploring the phenotypic space of non-Saccharomyces wine yeast biodiversity. *Food Microbiology*, 55, 32–46.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.017>
- Ruiz, E., Busto, M. D., Ramos-Gómez, S., Palacios, D., Pilar-Izquierdo, M. C., & Ortega, N. (2018). Encapsulation of glucose oxidase in alginate hollow beads to reduce the fermentable sugars in simulated musts. *Food Bioscience*, 24(June), 67–72.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.06.004>
- Sablayrolles, J. M. (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*, 42(4), 418–424.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.016>
- Sainz, D., Calvo, J., & Fernández, E. (2017). *Aplicación de nanofiltración por membrana y pervaporación para la desalcoholización de vinos comerciales y recuperación de aromas*. Universidad de valladolid.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine*

Research, 11(2), 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>

Varela, C., Barker, A., Tran, T., Borneman, A., & Curtin, C. (2017). Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 252, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.002>

Varela, C., Kutyna, D. R., Solomon, M. R., Black, C. A., Borneman, A., Henschke, P. A., ... Chambers, P. J. (2012). Evaluation of Gene Modification Strategies for the Development of Low-Alcohol-Wine Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6068–6077. <https://doi.org/10.1128/aem.01279-12>

Varela, J., & Varela, C. (2019). Microbiological strategies to produce beer and wine with reduced ethanol concentration. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.10.003>

Vinotec. (2019). Wineferm. Retrieved from https://www.vinotec.com/images/pdf/vinotec_wineferm.pdf

Whitener, M. E. B., Stanstrup, J., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M., & Vrhovsek, U. (2017). Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(2), 179–192. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12269>

Zumárraga, M., & Barbero, F. (n.d.). Contribución organoléptica en la vinificación. *Asociación de Bodegas de Rioja Alavesa*.

CAPITULO 8. ANEXOS

8.1 TABLA DE PRINCIPALES COMPUESTOS AROMÁTICOS

Tabla 8.1: Principales compuestos aromáticos del vino. Fuente: Adaptado de (Swiegers, Bartowsky, Henschke, & Pretorius, 2005)

1	Concentración en el vino [mg/L]	Umbral de aroma [mg/L]	Descriptor de aroma
Acetato de etilo	22,5 - 63,5	7,5 (10% etanol)	Esmalte de uñas, floral
Acetato isoamilo	0,1 - 3,4	0,03 (10% etanol)	Banana, pera
Acetato 2-feniletilo	0 - 18,5	0,25 (10% etanol)	Floral, rosa, frutal
Acetato isobutilo	0,01 - 1,6	1,6 (cerveza)	Banana, frutal
Acetato de hexilo	0 - 4,8	0,7 (vino)	Dulce, perfume
Butanoato de etilo	0,01 - 1,8	0,02 (10% etanol)	Floral, frutal
Hexanoato de etilo	0,03 - 3,4	0,05 (10% etanol)	Manzana verde
Octanoato de etilo	0,05 - 3,8	0,02 (10% etanol)	Jabón dulce
Decanoato de etilo	0 - 2,1	0,2 (vino sintético)	Flora, jabón
Propanol	9,0 - 68	500 (vino)	Acre, duro
Butanol	0,5 - 8,5	150 (10% etanol)	Fusel, espirituoso
Isobutanol	9,0 - 174	40 (10% etanol)	Fusel, espirituoso
Alcohol isoamilo	6,0 - 490	30 (10% etanol)	Duro, esmalte de uñas
Hexanol	0,3 - 12,0	4 (vino)	Césped verde
2-Feniletanol	4,0 - 197	10 (10% etanol)	Floral, rosa, frutal
Ácido acético	100 - 1150	280 (10% etanol)	Vinagre
Acetaldehído	10,0 - 75,0	100 (vino)	Sherry, nuez, manzana magullada

Diacetilo	<5	0,2 (vino) / 2,8 (vino tinto)	Mantecoso
Glicerol	5,0 - 14 [g/L]	5,2 [g/L] (vino)	Inodoro (sabor ligeramente dulce)
Linalool	0,0017 - 0,010	0,0015 (agua) / 0,025 (vino sintético)	Rosa
Geraniol	0,001 - 0,044	5 (agua) /30 (10% etanol)	Rosa
Citronellol	0,015 - 0,042	8 (agua) /100 (10% etanol)	Citronela
2-Acetil-1-pirrolina	Traza	0,0001 (agua)	Ratoncito
2-Acetil tetrahidropiridina	0,0048 - 0,1	0,0016 (agua)	Ratoncito
4-Etilfenol	0,012 - 6,5	0,14 (10% etanol) /0,6 (vino tinto)	Medicina, corral
4-Etil guaiacol	0,001 - 0,44	0,033 (agua) / 0,11 (vino tinto)	Fenólico, dulce
4-Vinil fenol	0,04 - 0,45	0,02 (agua)	Farmacéutico
4-Vinil guaiacol	0,0014 - 0,71	10 (agua)	Clavo de olor, fenólico

8.2 PROTOCOLO GENERAL DE FERMENTACIÓN

En general el protocolo de fermentación del vino se puede dividir en los siguientes pasos:

- Esterilización de materiales
- Acondicionamiento del mosto
- Preparación del inóculo
- Preparación del fermentador y condiciones operacionales
- Seguimiento de la fermentación

8.2.1 Esterilización de materiales

Todo el material de vidrio que vaya a ser utilizado durante el proceso de fermentación debe ser esterilizado mediante el autoclave. La esterilización se realiza según lo especificado en el manual del equipo descrito resumidamente en el anexo punto 3.2.4.1, se recomienda envolver todo el material en papel Kraft y utilizar cinta de autoclave para verificar el correcto funcionamiento del procedimiento.

Por otra parte, los utensilios que no puedan ser introducidos al autoclave, como el material de plástico, mangueras, airlock, etc. Se deben dejar durante 24 horas en una solución de metabisulfito al 2% con el fin de disminuir la carga bacteriana presente, ya que esto solo desinfecta, pero no esteriliza los materiales.

Procedimiento:

1. Se prepara una solución de Metabisulfito de potasio con una concentración del 2%, cuyo volumen sea capaz de cubrir todo el material que se necesite higienizar.
2. Se sumergen en totalidad los implementos dentro de la solución y se dejan reposar en un recipiente tapado durante 24 horas.
3. Preferentemente bajo campana o con mascarilla, Se vierte agua hirviendo dentro de la solución para la eliminación de gran parte del SO_x generado.
4. Finalmente se lavan los instrumentos con agua destilada, estos deben ser utilizado de forma inmediata.

8.2.2 Acondicionamiento del mosto

En primer lugar, se descongela el mosto a temperatura ambiente, esto se debe realizar de forma gradual y se debe tener presente que una vez descongelado no se puede volver a congelar debido a que se pueden ver afectadas las características organolépticas del mosto.

Procedimiento:

1. En caso de ser necesario ajustar los sulfitos hasta dejarlos en 35 ppm de SO₂ libre, esto se realiza con una solución de metabisulfito al 10%, lo cual equivale a una solución de SO₂ al 5%
2. Ajuste de pH hasta dejar el mosto en 3,55 esto realiza con soluciones de ácido tartárico o carbonato de potasio según corresponda.

3. Se realiza el ajuste de YAN hasta 250 mg/L con una solución de diamonio fosfato, y además se añaden 3 g/L del suplemento Wineferm.
4. Finalmente se vuelve a realizar un ajuste de pH para asegurar que se comience el proceso con un pH de 3,55.

8.2.3 Preparación del inóculo

Existen dos metodologías para la preparación del inóculo la primera es la preparación prolongada y la segunda la preparación rápida. La dosis de levadura utilizada en general depende de la recomendación del fabricante, además se recomienda que la diferencia de temperatura entre el mosto y el inóculo no supere los 5°C al momento de la inoculación esto con el fin de evitar los choques térmicos que pueden disminuir la población del microorganismo. A continuación, se detalla el paso a paso de cada una de las preparaciones.

Procedimiento preparación prolongada del inóculo

1. Utilizar material estéril, para el procedimiento.
2. En matraz Erlenmeyer de 250 mL, poner 20 ml de agua destilada y 20 ml del medio de cultivo a utilizar, todo medido con probeta.
3. Dejar el medio en shaker a 28 °C
4. Pesar 0,5 g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia* (por separado, marcar los utensilios utilizados para cada levadura con el fin de evitar la contaminación cruzada).
5. Cuando el sistema haya alcanzado la temperatura, echar la levadura y mezclar (verificar que no quede excesos de levadura en las paredes).
6. Mantener la temperatura del sistema a 28 °C y 100 RPM durante 48 horas.
7. Finalmente, sacar muestra para realizar conteo celular y dejar a temperatura ambiente.

Procedimiento de preparación rápida:

1. Utilizar material estéril, para el procedimiento.
2. En un vaso precipitado de 200 ml, poner 20 ml de agua destilada y 20 ml del medio de mosto, medir los volúmenes con probeta.
3. Pesar 4 g de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

4. Dejar el medio en placa calefactora y dejarlo en 37 °C, cuando haya alcanzado la temperatura agregar la levadura y mezclar sacando los excesos de levadura de las paredes.
5. Mantener la temperatura del sistema a 37,5 ±1 °C.
6. Agitar a los 5,15 y 30 min desde el comienzo del proceso.
7. Luego de los 30 minutos dejar enfriar a temperatura ambiente (lentamente).
8. Se realiza conteo celular para determinar el volumen de inóculo necesario en el fermentador.

8.2.4 Preparación del fermentador y condiciones operacionales

La fermentación ocurre dentro de matraces que se introducen al shaker, en donde se mantiene una temperatura ambiental constante de 25 °C, además de una agitación de 100 RPM que permita mantener a las levaduras en suspensión durante el proceso. Si bien la fermentación transcurre en un medio anaerobio, al inocular el mosto se debe añadir oxígeno ya que esto permite el mejor crecimiento de los microorganismos, para lograr la saturación del medio se burbujea oxígeno durante 10 minutos y de esta forma se asume que la fermentación comienza en un medio saturado de oxígeno.

8.2.5 Seguimiento de la fermentación

La fermentación comienza una vez que entra en contacto la levadura con el mosto en el fermentador, durante este estudio solo se realizó el control de temperatura y agitación del medio, es decir, no se realizaron ajustes de pH ni de nitrógeno asimilable durante el proceso.

Depende de cada estudio cuales son las principales variables a monitorear en este caso se lleva un registro de densidad, sólidos solubles, turbidez, conteo celular, acidez total, YAN y pH.

Se debe tener presente que en el caso de las fermentaciones secuenciales la adición de *S. cerevisiae* se realiza en el momento en que la densidad haya disminuido entre 15 – 20 puntos, o bien cuando sólidos solubles reduzcan en 5 °Brix.

8.3 ANÁLISIS EXPERIMENTALES

8.3.1 Determinación de densidad

Materiales:

- Picnómetro
- Balanza con precisión de 0,001 g o superior

Procedimiento:

1. Llenar el picnómetro con agua destilada hasta el tope.
2. Secar con un pequeño trozo de papel los excesos o agua que este por fuera, se recomienda usar guantes.
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.

$$\rho(20^{\circ}\text{C}) \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{Masa picnómetro con muestra} - \text{masa picnómetro vacío}}{\text{Volumen picnómetro}}$$

*La densidad es altamente afectada por la temperatura, si la muestra ha sido congelada, llevar la muestra a 20[°C] antes de realizar el procedimiento.

8.3.2 Determinación de sólidos solubles

Materiales:

- Refractómetro

Procedimiento:

1. Apretar el botón “cal” del equipo y marcar el cero con agua destilada o desionizada.

2. Llevar la muestra a una temperatura cercana a 20°C y agitar la muestra para su homogeneidad.
3. Colocar una pequeña muestra en el prisma del refractómetro limpio, teniendo en cuenta que la muestra cubra uniformemente y que no presente burbujas toda la superficie del prisma.
4. Leer índice refractivo, y realizar al menos dos determinaciones de la muestra preparada.

8.3.3 Determinación de pH

Materiales:

- Vaso precipitado 100 mL
- pH-metro
- Soluciones buffer de calibración

Procedimiento:

1. Se calibra el electrodo siempre antes de realizar la medición, en este caso solo con los puntos buffer de pH 7 y pH 4.
2. Se toman aproximadamente 30 [mL] de la muestra.
3. Limpiar el electrodo en agua destilada y se seca.
4. Se introduce el electrodo en la muestra fresca.
5. Se estabiliza el pH y se registra el pH y la temperatura.

8.3.4 Determinación de acidez total (con potenciómetro)

Este protocolo puede presentar modificaciones dependiendo del tipo de potenciómetro, o titulador automático que se utilice. En este caso la medición se realiza con un titulador automático (marca LabTec).

Materiales:

- Vaso de muestreo
- Bureta respectiva conectada a solución de NaOH al 0,1 M
- Soluciones buffer de calibración

Procedimiento:

1. Se enciende el titulador y se realiza la calibración según las indicaciones del equipo con los estándares de pH 7 y 10. Lavar con agua destilada y secar cada vez que se cambie de solución.
2. Tomar 3 mL de muestra a medir y añadir agua hirviendo hasta completar los 60 mL aproximadamente
3. Se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente y se añade un imán para agitar la muestra
4. Ajustar el valor de pH a 7 y anotar el volumen de NaOH utilizado
5. Limpiar el electrodo con agua destilada y dejar en solución de almacenamiento.
6. La acidez total se determina mediante la siguiente formula.

$$Acidez \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{V_{NaOH \text{ añadido}} \cdot [NaOH]}{V_{muestra} \cdot e} \cdot PM_{\text{ácido equivalente}}$$

*La acidez se determina en mililitros equivalente de algún ácido comúnmente usado, en este caso es ácido sulfúrico (PM=98,08, e=2).

8.3.5 Determinación de nitrógeno disponible (con potenciómetro)

Materiales:

- Vaso de muestreo
- Bureta respectiva conectada a solución de NaOH al 0,1 M
- Soluciones buffer de calibración

Procedimiento:

1. Se enciende el titulador y se realiza la calibración según las indicaciones del equipo con los estándares de pH 7 y 10. Lavar con agua destilada y secar cada vez que se cambie de solución.
2. Tomar 3 mL de muestra a medir y añadir agua destilada hasta completar los 60 mL aproximadamente.
3. Se introduce el electrodo a la muestra y se agita con ayuda de un imán, luego se ajusta el pH a 8
4. Una vez ajustado en pH 8 se añaden 2 mL formalina al 37% (ajustada en pH 8) y se vuelve a realizar la titulación hasta pH 8.
5. Anotar el volumen de NaOH añadido en el segundo ciclo

6. Limpiar el electrodo con agua destilada y dejar en solución de almacenamiento.
7. El valor del YAN se obtiene mediante la siguiente formula.

$$YAN \left[\frac{mg}{L} \right] = \frac{V_{NaOH \text{ añadido}} [mL] \cdot [NaOH] \left[\frac{mol}{L} \right] \cdot PM_{nitrogeno} \left[\frac{g}{mol} \right]}{V_{muestra} [mL]} \cdot 1000 \left[\frac{mg}{g} \right]$$

8.3.6 Determinación de turbidez

Materiales:

- Turbidímetro
- Soluciones de calibración
- Frascos para muestras

Procedimiento:

1. Se calibra el equipo con 4 soluciones estándar siguiendo las instrucciones del manual
2. En el frasco de medición se introduce 1 mL de muestra y 9 mL de agua (todo medido con pipeta) y tapar el frasco.
3. Agitar vigorosamente el frasco, limpiar el exterior e introducir al equipo para medir.
4. Equipo entrega la medición final en NTU, al cual se le debe multiplicar el factor de dilución utilizado.

*En caso de estar fuera de rango realizar una dilución mayor

8.3.7 Determinación de células viables

Materiales:

- Cámara Neubauer.
- Cubre objeto.
- Microscopio óptico.
- Propipetas
- Matraz aforado de 50 y 100 mL.
- Solución azul metileno.
- Vortex de agitación.

Procedimiento:

1. Se debe diluir la concentración celular, para determinar la cantidad de diluciones se utiliza el valor entregado por la turbidez, la concentración óptima para el conteo es de 10^6 células/mL.
2. En un tubo eppendorf añadir 0,25 mL de agua destilada, 0,25 mL de la solución de azul metileno y 0,5 mL de la muestra diluida en el punto anterior.
3. Lavar y secar cuidadosamente la cámara Neubauer y cubre objeto, intentar eliminar polvo y no dejar restos de papel.
4. Agitar el tubo eppendorf en vortex de agitación por al menos 10 segundos.
5. Depositar una gota de muestra en la cámara con el cubreobjeto puesto con ayuda de una pipeta, el líquido penetra la cámara por capilaridad hasta que se observe una lámina uniforme y no sobrepase los límites demarcados.
6. Poner cámara en microscopio y ajustar el enfoque hasta llegar al lente de 40X
7. Se realiza conteo de células viables (que no estén teñidas por dentro) en 5 cuadrados de según protocolo de conteo, las células que tocan el límite superior o izquierdo de cada cuadro deben considerarse, pero no las que estén en el límite inferior o derecho de este.
8. Lavar y ordenar los equipos utilizados. El número total de células viables se obtiene a partir de:

$$\text{Concentración de células} \left[\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right] = \frac{n^{\circ} \text{ de células vivas} \cdot 10^6}{20 \cdot \text{dilución}}$$

8.4 VALORES DE T-STUDENT UTILIZADOS

En la Tabla 8.2 se muestran los valores de t dependiendo de los grados de libertad que se posean y nivel de significancia elegida. Se debe recordar que los grados de libertad corresponden n-1, siendo n el tamaño de la muestra.

Tabla 8.2: Valores de t - student con diferentes grados de libertad

Grados de libertad (v)	% de significancia (α)	Valor t
3	5%	3,182
2	5%	4,303
1	5%	12,706

Los intervalos de confianza se obtienen mediante (S corresponde a la desviación estándar muestral).

$$IC = \bar{X} \pm t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{S}{\sqrt{n}}$$

8.5 RESULTADOS DE FERMENTACIONES

8.5.1 Fermentación monocultivo

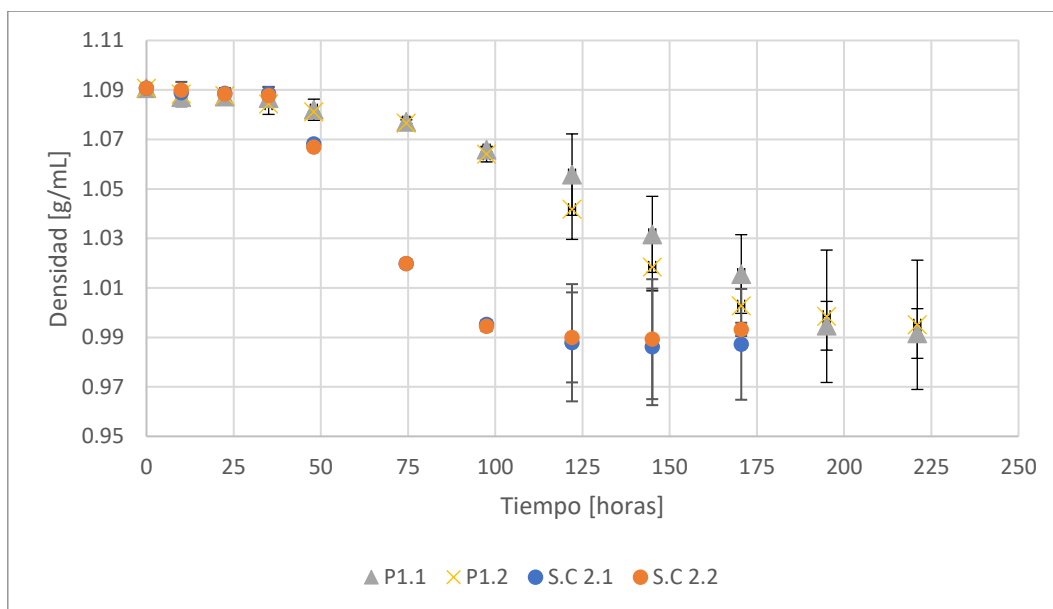


Figura 8.1: Gráfico de densidad en el tiempo de las 4 fermentaciones realizadas en F1

8.5.2 Fermentación secuencial

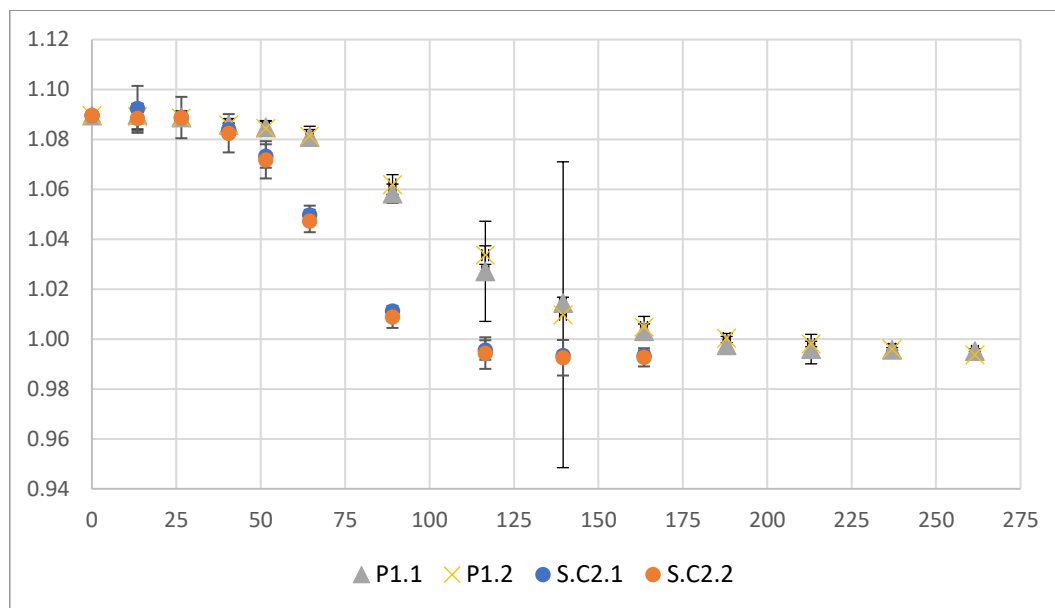


Figura 8.2: Gráfico de densidad en el tiempo de las 4 fermentaciones realizadas en F2

8.6 CÁLCULOS DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO

A continuación, se muestran los gráficos y líneas de tendencia de donde se obtuvieron los valores experimentales de las velocidades específicas presentas en el análisis de datos.

8.6.1 Fermentación monocultivo

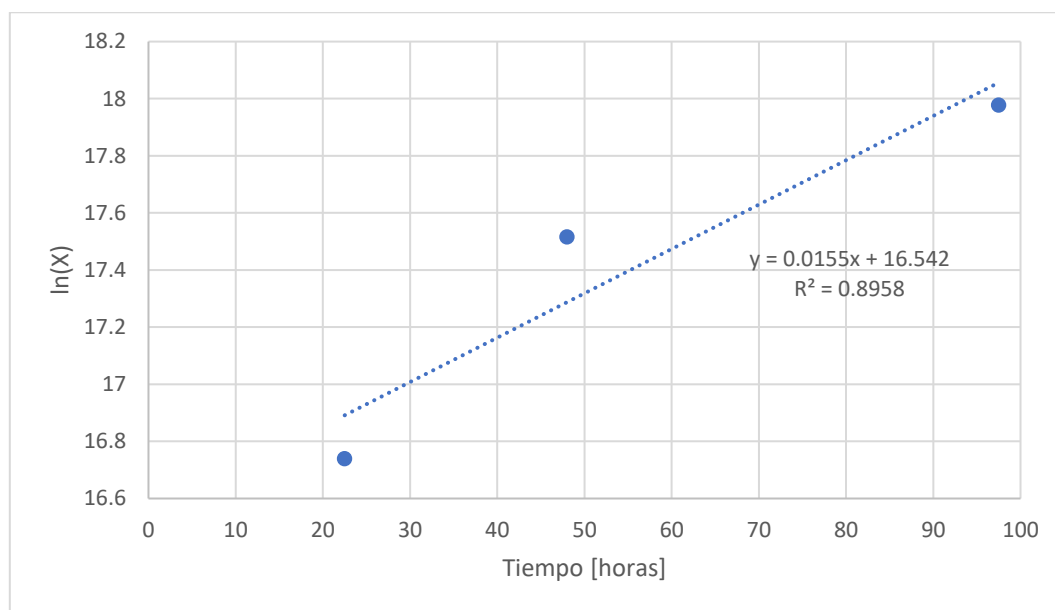


Figura 8.3: Obtención de velocidad específica de P1.1 en F1

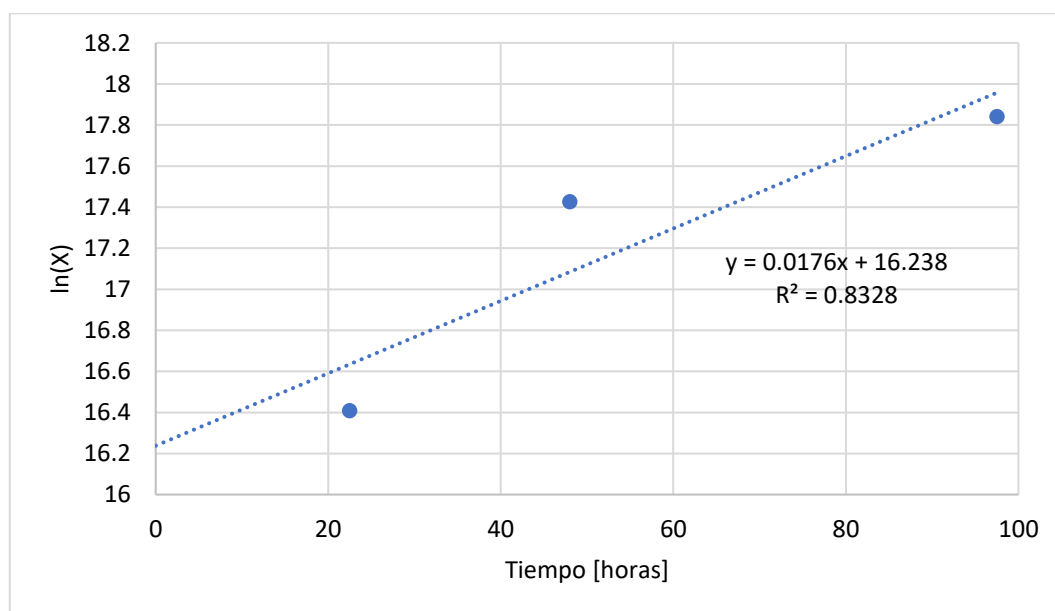


Figura 8.4: Obtención de velocidad específica de P1.2 en F1

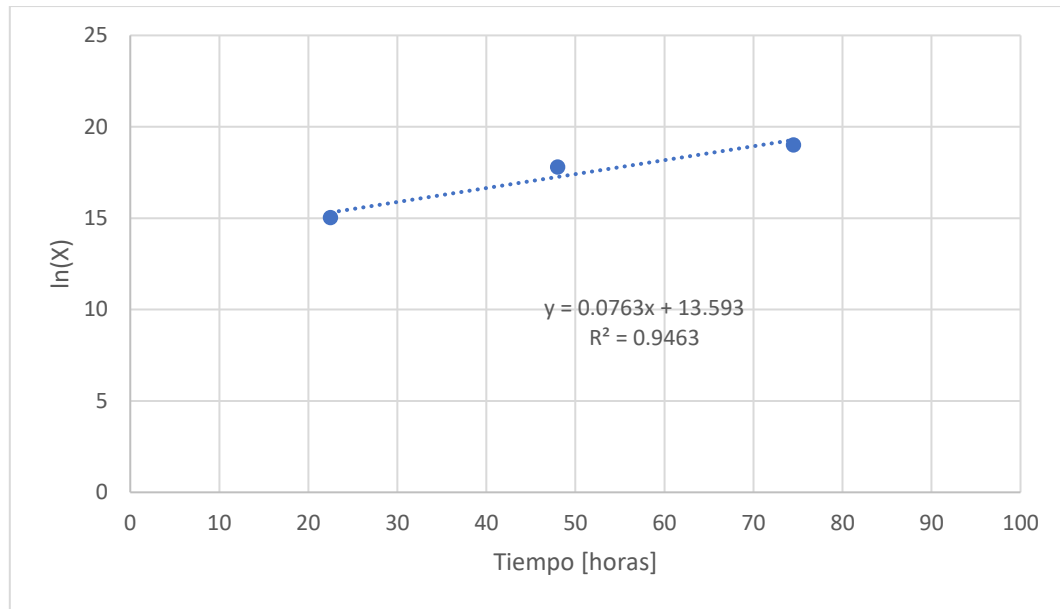


Figura 8.5: Obtención de velocidad específica de S.C 2.1 en F1

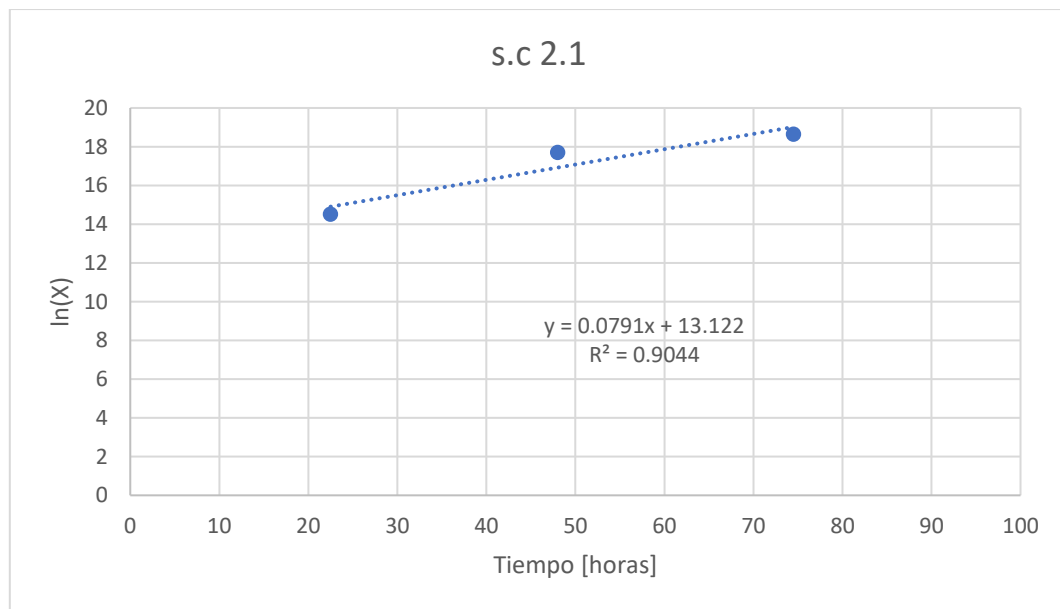


Figura 8.6: Obtención de velocidad específica de S.C 2.2 en F1

8.6.2 Fermentación secuencial

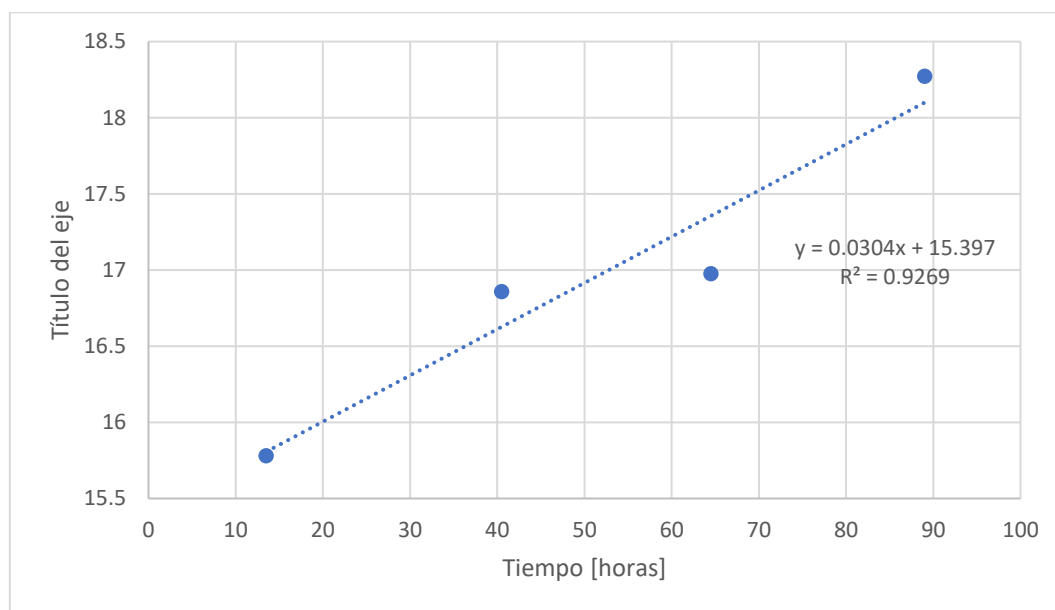


Figura 8.7: Obtención de velocidad específica de P1.1 en F2

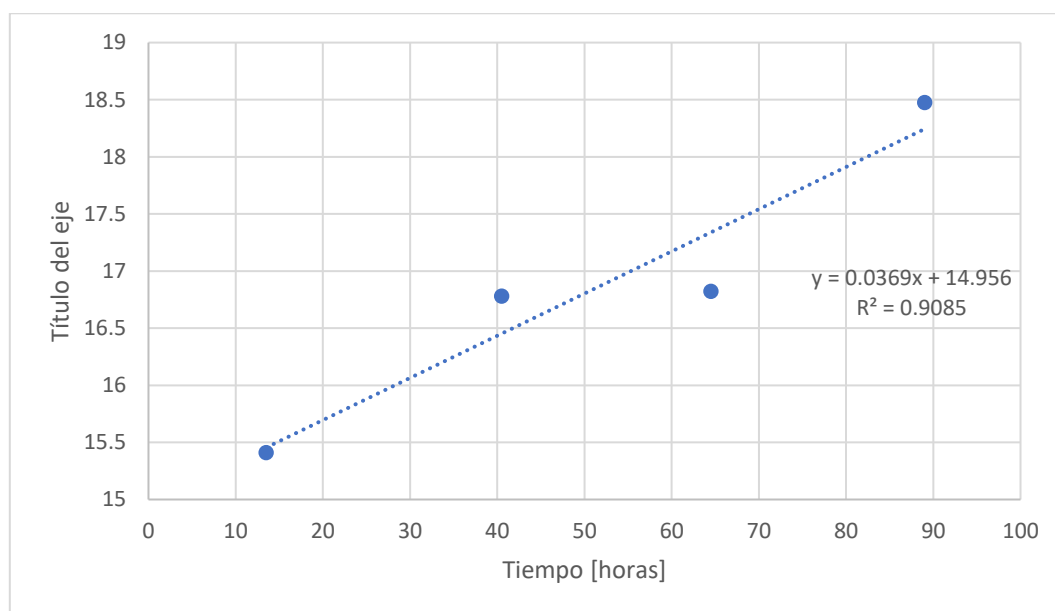


Figura 8.8: Obtención de velocidad específica de P1.2 en F2

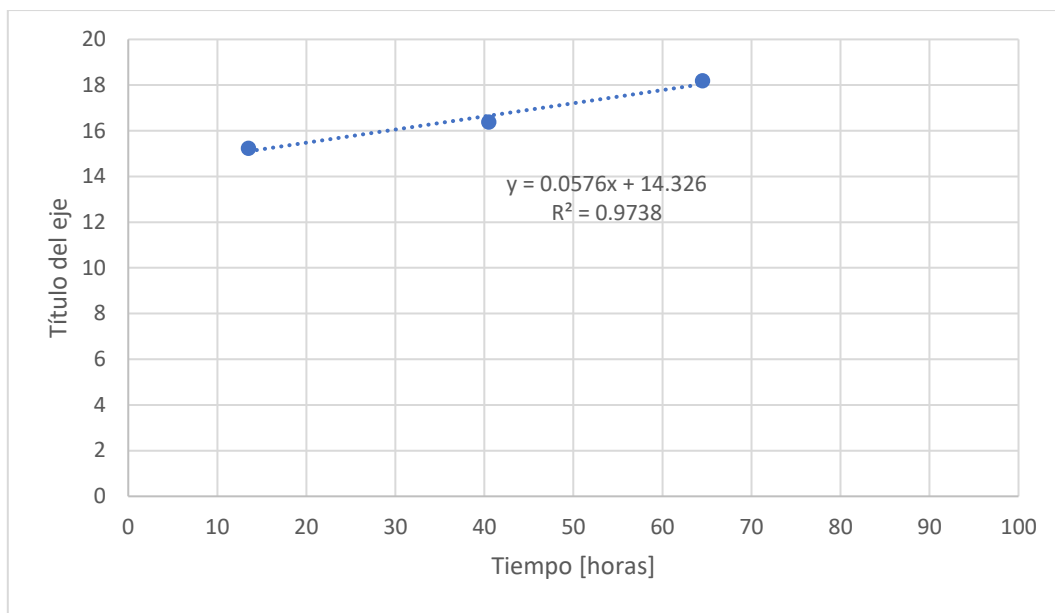


Figura 8.9: Obtención de velocidad específica de S.C 2.1 en F2

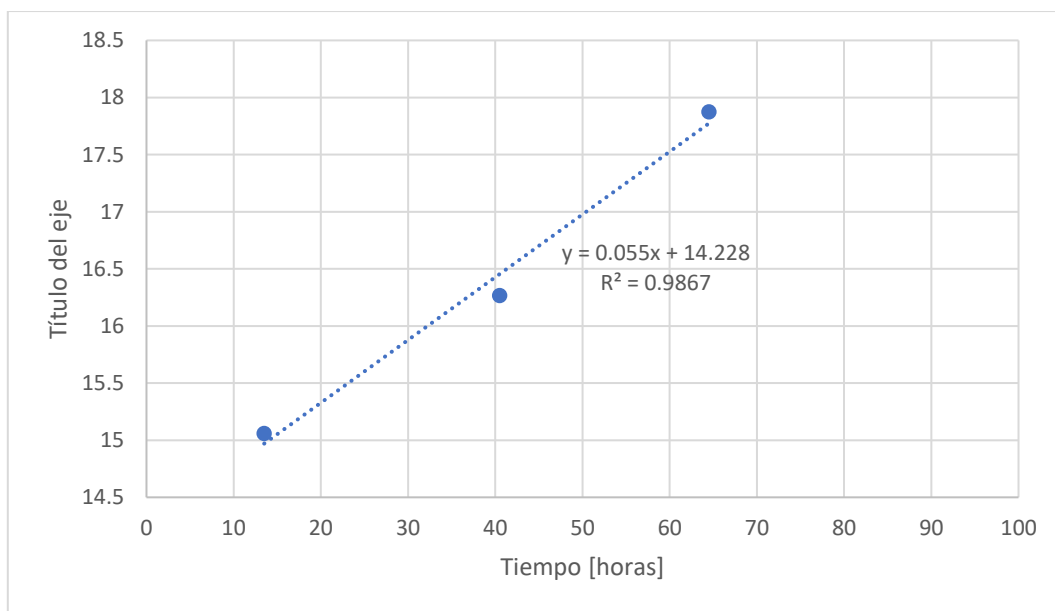


Figura 8.10: Obtención de velocidad específica de S.C 2.2 en F2

8.6.3 Fermentación de escalamiento

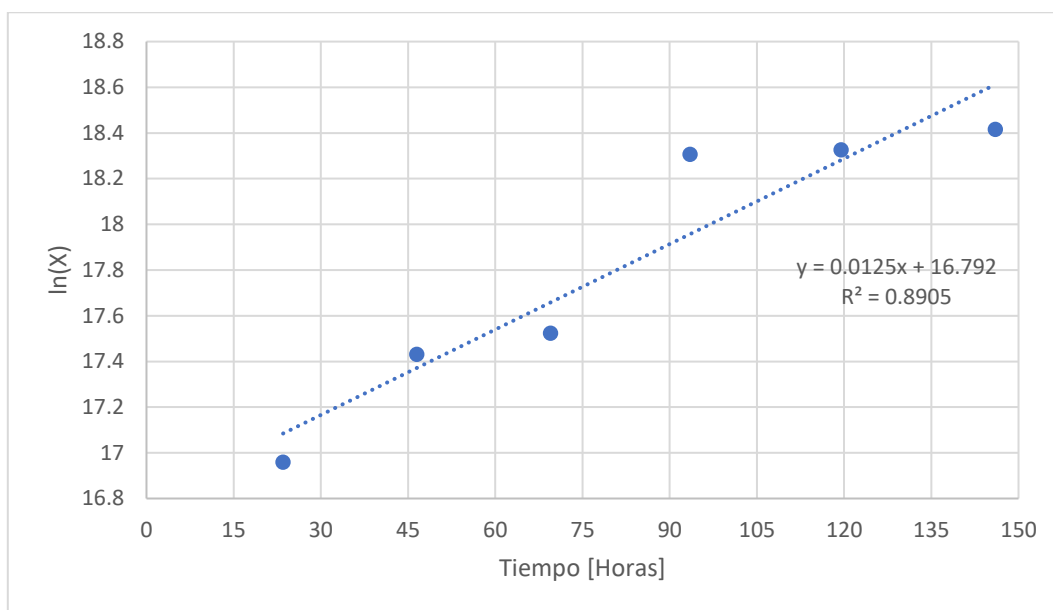


Figura 8.11: Obtención de velocidad específica de R2L en F3

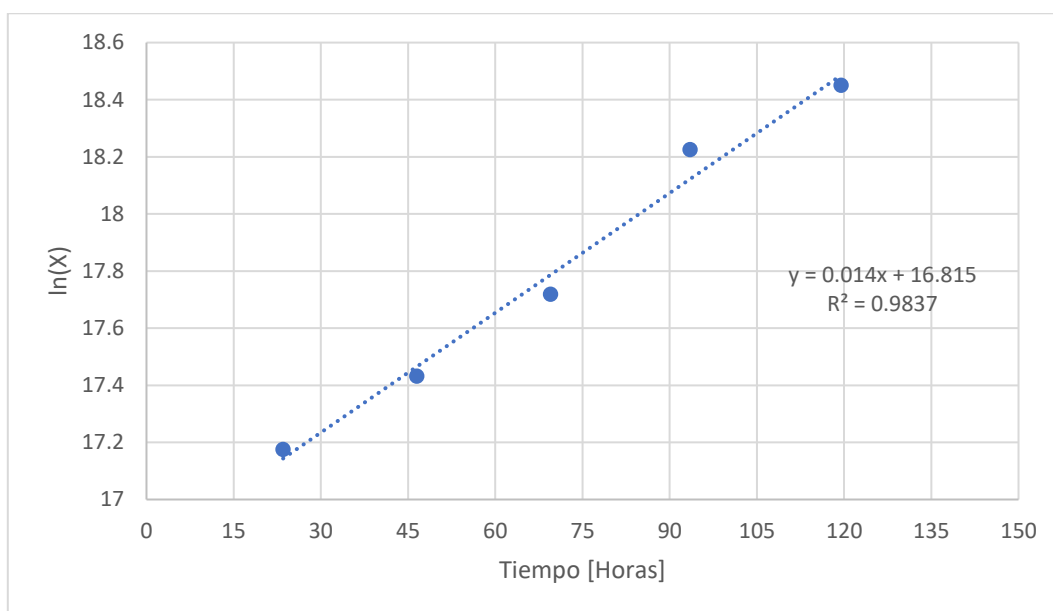


Figura 8.12: Obtención de velocidad específica de R4L en F3

8.7 TABLA DE RELACIÓN DENSIDAD CON AZUCAR (G/L)

Tabla 8.3: Relación densidad con g/L de azúcar en mosto y grado alcohólico probable (GAP). Fuente: (Pszczółkowski & Ceppi de Lecco, 2011)

Densidad	Azúcar g/L	GAP	Densidad	Azúcar g/L	GAP	Densidad	Azúcar g/L	GAP
1035	63	3,7	1081	186	10,9	1126	305,9	18
1036	66	3,9	1082	188	11	1127	308,6	18,2
1037	69	4	1083	191	11,2	1128	311,2	18,3
1038	72	4,2	1084	194	11,4	1129	313,9	18,5
1039	74	4,4	1085	196	11,5	1130	316,5	18,7
1040	76	4,5	1086	199	11,7	1131	319,2	18,8
1041	80	4,7	1087	202	11,9	1132	321,9	19
1042	82	4,8	1088	204	12	1133	324,6	19,1
1043	84	5	1089	207	12,2	1134	327,2	19,3
1044	87	5,1	1090	210	12,3	1135	329,9	19,5
1045	90	5,3	1091	212	12,5	1136	332,6	19,6
1046	92	5,4	1092	215	12,6	1137	335,3	19,8
1047	95	5,6	1093	218	12,8	1138	337,9	19,9
1048	98	5,7	1094	220	12,9	1139	340,6	20,1
1049	100	5,9	1095	223	13,1	1140	343,3	20,2
1050	103	6	1096	226	13,3	1141	346	20,4
1051	106	6,2	1097	228	13,4	1142	348,6	20,5
1052	108	6,3	1098	231	13,6	1143	351,3	20,7
1053	111	6,5	1099	234	13,8	1144	354	20,9
1054	114	6,7	1100	236	13,9	1145	356	21,1
1055	116	6,8	1101	239	14,1	1146	359,3	21,2
1056	119	7	1102	242	14,3	1147	362	21,3
1057	122	7,2	1103	244	14,4	1148	364,6	21,5
1058	124	7,3	1104	247	14,6	1149	367,3	21,7
1059	127	7,5	1105	250	14,7	1150	370	21,8
1060	130	7,6	1106	252	14,9	1151	372,6	22
1061	132	7,8	1107	255	15	1152	375,3	22,2
1062	135	7,9	1108	258	15,2	1153	378	22,3
1063	138	8,1	1109	260	15,3	1154	380,6	22,4
1064	140	8,2	1110	263	15,5	1155	383,3	22,6
1065	143	8,4	1111	266	15,7	1156	386	22,8
1066	146	8,6	1112	268	15,9	1157	388,6	23
1067	148	8,7	1113	271	16	1158	391,3	23,1
1068	151	8,9	1114	274	16,2	1159	393,9	23,2
1069	154	9	1115	276	16,3	1160	396,6	23,4
1070	156	9,2	1116	279	16,4	1161	398,7	23,5
1071	159	9,3	1117	282	16,6	1162	401,5	23,6

1072	162	9,5	1118	284	16,7	1163	404,2	23,8
1073	164	9,6	1119	287	16,9	1164	407	24,1
1074	167	9,8	1120	290	17,1	1165	409,7	24,2
1075	170	10	1121	292,6	17,3	1166	412,4	24,3
1076	172	10,1	1122	295,3	17,4	1167	415,1	24,5
1077	175	10,3	1123	298	17,6	1168	417,8	24,6
1078	178	10,5	1124	300,6	17,7	1169	420,6	24,8
1079	180	10,6	1125	303,3	17,9	1170	423,3	25
1080	183	10,8						