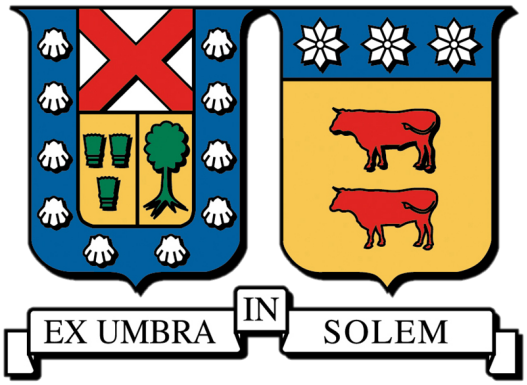
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL



CALIBRACIÓN DE MODELOS DINÁMICOS PARA LA PREDICCIÓN DE CINÉTICA DE FERMENTACIÓN DE VINOS BLANCOS

LICARAYEN CONA RIQUELME

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA

PROFESOR GUÍA: DR. LUIS GUILLERMO BERGH OLIVARES

CORREFERENTE EXTERNO: DR RICARDO LUNA

DICIEMBRE-2023

Resumen

El vino blanco es una bebida que se obtiene a partir de la fermentación alcohólica en condiciones anaeróbicas a partir del mosto de uvas blancas. Durante la fermentación las levaduras consumen sustratos como azúcares y nitrógeno produciendo metabolitos primarios como etanol y secundarios como aromas fermentativos que aportan en la calidad final del vino. El manejo de la nutrición del mosto y la temperatura de la fermentación son clave para obtener un producto de calidad y una operación reproducible. A escala industrial se suele realizar adiciones de nitrógeno al inicio y durante el proceso de fermentación con el objetivo de acelerar y no estancar la fermentación del vino. Sin embargo, no existe conocimiento en torno a los efectos de la aplicación de diferentes dosis de nitrógeno y condiciones de temperatura en las distintas etapas de la fermentación y su efecto en los tiempos de fermentación y calidad del vino.

Esta investigación realizada con el apoyo del centro de Investigación de la Viña Concha y Toro S.A. busca desarrollar modelos matemáticos que puedan predecir la cinética de fermentación de vinos blancos, bajo diferentes condiciones de temperatura y protocolos de nutrición. Para ello se utilizarán como base los modelos basados en ecuaciones diferenciales de Zenteno y Henriques que permiten diseñar protocolos de control en el proceso de fermentación que optimicen los tiempos de fermentación, costos y calidad del producto.

Inicialmente, se llevaron a cabo diseños experimentales a escala piloto y de laboratorio, abarcando diversas fermentaciones con protocolos de nutrición variados y diferentes temperaturas de operación. Posteriormente, se construyó una base de datos que registró el consumo de YAN, glucosa, fructosa y glicerol en el tiempo. A continuación, se ejecutó un análisis de sensibilidad local para identificar qué parámetros podían estimarse a partir de la información recopilada, seguido por la calibración de los modelos con el objetivo de perfeccionar su capacidad predictiva.

A partir de los resultados se concluye que ninguno de los modelos es estadísticamente significativo, debido a que poseen comportamiento no aleatorio y su media se aleja de cero. Esto sugiere que existe información que no está siendo contemplada por los modelos. Sin embargo el modelo Zenteno y el modelo propuesto logran realizar predicciones correctas en torno a la producción de glicerol a 17 °C y en torno a la etapa inicial de fermentación cuando la nutrición se aplica al cuarto día. Para mejorar la calibración de los modelos se recomienda realizar mediciones en torno

al crecimiento de biomasa, realizar mediciones en torno a los diferentes compuestos nitrogenados presentes en el mosto y determinar los puntos de muestreo mediante diseño experimental óptimo.

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que han contribuido en la realización de esta memoria, en el desarrollo de mi carrera universitaria y en mi formación como persona.

En primer lugar, quisiera expresar mi gratitud a mi profesor guía, Luis Bergh, cuya experiencia, conocimientos y orientación fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

También quiero agradecer al Centro de Investigación de la Viña Concha y Toro, cuyo respaldo ha facilitado el acceso a recursos y oportunidades cruciales para el éxito de esta investigación. Destaco la colaboración realizada por Ricardo Luna y Cristóbal Torrealba, quienes compartieron sus conocimientos y me dieron la orientación necesaria para desarrollar esta investigación. Además, agradezco el apoyo de los trabajadores de la bodega experimental y del laboratorio del centro de investigación, quienes siempre tuvieron excelente disposición al resolver mis inquietudes.

Además, quiero agradecer a mi padre y a mi madre, Paula Riquelme y Ángel Cona, quienes me apoyaron emocionalmente en este desafío y me dieron la orientación necesaria para aprender a tomar decisiones correctas. También quiero agradecer el apoyo y comprensión de mi pareja, Sebastián Véliz, que fue crucial en este proceso.

Asimismo, quiero agradecer el apoyo y el compañerismo otorgado por mis amigos de carrera: Francisca Orellana, Vicente Arévalo, Matías Benites, Marcelo Rivera, Thomas McIntosh, Ignacio Riveros y Benjamín Zambrano, quienes aportaron en mi vida con momentos de alegría y compartieron sus conocimientos para darnos apoyo mutuo en diversos momentos de mi etapa universitaria.

Quisiera agradecer a la Orquesta Estudiantil de la Universidad Técnica Federíco Santa María por aceptarme durante mis años de estudiante universitaria y permitirme compartir mi pasión por la música con un gran grupo humano, que se transformó en mi segunda familia en esta etapa y permitieron que mi desarrollo como ingeniera fuera más integral.

A todos ustedes, les doy mi más sincero agradecimiento por cada palabra de aliento, cada gesto y cada minuto de su tiempo en el que me brindaron su apoyo, ya que fue crucial para la realización de este trabajo y para culminar mi etapa universitaria.

Tabla de Contenidos

1 Introducción **1**

2 Objetivos y Alcances **3**

2.1 Objetivo General . . . 3

2.2 Objetivos Específicos . . . 3

2.3 Alcances . . . 3

3 Marco Teórico **5**

3.1 Vino blanco . . . 5

3.2 Fermentación alcohólica del vino . . . 5

3.3 Transformaciones metabólicas de la fermentación . . . 7

3.3.1 Glicolisis . . . 7

3.3.2 Bioquímica de la fermentación alcohólica. . . . 8

3.3.3 Fermentación Gliceropirúvica. . . . 10

3.4 Metabolismo de los compuestos nitrogenados. . . . 11

3.5 Importancia de la Nutrición en el vino. . . . 12

3.6 Efectos de la temperatura en la fermentación. . . . 13

3.7 Modelos Cinéticos de fermentación. . . . 14

3.7.1 Modelo Zenteno. . . . 15

3.7.2 Modelo Henriques . . . 18

4 Materiales y Métodos **20**

4.1 Fermentaciones de vino blanco. . . . 20

4.2 Diseño de experimentos. . . . 21

4.2.1 Protocolo de fermentaciones . . . 21

4.3 Materia prima. . . . 22

4.3.1 Mosto Chardonnay . . . 23

4.3.2 Mosto Sauvignon Blanc. . . . 23

4.3.3 Levadura. 24
4.4 Materiales y Equipos. 24
4.4.1 Estanques de fermentación a escala piloto. 24
4.4.2 Fermentadores a escala laboratorio. 25
4.4.3 Baño de recirculación y calentamiento RW-1025G. 26
4.4.4 Difusor cerámico con micro-poros 27
4.4.5 Medidor de densidad portátil DMA 35 Anton Par. 28
4.4.6 Medidor de oxígeno disuelto HQ30d. 29
4.4.7 Analizador automático Y15. 29
4.4.8 Medición y estimación de analitos de interés. 30
4.4.9 Experimentos a escala piloto. 36
4.4.10 Vinos Chardonnay a escala laboratorio. 38
4.5 Calibración e identificación de modelos. 39
4.5.1 Elementos de la identificación de parámetros. 40
4.5.2 Analisis de sensibilidad. 40
4.5.3 Estimación de parámetros. 42
4.5.4 Análisis de error. 43

5 Resultados y Discusión **44**
5.1 Fermentación a escala de laboratorio 44
5.1.1 Benchmarck entre modelos Zenteno, Henriques y modelo Nuevo 46
5.2 Fermentación mosto Chardonnay escala Piloto 53
5.2.1 Benchmark entre modelos Zenteno y modelo Nuevo. 54
5.3 Fermentación mosto Sauvignon Blanc escala Piloto 61
5.3.1 Benchmark entre modelo Zenteno y Modelo nuevo 62

6 Conclusiones y Recomendaciones **67**

7 Anexos **71**
7.1 ANEXO A: Ecuaciones modelo Nuevo 71
7.1.1 Ecuaciones del modelo Nuevo. 71
7.2 Anexo B: Valores iniciales parámetros. 72
7.3 Anexo C: Simulación de los modelos. 75
7.3.1 Fermentación de mosto Chardonnay a escala Laboratorio. 75
7.3.2 Fermentación de mosto Chardonnay a escala piloto. 77
7.3.3 Fermentación de mosto Sauvignon Blanc a escala piloto. 82
7.4 ANEXO D: Residuos de los modelos. 87

7.4.1 Fermentación de mosto Chardonnay a escala Laboratorio. 87
7.4.2 Fermentación de mosto Chardonnay a escala piloto. 90
7.4.3 Fermentación de mosto Sauvignon Blanc a escala piloto. 92

Lista de Tablas

4.1 Composición inicial mosto Chardonnay (Elaboración propia, 2023). 23
4.2 Composición inicial mosto Sauvignon Blanc (Elaboración propia, 2023). 23
4.3 Especificaciones técnicas de baño de recirculación y calentamiento (Viresa, 2023). . 27
4.4 Indicaciones metrológicas de medición de amoniaco. 31
4.5 Indicaciones metrológicas de medición de PAN. 32
4.6 Indicaciones metrológicas de medición de D-glucosa. 33
4.7 Indicaciones metrológicas de medición de D-glucosa/D-fructosa. 33
4.8 Indicaciones metrológicas de medición de glicerol. 35
4.9 Fermentación Gliceropirúvica. 35
4.10 Fermentación alcohólica. 36
4.11 Diseño factorial fraccionado vinos Chardonnay y Sauvignion Blanc a escala piloto. . 37
4.12 Factores experimentales del diseño factorial Vino Chardonnay. 37
4.13 Factores experimentales del diseño factorial Vino Sauvignon Blanc. 37

5.1 Parámetros calibrados modelo Zenteno 48
5.2 Parámetros calibrados modelo Henriques. 48
5.3 Parámetros calibrados Modelo Nuevo. 49
5.4 Test de ANOVA para la predicción del consumo de glucosa en modelo Zenteno. . . . 53
5.5 Test de ANOVA para la predicción del consumo de glucosa en modelo Nuevo. . . . 53
5.6 Parámetros estimados Modelo Zenteno 56
5.7 Parámetros estimados Modelo Nuevo 56
5.8 Parámetros estimados Modelo Zenteno 63
5.9 Parámetros estimados Modelo Nuevo 63

7.1 Parámetros fijos modelo Zenteno 72
7.2 Valores iniciales de parámetros de calibración modelo Zenteno, Henriques y modelo Nuevo para la fermentación de mosto Chardonay a escala laboratorio. 73

7.3 Valores iniciales de los parámetros de los modelos Zenteno y Nuevo para fermentación de mostos Chardonnay y Sauvignon Blanc a escala piloto. 74

Lista de Figuras

3.1 Fases de crecimiento de la levadura (Togores, 2018). 6
3.2 Rutas metabólicas formadas a partir de ácido pirúvico (Togores, 2018). 8
3.3 Bioquímica de la fermentación alcohólica (Togores, 2018). 9
3.4 Ruta de fermentación gliceropirúvica (Togores, 2018). 10
3.5 Metabolismo de la levadura para la formación de aromas, Adaptado de Bell and Henschke (2005). 11
3.6 Ruta de Ehrlich (Bell and Henschke, 2005). 12
3.7 Curvas de crecimiento de levaduras en fermentación alcohólica,(Togores, 2018) . . . 15

4.1 Plano de estanque de fermentación a escala piloto. 21
4.2 Estanques de fermentación de bodega. 24
4.3 Plano de estanque de fermentación a escala piloto. 25
4.4 Fermentadores a escala de laboratorio. 26
4.5 Baño de recirculación y calentamiento RW-1025G. 27
4.6 Difusor cerámico con microporos. 28
4.7 Medidor de densidad Anton Paar DMATM35. 28
4.8 Medidor de oxígeno disuelto HQ30d. 29
4.9 Analizador automático Y15 de Biosystems. 30
4.10 Curva de calibración de azúcar total en función de la densidad del mosto. 34
4.11 Baño termorregulado de fermentaciones a escala de laboratorio. 38
4.12 Procedimiento de identificación iterativa, Adaptado de Balsa-Canto et al. (2016). . . 40

5.1 Ejemplo de normalización de YAN. 44
5.2 Tasas de consumo y producción durante la fermentación 45
5.3 Análisis de sensibilidad de los modelos. 47
5.4 Análisis de residuos Modelo Zenteno 50
5.5 Análisis de error Modelo Henriques 51
5.6 Simulación modelo Henriques a 15 °C. 51

5.7 Análisis de error Modelo Nuevo. 52
5.8 YAN de experimentos con mostos Chardonnay a escala piloto con diferentes protocolos de nutrición 54
5.9 Análisis de sensibilidad para modelos Zenteno y modelo propuesto para fermentaciones de mosto Chardonnay a escala piloto 55
5.10 Simulación de los modelos Zenteno y modelo nuevo, en base a los datos del experimento 9. 57
5.11 Simulación de los modelos Zenteno y modelo nuevo, en base a los datos del experimento 5. 58
5.12 Distribución de error modelo Zenteno. 59
5.13 Distribución de error modelo Nuevo. 60
5.14 YAN de experimentos con mostos Sauvignon Blanc a escala piloto con diferentes protocolos de nutrición 61
5.15 Análisis de sensibilidad modelos Zenteno y Nuevo. 62
5.16 Simulación de experimento 3, a 19 °C con los modelos Zenteno y Nuevo. 64
5.17 Distribución de error modelo Zenteno. 65
5.18 Distribución de error modelo Nuevo. 66

7.1 Simulación de modelos Zenteno, Henriques y modelo Nuevo. 76
7.2 Simulación de modelos Zenteno y modelo Nuevo para experimentos realizados con Mosto Chardonnay a escala piloto 81
7.3 Simulación de modelos Zenteno y modelo Nuevo para experimentos realizados con Mosto Sauvignon Blanc a escala piloto 86
7.4 Análisis de error Modelo Zenteno 87
7.5 Análisis de error Modelo Henriques 88
7.6 Análisis de error Modelo Nuevo. 89
7.7 Distribución de error modelo Zenteno. 90
7.8 Distribución de error modelo Nuevo. 91
7.9 Distribución de error modelo Zenteno. 92
7.10 Distribución de error modelo Nuevo. 93

Nomenclatura

Variables estado	Significado,unidades
X	Biomasa, g/L
N	Nitrógeno Asimilable, g/L
E	Etanol, g/L
F	Fructosa, g/L
Gly	Glicerol, g/L
Glx	Glucosa, g/L
Símbolo	Significado, unidades
a_0	Parámetro de la fase de retardo.
β_{Fmax}	Tasa máxima de producción específica de etanol a partir de fructosa, g E/g Bio/h
β_{Gmax}	Tasa máxima de producción específica de etanol a partir de glucosa, g E/g Bio/h
β_{i0}	Valor de referencia de la tasa de producción específica de etanol $(I = G, F)$, g E/g Bio/h
β_F	Tasa específica de producción de etanol a partir de fructosa, g E/g Bio/h
β_G	Tasa específica de producción de etanol a partir de glucosa, g E/g Bio/h
C_{de}	Constante de muerte del etanol, L/g E
E_{ac}	Energía de activación de la cinética de crecimiento, kJ/kmol
E_{afe}	Energía de activación de la tasa de producción de etanol, kJ/kmol
E_{am}	Energía de activación del mantenimiento, kJ/kmol
E_{td}	Energía de activación de la muerte térmica, kJ/kmol
k_{Glx}	Constante de saturación de glucosa, g G/L
k_{G0}	Valor de referencia de constante de saturación de glucosa, g G/L
k_{ie}	Constante de inhibición del etanol, g E/L
k_{ie0}	Valor de referencia de constante de inhibición del etanol, g E/L
k_{ig}	Constante de inhibición del glucosa, g G/L
k_{ig0}	Valor d de referencia de constante de inhibición del glucosa, g G/L
K_D	Tasa de decaimiento celular de biomasa, 1/h
K_{D0}	Valor de referencia de tasa de decaimiento celular de biomasa 1/h

Símbolo	Significado, unidades
k_F	Constante de saturación de fructosa, g F/L
k_{F0}	Valor de referencia de constante de saturación de fructosa, g F/L
k_N	Concentración YAN de crecimiento semi-máximo g/L
k_{N0}	Concentración YAN de crecimiento semi-máximo g/L
lag	Fase de latencia
m	Coeficiente de mantenimiento, g Azúcar/g Bio/h
m_0	Valor de referencia del coeficiente de mantenimiento, g Azúcar/g Bio/h
μ	Tasa de crecimiento de biomasa, 1/h
μ_{max}	Tasa de crecimiento máximo de biomasa, 1/h
μ_0	Valor de referencia para la tasa de crecimiento específico, 1/h
ϕ_E	Factor de inhibición del etanol
R	Constante de los gases ideales, kJ/kmol/K
t	Tiempo, h
T	Temperatura, K
T_D	Temperatura de muerte térmica, K
v_F	Velocidad de transporte de Fructosa, g F/g Bio/h
v_{Glx}	Velocidad de transporte de glucosa, g Glx/g Bio/h
$v_{max,F}$	Velocidad máxima de transporte de fructosa, g F/g Bio/h
$v_{max,F0}$	Valor de referencia de velocidad máxima de transporte de fructosa, g F/g Bio/h
$v_{max,Glx}$	Velocidad máxima de transporte de glucosa, g Glx/g Bio/h
$v_{max,Glx0}$	Valor de referencia de velocidad máxima de transporte de glucosa, g Glx/g Bio/h
X_A	Biomasa activa, g/L
X_V	Biomasa viable, g/L
$Y_{E/F}$	Coeficiente de rendimiento Etanol/fructosa, g E/g G
$Y_{E/G}$	Coeficiente de rendimiento Etanol/glucosa, g E/g G
$Y_{E/S}$	Coeficiente de rendimiento Etanol/azúcar total, g E/g A
$Y_{Gly/S}$	Coeficiente de rendimiento Glicerol/azúcar total, g Gly/g A
$Y_{X/F}$	Coeficiente de rendimiento biomasa/fructosa, g Bio/g F
$Y_{X/G}$	Coeficiente de rendimiento biomasa/glucosa, g Bio/g G
$Y_{X/N}$	Coeficiente de rendimiento biomasa/nitrógeno, g Bio/g N

Capítulo 1

Introducción

La fermentación de vino blanco es un proceso dinámico que contempla 5 etapas: fase de latencia, crecimiento exponencial, crecimiento bajo concentraciones limitadas de nitrógeno, fase estacionaria y fase de decaimiento celular. En cada una de estas etapas se efectúan procesos biológicos y fisicoquímicos que definen las características y el perfil organoléptico final del vino.

La fermentación de vino se lleva a cabo principalmente utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La cinética de fermentación depende principalmente de la composición inicial de azúcar y nitrógeno en el mosto, el manejo de la temperatura y adición de nutrientes como fostato de amonio (FDA) durante la fermentación. El poder generar protocolos automatizados de estas variables es clave para optimizar el proceso en función de disminuir los tiempos de fermentación sin sacrificar la calidad del vino. Para ello es necesario desarrollar modelos predictivos del proceso de fermentación que sean capaces de adaptarse a diferentes condiciones de operación de temperatura y nutrición simultáneamente.

Con respecto a la nutrición, la composición inicial de nitrógeno es importante debido a que presenta efectos tanto en la cinética de fermentación como en la calidad organoléptica de los vinos. Esto se debe a que algunos aminoácidos son precursores de compuestos volátiles como alcoholes superiores y ésteres (Carrau et al., 2008). Los mostos de uva poseen diferentes fuentes de nitrógeno, como iones de amonio, aminoácidos y péptidos que poseen diferentes tazas de consumo durante la fermentación. Generalmente en la industria se mide el contenido de nitrógeno asimilable por la levadura (YAN), el cual se compone por amonio y aminoácidos primarios (Tesnière et al., 2015).

Cuando existen bajos niveles de nitrógeno inicial se producen fermentaciones lentas o se detiene el proceso, interrumpiéndose la división mitótica de la levadura, en consecuencia, se produce menos biomasa (Togores, 2018). Para evitar esto se realizan correcciones antes de iniciar la fermentación añadiendo FDA o nutrientes orgánicos ricos en aminoácidos, que se obtienen en base de paredes celulares de levadura (Togores, 2018).

El consumo de nitrógeno se produce en la fase de crecimiento exponencial (durante las primeras

48 horas) y su agotamiento inicia la fase estacionaria, donde se produce el consumo de glucosa y fructosa. En la industria se suelen añadir fuentes de nitrógeno en forma de fosfato de amonio en la fase de crecimiento con baja concentración de nitrógeno para fomentar la formación de biomasa y acelerar la cinética de fermentación. Sin embargo, el tiempo de nutrición y la dosificación pueden presentar diferentes consecuencias en aspectos cinéticos y de calidad del vino (Beltran et al., 2005). Durante la fermentación, el azúcar total se transforma principalmente en etanol y dióxido de carbono. Además, se forman subproductos que favorecen el perfil organoléptico del vino, que representan el 4% de los productos formados por la levadura. Mientras que el etanol y el glicerol representan el 90% y el 5% respectivamente (Togores, 2018).

Respecto a la temperatura, existen diversos estudios previamente realizados que plantean que la temperatura presenta efectos en la cinética de fermentación, afectando las tazas de consumo de nutrientes, la producción de biomasa y la producción de etanol. El primero en estudiar los efectos de la temperatura fue Boulton en 1980, sin embargo solo contempló los efectos en el crecimiento celular. Posteriormente Coleman et al. (2007) contempló los efectos de la temperatura en los parámetros cinéticos presentes en el modelo de Cramer et al. (2002), sin embargo el modelo no contempla los efectos termodinámicos ocurridos durante la reacción. Finalmente Zenteno et al. (2010) incluyó los efectos de las gradientes de temperatura en la fermentación de vino tinto. En general en la industria las fermentaciones de vino blanco se llevan a cabo en rangos de temperatura de 15-20 °C, lo que influye en la calidad del vino, como también en la productividad. A mayor temperatura de fermentación aumenta la cinética, por lo que se producen fermentaciones más rápidas. Sin embargo, esto presenta consecuencias negativas, debido a que se fomenta la formación de ácido sulfhídrico (el cual se percibe a través del aroma), lo cual es perjudicial para el perfil organoléptico. Por otro lado, las fermentaciones efectuadas a bajas temperaturas inducen fermentaciones muy lentas o incluso atascadas. Sin embargo, se incrementa la formación de terpenos libres, lo cual brinda aromas frutales en la producción de vinos blancos, favoreciendo el perfil organoléptico (Togores, 2018).

En la presente investigación se plantea la creación de un modelo que logre predecir el crecimiento de la biomasa en función del consumo de nitrógeno, glucosa y fructosa; la producción de etanol y glicerol; los efectos de la temperatura en la cinética de fermentación y los efectos de la nutrición con FDA en diferentes etapas de la fermentación. Para esto se efectuaran fermentaciones con diferentes protocolos de nutrición a diferentes temperaturas, midiendo durante el proceso el consumo de glucosa, fructosa y YAN en conjunto con la producción de etanol y glicerol.

El trabajo experimental se desarrollará en el Centro de Investigación e Innovación (CII) de la Viña Concha y Toro S.A. Se utilizarán mostos de uva Chardonnay y Sauvignon Blanc tratados y otorgados por la misma viña.

Capítulo 2

Objetivos y Alcances

2.1 Objetivo General

Elaborar un modelo dinámico que permita predecir el comportamiento de la fermentación en vinos blancos contemplando los efectos de la temperatura y nutrición en la cinética de fermentación.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar fermentaciones con diferentes condiciones de temperatura y nutrición a escala piloto y laboratorio en el CII de la viña Concha y Toro S.A.
- Generar una base de datos de la cinética de fermentación en torno al consumo y producción de los compuestos de interés para efectuar la calibración del modelo.
- Evaluar el efecto del diseño de diferentes protocolos de nutrición en la estimación de parámetros.
- Comparar el desempeño y robustez de las predicciones de los modelos existentes y el nuevo modelo propuesto.

2.3 Alcances

Este trabajo se realizó con uva Chardonnay y Sauvignon Blanc previamente clarificados provenientes de los fundos El Boldo, ubicado en la provincia de Cauquenes y Ucuquer ubicado en la ribera sur del río Rapel, ambos pertenecientes a la Viña Concha y Toro S.A. Las fermentaciones se llevaron a cabo en estanques de 250 L escala piloto y en reactores a escala laboratorio de 2 litros.

Para el desarrollo de los modelos matemáticos y su análisis estadístico se utilizó MATLAB^{R}. La estimación de parámetros y el análisis post-regresión fue realizado con el paquete AMIGO, el cual está enfocado en la simulación y calibración de modelos biológicos mediante sistemas de optimización no lineal.

Se utilizó el equipo Y15 de Biosystems para medir metabolitos como glucosa, fructosa, YAN y glicerol. Estos fueron medidos de forma periodica durante el procesos de fermentación para obtener las curvas que representan la cinética de fermentación y estimar los parámetros de los modelos dinámicos.

Capítulo 3

Marco Teórico

3.1 Vino blanco

Según la definición planteada por el código internacional de prácticas enológicas de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) "El vino es, exclusivamente, la bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial, de uvas frescas, estrujadas o no, o de mosto de uva". "Su contenido en alcohol adquirido no puede ser inferior a 8,5% vol"(VINE and WINE, 2015).

Para que un vino sea blanco, éste procede de la fermentación de uvas blancas y carece de maceración. Además, se considera que un vino es seco cuando su contenido en azúcar total es inferior a 4 g/L (VINE and WINE, 2015).

Según la ley 18.455 articulo 16, "el vino sólo podrá obtenerse de la fermentación alcohólica del mosto de uvas frescas o asoleadas de la especie Vitis vinífera. Además, los artículos 18 y 19 de la ley prohíben la adición de alcoholes, sacarosa o azúcar que no sean provenientes de la uva. Por otro lado, el artículo 36 de la ley 18.455 plantea que la graduación alcohólica mínima de un vino para su comercio es de 11,5 grados con un máximo de 1,5 grados de acidez volátil por litro.

3.2 Fermentación alcohólica del vino

La fermentación alcohólica es el proceso donde el jugo de uva o mosto es convertido en vino mediante el uso de levadura. Específicamente, la levadura consume los azúcares y nutrientes nitrogenados presentes en el mosto y mediante reacciones biológicas forma productos como etanol, glicerol y compuestos aromáticos (Togores, 2018). La levadura que generalmente se utiliza en la fermentación alcohólica es la cepa *Saccharomyces cereviasiae*, debido a que posee un alto poder fermentativo, es resistente al etanol y al dióxido de azufre. Además, este tipo de levadura posee la capacidad de fermentar casi todos los azúcares y no asimila nitratos (Togores, 2018).

La fermentación alcohólica se produce en 6 fases que son:

- Fase de latencia: fase de adaptación al medio por parte de las levaduras. En esta etapa no hay crecimiento celular.
- Fase de aceleración: En esta fase las levaduras comienzan a multiplicarse. Esta fase en conjunto con la anterior suele ocurrir en las primeras 24 horas, dependiendo de la temperatura a la cual se efectúe la fermentación. Esta fase se acaba cuando existe un exceso de CO_2 en el mosto.
- Fase de crecimiento exponencial: La población de levaduras crece exponencialmente. La población de biomasa viva coincide con la población de biomasa total. En esta etapa existen altos niveles de nitrógeno disponible.
- Fase de ralentización del crecimiento: en esta etapa hay poco nitrógeno disponible, por lo que la población de levaduras deja de crecer.
- Fase estacionaria: el crecimiento de biomasa es nulo, la población de levaduras permanece estacionaria. Se produce el consumo de azúcar, producción de etanol, glicerol y de algunos compuestos aromáticos.
- Fase de declive o latencia: la población de levaduras totales disminuye lentamente, mientras que la biomasa activa disminuye su población drásticamente consumiendo los últimos gramos de azúcar total disponible. Las células mueren por autolisis.

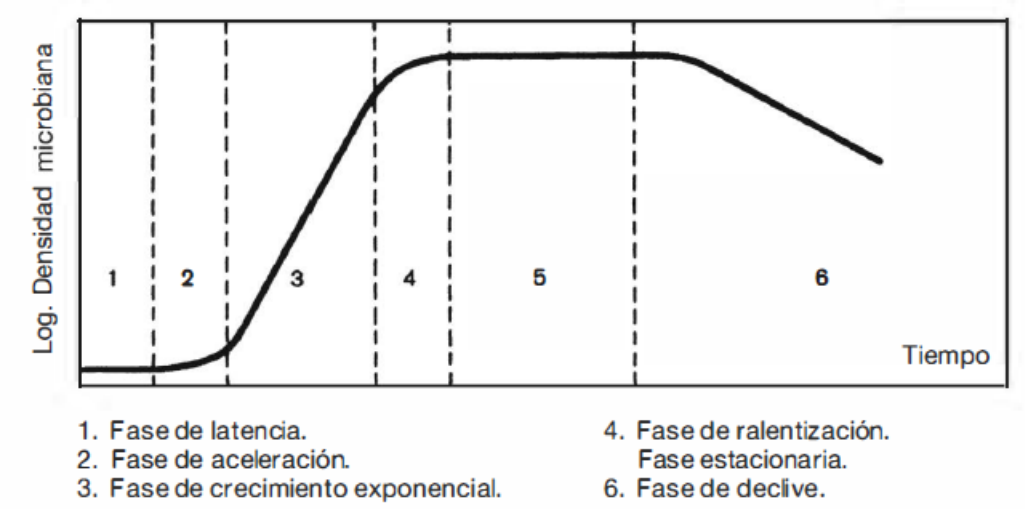


Figura 3.1: Fases de crecimiento de la levadura (Togores, 2018).

3.3 Transformaciones metabólicas de la fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso catabólico mediante el cual se obtiene energía y nuevas sustancias que posteriormente se utilizan para producir reacciones anabólicas que formarán nuevos compuestos. El principal sustrato que entrega el mosto es el azúcar, que es utilizado para formar etanol, CO_2 y otros metabolitos. Durante la fermentación del mosto ocurren otros procesos en forma simultánea que van a afectar la composición final del vino, entre las que están la fermentación gliceropiruvica, fermentación homoláctica, degradación del ácido málico, catabolismo, anabolismo de los aminoácidos, y el metabolismo de los compuestos azufrados (Togores, 2018).

3.3.1 Glicolisis

La glicolisis es un conjunto de reacciones que promueve la transformación de azucares en ácido pirúvico, estas se producen de forma aeróbica y anaeróbica.

El alcohol etílico se obtiene a partir de ácido pirúvico, el cual va a ser precursor de la producción de otros metabolitos durante la fermentación, entre los cuales destacan el ácido acético, ácido oxálico, entre otros, los cuales presentan efectos en las propiedades organolépticas del vino. A partir del ácido pirúvico se pueden desarrollar nuevas fermentaciones que dan origen a diversos metabolitos que se encuentran en el vino.

La Figura 3.2 muestra las diferentes rutas metabólicas que permiten del desarrollo de la fermentación alcohólica, láctica, acética entre otras. Cabe destacar que para el desarrollo de las fermentaciones no alcohólicas se requiere de la participación de bacterias lácticas, acéticas, entre otros microorganismos que se encuentran en el ambiente.

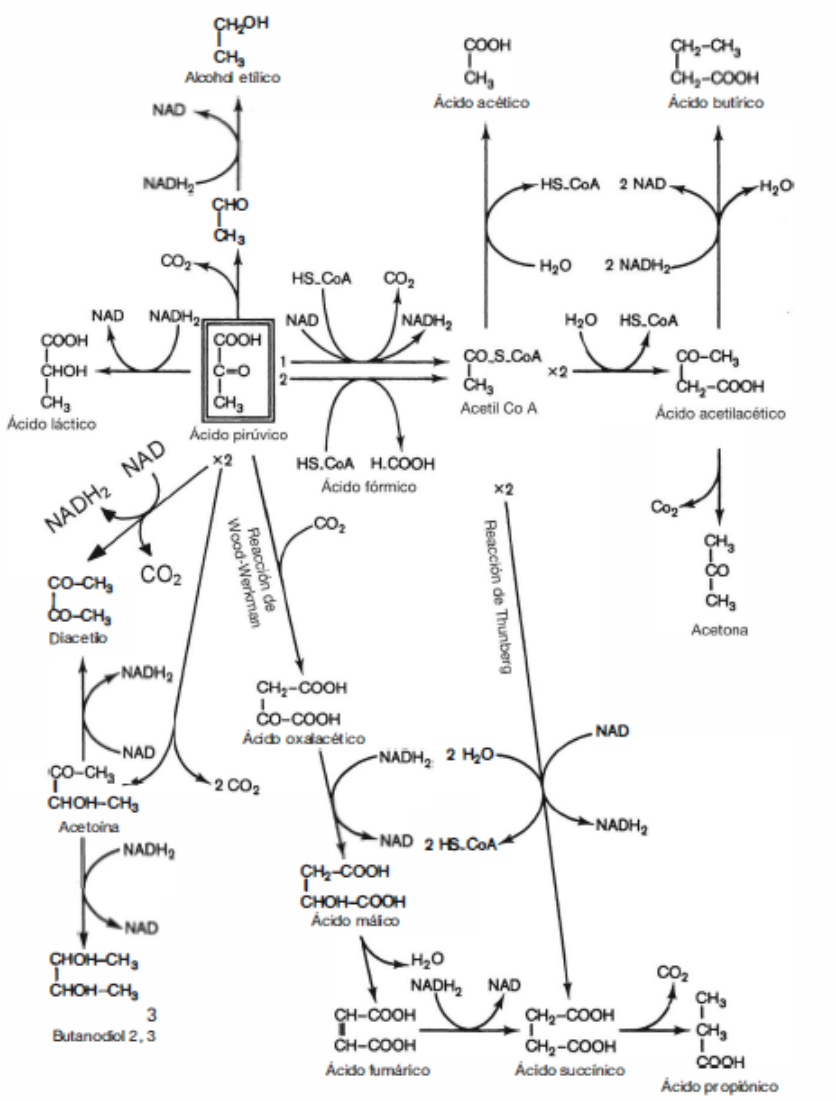


Figura 3.2: Rutas metabólicas formadas a partir de ácido pirúvico (Togores, 2018).

3.3.2 Bioquímica de la fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica es la principal reacción que predomina durante el proceso de elaboración de vino, donde el producto principal es el alcohol etílico, llegando a volúmenes del 12% v/v. Este se produce en las levaduras y se libera mediante procesos de difusión, abandonando el citoplasma.

Para que ocurra la fermentación, en primer lugar, se efectúa la glicolisis, proceso en que se transforman los azúcares en ácido pirúvico, mediante una serie de reacciones. En este proceso se obtiene energía en forma de ATP. Posteriormente el piruvato se transforma en acetaldehído para finalmente dar origen al alcohol etílico. La ruta descrita anteriormente se puede observar en la Figura 3.3.

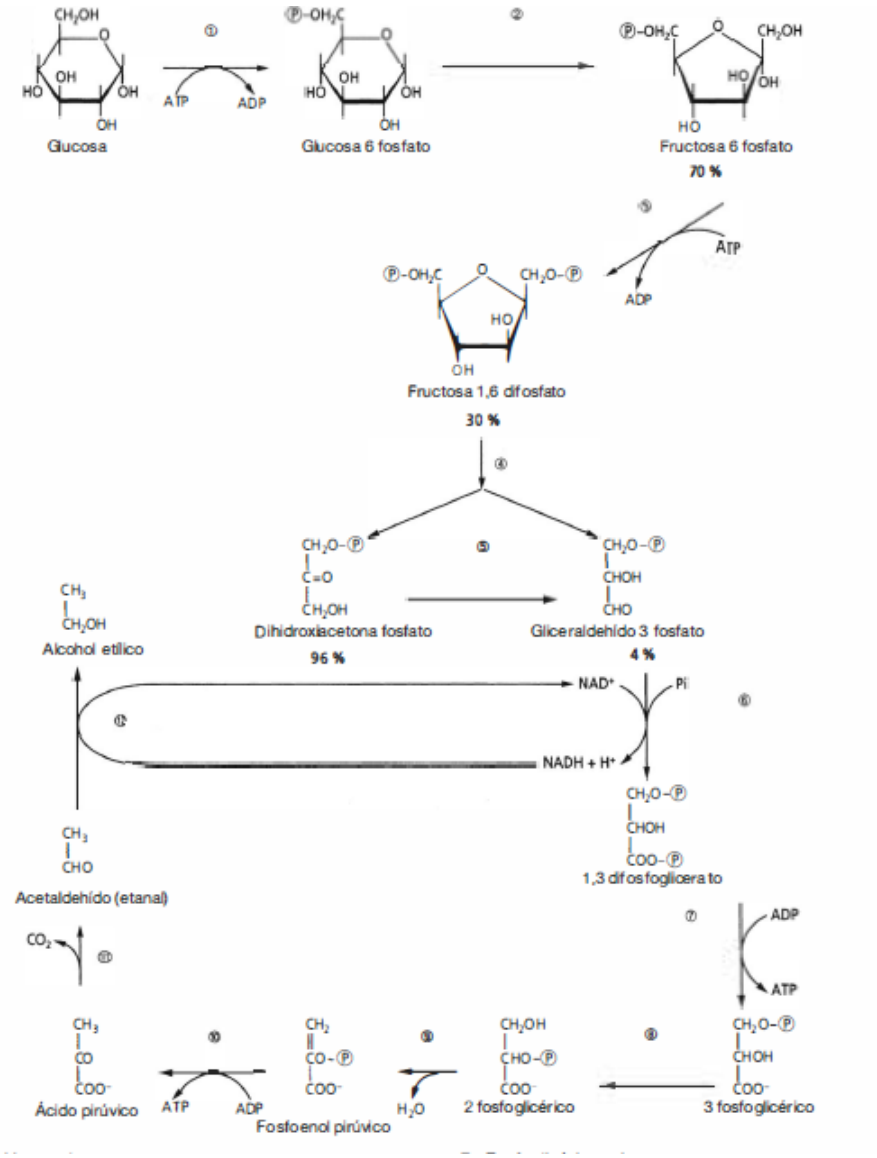


Figura 3.3: Bioquímica de la fermentación alcohólica (Togores, 2018).

En la industria enológica existe la tendencia de efectuar aplicaciones de oxígeno en ciertas etapas de la fermentación para promover el crecimiento de las levaduras, debido a que se produce una mayor disponibilidad de energía. Sin embargo, cuando existen altas concentraciones de azúcar, las levaduras prefieren la metabolización por fermentación alcohólica, por sobre el ciclo de Krebs, lo cual se conoce como efecto *Crabtree* y éste sucede con concentraciones de azúcar superiores a 9 g/L (Togores, 2018).

3.3.3 Fermentación Gliceropirúvica.

En algunos casos las moléculas de azúcar no solo se transforman en ácido pirúvico, sino que también se produce glicerol de acuerdo con la ecuación resumida de Neuberg:

$$Azucar \longrightarrow Glicerol + AcidoPiruvico \tag{3.1}$$

Usualmente se forman concentraciones finales de glicerol que varían entre 5 y 11 [g/L] (Togores, 2018). Se estima que un 8% de los azucares se utiliza para la ejecución de la ruta gliceropirúvica (Togores, 2018). Por otro lado, a medida que se forman moléculas de glicerol, se forma ácido pirúvico, el cual no puede transformarse en etanol, formando otros compuestos que pueden ser indeseados en el vino, como el ácido acético, acetaldehído entre otros (Togores, 2018). Dicha ruta metabolica se puede observar en la Figura 3.4.

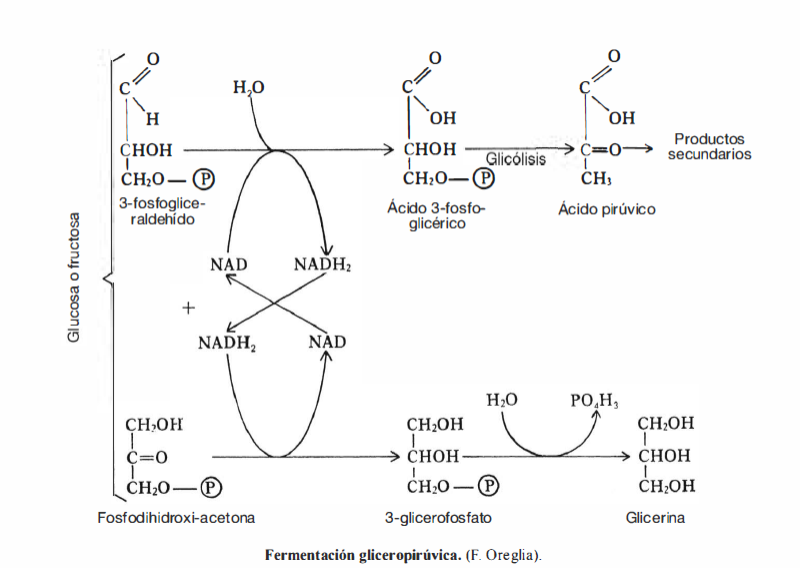


Figura 3.4: Ruta de fermentación gliceropirúvica (Togores, 2018).

Esta fermentación es más activa al inicio del proceso, debido a que las levaduras utilizan el glicerol como mecanismo de defensa ante la elevación de la presión osmótica, la cual aumenta con concentraciones altas de azúcares. Los factores que influyen en la producción de glicerol son la temperatura y el pH alto del mosto, la anaerobiosis y la falta de tiamina y ácido pantoténico (Togores, 2018).

El glicerol aporta sabores dulces y mayor densidad en boca al vino, por lo que se considera que es un compuesto que favorece la calidad del producto final, pero para que sus efectos sean apreciables se deben producir altas concentraciones del compuesto. Sin embargo, su alta producción puede desencadenar la formación de compuestos indeseados.

3.4 Metabolismo de los compuestos nitrogenados.

Las levaduras sintetizan proteínas a partir del nitrógeno que se encuentren disponibles en el mosto. Para esto inician una serie de procesos catabólicos que producen ésteres y alcoholes superiores, los cuales poseen efectos significativos en la calidad del producto final.

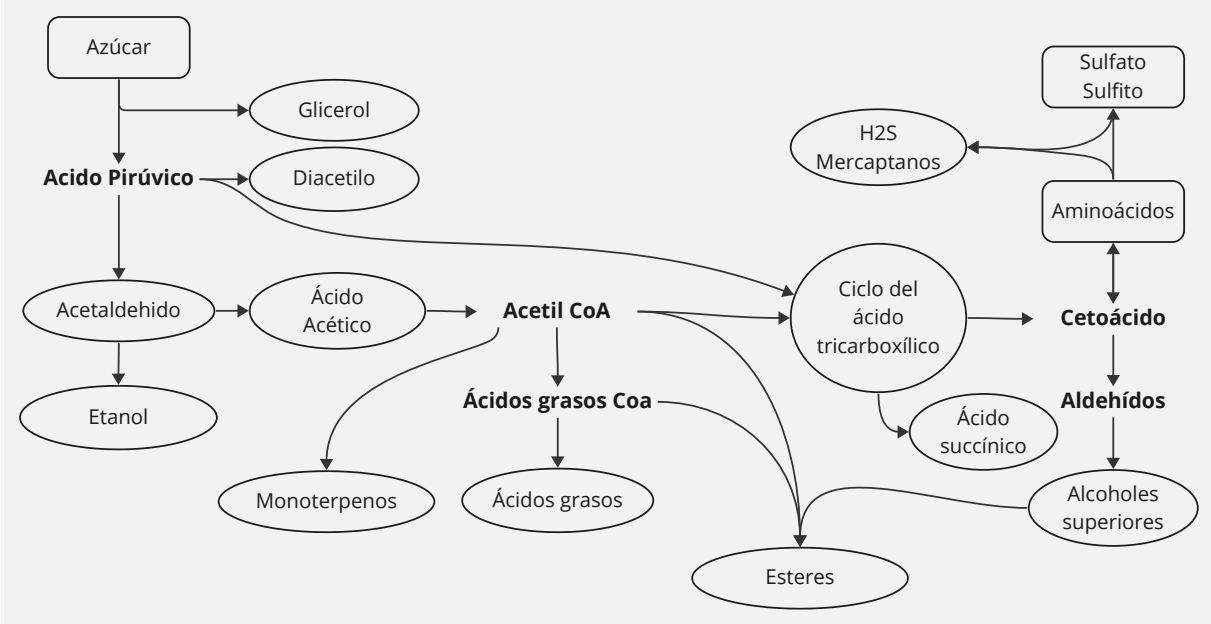


Figura 3.5: Metabolismo de la levadura para la formación de aromas, Adaptado de Bell and Henschke (2005).

En la Figura 3.5 se da a conocer el metabolismo de la levadura para la formación de compuestos aromáticos, durante la fermentación alcohólica. Se puede observar a través del diagrama que los compuestos nitrogenados reaccionan con los sulfitos y sulfatos para producir compuestos aromáticos, regulando a su vez el metabolismo celular (Bell and Henschke, 2005).

Durante la fermentación, las levaduras asimilan gran parte del nitrógeno disponible. Sin embargo, a medida que aumenta el etanol, se dificulta el transporte de aminoácidos, debido a las modificaciones que sufre la membrana plasmática. Debido a esto, quedan partículas de nitrógeno en suspensión.

Por otro lado, se puede observar que el ácido sulfhídrico es el compuesto final de la cadena de reducción de sulfatos o se obtiene como producto intermedio en la síntesis de aminoácidos azufrados. La producción de H_2S se ve favorecida cuando las fermentaciones se producen a altas temperaturas, con alto pH, y cuando los mostos poseen poco YAN (Togores, 2018). Se busca prevenir la producción de este compuesto debido a que aporta sabores indeseados al vino.

Cuando existe una concentración deficiente de nitrógeno disponible, aumenta la concentración de alcoholes superiores en el vino. Los alcoholes superiores se forman mediante la ruta de Ehrlich,

que se muestra en la Figura 3.6. Al existir déficit de aminoácidos durante la fase de crecimiento, se activa su síntesis a partir de α-cetoácidos (los cuales se obtienen durante la glicolisis). Al no existir nitrógeno suficiente para efectuar la transaminación, los α-cetoácidos sobrantes se transformarán en alcoholes superiores. Otros factores que favorecen la formación de este compuesto son las temperaturas superiores a 20 °C, pH elevados y una mala clarificación del vino (Togores, 2018).

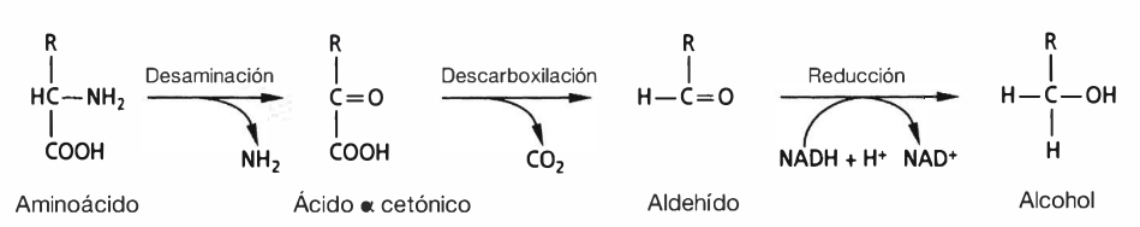


Figura 3.6: Ruta de Ehrlich (Bell and Henschke, 2005).

Por otro lado, los ésteres aportan aromas afrutados y florales, por lo que son deseados en los vinos. Estos provienen del metabolismo de azúcares y aminoácidos desarrollado por la levadura, que efectúa una síntesis enzimática a partir de alcoholes superiores y ácidos grasos. Sin embargo, al existir un déficit de nitrógeno se inhibe la formación de estos compuestos (Bell and Henschke, 2005).

3.5 Importancia de la Nutrición en el vino.

El nitrógeno asimilable por la levadura (YAN, acrónimo de su nombre en inglés *yeast assimilable nitrogen*) es de suma importancia en la cinética de fermentación, ya que posee efectos en el crecimiento y metabolismo de las levaduras. Cuando los mostos son deficientes en nitrógeno (cantidades de YAN inferiores a 120 mg/L) se añaden fuentes externas de nitrógeno para prevenir el estancamiento de la fermentación. Estas adiciones se realizan al inicio y durante la fermentación.

El amonio es una de las fuentes de nitrógeno más consumidas por la levadura, y la adición de este compuesto durante la fermentación reduce la producción de sulfuro de hidrogeno; favorece la producción de glicerol; estimula el consumo de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada. Sin embargo, el amonio inhibe la absorción de argina y alanina (Beltran et al., 2005). El nitrógeno posee efectos en la formación de proteínas, la cual se hace principalmente en la fase de crecimiento de biomasa, y disminuye cuando la población de levaduras alcanza su máximo valor. La adición de nitrógeno en esta etapa permite reiniciar la síntesis de proteínas y activa la fermentación por el aumento de la actividad de transporte de azucares (Togores, 2018).

Existen muchos factores que poseen efectos en el contenido de nitrógeno en los mostos, como la variedad y la madurez de la cepa; las características medioambientales como la fertilidad del suelo

y las condiciones climáticas; y las prácticas vitivinícolas. El contenido de amonio en los mostos varía entre un 40 y un 51% del YAN (Crépin et al., 2012).

Al haber más nitrógeno en el medio se favorece la producción de biomasa y aumenta la tasa de consumo de azúcar. Las adiciones de nitrógeno durante la fase de crecimiento exponencial favorecen el crecimiento de biomasa, acelerando la cinética de fermentación. Sin embargo, cuando las adiciones de nitrógeno ocurren en la fase estacionaria, no se produce aumento de biomasa (Beltran et al., 2005).

Desde la perspectiva aromática, la adición de nitrógeno regula la formación de compuestos volátiles y no volátiles que favorecen el perfil organoléptico de los vinos blancos, favoreciendo la formación de esteres según lo explicado en la Sección 3.4 (Bell and Henschke, 2005).

3.6 Efectos de la temperatura en la fermentación.

La temperatura presenta efectos en la cinética de fermentación, debido a que a mayor temperatura se acelera la producción de biomasa. Sin embargo, se producen vinos de menor calidad. Al trabajar a altas temperaturas se reduce la producción de alcohol debido a que se favorece la fermentación gliceropirúvica. Además, se favorece la formación de alcoholes superiores. Por otro lado, cuando se trabaja a bajas temperaturas se promueve la formación de ácidos grasos y esteres, favoreciendo las propiedades organolépticas del vino. Para vinos blancos se recomienda trabajar con temperaturas entre 15 y 20 °C (Togores, 2018).

Al trabajar temperaturas muy altas, se fomenta la muerte celular prematura de la biomasa, por ende, puede causar una parada de fermentación. Otro factor que hay que tener en cuenta es que el alza de temperatura brusco puede provocar estrés térmico en las levaduras, por lo que no se recomienda promover cambios de temperatura igual o superiores a 5 °C (Togores, 2018).

Por otro lado, las bajas temperaturas permiten aumentar la tolerancia de las levaduras a la presencia de etanol, debido a que aumenta el grado de insaturación de los ácidos grasos de la membrana de la levadura (Pérez et al., 2018). Esto favorece el crecimiento de biomasa cuando hay altas concentraciones de etanol.

Usualmente la fermentación alcohólica de vinos blancos se realiza a bajas temperaturas para mejorar el perfil aromático, ya que se favorece la retención de aromas, mejora la calidad del vino respecto a la acidez volátil y aumenta la producción de alcohol y glicerol.

Por otro lado, la fermentación alcohólica es un proceso exotérmico, en el cual se liberan 25,4 kcal/mol de energía en forma de calor al mosto, por lo que sube la temperatura de éste. Actualmente los fermentadores de las bodegas cuentan con chaquetas refrigerantes que previenen las alzas de temperatura durante la fermentación.

3.7 Modelos Cinéticos de fermentación.

Actualmente existen dos tipos de modelos matemáticos: basados en datos o de caja negra, que buscan describir un sistema sin tener conocimiento del comportamiento interno; y los modelos basado en ecuaciones ó fenomenológicos que buscan describir cuáles son los comportamientos que describen a un determinado sistema.

Los modelos de caja negra son sencillos, parsimoniosos y fácilmente identificables. Sin embargo, presentan la dificultad de ser poco interpretables, por lo que la extrapolación de sistemas similares con diferentes condiciones de operación carece de sentido (Brun et al., 2001).

Los modelos fenomenológicos, en cambio, buscan describir cuáles son los fenómenos internos que ocurren en un proceso. Sin embargo, éstos suelen ser más complejos y presentan poca identificabilidad debido a que "lo que desea describirse internamente del sistema es superior a lo que puede observarse sobre la descripción externa del sistema" (Brun et al., 2001). Estos sistemas se fundamentan en base a hipótesis basados en la comprensión del funcionamiento de los procesos.

En esta investigación se trabajará con modelos mecanicistas que buscan describir el comportamiento interno de la fermentación en torno a las tasas de consumo de nitrógeno, azúcares, tasas de producción de metabolitos primarios y cómo éstos se ven afectados por el crecimiento de biomasa.

Los modelos de fermentación de vinos actuales tienen como principio el modelo cinético de Monod, que define el crecimiento celular de la biomasa en función de sustratos como nutrientes limitantes (Miller and Block, 2020). Sin embargo, hay distintos estudios que definen la biomasa de diferentes formas, entre las cuales está la biomasa total, que es la que se forma durante la fermentación, y posteriormente está la biomasa activa o viable, que promueve el consumo de nitrógeno y azúcares, el crecimiento de ambas biomasas y el consumo de azúcar se puede observar en la Figura 3.7.

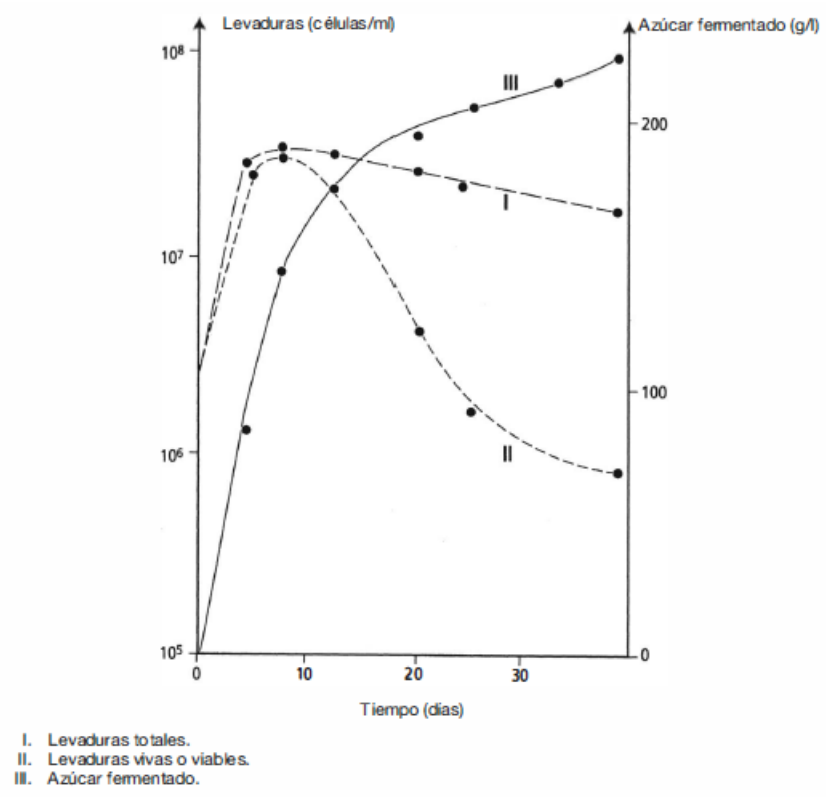


Figura 3.7: Curvas de crecimiento de levaduras en fermentación alcohólica,(Togores, 2018)

El primer modelo cinético que contempló los efectos de la temperatura en la cinética de fermentación fue el modelo de Boulton, el cual además contempla los efectos de la concentración inicial de glucosa y fructosa, en conjunto con el etanol producido en el crecimiento de la biomasa. Por otro lado, (Cramer et al., 2002) contempla el nitrógeno como reactivo limitante en el proceso de fermentación, ya que de este compuesto depende el crecimiento de biomasa. Posteriormente Coleman et al. (2007) desarrolló un modelo predictivo que contempla los efectos de la temperatura en la cinética de fermentación, experimentando con mostos de vinos blancos que poseen diferentes concentraciones iniciales de azúcar y nitrógeno. El problema de este último modelo es que define los efectos de la temperatura en la fermentación a partir de ecuaciones polinómicas que no poseen un sentido físico (modelo de caja negra).

3.7.1 Modelo Zenteno.

Basándose en los modelos planteados previamente, Zenteno et al. (2010) elabora un nuevo modelo que contempla los efectos de la temperatura y los gradientes de temperatura en los estanques de dimensión industrial.

Los supuestos del modelo plantean que el crecimiento de la biomasa depende del etanol y la

temperatura; que el nitrógeno es el sustrato limitante; que el consumo de azúcar para la producción de etanol y biomasa son independientes; además contempla los efectos de la inhibición competitiva que se ejerce entre la glucosa y fructosa, en especial bajo la existencia de altas concentraciones de azúcar total y aborda los efectos de la inhibición del etanol en el consumo de azúcar (Zenteno et al., 2010).

El crecimiento de biomasa viable X_v se modela a partir de la Ecuación 3.2:

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu - K_D) * X_v \tag{3.2}$$

La tasa de crecimiento de biomasa μ contempla los efectos de la temperatura y su comportamiento, este se modela a partir de la Ecuación 3.3:

$$\mu = \mu_{max}(T) * \frac{N}{N + k_N(T)} \tag{3.3}$$

Los efectos de la temperatura en la tasa de crecimiento de biomasa máximo se modelan a partir de la Ecuación 3.4:

$$\mu_{max} = \mu_0 * exp[\frac{E_{ac} * (T - 300)}{300 * R * T}] \tag{3.4}$$

Por otro lado, la tasa de decaimiento celular de biomasa K_D se ve influenciada por la temperatura y las concentraciones de etanol presentes durante la fermentación. Dicho comportamiento se modela a partir de la Ecuación 3.5

$$K_D = k_{D0} * exp[C_{de} * E + E_{td} * \frac{T - 305,65}{305,65 * R * T}] \tag{3.5}$$

Esta expresión se activa en función de la temperatura umbral a la cual se produce la muerte térmica. Si la temperatura a la cual se efectúa la fermentación es mayor que la temperatura umbral, se activa la tasa de decaimiento celular. La temperatura umbral se define a través de una ecuación polinómica asociada a las concentraciones de etanol presentes en el mosto que se da a conocer en la Ecuación 3.6 (Zenteno et al., 2010).

$$T_D = -0,0001E^3 + 0,0049E^2 - 0,1279E + 315,89 \tag{3.6}$$

La tasa de consumo de nitrógeno depende directamente de la cantidad de biomasa presente. $Y_{X/N}$ corresponde al coeficiente de rendimiento de biomasa/nitrógeno, el cual relaciona cuanto nitrógeno se consume para producir cierta cantidad de biomasa. El consumo de nitrógeno en el tiempo se modela a partir de la Ecuación 3.7:

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{X/N}} * X_v \tag{3.7}$$

El consumo de glucosa y fructosa está definido por las Ecuaciones 3.8 y 3.9:

$$\frac{dGlx}{dt} = -(\frac{\mu}{Y_{X/G}} + \frac{\beta_G}{Y_{E/G}} + m * \frac{Glx}{Glx + F}) * X_v \tag{3.8}$$

$$\frac{dF}{dt} = -(\frac{\mu}{Y_{X/F}} + \frac{\beta_F}{Y_{E/F}} + m * \frac{F}{Glx + F}) * X_v \tag{3.9}$$

$Y_{X/G}$ e $Y_{X/F}$ son los coeficientes de rendimiento que relacionan cuanta glucosa o fructosa se consumen para producir biomasa, mientras que $Y_{E/G}$ e $Y_{E/F}$ son los coeficientes de rendimiento que relacionan cuanta glucosa y fructosa se consume para producir etanol. La tasa específica de mantenimiento celular m pondera el contenido de glucosa y fructosa en función del contenido total de azúcar. El valor de m se ve afectado por la temperatura, y se modela a partir de la Ecuación 3.10 (Zenteno et al., 2010).

$$m = m_0 * exp[\frac{E_{am} * (T - 293,3)}{293,3 * R * T}] \tag{3.10}$$

Por otro lado, β_G y β_F representan la fracción de glucosa y fructosa que va a producir etanol y su comportamiento se modela a partir de las Ecuaciones 3.11 y 3.12.

$$\beta_G = \beta_{Gmax} * \frac{Glx}{Glx + k_{Glx}(T)} * \frac{k_{IE}(T)}{Eth + k_{IE}(T)} \tag{3.11}$$

$$\beta_F = \beta_{Fmax} * \frac{F}{F + k_F(T)} * \frac{k_{IG}(T)}{Glx + k_{IG}(T)} * \frac{k_{IE}(T)}{Eth + k_{IE}(T)} \tag{3.12}$$

Esta ecuación plantea que existe preferencia en el consumo de glucosa por sobre el consumo de fructosa debido a que su metabolización es más eficiente (Gee and Ramirez, 1994). Las tasas máximas de producción poseen dependencia de la temperatura y esto se modela a partir de la Ecuación 3.13.

$$\beta_{imax} = \beta_{i0} * exp[\frac{E_{afe} * (T - 296,15)}{296,15 * R * T}] \qquad i = Glx, F \tag{3.13}$$

Además se determinó que las constantes cinéticas pueden ser modeladas a partir de la ecuación de Arrhenius, la cual contempla los efectos de la temperatura. Su formula se da a conocer en la Ecuación 3.14.

$$k_i = k_{i0} * exp[E_{ak_i} \frac{*(T - T^r)}{293,15 * R * T}] \qquad i = N, Glx, F, IG, IE \tag{3.14}$$

Donde IE representa la constante de inhibición del etanol e IG representa la constante de inhibición de glucosa.

Por otro lado, para la producción de etanol se utiliza el modelo de Luedeking y Piret, el cual plantea que la producción de etanol se produce antes de que finalice el crecimiento exponencial de la biomasa, por ende, no presenta un factor de crecimiento asociado. Su comportamiento se modela a partir de la Ecuación 3.15:

$$\frac{dE}{dt} = (\beta_G + \beta_F) * X_v \tag{3.15}$$

3.7.2 Modelo Henriques

Para efectos de esta investigación se trabajará con uno de los modelos estudiado en la investigación "The Monod Model Is Insufficient To Explain Biomass Growth in Nitrogen-Limited Yeast Fermentation" (Henriques and Balsa-Canto, 2021), que contempla la biomasa total y la biomasa activa.

La tasa de crecimiento de biomasa se divide en dos tipos: la masa celular activa, que es responsable del consumo de sustratos y de la producción de etanol y glicerol; y la biomasa total, que es el conjunto de biomasa activa e inactiva. La biomasa total se modela a partir de la Ecuación 3.16, mientras que la biomasa activa contempla la tasa de decaimiento celular K_D y se modela a partir de la Ecuación 3.17. Ambas ecuaciones se obtienen a partir del modelo de (Cramer et al., 2002).

$$\frac{dX}{dt} = \mu * X \tag{3.16}$$

$$\frac{dX_A}{dt} = \frac{dX}{dt} - K_D * X_A * E \tag{3.17}$$

La tasa de crecimiento de biomasa μ se modela a partir de la ecuación de Monod, la cual está directamente relacionada al consumo de nitrógeno, como se observa en la Ecuación 3.18 y se multiplica por un factor lag que contempla la fase de latencia del crecimiento celular, su comportamiento se modela a partir de la Ecuación 3.19 basado en el modelo planteado por Baranyi and Roberts (1994) .

$$\mu = lag(t) * \mu_{max}(T) * \frac{N}{N + k_N(T)} \tag{3.18}$$

$$lag(t) = \frac{a_0}{a_0 + (1 + a0) * e^{\mu_{max}} * t} \tag{3.19}$$

Para la modelación del consumo de nitrógeno se plantea el modelo de Cramer, el cual se puede

observar en la Ecuación 3.20:

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{X/N}} * X \tag{3.20}$$

En esta ecuación se determina que el consumo de nitrógeno está asociado al crecimiento de la biomasa total.

Las tasas de consumo de glucosa y fructosa contemplan los efectos de la fase de latencia y plantean que el consumo de cada uno de estos azúcares está asociado al crecimiento de la biomasa activa. Las tasas de consumo de glucosa y fructosa se modelan a partir de las Ecuaciones 3.21 y 3.22.

$$\frac{dGlx}{dt} = -X_A * v_{Glx} * lag(t) \tag{3.21}$$

$$\frac{dF}{dt} = -X_A * v_F * lag(t) \tag{3.22}$$

La velocidad de transporte de glucosa y fructosa v_{Glx} y v_F está definido a partir de las ecuaciones de cinética de Michaelis y Menten, las cuales se muestran en las Ecuaciones 3.24 y 3.25. Además, contempla los efectos de inhibición provocada por la presencia de etanol, cuyo comportamiento se modela a partir de la Ecuación 3.23.

$$\phi_E = \frac{1}{1 + E/k_{iE}} \tag{3.23}$$

$$v_{Glx} = v_{max,Glx} * \frac{Glx}{Glx + k_{Glx}} * \phi_E \tag{3.24}$$

$$v_F = v_{max,F} * \frac{F}{F + k_F} * \phi_E \tag{3.25}$$

Además, el modelo plantea que la producción de metabolitos está vinculado al consumo de glucosa y fructosa en el tiempo. Los metabolitos por estudiar en este modelo son el etanol y el glicerol, y su producción se modela a partir de las Ecuaciones 3.26 y 3.27.

$$\frac{dE}{dt} = -Y_{E/S} * (\frac{dGlx}{dt} + \frac{dF}{dt}) \tag{3.26}$$

$$\frac{dGly}{dt} = -Y_{Gly/S} * (\frac{dGlx}{dt} + \frac{dF}{dt}) \tag{3.27}$$

Donde $Y_{E/S}$ y $Y_{Gly/S}$ son los coeficientes de rendimiento que vinculan cuanta azúcar total se consume para producir etanol y glicerol respectivamente.

Capítulo 4

Materiales y Métodos

4.1 Fermentaciones de vino blanco.

Se llevaron a cabo fermentaciones de vino blanco a escala piloto y laboratorio. En cada caso, se recibió el mosto y se realizaron mediciones de grados Brix, densidad, YAN inicial y azúcares totales. Además, se evaluó si el mosto requería corrección de YAN, y en caso afirmativo, se aplicó la corrección mediante la adición de FDA.

Posteriormente se inoculó el mosto con levadura Maurivin PDM. Se efectuó un monitoreo continuo de temperatura para asegurar que se trabajó con las condiciones indicadas. En el caso de los reactores a escala piloto, la temperatura se midió en función de lo que dicta la chaqueta de refrigeración, la cual es monitoreada desde la sala de control de la bodega experimental de la viña y la temperatura se regula con agua de refrigeración, mientras que en los reactores a escala de laboratorio, se midió la temperatura del baño termorregulado. Se emplean sistemas de refrigeración para prevenir el alza de temperatura provocado por las reacciones químicas involucradas en la fermentación, que liberan energía en forma de calor.

Para efectos del modelo cinético solo se midió el cambio de YAN, glucosa y glicerol, mediante técnicas de espectro-fotometría. Para la medición de densidad y °Brix se utilizó el equipo analizador Anton Paar D35 y se realizaron mediciones puntuales. Se tomaron muestras de 250 ml, en el caso de los reactores a escala piloto, y muestras de 2 ml, para los experimentos a escala de laboratorio.

Durante la fermentación se efectúa la microoxigenación del mosto en la nutrición, ya que se favorece la cinética, debido a que aumenta la formación de biomasa y se mejora la mezcla del FDA en el mosto. Los efectos del oxígeno disuelto no están contemplados en el modelo cinético, sin embargo, se realizan mediciones puntuales de O_2 presente en las muestras con el medidor de oxígeno disuelto HQ30d.

No se efectuaron las mediciones de producción de biomasa ni de etanol, debido a que no se disponía de la tecnología necesaria. Al no tener conocimiento del comportamiento de la biomasa

durante la fermentación, no se conocen los efectos de la nutrición en el crecimiento de la levadura. Por otro lado, se estimó la concentración de etanol en el tiempo, mediante un balance de materia que se dará a conocer más adelante. Sin embargo, este método de estimación trae consigo la incertidumbre de la medición de azúcar, glicerol y de densidad.

En la Figura 4.1 se pueden apreciar los pasos realizados durante la experimentación.

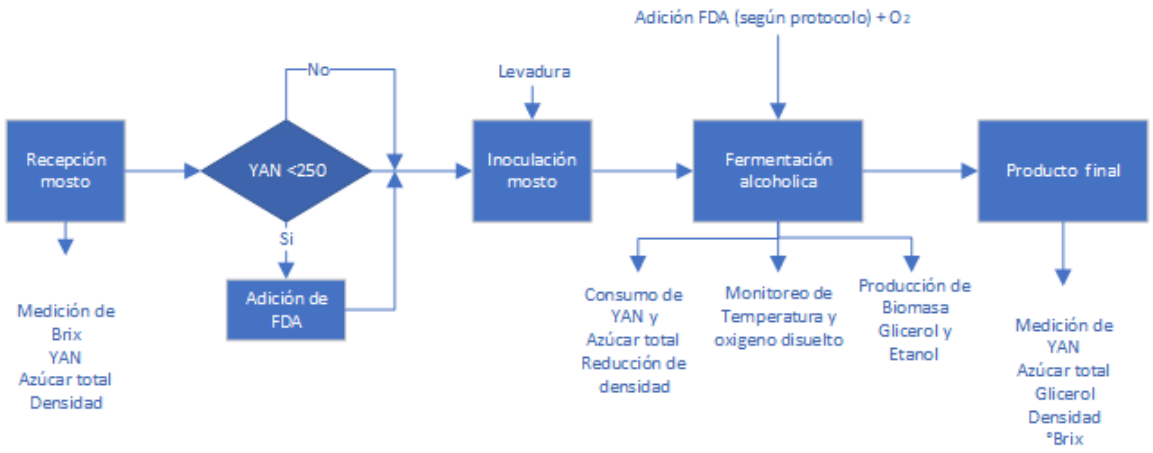


Figura 4.1: Plano de estanque de fermentación a escala piloto.

A partir de los modelos Henriques y Zenteno se propone la creación de un nuevo modelo que contempla 6 variables de estado, que son: consumo de YAN, glucosa y fructosa, crecimiento de biomasa viable y producción de etanol y glicerol y contempla los efectos de la temperatura. Las ecuaciones que describen el sistema se encuentran en el Anexo A.

4.2 Diseño de experimentos.

Se trabajó con tres experimentos diferentes; dos a escala piloto y uno a escala de laboratorio. Para los experimentos a escala piloto se utilizaron 230 litros de mostro fresco por reactor, mientras que en los experimentos de laboratorio se trabajó con 1,5 litros de mosto congelado.

El diseño de los experimentos fue elaborado por encargados del Área de Ingeniería del Centro de Investigación de la Viña Concha y Toro.

4.2.1 Protocolo de fermentaciones

Para las fermentaciones realizadas a escala piloto y a escala de laboratorio se trabajó con 0,3 g de levadura seca por litro de mosto y se efectuó el siguiente protocolo:

1. Esterilizar todos los implementos a utilizar con oxonia.

2. En un envase a temperatura ambiente, se hidrata la levadura con agua purificada a 37°C (ya que ésta es la temperatura ideal para iniciar la actividad de las levaduras). La solución resultante posee una concentración de 10% en peso. Se deja reposar la levadura por 30 minutos a una hora. En ese intertanto, añadir el mismo volumen de agua en mosto para disminuir la temperatura de la levadura.

3. Posteriormente se efectúa la inoculación del mosto en los fermentadores, dando comienzo a la fermentación.

4. Efectuar las aplicaciones de fosfato de amonio y el monitoreo de la fermentación según lo dicta el protocolo de cada experimento. Tras aplicar el FDA, realizar aplicaciones de oxígeno puro con difusor de cerámica por 30 segundos con un caudal de 100 [ml/min] hasta alcanzar una concentración de 6 mg/L.

5. Cuando el mosto alcance una densidad inferior a 993 [g/L] se da por finalizada la fermentación.

4.3 Materia prima.

Para el desarrollo de la investigación se utilizaron dos variedades de mosto de vino blanco: Chardonnay proveniente del fundo El Boldo, ubicado en la provincia de Cauquenes, cuartel 87 y mosto Sauvignon Blanc proveniente del fundo Ucuquer cuartel 54, ubicado en la ribera sur del río Rapel.

Las uvas, al ser recolectadas de diversos viñedos, exhiben variados perfiles de terroir, un concepto que postula una conexión entre la calidad del vino producido y el lugar específico de la cosecha de la uva. Este fenómeno se debe a que la presencia de nutrientes y materia orgánica en los suelos de un viñedo influye en las propiedades organolépticas del vino (Foroni et al., 2017). Diversas investigaciones indican que la composición fenólica de los mostos está condicionada por factores climáticos, radiación solar, exposición al sol y las características medioambientales. La riqueza en nitrógeno del terreno de la viña, por ejemplo, propicia la formación de compuestos nitrogenados en la vid (Bell and Henschke, 2005). Esto repercute en la cinética de fermentación del vino, por lo que el uso de mostos de uva con distintos perfiles de terroir puede influir en la calibración de los parámetros.

Los mostos que se utilizan son previamente clarificados, para evitar un exceso de material solido vegetal y fangos que se encuentran en suspensión, debido a que esto presenta consecuencias negativas en el perfil organoléptico de los vinos. Sin embargo, esto no presenta efectos en la cinética (Flanzy, 2000).

4.3.1 Mosto Chardonnay

Para los experimentos realizados a escala piloto se trabajó con mosto fresco, mientras que para los experimentos a escala de laboratorio se trabajó con mosto congelado, lo cual solo presenta efectos en la calidad del vino, no en la cinética.

Para la determinación de las condiciones iniciales del mosto se midieron las condiciones de cada uno de los 10 fermentadores con los cuales se trabajó y se estableció una condición promedio por cada variable estudiada, las cuales se dan a conocer en la Tabla 4.1:

Tabla 4.1: Composición inicial mosto Chardonnay (Elaboración propia, 2023).

	Concentración promedio	Desviación estándar	Unidad
Contenido de YAN promedio	233	13,11	[mg/L]
Contenido de Amonio promedio	83	6,24	[mg/L]
Contenido de PAN promedio	165	8,73	[mg/L]
Contenido de azucares totales	190,12	2,94	[g/L]
Contenido de Glucosa promedio	98,47	2,95	[g/L]
Contenido de Fructosa promedio	91,67	2,44	[g/L]

Sin embargo, para efecto de las calibraciones se trabajó con las condiciones iniciales de cada fermentador.

4.3.2 Mosto Sauvignon Blanc.

Para la caracterización inicial del mosto se midieron las condiciones de cada uno de los 10 fermentadores con los cuales se trabajó y se estableció una condición promedio por cada variable estudiada, las cuales se dan a conocer en la Tabla 4.2:

Tabla 4.2: Composición inicial mosto Sauvignon Blanc (Elaboración propia, 2023).

	Concentración promedio	Desviación estándar	Unidades
Contenido de YAN promedio	261,8	7,96	[mg/L]
Contenido de Amonio promedio	80	3,40	[mg/L]
Contenido de PAN promedio	196,2	5,57	[mg/L]
Contenido de azucares totales	184,43	6,28	[g/L]
Contenido de Glucosa promedio	96,06	3,60	[g/L]
Contenido de Fructosa promedio	88,36	2,93	[g/L]

Sin embargo, para efecto de las calibraciones se trabajó con las condiciones iniciales de cada fermentador.

4.3.3 Levadura.

La levadura que se utilizó para la realización de los experimentos es Maurivin PDM, la cual es del tipo Saccharomyces cerevisiae de variedad bayanus. Ésta se vende en estado seco y es una levadura enfocada en la elaboración de vinos, por su contribución en el perfil aromático y por sus fermentaciones robustas. Esta levadura es recomendada para fermentación de las cepas Chardonnay y Sauvignon Blanc.

4.4 Materiales y Equipos.

4.4.1 Estanques de fermentación a escala piloto.

Los estanques de fermentación fabricados a escala piloto poseen un volumen de 250 litros, con un diámetro de 0,47 metros. El estanque está fabricado con acero inoxidable, como se puede observar en la Figura 4.2.

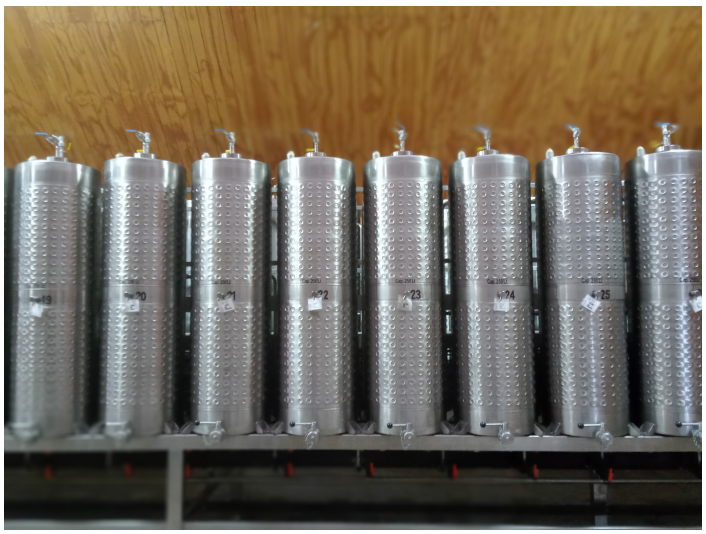


Figura 4.2: Estanques de fermentación de bodega.

Estos estanques cuentan con un acople rápido de gas Cornelius de plástico para prevenir eventos de sobre presión provocados por la generación de CO_2 durante la fermentación. Además, poseen una camisa de refrigeración abotonada de 1450x500x1 mm, con un área de 0,725 m_2, por donde ingresa el agua de refrigeración para efectuar el control de temperatura de los estanques. Los estanques cuentan con una válvula manual para efectuar la toma de muestras, la cual posee un diámetro de 0,5 pulgadas y se encuentra en la parte inferior del fermentador. Estas características se pueden observar en la Figura 4.3 .

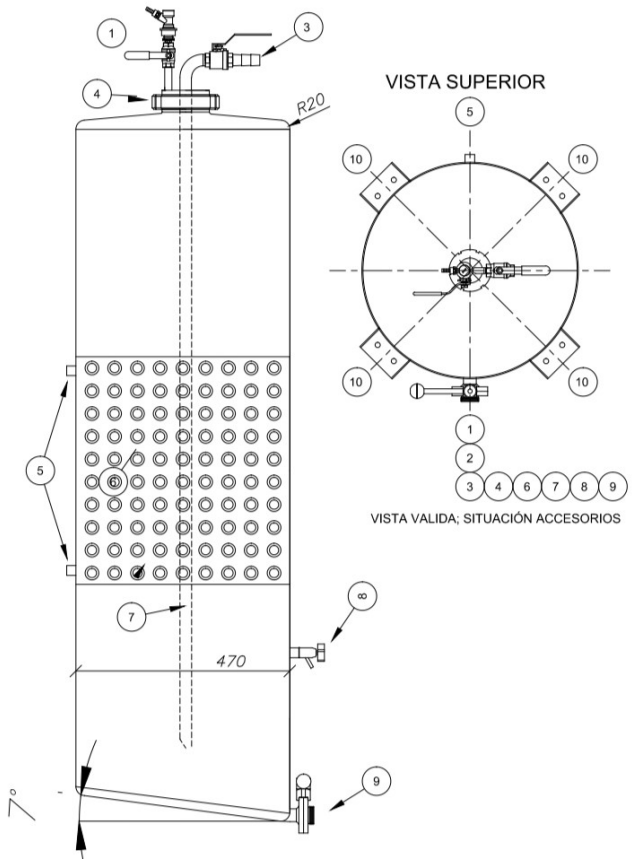


Figura 4.3: Plano de estanque de fermentación a escala piloto.

Trabajar con fermentadores a escala piloto presenta desafíos significativos, ya que lograr una mezcla homogénea a lo largo de todo el proceso es complejo. Además se producen gradientes de temperatura entre la chaqueta de refrigeración y el centro del fermentador, lo cual podría impactar la cinética de fermentación. Sin embargo, hasta el momento, este efecto no ha sido considerado en la calibración de los modelos. Además, otro factor que influye en la calibración es la limitación de la toma de muestras, que solo puede realizarse en la parte inferior del fermentador, donde se acumula la mayor cantidad de sedimentos generados durante la fermentación. Esta restricción puede afectar la precisión de las mediciones de los componentes a estudiar. Estas dificultades pueden provocar errores significativos al momento de efectuar las calibraciones de los modelos cinéticos estudiados.

4.4.2 Fermentadores a escala laboratorio.

Los fermentadores a escala de laboratorio fueron construidos utilizando botellas de vidrio boro silicato de 2 litros, las cuales contaban con una tapa que incorporaba un sistema de alivio de presión. Este mecanismo prevenía situaciones de sobre-presión generadas por la producción de dióxido de carbono (CO_2) durante la fermentación, al mismo tiempo que bloqueaba la entrada de

oxígeno al interior del fermentador. Además, los fermentadores cuentan con una manguera interna que simplifica la extracción de muestras sin necesidad de abrir el reactor, evitando así cualquier contacto inoportuno con el oxígeno y, por consiguiente, preservando la integridad del proceso. Los fermentadores se dan a conocer en la Figura 4.4.



Figura 4.4: Fermentadores a escala de laboratorio.

Para el control de la temperatura durante la fermentación, los fermentadores se sumergen en un baño termorregulado. La temperatura de este baño se controla mediante el baño de recirculación y calentamiento RW-1025G, cuyas características detalladas se presentan en la Sección 4.4.3.

La utilización de fermentadores de volumen reducido ofrece un mayor control sobre las variables que inciden en la fermentación. Esto se traduce en una mejor homogeneización de la mezcla, un mayor control de la temperatura, ya que se generan gradientes de temperatura más reducidos, y la posibilidad de realizar tomas de muestra en el centro del fermentador.

4.4.3 Baño de recirculación y calentamiento RW-1025G.

El baño de recirculación y calentamiento permite establecer temperaturas constantes en los fermentadores utilizados a escala de laboratorio. Este equipo cuenta con un serpentín metálico que entra en contacto con el agua del baño termorregulado (Viressa, n.d.). El equipo se puede observar en la Figura 4.5.

Las especificaciones técnicas del equipo se detallan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Especificaciones técnicas de baño de recirculación y calentamiento (Viresa, 2023).

Volumen	10 [L]
Rango de temperatura	-25 a 150 [°C]
Estabilidad de temperatura	0,05 [°C]
Controlador	Pantalla digital
Sensor	Pt100 Ω



Figura 4.5: Baño de recirculación y calentamiento RW-1025G.

4.4.4 Difusor cerámico con micro-poros

Para asegurar una micro-oxigenación controlada de los vinos se utilizó un difusor cerámico con micro-poros cuyo diámetro es de 1 micra, que permite la formación de burbujas pequeñas, lo cual favorece la difusión del oxígeno disuelto en el mosto. El implemento se observa en la Figura 4.6. Este equipo se utilizó para las fermentaciones a escala piloto y a escala de laboratorio.



Figura 4.6: Difusor cerámico con microporos.

4.4.5 Medidor de densidad portátil DMA 35 Anton Par.

El medidor de densidad portátil DMA 35 Anton Paar permite medir la densidad, °brix y temperatura de las muestras, lo cual permite obtener la curva de cinética de densidad y ° Brix. Las mediciones se indican en la pantalla del equipo, como se puede ver en Figura 4.7.

La medición de densidad se basa en el principio del tubo en U oscilante, ya que la muestra se ingresa a un tubo en U de boro-silicato, a la cual le llega una radiación tal que produce vibraciones en la frecuencia característica de la muestra, la cual tiene relación con la densidad de la muestra (AntonPaarGmbH, 2018).

Además, el equipo compensa los efectos de la temperatura automáticamente al momento de leer la densidad.



Figura 4.7: Medidor de densidad Anton Paar DMATM35.

Este equipo se utilizó para la medición de densidad de las muestras a escala piloto y a escala de laboratorio.

4.4.6 Medidor de oxígeno disuelto HQ30d.

El medidor de oxígeno disuelto HQ30d de marca HACH es un equipo digital que cuenta con una sonda digital de oxígeno disuelto luminiscente IntellicalTM LDO101, la cual reconoce el parámetro de los test, almacena el historial de calibración y los ajustes del método para minimizar los errores. Los rangos de medición del equipo van desde 0,1 a 20 mg/L de oxígeno disuelto(HACH, n.d.).

El equipo fue diseñado para realizar mediciones de oxígeno disuelto en aguas residuales, agua potable y aguas en general. El equipo se puede observar en la Figura 4.8.



Figura 4.8: Medidor de oxígeno disuelto HQ30d.

Este equipo se utilizó para la medición de oxigeno disuelto de las muestras a escala piloto y a escala de laboratorio.

4.4.7 Analizador automático Y15.

El analizador automático Y15 es un espectrofotómetro enzimático/químico, por ende, mide concentraciones de sustancias de una muestra utilizando reacciones enzimáticas y métodos colorimétricos. El principio básico de funcionamiento del equipo es que se añade una enzima especifica a la muestra, que reacciona con el compuesto de interés. Producto de esto, la muestra cambia de color, lo cual es medible a través del cambio de absorbancia, que es proporcional a la concentración del analito presente (BioSystems, n.d.).

El equipo fue creado por Biosystems TM con el propósito de realizar análisis enológicos en torno a la composición del vino. El equipo se observa en la Figura 4.9



Figura 4.9: Analizador automático Y15 de Biosystems.

Este equipo fue utilizado para realizar la medición de muestras tanto a escala piloto como a escala de laboratorio, centrándose en el comportamiento cinético de la fermentación de los vinos. Se llevaron a cabo mediciones de la composición de amonio, aminoácidos primarios, glucosa y glicerol a lo largo del tiempo.

La medición de los compuestos mencionados anteriormente se efectúa mediante el método diferencial birreactivo. Este método consiste en utilizar dos soluciones de reactivos: una que reacciona con el analito y otra solución que no reacciona. De esta forma se obtiene una muestra con reactivo y otra de referencia. Posteriormente se mide la diferencia de absorbancia de ambas muestras, la que se correlaciona con la concentración del analito presente en la muestra. Este método permite reducir las interferencias de la muestra que puedan afectar la precisión de la medición.

4.4.8 Medición y estimación de analitos de interés.

Medición de YAN.

La medición de YAN es un método calculado que contempla la suma de la medición de amonio y de nitrógeno amínico primario, presentes en el mosto.

Medición de Amoniaco.

La medición de amoniaco se efectúa mediante método enzimático, mediante el cual se mide el consumo de NADH, el cual se cuantifica espectrofotométricamente. La reacción química se da a conocer en la Ecuación 4.1 (BioSystems, n.d.):

$$NH_4^+ + NADH + H^+ + 2 - Oxoglutarato \xrightarrow{ph=9,5} Glutarato + NAD^+ \tag{4.1}$$

La lectura de absorbancia se efectúa con una longitud de onda de 340 nm a 37 °C.

Las características metrológicas se dan a continuación:

El límite de linealidad: 200 [mg/L].

Límite de detección: 3 [mg/L].

Para determinar la repetibilidad y la impresición total del metodo de medición se utilizaron dos concentraciones, cuyos resultados se dan a conocer en la Tabla 4.4:

Tabla 4.4: Indicaciones metrológicas de medición de amoniaco.

Concentración media [mg/L]	Repetibilidad	Imprecisión total
50	1,3%	4,6%
150	1,2%	1,6%

Según la "Guía Práctica de Validación de Métodos y Determinación de la Incertidumbre de la Medición" del Instituto de Salud Pública de Chile, se establece que la repetitibilidad para la medición de compuestos cuya concentraión es cercana a 100 [mg/L] debe ser inferior al 4%. En este contexto, las magnitudes proporcionadas en la Tabla 4.4 cumplen con dicho criterio, lo que indica que son apropiadas para llevar a cabo las mediciones según los estándares mencionados.

Los reactivos utilizados en el método son:

Reactivo A: Tetraborato de sodio 5 mmol/L, NADH 0,5 mmol/L y conservantes. Los reactivos poseen un pH 9,5.

Reactivo B: Hepes 400 mmol/L, 2-oxoglucarato 22 mmol/L, glutamato deshidrogenasa $>$ 140 140 U/ml, etilenglicol 0,2 L/L y conservantes. Los reactivos poseen un pH de 8,0.

Medición de Nitrógeno Amínico Primario (PAN).

Los compuestos nitrogenados del mosto que contienen un nitrógeno amínico primario reaccionan con o-ftaldialdehido (OPA), en presencia de un reductor en un medio básico, generando un compuesto que se cuantifica espectrofotométricamente. La reacción química se muestra a continuación (BioSystems, n.d.).

$$NH_2R + OPA \xrightarrow[reductor]{ph=9,5} [OPA - NH_2R] \tag{4.2}$$

La lectura de absorbancia se efectúa con una longitud de onda de 340 nm.

Las características metrológicas se dan a continuación:

El límite de linealidad: 400 [mg/L]. Límite de detección: 1 [mg/L].

Para determinar la repetibilidad y la impresición total del metodo de medición se utilizaron dos concentraciones, cuyos resultados se dan a conocer en la Tabla 4.5:

Tabla 4.5: Indicaciones metrológicas de medición de PAN.

Concentración media [mg/L]	Repetibilidad	Imprecisión total
68	0,8%	2,1%
135	0,4%	1,5%

Según la "Guía Práctica de Validación de Métodos y Determinación de la Incertidumbre de la Medición" del Instituto de Salud Pública de Chile, se establece que la repetitibilidad para la medición de compuestos cuya concentración es cercana a 100 [mg/L] debe ser inferior al 4%. En este contexto, las magnitudes proporcionadas en la Tabla 4.5 cumplen con dicho criterio, lo que indica que son apropiadas para llevar a cabo las mediciones según los estándares mencionados.

Los reactivos utilizados en el método son:

Reactivo A1: Solución tampón, conservantes, pH=9,9.

Reactivo A2: N-acetilcisteina, conservantes, pH=6,2.

Reactivo B: o-ftaldialdehido, conservantes, pH=9,4.

Medición de Glucosa y Fructosa.

Para medir las concentraciones de glucosa y fructosa presentes en el mosto se recurre al método enzimático para la determinación de D-glucosa y D-fructosa, las cuales al reaccionar generarán NADPH, que puede ser medido por espectrofotometría (BioSystems, n.d.).

$$D - Fructosa \xrightarrow{HK} Fructosa - 6 - fosfato + ADP \tag{4.3}$$

$$D - Gluctosa \xrightarrow{HK} Gluctosa - 6 - fosfato + ADP \tag{4.4}$$

$$Fructosa - 6 - fosfato \xrightarrow{PGI} Gluctosa - 6 - fosfato \tag{4.5}$$

$$Fructosa - 6 - fosfato + NADP^{+} \xrightarrow{G6P-DH} Gluconato - 6 - fosfato + NADH + H^{+} \tag{4.6}$$

La lectura de absorbancia se efectúa con una longitud de onda de 340 nm.

Las características metrológicas se dan a continuación:

El límite de linealidad: 8 [g/L].

Límite de detección: 0,01 [g/L].

Para la medición de concentraciones de azúcar superiores a 8 [g/L], el equipo emplea un método de dilución de la muestra a razón 1:40, de esta forma se logra extender el limite de linealidad hasta una concentración de azúcar total de 320 [g/L].

Para determinar la repetibilidad y la impresición total del metodo de medición de D-glucosa y D-fructosa se utilizaron dos concentraciones, cuyos resultados se dan a conocer en las Tablas 4.6 y 4.7:

Tabla 4.6: Indicaciones metrológicas de medición de D-glucosa.

Concentración media [g/L]	Repetibilidad	Imprecisión total
0,51	2,1%	3,4%
0,63	1%	2,8%

Tabla 4.7: Indicaciones metrológicas de medición de D-glucosa/D-fructosa.

Concentración media [g/L]	Repetibilidad	Imprecisión total
1,04	1,4%	2,4%
4,1	0,7%	2,8%

Según la "Guía Práctica de Validación de Métodos y Determinación de la Incertidumbre de la Medición" del Instituto de Salud Pública de Chile, se establece que la repetitibilidad para la medición de compuestos cuya concentración es cercana a 1 [g/L] debe ser inferior al 2,83%. En este contexto, las magnitudes proporcionadas en la Tabla 4.4 cumplen con dicho criterio, lo que indica que son apropiadas para llevar a cabo las mediciones según los estándares mencionados.

Los reactivos utilizados en el método son:

Reactivo A1: Solución tampón 70 mmol/L, Hexoquinasa $>$ 15 U/ml, NADP $>$1,5 mM, conservantes, pH=6,9.

Reactivo A2: Solución tampón 70 mmol/L, fosfoglucosa isomerasa $>$ 50 U/ml, conservantes, pH=6,9.

Reactivo B: Solución tampón 150 mmol/L, ATP $>$ 15 mmol/L, glucosa-6-fosfato, deshidrogenasa $>$ 10 U/ml, conservantes, pH = 8,9.

Por otro lado, para economizar gastos en la medición de D-glucosa/D-fructosa se crea una curva que relaciona densidad con la cantidad de azúcar total presente en los mostos. Se determinó que esta relación es lineal y se puede observar en la Figura 4.10.

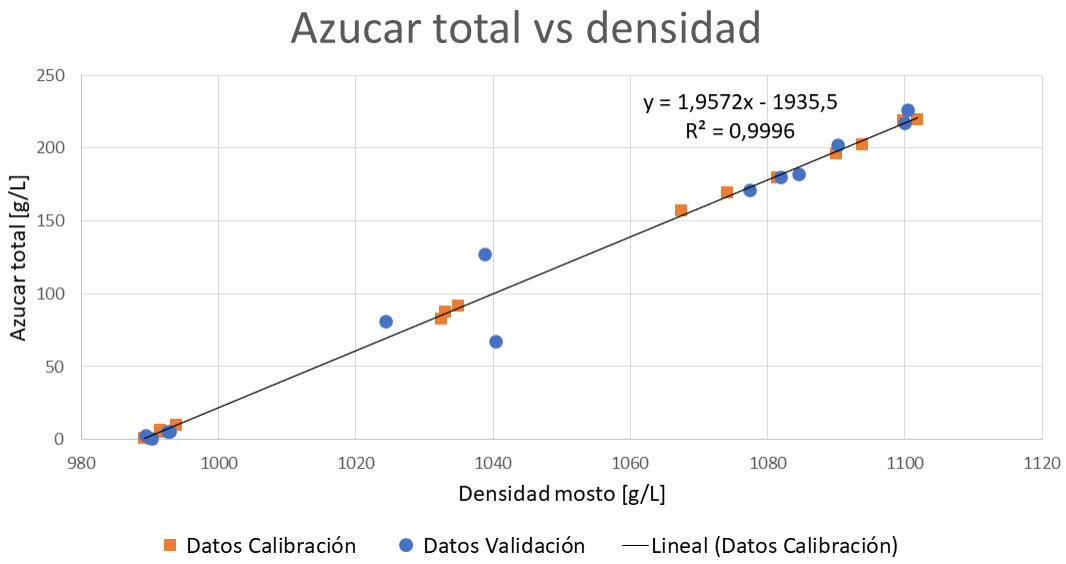


Figura 4.10: Curva de calibración de azúcar total en función de la densidad del mosto.

Finalmente, para calcular la fructosa presente en el mosto, se resta la glucosa medida de la azúcar total estimada.

Medición de Glicerol.

El glicerol se determina por métodos de colorimetría, en que las reacciones acopladas generan un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría (BioSystems, n.d.).

$$Glicerol + ATP \xrightarrow{Glicerolquinasa} Glicerol - 3 - p + ADP \tag{4.7}$$

$$Glicerol - 3 - p + ADP + O_2 \xrightarrow{G-3P-oxidasa} Dihidroxiacetona - P + H_2O \tag{4.8}$$

$$2H_2O + 4 - Aminoantipirina + 4 - Clorofenol \xrightarrow{Peroxidasa} Quinoaimina + 4H_2O \tag{4.9}$$

La lectura de absorbancia se efectúa con una longitud de onda de 500 ± 20 nm a 37 °C.

Las características metrológicas se dan a continuación:

El límite de linealidad: 20 [g/L].

Límite de detección: 0,24 [g/L].

Para determinar la repetibilidad y la impresición total del metodo de medición se utilizaron dos concentraciones, cuyos resultados se dan a conocer en la Tabla 4.8:

Tabla 4.8: Indicaciones metrológicas de medición de glicerol.

Concentración media [g/L]	Repetibilidad	Imprecisión total
0,15	2%	4,7%
0,63	1%	3%

La composición del reactivo a utilizar es:

Pipes 45 mmol/L, cloruro de magnesio 5mmol/L, 4 -clorofenol 6 mmol/L, glicerol quinasa >1,5 U/ml, glicerol-3-fosfato oxidasa > 4 U/ml, peroxidasa > 0,8 U/ml, 4-aminoantipirina 0,75 mmol/L, ATP 0,9 mmol/L. La solución reactiva se encuentra a un pH pH 7.0.

Estimación de etanol

Para estimar la concentración de etanol, se plantea un balance de masa que se basa en la suposición de que el azúcar presente se consume exclusivamente para la producción de etanol mediante la fermentación alcohólica y glicerol mediante la fermentación gliceropirúvica, como se propone en el trabajo de Togores (2018). Además, para los propósitos de esta investigación, se considera que la concentración de azúcar destinada a la formación de otros compuestos es despreciable.

La Tabla 4.9 da a conocer la reacción química simplificada que ocurre durante la fermentación gliceropirúvica y tal como se menciona en el apartado "Fermentación Gliceropirúvica". El piruvato producido en esta reacción no será utilizado para producir etanol (Togores, 2018).

Tabla 4.9: Fermentación Gliceropirúvica.

	$C_6H_{12}O_6$	->	Glicerol	+	Piruvato
ni	a_0		G_0		
nr	$-a_0\varsigma_1$		$a_0\varsigma_1$		$a_0\varsigma_1$
nf	a_0(1- ς_1)		G_0+aς_1		$a_0\varsigma_1$

Donde a_0 representa los moles de azúcar inicial del proceso, G_0 representa los moles iniciales de glicerol y ς_1 representa el factor de conversión de azúcar en glicerol.

Para obtener ς_1 se trabaja con la concentración de glicerol en el tiempo tal como se muestra en la Ecuación 4.10, donde PM representa el peso molecular del azúcar y del glicerol respectivamente.

$$\varsigma_1 = \frac{G(t) - G_0}{a_0} * \frac{PM_{azzucar}}{PM_{Glicerol}} \tag{4.10}$$

Se asume que la fermentación alcohólica ocurre de manera simultánea a la fermentación gliceropiruvica, por lo que una parte de la azúcar consumida en un instante de tiempo específico se emplea para producir glicerol, mientras que la otra parte se emplea para producir etanol (Togores, 2018). La reacción química resumida de la fermentación alcohólica se puede observar en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10: Fermentación alcohólica.

	$C_6H_{12}O_6$	->	$2C_2H_6O$	+	$2CO_2$
ni	a_0(1- ς_1)				
nr	-a_0(1- ς_1)ς_2		$2a_0$(1- ς_1)ς_2		$2a_0$(1- ς_1)ς_2
nf	a_0(1- ς_1)(1- ς_2)		$2a_0$(1- ς_1)ς_2		$2a_0$(1- ς_1)ς_2
	Azucar(t)		Etanol(t)		$CO_2(t)$

Donde ς_2 representa el factor de conversión de azúcar disponible para producir etanol. Este factor se calcula a partir de la Ecuación 4.11.

$$\varsigma_2 = 1 - \frac{Azucar(t)}{a_0(1-\varsigma_1)} \tag{4.11}$$

Finalmente, para obtener las concentraciones de etanol en el tiempo se aplicó un factor de corrección de 1,11 basado en los valores finales de etanol que se obtuvieron según los datos entregados por la bodega experimental. El etanol en el tiempo se calcula a partir de la Ecuación 4.12.

$$Etanol(t) = 1,11 * 2 * a_0(1-\varsigma_1) * \varsigma_2 \frac{PM_{etanol}}{PM_{azucar}} \tag{4.12}$$

Para validar el método, se emplearon datos de fermentaciones de vinos blancos realizados en la bodega experimental el año 2022, en que se contaba con la medición de alcohol, azúcar y glicerol.

Las limitaciones de los supuestos empleados son que los resultados se pueden ver alterados por el error de arrastre que se pueda tener de las mediciones de glucosa, fructosa y de glicerol.

4.4.9 Experimentos a escala piloto.

Se trabajó con dos sepas diferentes en esta experimentación, los cuales son Chardonnay y Sauvignon Blanc. El propósito de ambas pruebas consistió en evaluar el efecto de los diferentes tiempos de nutrición y las diferentes dosis aplicadas, trabajando con diferentes temperaturas de fermentación. Para esto, se hizo un diseño factorial 2^3 con dos puntos centrales, teniendo un total de 10 experimentos por sepa, los cuales se efectuaron de manera simultanea. No se trabaja con replicados en esta instancia debido a que la medición de los compuestos es costosa y porque no se contaba con los fermentadores necesarios para realizar los replicados en la bodega experimental. Debido a esto no se pudo realizar los test por falta de ajuste para cada modelo que se estudió.

En la Tabla 4.11 se dan a conocer las combinaciones experimentales realizadas para la experimentación. Se utilizó el mismo diseño factorial para la experimentación en ambas cepas.

Tabla 4.11: Diseño factorial fraccionado vinos Chardonnay y Sauvignion Blanc a escala piloto.

Proceso	Tiempo de nutrición	Dosis FDA	Temperatura
1	+	-	-
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	+	+
5	-	+	+
6	-	-	+
7	-	+	-
8	-	-	-
9	0	0	0
10	0	0	0

Los factores por analizar son cuantitativos, para los mostos de cepa Chardonnay se trabajó con los factores que se dan a conocer en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12: Factores experimentales del diseño factorial Vino Chardonnay.

	Tiempo nutrición 1	Tiempo nutrición 2	Dosis FDA 1	Dosis FDA 2	Temperatura
+	6 día	9 día	30 g/hL	10 g/hL	19 °C
0	4 día	7 día	20 g/hL	20 g/hL	17 °C
-	2 día	5 día	10 g/hL	30 g/hL	15 °C

En bodega, se efectuó una adición de 23 g de FDA a cada estanque con mosto Chardonnay antes de comenzar la fermentación, debido a que el mosto inicial posee bajo contenido de YAN.

Debido a que los tiempos de nutrición empleados en la experimentación con vinos Chardonnay dieron resultados que no concordaban con lo esperado se efectuó un cambio en los tiempos de nutrición de los experimentos con mosto Sauvignon Blanc. Los factores a analizar se dan a conocer en la tabla 4.13.

Tabla 4.13: Factores experimentales del diseño factorial Vino Sauvignon Blanc.

	Tiempo nutrición 1	Tiempo nutrición 2	Dosis FDA 1	Dosis FDA 2	Temperatura
+	3,5 día	4,5 día	30 g/hL	10 g/hL	19 °C
0	2,5 día	3,5 día	20 g/hL	20 g/hL	17 °C
-	1,5 día	2,5 día	10 g/hL	30 g/hL	15 °C

Para las fermentaciones se midió el comportamiento de la glucosa, YAN y densidad en el tiempo. Además, se midieron las condiciones iniciales de cada estanque. Esto último a pesar de ser de la misma matriz, debido a que el mosto de uva blanca no es lo suficientemente homogéneo como para asumir la misma condición inicial en todos los estanques. Para las mediciones se emplearon muestras frescas.

Los tiempos de muestreo de la fermentación de ambos mostos se determinaron a partir de la simulación del comportamiento de la fermentación a partir del modelo Zenteno, empleando los parámetros nominales que se dan a conocer en la Tabla 7.2 y se emplearon las condiciones de operación dadas en el diseño factorial. Los tiempos de medición se enfocaron en registrar la fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria.

4.4.10 Vinos Chardonnay a escala laboratorio.

Se llevaron a cabo experimentos a tres diferentes temperaturas: 15, 17 y 19 °C, utilizando un protocolo de nutrición común que implicaba la adición de 20 g/hL de fosfato de amonio en el cuarto día de fermentación.

Previamente al inicio de la fermentación, se introdujeron 0,17 g de fosfato de amonio en cada fermentador para alcanzar un nivel inicial más elevado de Nitrógeno Asimilable (YAN).

El diseño experimental se ajustó para permitir triplicados de los experimentos, considerando la disponibilidad de fermentadores y reactivos de medición.

La realización de los experimentos por triplicado tuvo como objetivo abordar aspectos como el error experimental, la consistencia de los datos, la similitud de los resultados experimentales, el análisis de la variabilidad de los datos, la identificación de valores atípicos, la detección de errores por falta de ajuste y la evaluación de la reproducibilidad de los datos.

Con el fin de evitar grandes fluctuaciones de temperatura, los fermentadores fueron sumergidos en un baño termorregulado de dimensiones 33 x 49 cm, asegurándose de que el agua cubriera el nivel del mosto. El control de la temperatura se llevó a cabo mediante el uso del baño de recirculación y calentamiento RW-1025G, como se muestra en la Figura 4.11.

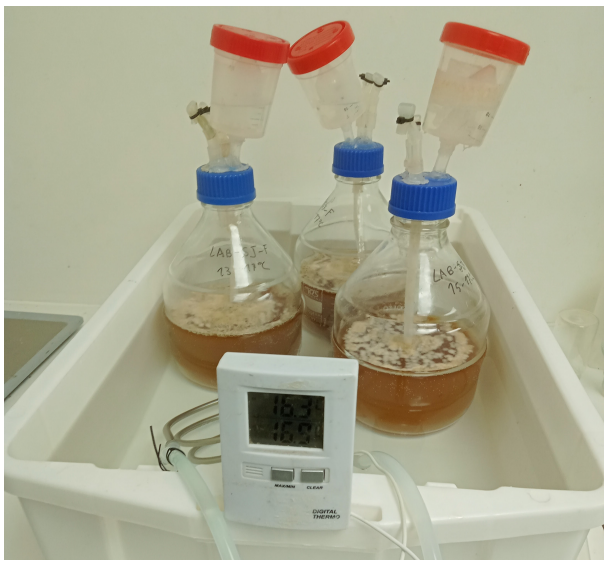


Figura 4.11: Baño termorregulado de fermentaciones a escala de laboratorio.

Los momentos de medición se determinaron basándose en la predicción del comportamiento de las curvas de consumo obtenidas al simular la fermentación alcohólica utilizando el modelo Zenteno. En esta simulación, se emplearon los parámetros nominales detallados en la Tabla 7.2, y se tuvieron en cuenta las condiciones de operación del experimento, centrándose específicamente en las mediciones durante la etapa de crecimiento exponencial de la biomasa.

Las limitaciones principales respecto a las mediciones del proceso de fermentación surgieron debido a que estas se llevaron a cabo durante el horario laboral. Por lo tanto, no fue posible realizar muestreos en momentos críticos de la fermentación. Esta limitación afectó la capacidad de caracterizar de manera más detallada las transiciones entre las diferentes etapas de la fermentación. La falta de muestreos en momentos cruciales restringió la sensibilidad de la calibración de los parámetros del modelo, impidiendo una comprensión más profunda de las dinámicas del proceso.

4.5 Calibración e identificación de modelos.

Usualmente los modelos matemáticos que simulan el comportamiento de sistemas biológicos complejos están compuestos por ecuaciones diferenciales, con una elevada cantidad de parámetros no medibles que deben estimarse a partir del ajuste del modelo a los datos experimentales. Sin embargo, el carácter no lineal de los modelos en conjunto con el elevado número de parámetros conlleva que la identificación del modelo sea compleja, producto del carácter multimodal del problema (Balsa-Canto and Banga, 2010).

El toolbox AMIGO.2 (Advanced Model Identification using Global Optimization), busca facilitar la identificación de parámetros mediante a la aplicación de métodos estocásticos globales, métodos híbridos y a la metaheurística para hacer frente a la multimodalidad en biología de sistemas.

Usualmente la identificación de modelos biológicos consume una gran cantidad de datos, por lo que AMIGO efectúa la ruta que se muestra en el esquema 4.12 para maximizar la precisión de la estimación de parámetros minimizando la función costo.

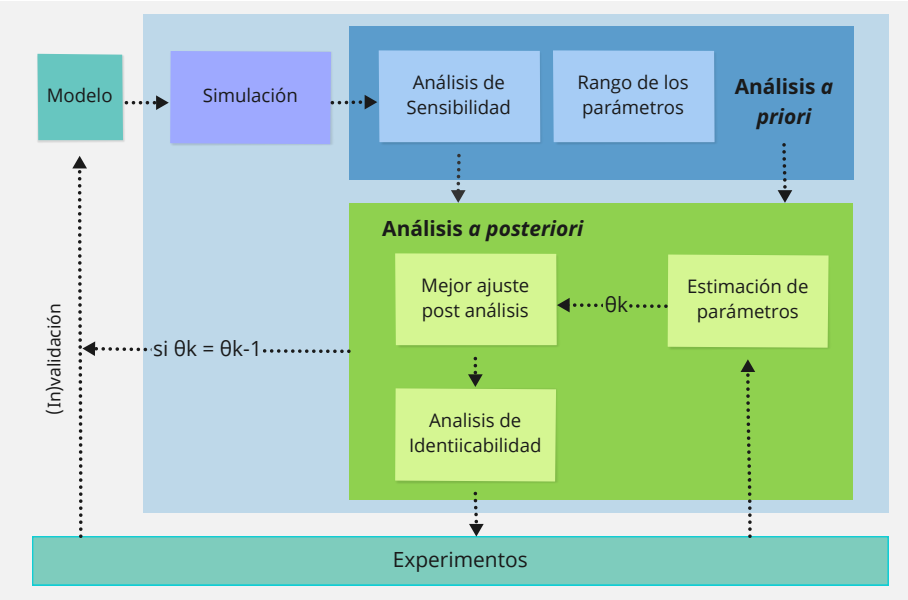


Figura 4.12: Procedimiento de identificación iterativa, Adaptado de Balsa-Canto et al. (2016).

En primera instancia se realiza un análisis de sensibilidad estructural para determinar que parámetros son más influenciables en el comportamiento del modelo, de esta manera se determina que datos se pueden estimar de manera confiable con los datos que hay disponibles. Con los parámetros seleccionados del análisis de sensibilidad estructural, se realiza la calibración de estos valores mediante el método de minimización de la función de costo, posteriormente se evalúan los intervalos de confianza de los parámetros y finalmente se realiza el análisis de los residuos para determinar si el modelo es estadísticamente correcto.

4.5.1 Elementos de la identificación de parámetros.

El sistema está descrito como un vector de variables de estado, que definen el cambio de diferentes variables en el tiempo. Este vector es la solución única del conjunto y se muestra en la Ecuación 4.13, donde $\dot{x}$ representa los valores simulados, x representa a los datos, u son los valores accionables, θ son los parametros y t es el tiempo.

$$f(\dot{x}, x, u, \theta, t) = 0 \tag{4.13}$$

4.5.2 Analisis de sensibilidad.

Para evitar la sobre parametrización de los modelos, respecto a alguna información, el software implementa el método planteado por Brun et al. (2001). Ellos abordan la identificabilidad de los parámetros a partir de un análisis de sensibilidad local (Brun et al., 2001).

La identificabilidad de los parámetros consiste en la clasificación de éstos por orden de su influencia relativa en el modelo, a partir del cálculo de las sensibilidades paramétricas locales, para un observable o un tiempo de muestreo, obteniendo una matriz de sensibilidad. Este método se define a partir de la Ecuación 4.14:

$$S_p^{e,o}(t_s^{e,o}) = \frac{dy^{e,o}}{d\theta_p}(t_s^{e,o}); \quad p = 1, ...n_\theta \tag{4.14}$$

Donde S_p mide el cambio de la función tras el cambio del valor de los parámetros. De esta forma se evalúa el impacto individual de los parámetros que determinan la variabilidad de los resultados del modelo. Para evaluar la sensibilidad local de cada parámetro se considera la sensibilidad del modelo a pequeñas variaciones de cada parámetro en un lugar específico.

Para obtener magnitudes adimensionales, respecto a la sensibilidad de los parámetros, se escala la matriz de sensibilidad según lo planteado en la Ecuación 4.15:

$$s_d = v_{ij}\frac{\Delta\theta_j}{SC_j} \quad i = 1, 2, ..., n \quad j = 1, 2, ..., m. \tag{4.15}$$

Donde v_ij es un elemento del vector de sensibilidad, $\Delta\theta$ es un rango razonable de parámetros y SC_j es un factor de escala con la misma dimensión física de la observación correspondiente. La norma de las columnas s_d indica la importancia individual de cada parámetro. Cuando el valor de la norma del parámetro es alto, significa que un cambio en el valor del parámetro presenta un efecto importante en el vector de resultados del modelo (Brun et al., 2001).

Para producir estimaciones más precisas el software AMIGO aplica el muestreo por hipervínculos latinos LHS (del inglés Latin hypercube sampling), que consiste en seleccionar una muestra representativa de un espacio de variables múltiples para maximizar la eficiencia y cobertura de la muestra. El LHS divide el espacio de variables en cubos y selecciona un solo punto en cada celda. Las variables se dividen en rangos iguales y se asigna un punto por rango en cada dimensión, asegurando que la muestra represente de manera equitativa el rango de valores de cada variable. Al utilizar este método se reduce la correlación entre variables y captura la variabilidad de forma eficiente (Balsa-Canto et al., 2016).

El muestreo por hipervínculos latinos, enfocado en el análisis de sensibilidad, divide el rango de cada parámetro en intervalos no superpuestos sobre la base de igual probabilidad a los cuales se denominará n_{lsh}. Posteriormente se selecciona aleatoriamente un valor de parámetros de cada n_{lsh} con respecto a la densidad de probabilidad del intervalo. Al implementar este método se puede explorar el espacio de parámetros sin requerir un gran número de muestras (Balsa-Canto et al., 2016).

Para obtener información en torno a los signos y la distribución de los valores de cada columna se recomienda calcular los siguientes factores de importancia:

$$\delta_j^{msqr} = \frac{1}{n_{lhs} n_d} \sqrt{\sum_{mc=1}^{n_{lsh}} \sum_{d=1}^{n_d} ([s_d]_{mc})^2} \tag{4.16}$$

$$\delta_j^{mabs} = \frac{1}{n_{lhs} n_d} \sum_{mc=1}^{n_{lsh}} \sum_{d=1}^{n_d} |[s_d]_{mc}| \tag{4.17}$$

$$\delta_j^{mean} = \frac{1}{n_{lhs} n_d} \sum_{mc=1}^{n_{lsh}} \sum_{d=1}^{n_d} [s_d]_{mc} \tag{4.18}$$

$$\delta_j^{max} = \frac{1}{n_{lhs} n_d} \sum_{mc=1}^{n_{lsh}} [maxs_d]_{mc} \tag{4.19}$$

$$\delta_j^{min} = \frac{1}{n_{lhs} n_d} \sum_{mc=1}^{n_{lsh}} [mins_d]_{mc} \tag{4.20}$$

Donde las diferencias entre δ_j^{msqr} y δ_j^{mabs} indican una gran variabilidad o valores atípicos en el rango de parámetros. δ_j^{max} y δ_j^{min} permiten detectar los valores atípicos y permite conocer el rango que puede tomar cada parámetro. La comparación entre δ_j^{mabs} y δ_j^{mean} permite saber si todos los posibles valores del parámetro presentan el mismo signo y δ_j^{mean} da a conocer el signo del efecto medio que el cambio de un parámetro tiene sobre el resultado del modelo. En el contexto de estimación de parámetros por el método de mínimos cuadrados ponderados δ_j^{msqr} la mejor opción respecto a la clasificación de parámetros (Brun et al., 2001).

A partir de esta información se determina si es necesario reformular el modelo o fijar los parámetros menos relevantes para mejorar la identificación estructural. De esta manera se reduce la incertidumbre de los parámetros que se van a calibrar.

4.5.3 Estimación de parámetros.

La estimación de parámetros se obtiene a partir de la minimización de la función de costo, que busca minimizar la diferencia entre el valor medio y el valor predicho. Para el caso en que la varianza es homocedástica, la función de costo se calcula a partir del método de mínimos cuadrados ponderado, el cual se muestra en la Ecuación 4.21.

$$Q_{lsq}(\theta) = \sum_{k=1}^{N_e} \sum_{j=1}^{N_{y,k}} \sum_{i=1}^{N_{t,j,k}} \frac{(y_{i,j,k}(x(t_i,\theta),\theta) - \tilde{y}_{i,j,k})^2}{\sigma_d^2} \tag{4.21}$$

Donde N_e es el número de experimentos, $N_{y,k}$ es el número de compuestos observados y $N_{t,k,j}$ es el número de puntos temporales de medición, donde el vector de residuos es construido a partir

del cuadrado del error. Este método de optimización es optimización por mínimos cuadrados no lineales(Gábor & Banga, 2015).

$$Minimizar \quad Q_{lsq}(\theta) = R(\theta)^T R(\theta) \tag{4.22}$$

$$\begin{aligned} \text{Sujeto a} \qquad & \theta_{min} \leq \theta \leq \theta_{max} \\ & \frac{dx(t,\theta)}{dt} = f(u(t), x(t,\theta), \theta), \\ & y(x,\theta) = g(x(t,\theta),\theta), \\ & x(t_0) = x_0(\theta), \quad t\epsilon[t_0, t_f]. \end{aligned}$$

4.5.4 Análisis de error.

Para evaluar si los modelos son estadísticamente correctos, se realizará un análisis de residuos que abordará los siguientes aspectos: Se realizará el análisis de varianza constante, se verificará si la media de los residuos se aproxima a cero, se examinará si los residuos muestran una distribución aleatoria o exhiben alguna tendencia discernible, y se evaluará la normalidad en la distribución de los residuos utilizando el test de Anderson-Darling.

Capítulo 5

Resultados y Discusión

5.1 Fermentación a escala de laboratorio

Para las fermentaciones realizadas a 15 °C se efectuaron 11 puntos de muestreo, mientras que para las fermentaciones realizadas a 17 °C se efectuaron 13 puntos de muestreo y para la fermentación a 19 °C se efectuaron 9 puntos de muestreo, esto debido a que existían cantidades restringidas de reactivo.

Por otro lado se puede observar que existe un contenido de YAN residual, que para efectos de la modelación de los datos se normalizará para optimizar los parámetros en función del YAN efectivamente consumido, para esto se restará el valor más bajo de YAN medido a la medición total del YAN, como se ilustra en la Figura 5.1.

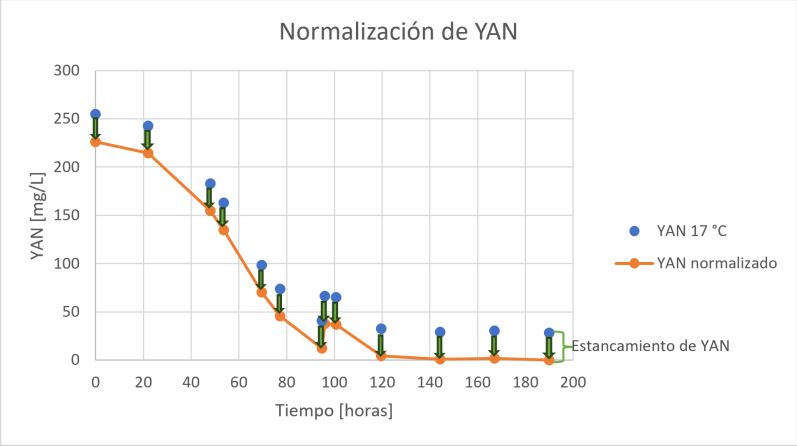


Figura 5.1: Ejemplo de normalización de YAN.

Según la revisión de la literatura, es frecuente encontrar la presencia de Nitrógeno Asimilable (YAN) residual durante el proceso de fermentación del vino. Esta situación se atribuye a la

existencia de compuestos nitrogenados que la levadura no logra sintetizar. La falta de utilización de estos compuestos impacta en la cinética de la fermentación, ya que no contribuyen al crecimiento de la levadura, como señala Tesnière et al. (2015).

Se identifican diversas fuentes de nitrógeno que la levadura prioriza para su consumo, debido a que favorecen un crecimiento específico elevado. Entre estas fuentes se encuentran la glutamina, glutamato, asparagina y el amonio. Por otro lado, existen fuentes de nitrógeno, como la prolina, alantoína o urea, que se consideran pobres en nitrógeno y promueven un crecimiento más lento. La levadura selecciona los sustratos que posibilitan un crecimiento óptimo mediante un mecanismo de regulación conocido como represión de catabólicos nitrogenados (NCR). De esta manera, la levadura evita la absorción de fuentes de nitrógeno que ofrecen un aporte limitado, como indicado por Tesnière et al. (2015).

A partir de la Figura 5.2 se puede observar que existe una alta variabilidad de los datos en la medición de glucosa, YAN y glicerol, esto se debe a que es muy complejo homogeneizar el mosto para que posea las mismas condiciones en todos los reactores. Además, la variabilidad de los datos se debe a que los métodos de medición no poseen buenos índices de replicación de los datos.

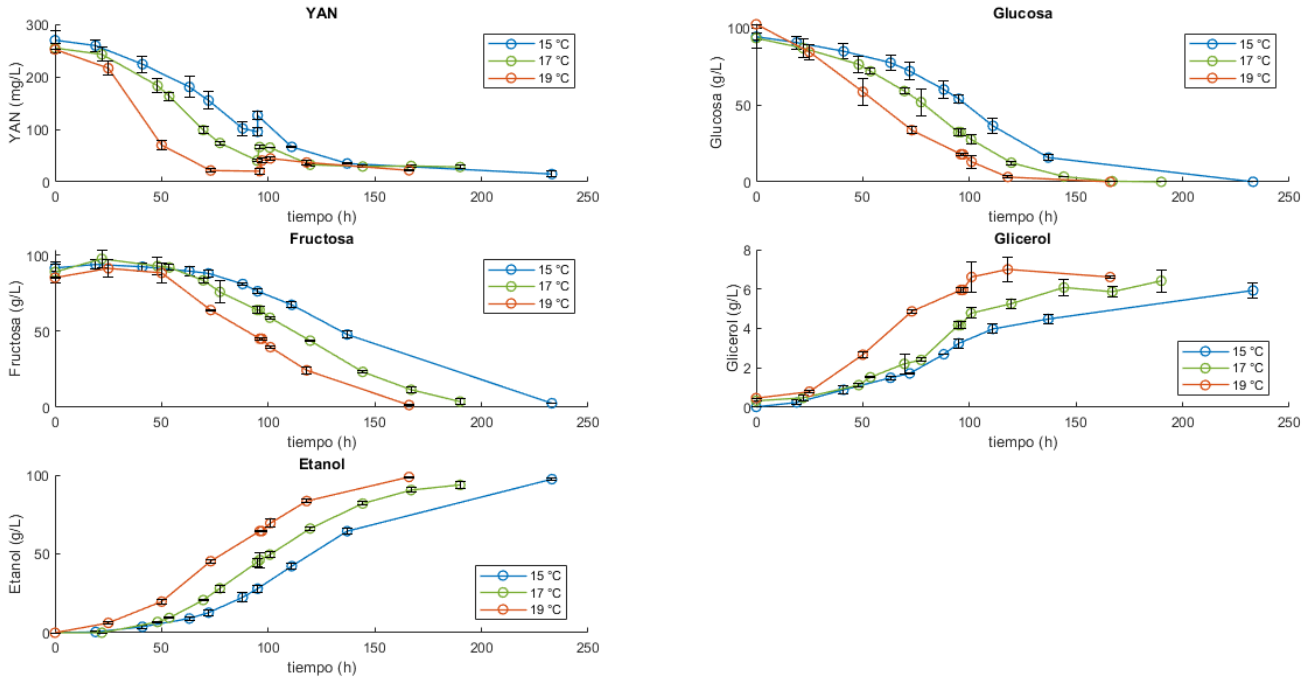


Figura 5.2: Tasas de consumo y producción durante la fermentación

Para la estimación de los parámetros se efectuó la eliminación de los *outliers* mediante criterio gráfico, los cuales pueden afectar la calidad de la estimación de los parámetros.

5.1.1 Benchmarck entre modelos Zenteno, Henriques y modelo Nuevo

Análisis de sensibilidad.

Para el análisis de sensibilidad se empleó el método del software AMIGO 2 explicado en la Sección 4.2.2. Para la realización de este análisis se utilizaron los parámetros nominales con sus respectivos valores máximos y mínimos que se dan a conocer en la Tabla 7.2 que se encuentra en el anexo. Además se ingresa al software las temperaturas utilizadas, y el protocolo de nutrición implementado.

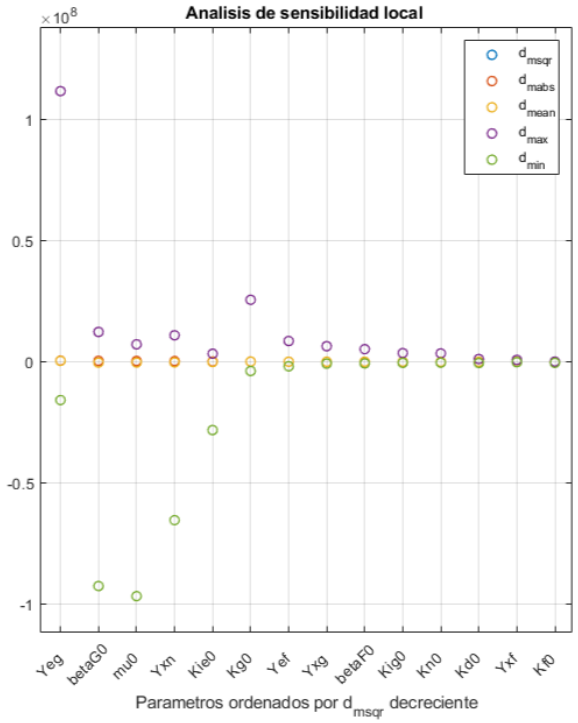
En las Figura 5.3 los parámetros están ordenados desde el que posee mayor sensibilidad al que posee menor sensibilidad estructural. Se puede observar que los parámetros k_{F0}, k_{G0}, k_{ig0}, k_{ie0}, en el caso del modelo Zenteno y del modelo propuesto y k_F, k_G y k_{ie} para el modelo Henriques, presentan una baja sensibilidad en los modelos, debido a que las concentraciones de sustrato poseen ordenes de magnitud superiores al valor de dichas constantes, haciendo que el efecto de estos parámetros en el modelo sea despreciable.

Por otro lado el parámetro k_{D0} o k_D, definen la muerte celular y está directamente relacionado con la medición de biomasa. Al no existir dichas mediciones la sensibilidad estructural del parámetro es muy baja.

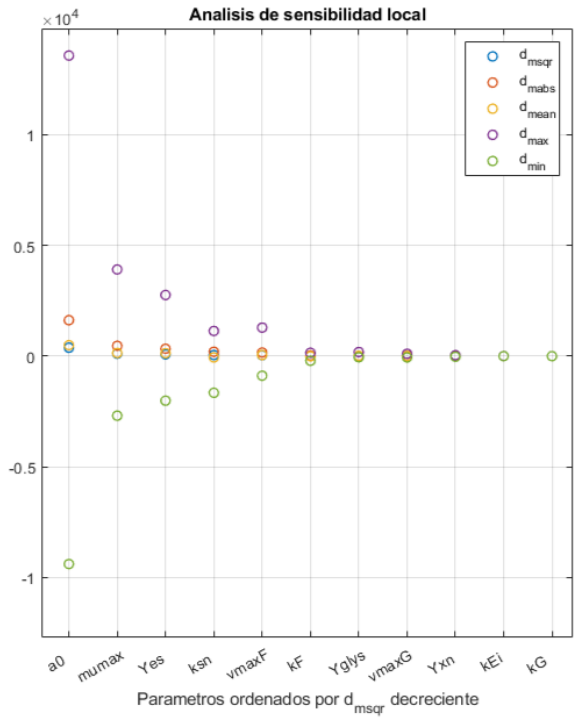
El parámetro k_{N0} o k_N es más sensible en la etapa de crecimiento exponencial, donde se produce el mayor consumo de nitrógeno. Al haber pocos datos en esa fase, el parámetro posee poca sensibilidad estructural.

Además los parámetros que representan los coeficientes de rendimiento de glucosa y fructosa en función de la biomasa $Y_{X/G}$ y $Y_{X/F}$ también poseen baja sensibilidad estructural, ya que definen cuanta glucosa y fructosa se consume para producir biomasa. Al no estar la medición de biomasa estos parámetros presentan dificultades para ser estimados.

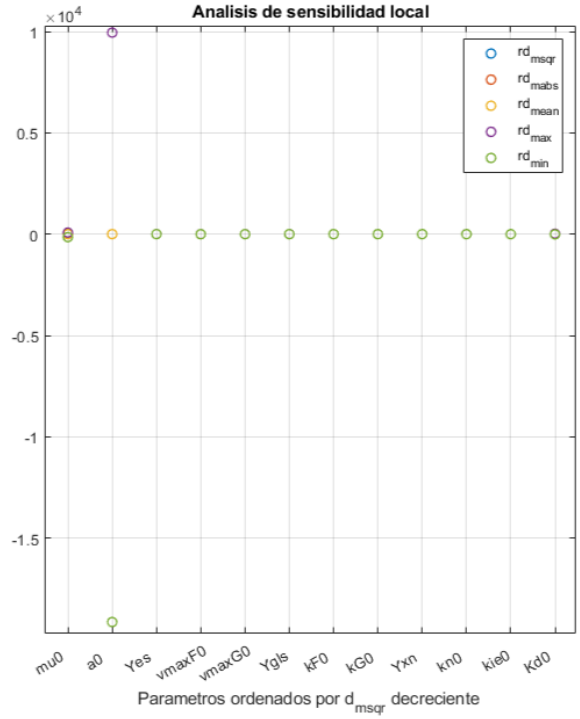
En el caso de los modelos Henriques y el modelo nuevo, el coeficiente de rendimiento de nitrógeno $Y_{X/N}$ presenta problemas de identificabilidad estructural, ya que posee relación directa con la producción de biomasa.



(Modelo Zenteno)



(Modelo Henriques)



(Modelo nuevo)

Figura 5.3: Análisis de sensibilidad de los modelos.

Estimación de parámetros.

Para la estimación de los parámetros se utilizarán los parámetros nominales que se dan a conocer en la Tabla 7.2 que se encuentra en el anexo.

Los parámetros estimados en el modelo Zenteno se dan a conocer en la Tabla 5.1. Los parámetros que no se encuentran en la Tabla no pudieron ser estimados por su baja sensibilidad estructural, por lo que se fija su valor al momento de realizar la calibración del modelo.

Tabla 5.1: Parámetros calibrados modelo Zenteno

Parámetros	Valor Nominal	Valor Calibrado	Intervalo de confianza
μ_0	0,098	0,055	10,90%
β_{G0}	0,230	0,431	19,10%
β_{F0}	0,586	0,426	32,60%
$Y_{X/N}$	31,422	8,936	23,50%
$Y_{E/G}$	0,765	0,545	14,90%
$Y_{E/F}$	0,627	5,189	22,30%

Se puede observar los intervalos de confianza son superiores al 5%, lo cual demuestra que existe alta incertidumbre en torno a estos parámetros. Para reducir la incertidumbre de los parámetros μ_0 y de $Y_{X/N}$ es necesario aumentar las mediciones en torno a la fase de consumo de nitrógeno, además, estos parámetros poseen relación directa con la medición de biomasa, por lo que es necesario incorporar la medición de este dato para reducir la incertidumbre. Por otro lado, para disminuir los intervalos de confianza de los parámetros, β_{G0}, β_{F0}, $Y_{E/G}$, $Y_{E/F}$, es necesario aumentar las mediciones de glucosa, fructosa y etanol en la etapa final de la fermentación, para saber en que minuto se produce el fin del consumo de los sustratos mencionados y por ende se produce el fin de la producción de etanol.

El modelo Henriques no contempla los efectos de la temperatura, por ende se realizará una calibración con los experimentos a 15 °C, a 17 °C y a 19 °C. Los parámetros estimados se dan a conocer en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2: Parámetros calibrados modelo Henriques.

		15 C°		17°C		19 °C	
Parámetros	Valor Nominal	Valor Calibrado	Intervalo de Confianza	Valor Calibrado	Intervalo de Confianza	Valor Calibrado	Intervalo de Confianza
a_0	0,0001	0,555570	36%	0,257	50,80%	0,269	93%
μ_{max}	0,244	0,042	9,50%	0,065	12,30%	0,096	21,20%
$Y_{E/S}$	0,374	0,486	7,57%	0,514	5,33%	0,503	6,72%
v_{maxG}	1,26	0,793	12,10%	1,053	9,95%	1,183	11,80%
v_{maxF}	0,592	0,307	9,94%	0,366	7,25%	0,348	9,02%
$Y_{Gly/S}$	0,105	0,039	6,32%	0,038	5,02%	0,0405	5,94%

Se puede observar que el parámetro a_0 presenta altos intervalos de confianza, esto se debe a que dicho parámetro define la duración de la fase de latencia, de la cual hay poca recopilación de datos. Para disminuir la incertidumbre en torno a este parámetro es necesario aumentar la toma de datos en la etapa inicial de fermentación para tener mayor claridad de cuando se acaba la fase de latencia durante la fermentación.

Por otro lado, la poca cantidad de datos de los experimentos realizados a 19 °C implican en altos intervalos de confianza en la estimación de μ_{max}, esto se debe a que hay pocas mediciones en torno a la fase de consumo de nitrógeno.

Los parámetros calibrados del modelo nuevo se dan a conocer en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3: Parámetros calibrados Modelo Nuevo.

Parámetro	Valor nominal	Valor calibrado	Intervalo de Confianza
a_0	0,0001	0,346	26,80%
μ_0	0,098	0,099	8,39%
$v_{max,G0}$	0,230	1,362	7,76%
$v_{max,F0}$	0,586	0,63	7%
$Y_{E/S}$	0,374	0,505	4,11%
$Y_{Gly/S}$	0,105	0,037	3,75%

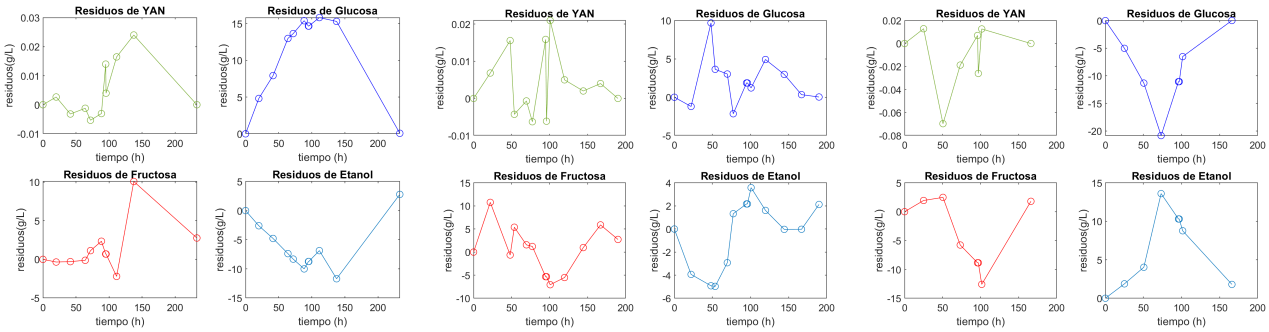
Se puede observar que la mayoría de los parámetros presentan intervalos de confianza inferiores al 10% salvo el valor de a_0, esto se debe a quese tomaron pocos datos al inicio de la fermentación, la cual tiene relación con el valor de a_0, ya que este valor posee relación directa con la fase de latencia del crecimiento celular. Otro factor a considerar es que la duración de la fase de latencia depende de la temperatura a la cual se efectúa la fermentación, sin embargo en el modelo se asume que el comportamiento del parámetro a_0 no depende de la temperatura, lo cual puede inducir a error en el modelo.

A partir de la calibración de parámetros se puede observar que el modelo nuevo es el que presenta una menor incertidumbre en la estimación de los parámetros.

Análisis de error Modelo Zenteno.

En la Figura 7.4 que se encuentra en el Anexo se muestra el comportamiento de los residuos del modelo Zenteno. Se puede observar que a los 15 °C los residuos asociados a la glucosa no muestran un comportamiento aleatorio, tendiendo a ser en su mayoría positivos, esto se debe a que en estos experimentos el consumo de azúcar se produjo más rápido que en el Experimento 1 por razones desconocidas. Además los residuos poseen una media lejana a cero, lo que indica que el modelo no es estadísticamente correcto en este caso, sin embargo la media de los residuos de YAN, etanol y fructosa si son cercanos a cero antes de las 100 horas, por lo que el modelo realiza un buen

ajuste en una etapa temprana de la fermentación. En los experimentos realizados a 17 °C se puede observar que la mayoría de los residuos posee una distribución aleatoria, salvo por los residuos asociados a la medición de fructosa en el segundo experimento, sin embargo los residuos asociados a la glucosa en el Experimento 5 y la fructosa en el Experimento 6 no poseen media cercana a cero, por lo que el modelo no es estadísticamente correcto en esas situaciones. Finalmente los residuos asociados a los experimentos realizados a 19 °C presentan un comportamiento no aleatorio en todos los experimentos y su media no es cercana a cero, por lo que se descarta que el modelo sera estadísticamente correcto en esta situación.

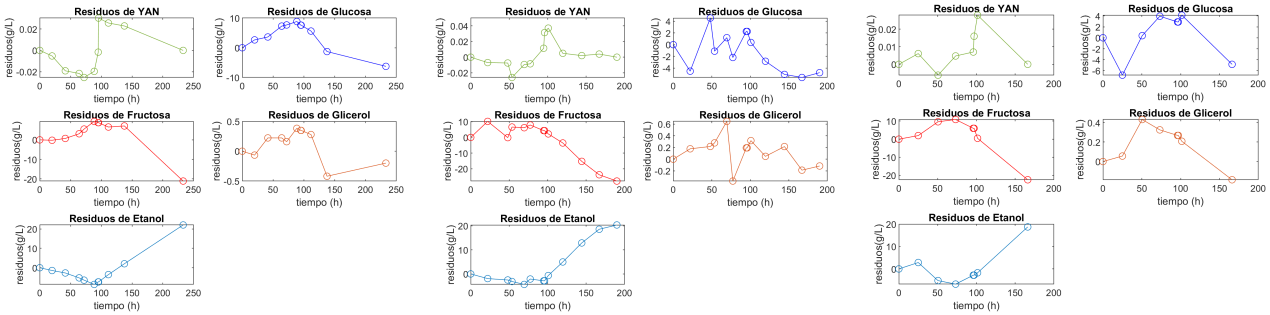


(Experimento 2 a 15 °C) (Experimento 5 a 17 °C) (Experimento 9 a 19 °C)

Figura 5.4: Análisis de residuos Modelo Zenteno

Análisis de error Modelo Henriques.

En la Figura 7.5, ubicada en el Anexo, se presentan los residuos relacionados con el modelo de Henriques. Se destaca que únicamente los residuos vinculados al comportamiento del glicerol en los experimentos llevados a cabo a 17 °C exhiben un patrón aleatorio, evidenciando una media cercana a cero, por lo que el modelo es estadisticamente correcto para la predicción del comportamiento de glicerol en el tiempo bajo estas condiciones. En contraste, los residuos asociados a los demás componentes muestran un comportamiento no aleatorio, con una media que se aparta de cero. Además, se observa que la magnitud de los residuos vinculados a la glucosa, fructosa y etanol tiende a aumentar en la fase final de la fermentación.



(Experimento 2 a 15 °C) (Experimento 4 a 17 °C) (Experimento 9 a 19 °C)

Figura 5.5: Análisis de error Modelo Henriques

La Figura 5.6 muestra que el modelo supone un estancamiento en el consumo de fructosa, lo que conlleva a que el modelo prediga una producción de etanol inferior a la real, esto se debe a que el modelo asocia el consumo de glucosa y fructosa a la producción de biomasa activa, la cual, según la simulación empieza su etapa de muerte después de las 100 horas.

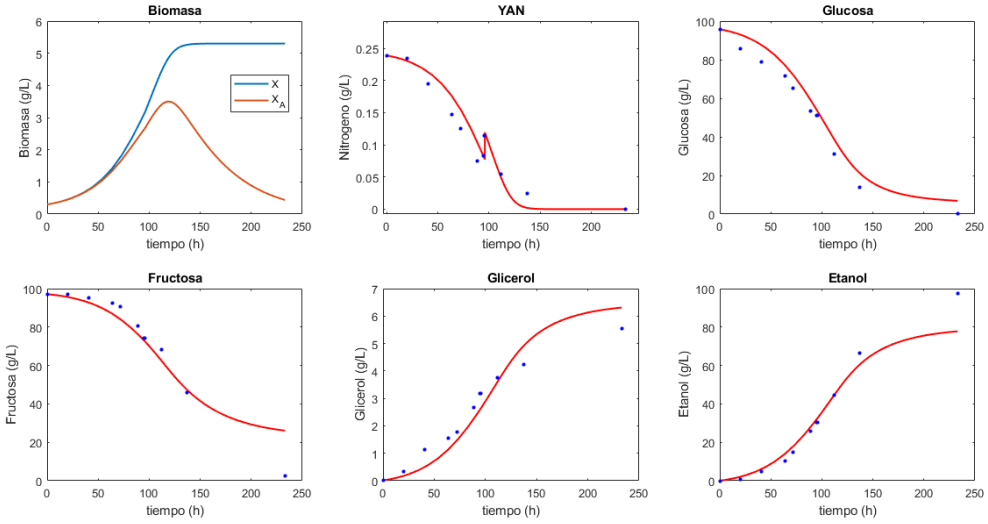


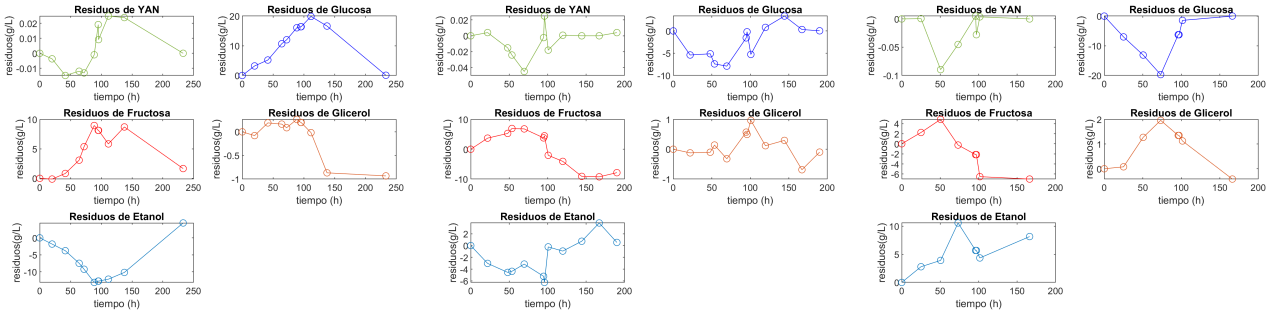
Figura 5.6: Simulación modelo Henriques a 15 °C.

Por esta razón se descarta el uso de éste modelo para predecir el comportamiento de los demás experimentos.

Análisis de error modelo Nuevo.

En la Figura 7.6 ubicada en el Anexo se da a conocer el comportamiento de los residuos del modelo nuevo. Se puede observar que la media de los errores asociados a las mediciones de YAN y glicerol en los experimentos realizados a 17 °C poseen una media cercana a cero y presentan

un comportamiento aleatorio, por lo que el modelo es estadísticamente correcto para la predicción del comportamiento de dichos compuestos. Sin embargo los demás residuos presentan un comportamiento no aleatorio.



(Experimento 2 a 15 °C) (Experimento 6 a 17 °C) (Experimento 9 a 19 °C)

Figura 5.7: Análisis de error Modelo Nuevo.

Tras examinar los residuos de los tres modelos, se puede inferir que la ausencia de mediciones en los experimentos realizados a 15 y 19 °C afectó la capacidad de los modelos para representar adecuadamente la cinética de fermentación con dichas temperaturas.

La presencia de residuos con comportamientos no aleatorios se atribuye a la influencia de factores que inciden en la fermentación de vinos blancos y que no están contemplados por los modelos. Estos factores pueden incluir gradientes de temperatura dentro del fermentador, la distribución no uniforme de sustratos en el mosto, y otros elementos no considerados. Además, otro elemento que impacta en el comportamiento de los residuos es el uso de datos estimados de etanol, basados en el método descrito en la Sección 4.4.8. Este método fue validado únicamente con la concentración final de etanol en fermentaciones previas, sin contar con información de los niveles intermedios de etanol durante el proceso.

Test de Error por Falta de Ajuste.

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de la calidad de ajuste del modelo mediante la prueba de ANOVA para cada una de las variables investigadas a distintas temperaturas. Este análisis se realizó utilizando experimentos triplicados. Es importante señalar que, en este caso, no se llevó a cabo la toma de muestras en triplicado.

A partir del análisis se determinó que los únicos modelos que presentaron error por calidad de ajuste fueron los empleados para predecir el consumo de glucosa a 17 °C de los modelos Zenteno y del modelo propuesto, cuyos resultados se dan a conocer en las Tablas 5.4 y 5.5.

Tabla 5.4: Test de ANOVA para la predicción del consumo de glucosa en modelo Zenteno.

Fuente de variabilidad	SC	GL	Varianza	F_{calc}	F_{tabla}
Regresión	41894,82	3	13964,9	1255,09	0,99
Residuos	400,56	36	11,127		
Error Puro	401,725	26	15,451	-0,01	0,99
Error Falta de Ajuste	-1,16	10	-0,116		
Total	40247,19				

Tabla 5.5: Test de ANOVA para la predicción del consumo de glucosa en modelo Nuevo.

Fuente de variabilidad	SC	GL	Varianza	F_{calc}	F_{tabla}
Modelo	43481	3	14493,7	1064,86	0,99
Residuos	489,99	36	13,611		
Error Puro	401,72	26	15,451	0,57	0,99
Error Falta de Ajuste	88,27	10	8,827		
Total	39830				

5.2 Fermentación mosto Chardonnay escala Piloto

En los gráficos de la Figura 5.8 se observa que en todos los casos no se produce el consumo de YAN después de la segunda nutrición, esto se debe a que la aplicación de FDA se produjo en una etapa avanzada de la fermentación, cuando la densidad del mosto es inferior a 1050 g/L. En esta fase las levaduras priorizan el consumo de azucares por sobre el consumo de nitrógeno. La existencia de altos niveles de nitrógeno residual no es recomendable para efectos de la calidad del vino, ya que favorece el crecimiento de microorganismos que producen compuestos no deseados en el producto final (Bell and Henschke (2005)).

Por otro lado se puede observar que en los Experimentos 3 y 4, realizados a 19 °C solo se realizó una aplicación de FDA, debido a que la fermentación acabó antes de lo que se había planeado.

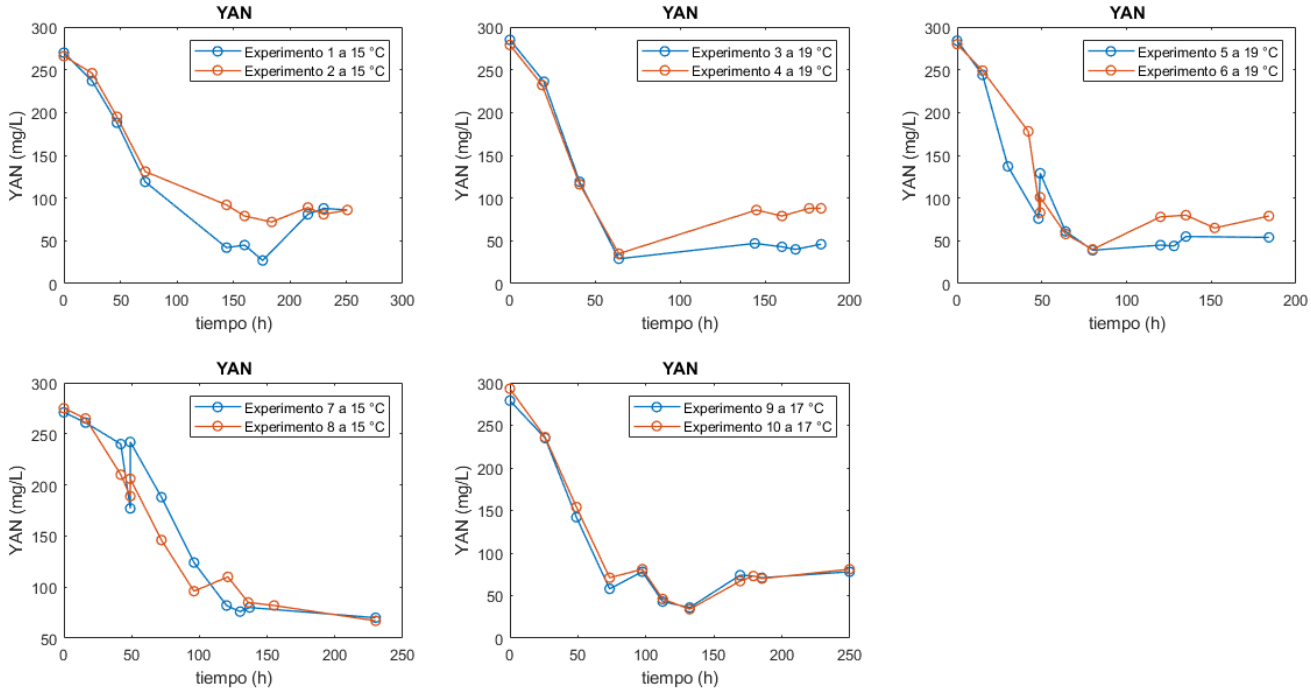


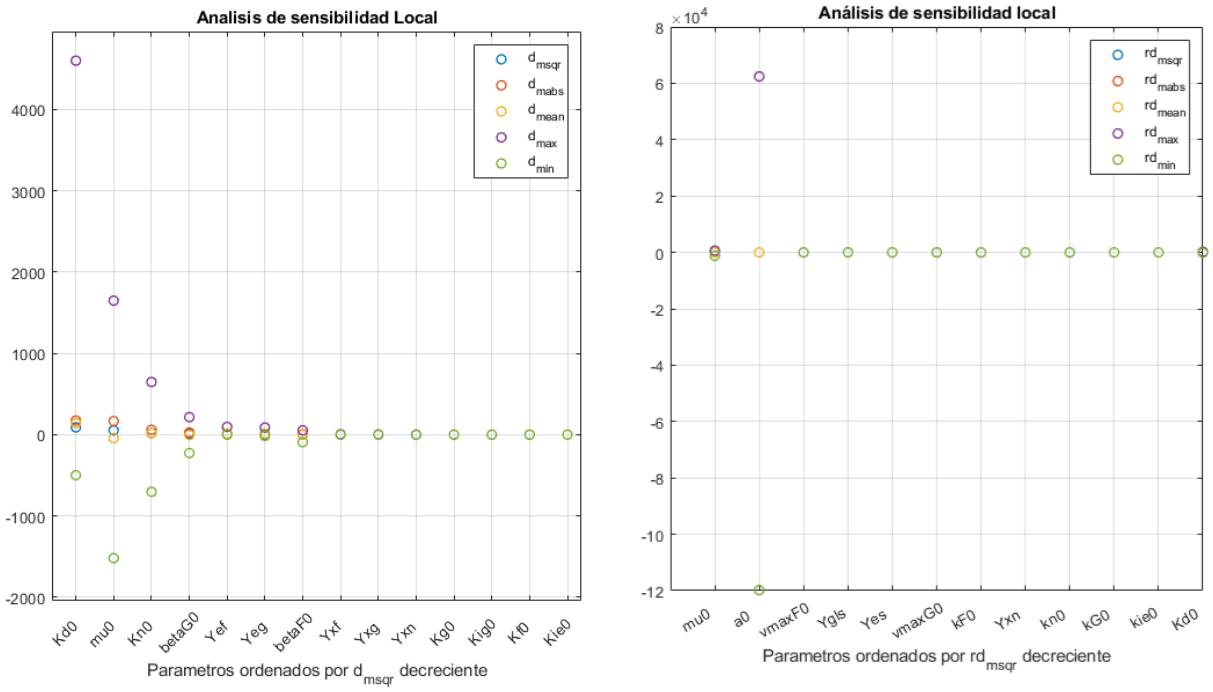
Figura 5.8: YAN de experimentos con mostos Chardonnay a escala piloto con diferentes protocolos de nutrición

5.2.1 Benchmark entre modelos Zenteno y modelo Nuevo.

Análisis de sensibilidad

Para la realización de este análisis de sensibilidad se utilizaron los parámetros nominales con sus respectivos valores máximos y mínimos que se dan a conocer en la Tabla 7.3 que se encuentra en el anexo. Además se introdujeron en el software las temperaturas utilizadas y se aplicó el protocolo de nutrición según lo establecido en el diseño experimental.

En la Figura 5.9 se da a conocer el análisis de sensibilidad estructural de cada uno de los parámetros para este diseño experimental.



(Modelo Zenteno) (Modelo propuesto)

Figura 5.9: Análisis de sensibilidad para modelos Zenteno y modelo propuesto para fermentaciones de mosto Chardonnay a escala piloto

Se puede observar que para ambos modelos las constantes cinéticas asociadas al consumo de glucosa y fructosa k_{F0} y k_{G0} presentan baja sensibilidad estructural, por lo que no pueden ser estimados. Esta situación también ocurre con las constantes cinéticas de inhibición k_{iG0} y k_{ie0}. Además, los coeficientes de rendimiento asociados a la biomasa como $Y_{X/N}$, $Y_{X/G}$ e $Y_{X/F}$ tampoco poseen una gran sensibilidad estructural, debido a que no se cuenta con la medición de biomasa. Por otro lado, al no existir la medición de glicerol en este diseño experimental, no se logra estimar el parámetro $Y_{Gly/S}$ en el modelo propuesto.

En el caso del modelo Zenteno, el diseño experimental evaluado aumentó la sensibilidad estructural de los parámetros K_{D0} y K_{N0}.

Calibración del modelo

En la Tabla 5.6 se dan a conocer los parámetros estimados del modelo Zenteno. Como valores iniciales se utilizaron los que se dan a conocer en la Tabla 7.3 que se encuentra en el Anexo B.

Tabla 5.6: Parámetros estimados Modelo Zenteno

	Valor nominal	Valor calibrado	Intervalos de Confianza
μ_0	0,055	0,095	23,30%
β_{G0}	0,431	0,387	26,10%
β_{F0}	0,426	0,335	52%
K_{N0}	0,010	0,088	76,30%
K_{D0}	0,000	0,015	29,80%
$Y_{E/G}$	0,545	0,650	26,10%
$Y_{E/F}$	0,519	0,401	54%

Se puede observar que en este diseño experimental se pudo estimar el valor de K_{D0}, debido a que el modelo asume que el estancamiento del consumo de nitrógeno para las nutriciones que ocurren después de 150 horas se debe a la muerte de las levaduras, esto se puede observar en la Figura 5.10. Por otro lado, aplicar nutrientes en dos puntos ayudó al aumento de sensibilidad del parámetro k_{N0}, por lo que se logró su estimación. Sin embargo, estos parámetros en conjunto con μ_0 tienen relación directa con el crecimiento de biomasa, por lo que la medición de este parámetro es fundamental para reducir la incertidumbre en torno a dichos parámetros.

En la Tabla 5.7 se pueden observar los parámetros estimados del modelo nuevo. Se puede observar que en este caso no se logró la estimación del parámetro K_{D0}, ya que dicho parámetro es poco sensible estructuralmente si no se cuenta con la medición de biomasa, es por esto que el modelo no logra simular es estancamiento en torno al consumo de YAN en los experimentos cuya nutrición se realizó después de 150 horas, esto se puede observar en la Figura 5.10.

Tabla 5.7: Parámetros estimados Modelo Nuevo

	Valor nominal	Valor calibrado	Intervalos de Confianza
a_0	0,346	0,461	55%
μ_0	0,099	0,114	17,40%
k_{ie0}	76,100	21,262	69,30%
$v_{max,G0}$	1,362	1,673	49,20%
$v_{max,F0}$	0,630	1,051	51,10%
$Y_{E/S}$	0,505	0,524	3,75%

Se puede observar que existe una gran incertidumbre en torno a la estimación del parámetro a_0, esto se debe a que se cuenta con pocos datos respecto a la fase de latencia y porque se asume que el parámetro posee un comportamiento isotermico.

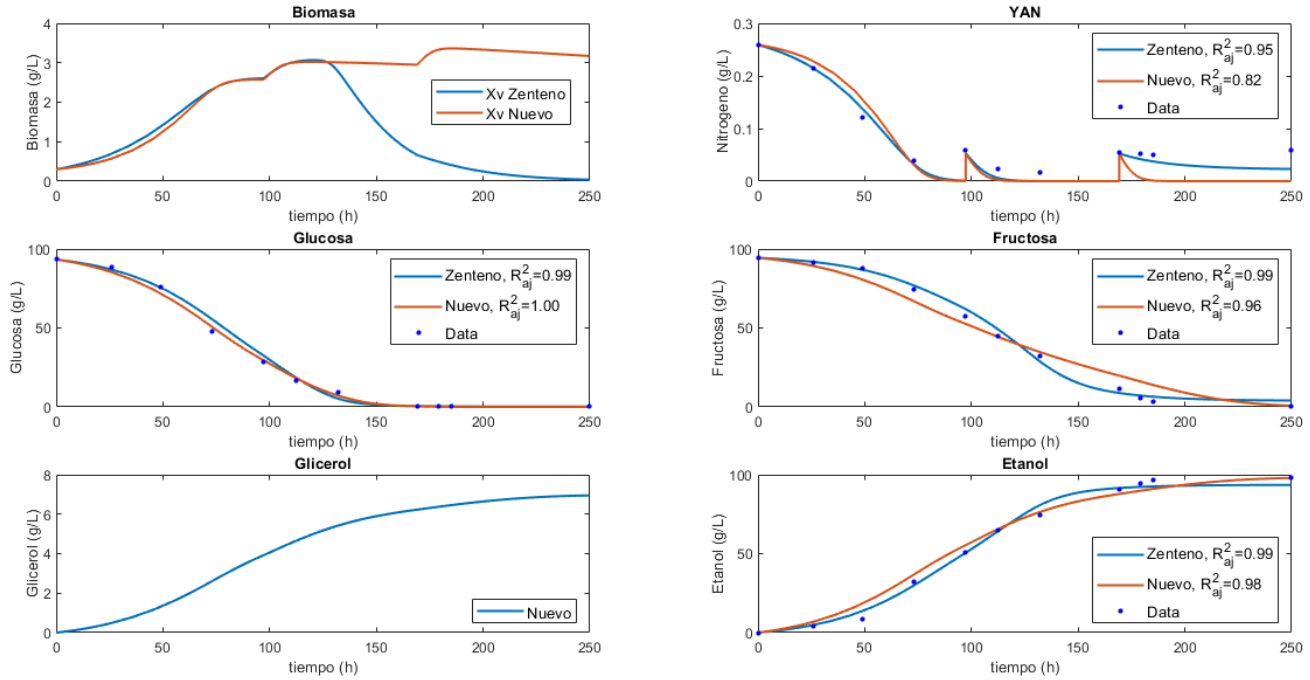


Figura 5.10: Simulación de los modelos Zenteno y modelo nuevo, en base a los datos del experimento 9.

Otro factor que influye en la incertidumbre de los parámetros, es que que ninguno de los modelos logra predecir el estancamiento del consumo de YAN cuando la nutrición se realiza entre las 100 y 150 horas, como se puede observar en la Figura 5.11, situación que ocurre en los Experimentos 5, 6, 7 y 8. Esto puede traer consecuencias respecto a la predicción del consumo de glucosa y fructosa. Para estas situaciones es necesario hacer un estudio más profundo en torno a qué efectos producen el estancamiento de consumo de nitrógeno cuando las nutriciones se aplican en los tiempos antes mencionados, ya que este fenómeno no es dependiente de la muerte celular.

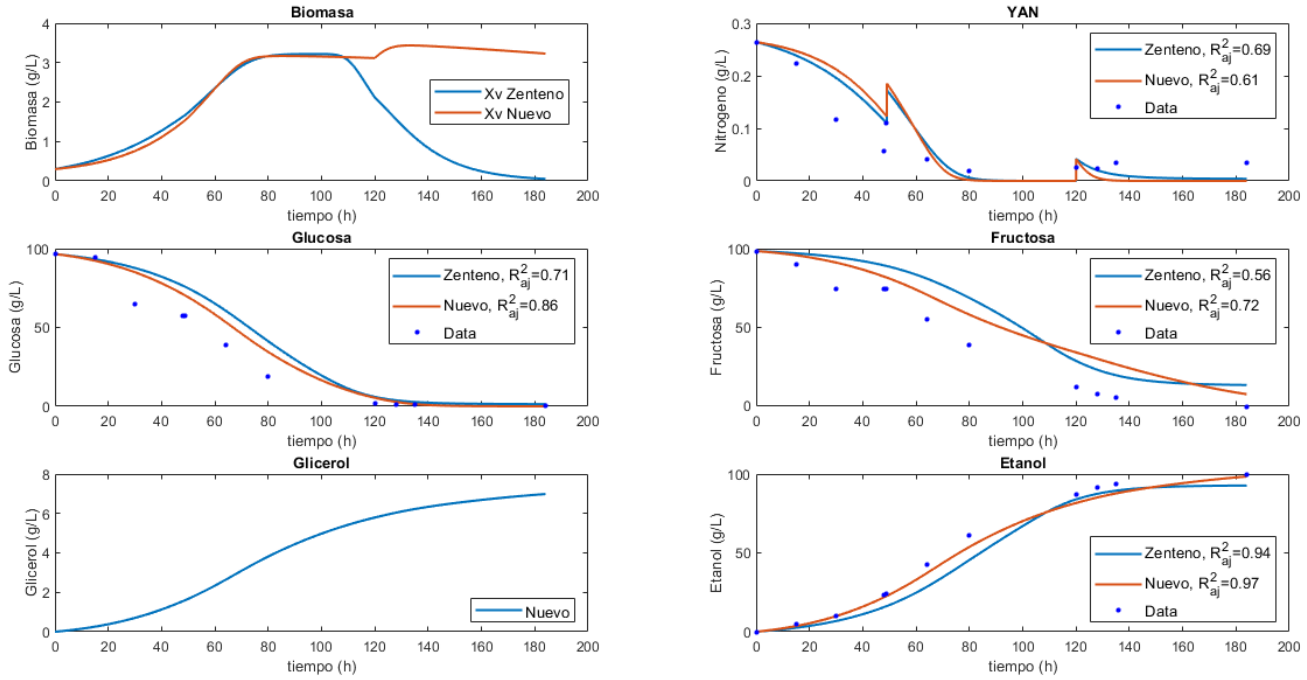


Figura 5.11: Simulación de los modelos Zenteno y modelo nuevo, en base a los datos del experimento 5.

Análisis de error.

En la Figura 7.7, ubicada en el Anexo, se exhibe la distribución de los residuos del modelo Zenteno con respecto a cada una de las variables medidas. Es relevante señalar que ninguno de los residuos presenta una media cercana a cero. No obstante, se observa que los residuos de los Experimentos 1, 6, 7, 8, 9 y 10 tienen una media cercana a cero en la fase inicial de la fermentación, como se representa en la Figura 5.12. Además, se destaca que los residuos asociados a las mediciones de Nitrógeno Asimilable (YAN) en los mencionados experimentos, así como los residuos vinculados a la medición de fructosa y etanol del Experimento 8, muestran un comportamiento aleatorio.

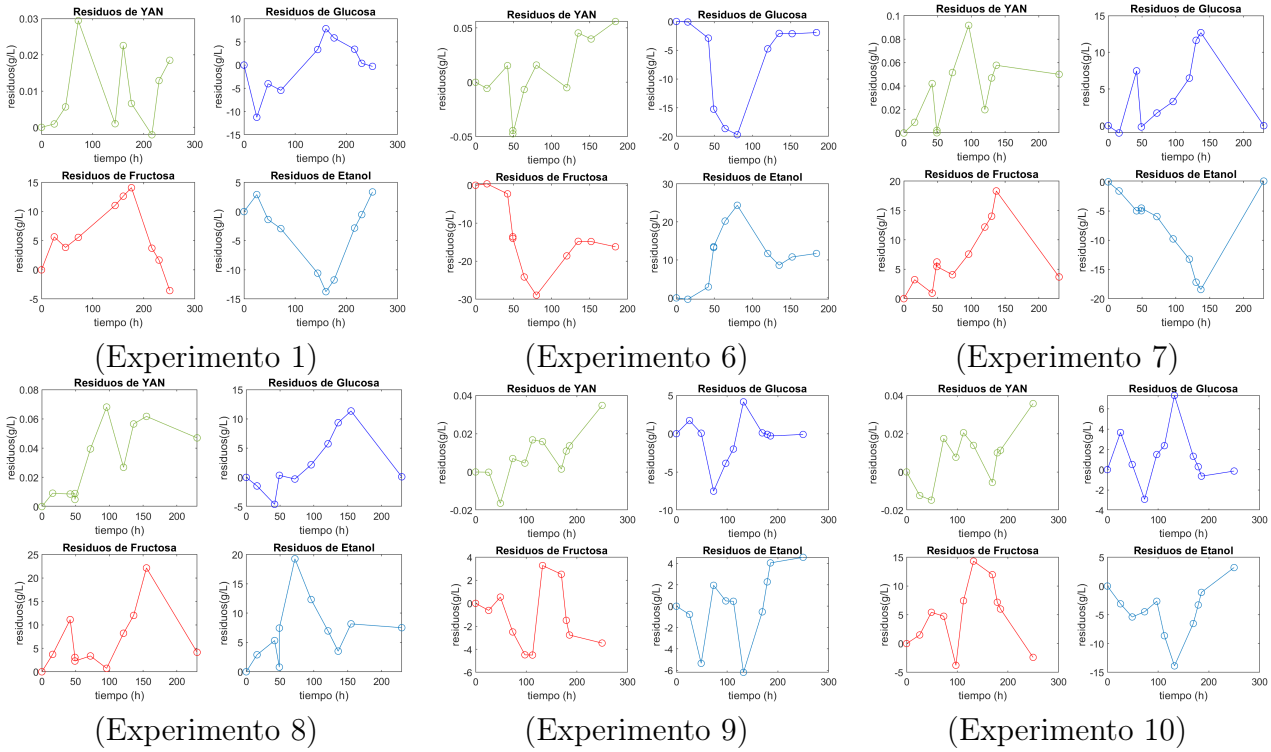


Figura 5.12: Distribución de error modelo Zenteno.

En la Figura 7.8 ubicada en el Anexo se da a conocer la distribución de los residuos asociados al modelo propuesto. Se puede observar que ninguno de los residuos posee una media cercana a cero. Por otro lado, solo los residuos asociados a la medición de glucosa en los Experimentos 1, 2, 5, 7, 8, 9 y 10, en conjunto con los residuos asociados a la medición de YAN en los Experimentos 1, 2, 5, 7, 8, 9 y 10 y los residuos asociados a la medición de etanol en el Experimento 8 presentan un comportamiento aleatorio. A partir del análisis se descarta que el modelo sea estadísticamente significativo, ya que existe un sesgo en torno a las variables.

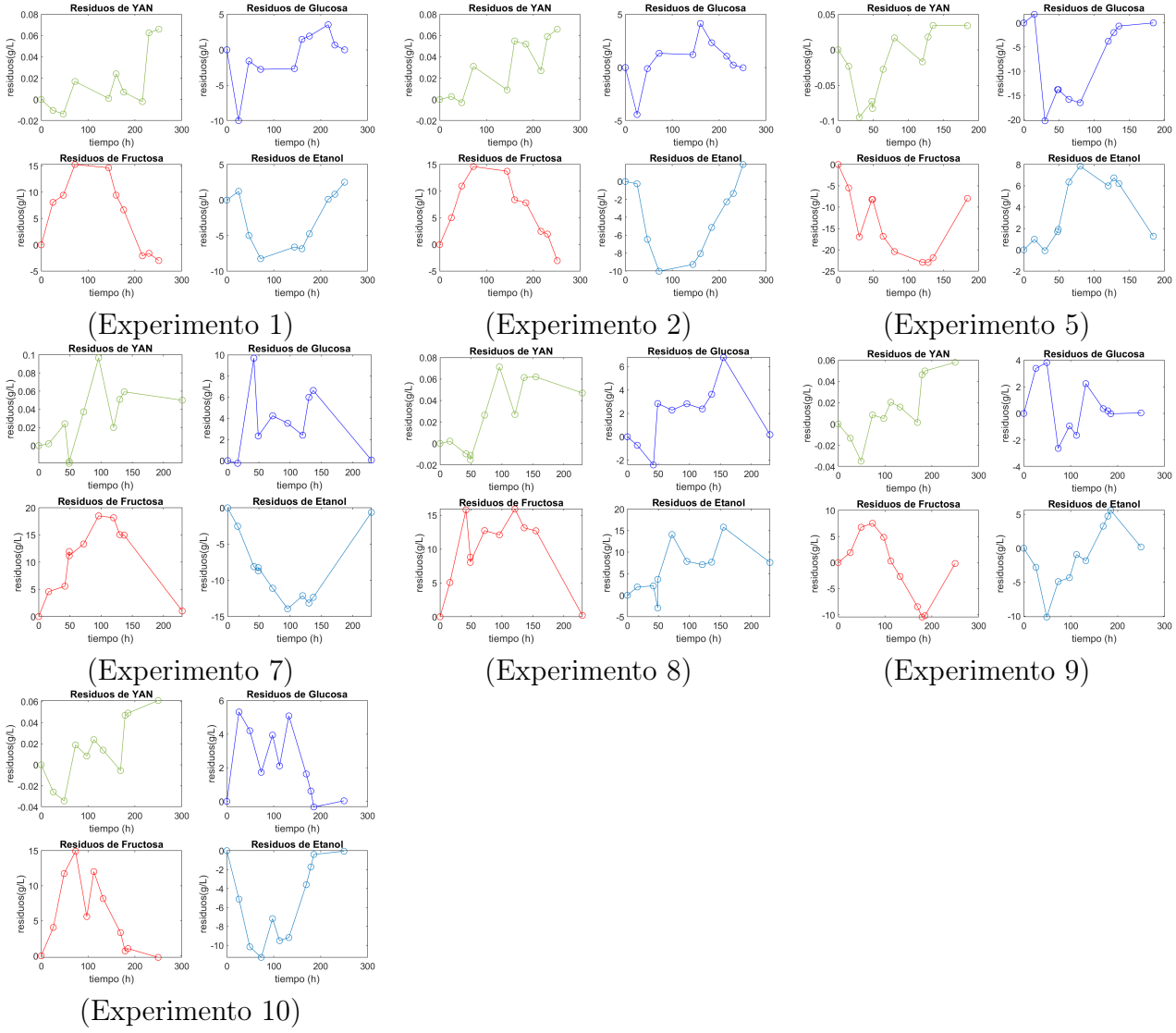


Figura 5.13: Distribución de error modelo Nuevo.

A través del análisis de error de ambos modelos, se evidencia que no son estadísticamente apropiados para las condiciones descritas. Esto se debe a su incapacidad para considerar factores que pueden influir en la fermentación, como los gradientes de temperatura dentro de los tanques de fermentación, la suposición de un comportamiento homogéneo del mosto y la falta de capacidad para prever fenómenos de estancamiento posteriores a las nutriciones tardías. Además, la ausencia de replicados en el experimento impide determinar si el comportamiento de las fermentaciones es normal o si existen anomalías, así como identificar posibles errores por falta de ajuste.

Asimismo, al carecer de información sobre el comportamiento de la biomasa, se realiza una suposición sobre su crecimiento que puede no corresponder fielmente a la realidad. Estos aspectos destacan las limitaciones de los modelos en capturar la complejidad de los procesos de fermentación y subrayan la importancia de considerar factores adicionales para mejorar la precisión y aplicabil-

idad de los modelos.

5.3 Fermentación mosto Sauvignon Blanc escala Piloto

En la Figura 5.14 se da a conocer el consumo de YAN en los experimentos.

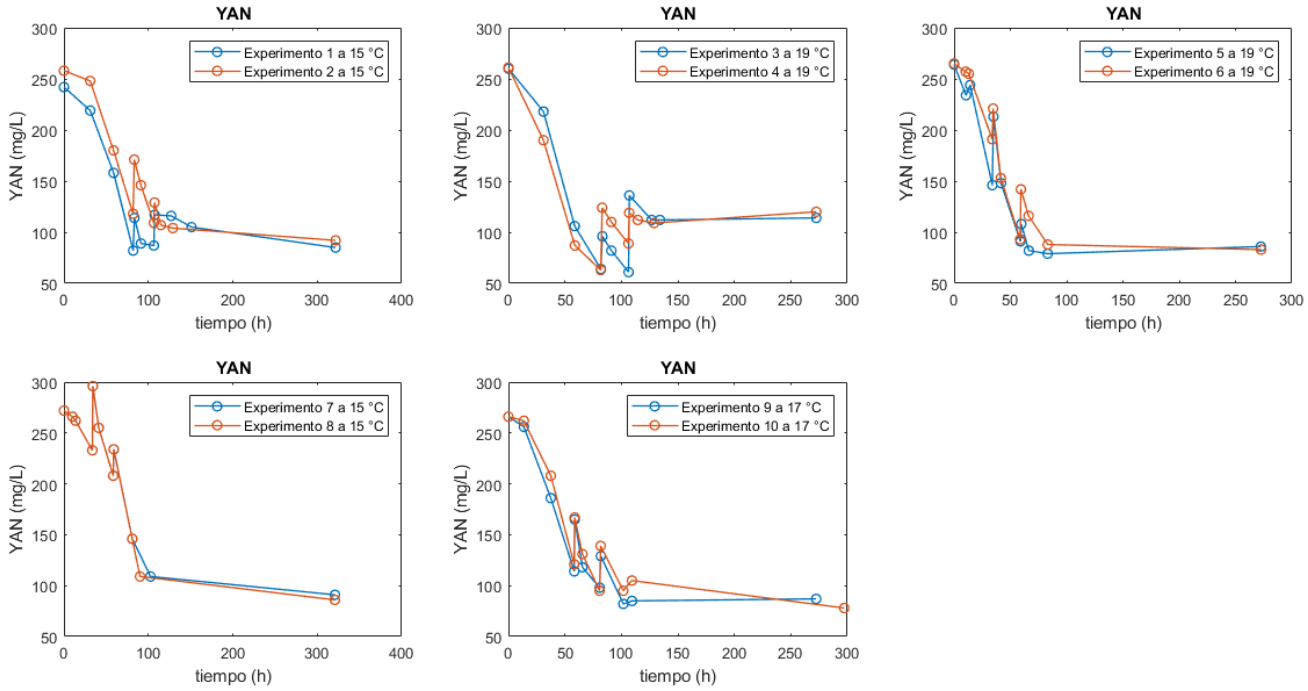


Figura 5.14: YAN de experimentos con mostos Sauvignon Blanc a escala piloto con diferentes protocolos de nutrición

En los gráficos, se evidencia que en todos los experimentos se genera un residuo final de Nitrógeno Asimilable (YAN) entre 50 y 100 mg/L. Esta situación se atribuye a la elevada concentración de aminoácidos primarios en el mosto, como se puede observar en la Tabla 4.2 ubicada en la sección 4.3.2. Estos aminoácidos primarios contienen compuesto nitrogenados que no son consumidos por la levadura, ya que son considerados como fuentes pobres en nitrógeno. Esta condición puede impactar en la cinética de la fermentación, ya que se generará menos biomasa debido a la presencia de elevadas concentraciones de compuestos nitrogenados que no contribuyen de manera significativa al crecimiento de la biomasa y, por ende, no son sintetizados por la levadura.

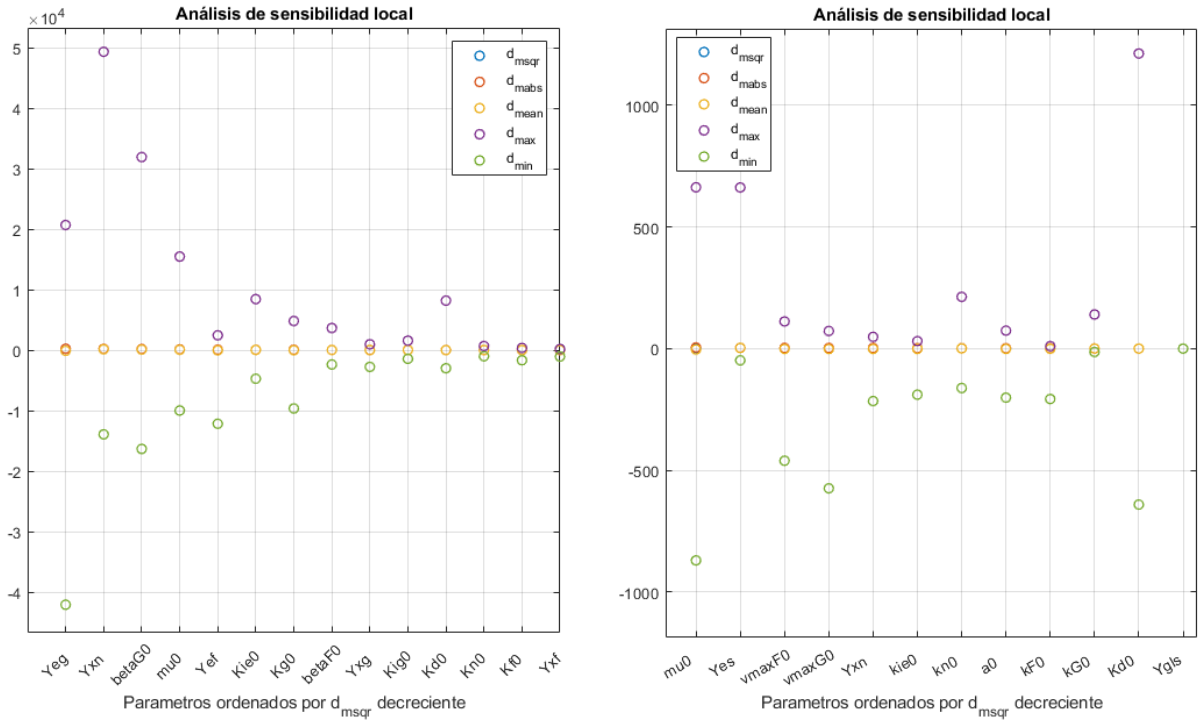
Por otro lado se puede observar un YAN residual superior a 100 [mg/L] en los Experimento 3 y 4, después de la segunda aplicación de FDA, esto se debe a que la segunda nutrición se aplicó de forma tardía.

Para efectuar la calibración de los modelos se empleó el método de normalización del consumo de YAN que se da a conocer en la Sección 5.1.

5.3.1 Benchmark entre modelo Zenteno y Modelo nuevo

Análisis de sensibilidad.

En la Figura 5.15 se puede observar el análisis de sensibilidad estructural de cada uno de los parámetros de cada modelo para este nuevo diseño experimental.



(Modelo Zenteno) (Modelo Henriques)

Figura 5.15: Análisis de sensibilidad modelos Zenteno y Nuevo.

Se puede observar que nuevamente los parámetros k_{ig0}, k_{G0}, k_{F0} presentan una baja sensibilidad estructural en ambos modelos, por lo que el valor de estos parámetros no es estimable.

A su vez, los parámetros $Y_{X/G}$ e $Y_{X/F}$ en el modelo Zenteno también presentan baja sensibilidad estructural, por lo que tampoco son parámetros estimables.

Por otro lado k_{N0} aumentó su sensibilidad en el modelo Nuevo, mientras que en el modelo Zenteno presenta una baja sensibilidad.

Además K_{D0} posee una baja sensibilidad estructural en ambos modelos debido a que no se realizaron las mediciones de biomasa.

Finalmente no se puede estimar el parámetro $Y_{Gly/S}$ en el modelo nuevo debido a que no se cuenta con la medición de glicerol.

Estimación de parámetros.

Los parámetros estimados del modelo Zenteno se dan a conocer en la Tabla 5.8, mientras que los parámetros del modelo Nuevo se dan a conocer en la Tabla 5.9

Tabla 5.8: Parámetros estimados Modelo Zenteno

	Valor nominal	Valor Calibrado	Intervalo de confianza
μ_0	0,055	0,140	28%
β_{G0}	0,431	0,244	27,30%
β_{F0}	0,426	0,915	47,50%
K_{N0}	0,010	0,083	54,80%
K_{ie0}	198,3	27,53	54,40%
$Y_{X/N}$	8,936	22,77	39,90%
$Y_{E/G}$	0,545	0,413	36,70%
$Y_{E/F}$	0,519	0,768	20,70%

Tabla 5.9: Parámetros estimados Modelo Nuevo

	Valor nominal	Valor Calibrado	Intervalo de Confianza.
a_0	0,346	0,456	51,90%
μ_0	0,099	0,109	27,60%
k_{N0}	0,078	0,048	75,30%
k_{ie0}	76,10	51,26	70,60%
v_{maxG0}	1,362	1,157	32,50%
v_{maxF0}	0,630	0,854	33,20%
$Y_{E/S}$	0,505	0,527	4,50%

Se puede observar que los valores de K_{N0}, μ_0 en ambos modelos presentan altos valores de incertidumbre, esto se debe a que el modelo no logró predecir el estancamiento en el consumo de nitrógeno ocurrido en los Experimentos 3 y 4, y dichos parámetros están fuertemente ligados a la estimación de dichos parámetros. Esto también produjo consecuencias en la estimación de $Y_{X/N}$ en el modelo Zenteno.

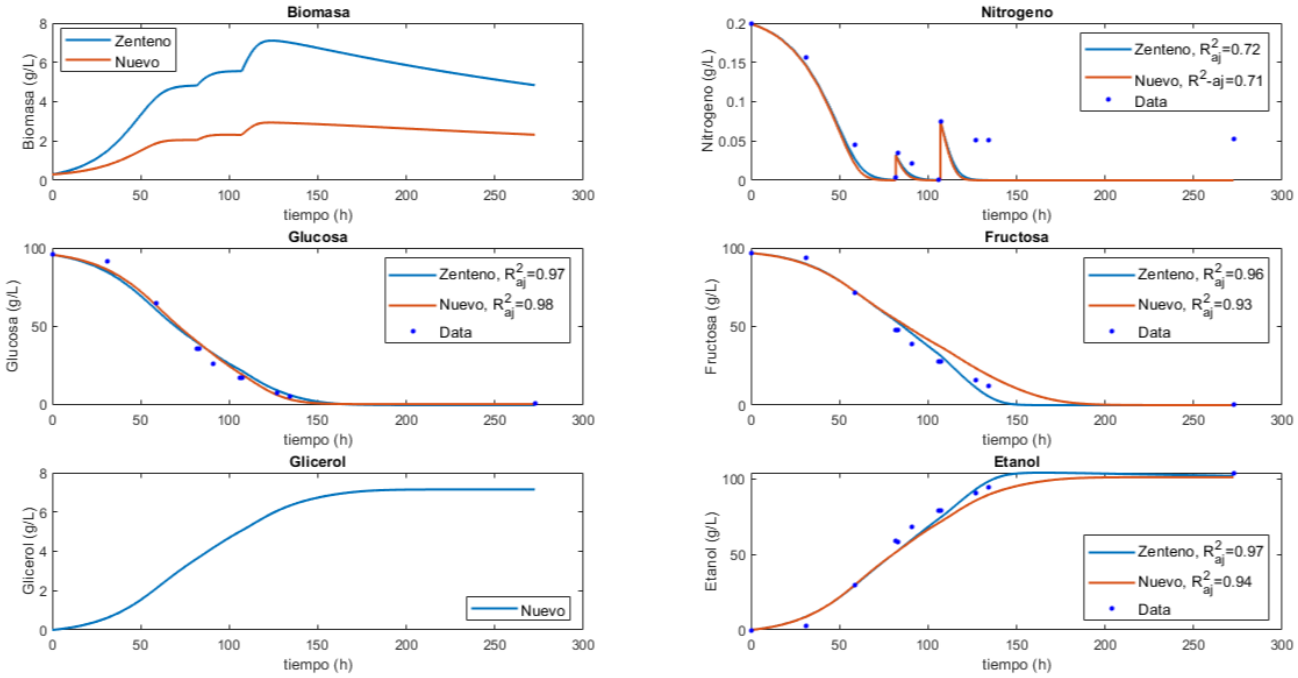


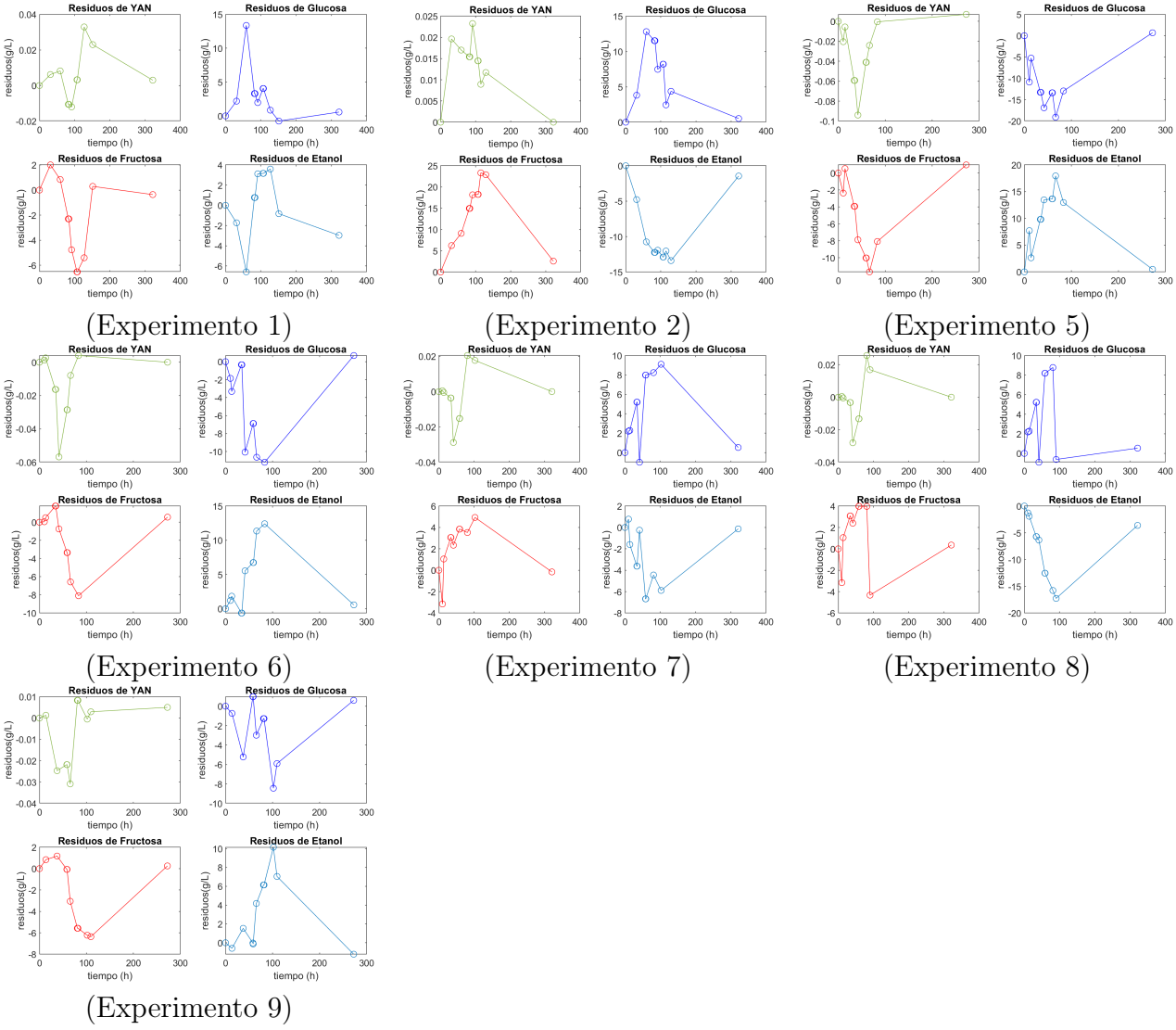
Figura 5.16: Simulación de experimento 3, a 19 °C con los modelos Zenteno y Nuevo.

Cabe destacar que emplear diferentes tiempos y dosis de adición de FDA aumentó la identificabilidad de K_{N0} en ambos modelos, sin embargo se puede observar que en el modelo Zenteno este parámetro presenta menor incertidumbre.

Por otro lado, existe una alta incertidumbre en los parámetros asociados al consumo de glucosa y fructosa, que son β_{G0}, β_{F0}, $Y_{E/G}$ e $Y_{E/F}$ en el caso del modelo Zenteno y en los parámetros $v_{max,G0}$ y $v_{max,F0}$ en el modelo Nuevo, esto se debe a la falta de datos en torno a la fase de termino de consumo de estos azucares. Esto también posee consecuencias en la estimación de K_{ie0} en ambos modelos.

Análisis de error.

En la Figura 7.9, ubicada en el Anexo, se presenta la distribución del error de cada experimento asociado al modelo Zenteno. Se destaca que los errores relacionados con la glucosa en los Experimentos 1, 2, 5, 6, 7, 8 y 9 exhiben una distribución aleatoria, mientras que los residuos de las demás variables muestran un comportamiento no aleatorio. Adicionalmente, se observa que ninguno de los residuos tiene una media cercana a cero, indicando así que el modelo presenta un sesgo con respecto a las variables estudiadas.



(Experimento 1) (Experimento 2) (Experimento 5)

(Experimento 6) (Experimento 7) (Experimento 8)

(Experimento 9)

Figura 5.17: Distribución de error modelo Zenteno.

En la Figura 7.10 ubicada en el Anexo se muestra la distribución de los residuos del modelo Nuevo. Se puede observar que los residuos asociados a la medición de glucosa en los Experimentos 1, 2, 5, 6, 7, 8 y 9, en conjunto con los residuos asociados a la medición de YAN en los Experimentos 2, 3, 4 y 9, y la medición de etanol en el Experimento 7 presentan un comportamiento aleatorio, sin embargo ninguno de los residuos posee una media cercana a cero, por lo que se descarta que el modelo sea estadísticamente correcto.

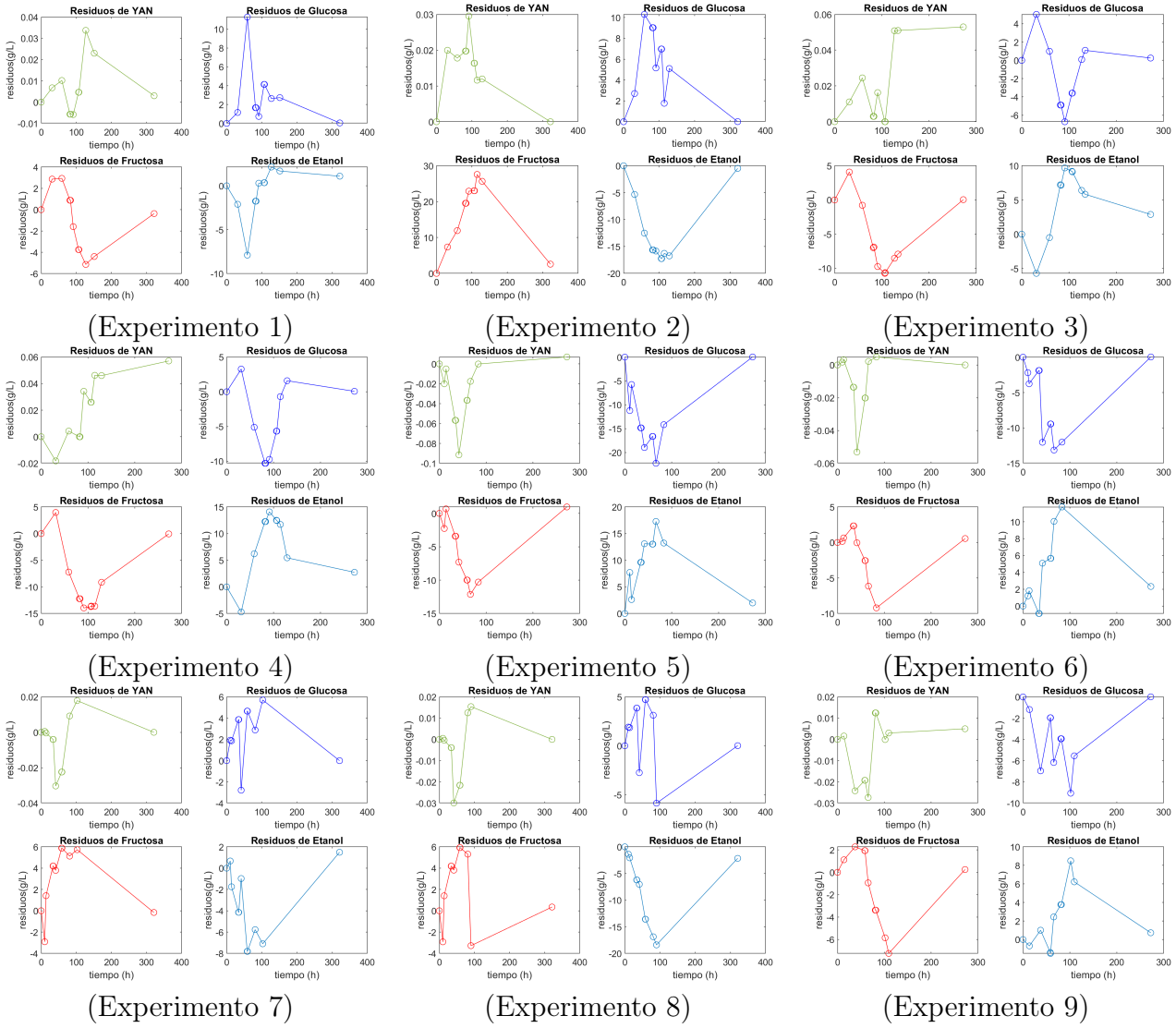


Figura 5.18: Distribución de error modelo Nuevo.

El análisis de error de ambos modelos revela su falta de validez estadística para las condiciones descritas. Esto se debe a que no tienen en cuenta efectos que pueden incidir en la fermentación, como los gradientes de temperatura en los tanques de fermentación y la suposición de un comportamiento homogéneo en el mosto. Además, la falta de replicados en los experimentos impide determinar si el comportamiento de la fermentación sigue patrones esperados o si los resultados exhiben un comportamiento inesperado.

Adicionalmente, la ausencia de información sobre el comportamiento de la biomasa lleva a asumir un crecimiento que podría no corresponder fielmente a la realidad, introduciendo incertidumbre en la precisión de los modelos. Estos aspectos resaltan las limitaciones y la necesidad de considerar factores adicionales para mejorar la representación y aplicabilidad de los modelos.

Capítulo 6

Conclusiones y Recomendaciones

En la presente investigación, se llevó a cabo el análisis de dos modelos dinámicos de fermentación de vinos, y se propuso un nuevo modelo mediante la fusión de ambos modelos estudiados. Para el análisis de los modelos se desarrolló una serie de experimentos con diversos protocolos de fermentación. Los resultados arrojaron valiosas conclusiones.

El uso del análisis de sensibilidad estructural, que permitió identificar qué parámetros podían estimarse con precisión y cuáles no eran estimables a partir de la información disponible. Esta aproximación contribuyó a reducir la incertidumbre en torno a los parámetros estimables, brindando una mayor confiabilidad a los resultados.

Sin embargo, se descubrió que los modelos existentes no eran estadísticamente precisos debido a que la mayoría de los residuos presentaban un comportamiento no aleatorio y en la mayoría de los casos la norma de los residuos fue lejana a cero. Esto sugiere que existen factores influyentes en el proceso de fermentación que no se encontraban considerados en los modelos evaluados, como los gradientes de temperatura al interior de los fermentadores, la no distribución homogénea del mosto y el desconocimiento de como es el crecimiento de biomasa durante la fermentación. Otro factor que puede afectar en el comportamiento en los residuos son la impresión de las técnicas de medición, por lo que se recomienda realizar estudios de técnicas de medición que permitan disminuir la variabilidad del error. Además, la falta de datos en las etapas finales y en el consumo acelerado de nitrógeno llevó a una ampliación de los intervalos de confianza de los parámetros, lo que afectó la precisión de las estimaciones. Sin embargo los modelos logran predicciones aceptables en torno al consumo de nitrógeno en la fase de crecimiento de biomasa para los experimentos desarrollados a escala de laboratorio.

El uso de diferentes cepas de uva blanca, cada una con su propio terroir, impacta en la composición de compuestos nitrogenados presentes en el mosto. Esto, a su vez, influye en la cinética de fermentación y en la necesidad de realizar calibraciones específicas para cada cepa de uva blanca. Es esencial reconocer que cada cepa muestra un estancamiento único en el consumo de nitrógeno.

Por otro lado, ninguno de los modelos propuestos logra predecir con precisión el estancamiento en el consumo de nitrógeno asimilable (YAN) cuando la nutrición se aplica entre las 100 y 150 horas de fermentación. Esta observación subraya la complejidad y la influencia de factores aún no considerados en los modelos en estudio, ya que el estancamiento en el consumo de YAN en este intervalo de tiempo no puede ser explicado por las variables analizadas en los modelos existentes.

Para futuras investigaciones, se sugiere un análisis detallado de los compuestos nitrogenados en el mosto, modelando su comportamiento individualizado. Para mejorar la confiabilidad de los modelos y comprender mejor los fenómenos relacionados con el estancamiento en el consumo de YAN, se recomienda realizar mediciones de biomasa para comprender de mejor manera este fenómeno. Estas mediciones serán fundamentales para reducir la incertidumbre en los parámetros relacionados con el crecimiento de la biomasa y para obtener una comprensión más profunda de los factores que afectan el proceso de fermentación. Además, se sugiere la aplicación de un diseño óptimo de experimentos para determinar los momentos de medición más adecuados, lo que aumentaría la sensibilidad de los parámetros y reduciría la incertidumbre en su estimación. Asimismo, se aconseja utilizar triplicados en los experimentos para verificar posibles errores por falta de ajuste en los modelos, y se enfatiza la importancia de realizar triplicados de las mediciones para evaluar la repetitibilidad de los resultados. En resumen, esta investigación resalta la importancia de abordar estos desafíos para lograr modelos más precisos y aplicables en el campo de la fermentación.

References

AntonPaarGmbH (2018). Instruction manual and safety information. *instrumentos*.

Balsa-Canto, E. and Banga, J. R. (2010). Amigo: A model identification toolbox based on global optimization and its applications in biosystems. *IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)*, 11:132–137.

Balsa-Canto, E., Henriques, D., Gábor, A., and Banga, J. R. (2016). Amigo 2 theoretical background. *IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)*.

Baranyi, J. and Roberts, T. A. (1994). Review paper a dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23:277–294.

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

Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Brun, R., Reichert, P., and Künsch, H. R. (2001). Practical identifiability analysis of large environmental simulation models. *Water Resources Research*, 37:1015–1030.

Carrau, F. M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P. A., and Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by saccharomyces cerevisiae wine yeasts: Effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Research*, 8:1196–1207.

Coleman, M. C., Fish, R., and Block, D. E. (2007). Temperature-dependent kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:5875–5884.

Cramer, A. C., Vlassides, S., and Block, D. E. (2002). Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Biotechnology and bioengineering*, 77:49–60.

Crépin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., and Camarasa, C. (2012). Sequential use of nitrogen compounds by saccharomyces cerevisiae during wine fermentation: A model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:8102–8111.

Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., Aguilera, M., and Sandoval, S. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "aspectos generales sobre la validación de métodos". *Quimica analitica*.

Flanzy, C. (2000). Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. *enology*.

Foroni, F., Vignando, M., Aiello, M., Parma, V., Paoletti, M. G., Squartini, A., and Rumiati, R. I. (2017). The smell of terroir! olfactory discrimination between wines of different grape variety and different terroir. *Food Quality and Preference*, 58:18–23.

Gee, D. A. and Ramirez, W. F. (1994). A flavour model for beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 100:321–329.

Henriques, D. and Balsa-Canto, E. (2021). The monod model is insufficient to explain biomass growth in nitrogen-limited yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 87:1–22.

Miller, K. V. and Block, D. E. (2020). A review of wine fermentation process modeling. *Journal of Food Engineering*, 273.

Pérez, D., Assof, M., Bolcato, E., Sari, S., and Fanzone, M. (2018). Combined effect of temperature and ammonium addition on fermentation profile and volatile aroma composition of torrontés riojano wines. *LWT*, 87:488–497.

Tesnière, C., Brice, C., and Blondin, B. (2015). Responses of saccharomyces cerevisiae to nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Togores, J. (2018). José togores. *Enology*.

Torrealba, C., Luna, R., Cuevas-Valenzuela, J., and Pérez-Correa, J. R. (2023). Model transfer and scaling-up in constrained experimental systems: a multi-criteria approach to robust model-building and application in wine fermentation systems. *wine and biotecnology*.

VINE, I. O. O. and WINE (2015). Código internacional de prácticas enológicas. *wine*.

Zenteno, M. I., Pérez-Correa, J. R., Gelmi, C. A., and Agosin, E. (2010). Modeling temperature gradients in wine fermentation tanks. *Journal of Food Engineering*, 99:40–48.

Capítulo 7

Anexos

7.1 ANEXO A: Ecuaciones modelo Nuevo

7.1.1 Ecuaciones del modelo Nuevo.

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - k_D) * X_v \tag{7.1}$$

$$lag(t) = \frac{a_0}{a_0 + (1 + a0) * e^{\mu_{max}} * t} \tag{7.2}$$

$$\mu = lag(t) * \mu_{max}(T) * \frac{N}{N + k_N(T)} \tag{7.3}$$

$$\mu_{max} = \mu_0 * exp[\frac{E_{ac} * (T - 300)}{300 * R * T}] \tag{7.4}$$

$$k_D = k_{D0} * exp[C_{de} * E + E_{td} * \frac{T - 305,65}{305,65 * R * T}] \tag{7.5}$$

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{X/N}} * X_v \tag{7.6}$$

$$v_{max,i} = v_{i0} * exp[\frac{E_{afe} * (T - 296,15)}{296,15 * R * T}] \qquad i = Glx, F \tag{7.7}$$

$$k_{ie} = k_{ie0} * exp[E_{ak_i} \frac{*(T - T^r)}{293,15 * R * T}] \qquad i = N, G, F, IE \tag{7.8}$$

$$\phi_E = \frac{1}{1 + E/k_{Ei}} \tag{7.9}$$

$$v_{Glx} = v_{max,Glx} * \frac{Glx}{Glx + k_{Glx}} * \phi_E \tag{7.10}$$

$$v_F = v_{max,F} * \frac{F}{F + k_F} * \phi_E \tag{7.11}$$

$$\frac{dGlx}{dt} = -X_v * v_{Glx} * lag(t) \tag{7.12}$$

$$\frac{dF}{dt} = -X_v * v_F * lag(t) \tag{7.13}$$

$$\frac{dE}{dt} = -Y_{E/S} * (\frac{dGlx}{dt} + \frac{dF}{dt}) \tag{7.14}$$

$$\frac{dGly}{dt} = -Y_{Gly/S} * (\frac{dGlx}{dt} + \frac{dF}{dt}) \tag{7.15}$$

7.2 Anexo B: Valores iniciales parámetros.

Para la estimación de parámetros del modelo Zenteno se fijarán los parámetros que se dan a conocer en la Tabla 7.1 los cuales se entregan en el paper de Zenteno et al. (2010)

Tabla 7.1: Parámetros fijos modelo Zenteno

Parametro	Valor
C_{de}	0.0415 m3/kg E
E_{ac}	59,453 kJ/kmol
E_{afe}	11,000 kJ/kmol
E_{am}	37,681 kJ/kmol
E_{td}	130,000 kJ/kmol
m_0	0.01 kg S/kg Bio/h
R	8.314 kJ/kmol/K
T_{ref}	293,15 K

Tabla 7.2: Valores iniciales de parámetros de calibración modelo Zenteno, Henriques y modelo Nuevo para la fermentación de mosto Chardonay a escala laboratorio.

	Zenteno	Henriques	Nuevo	LB	UB
a_0	-	1E-04	1E-04	1E-04	1
β_{F0}	0,586013	-	-	0,3	30
β_{G0}	0,2302109	-	-	0,3	30
k_D	-	0,000279	-	1E-05	1
k_{D0}	0,0003935	-	0,000279	1,E-05	1
k_F	-	0,000215	-	1E-05	1
k_{F0}	7,60597210	-	7,60597210	1E-05	1
k_G	-	35,9	-	1E-05	1
k_{G0}	8,8380804	-	8,8380804	1E-05	1
k_{ie0}	198,33846	76,1	76,1	0	200
k_{ig0}	38,209593	-	-	0	200
k_N	-	0,0782	-	1E-05	1
k_{N0}	0,0102493	-	0,0782	1E-05	1
μ_0	0,0978333	-	0,0978333	0	1
μ_{max}	-	0,244	-	0	1
$v_{max,F}$	-	0,592	-	0,3	30
$v_{max,F0}$	-	-	0,586013	0,3	30
$v_{max,G}$	-	1,26	-	0,3	30
$v_{max,G0}$	-	-	0,2302109	0,3	30
$Y_{E/F}$	0,6265166	-	-	0	1
$Y_{E/G}$	0,6265166	-	-	0	1
$Y_{E/S}$	-	0,374	0,374	0	1
$Y_{Gly/S}$	-	0,105	0,105	0	1
$Y_{X/F}$	1,4082776	-	-	1	30
$Y_{X/G}$	1,6621225	-	-	1	30
$Y_{X/N}$	31,4221994	17,8	8,936	1	30

Los parámetros dados que se dan a conocer en la Tabla 7.2 son obtenidos a partir de los paper Torrealba et al. (2023) y Henriques and Balsa-Canto (2021).

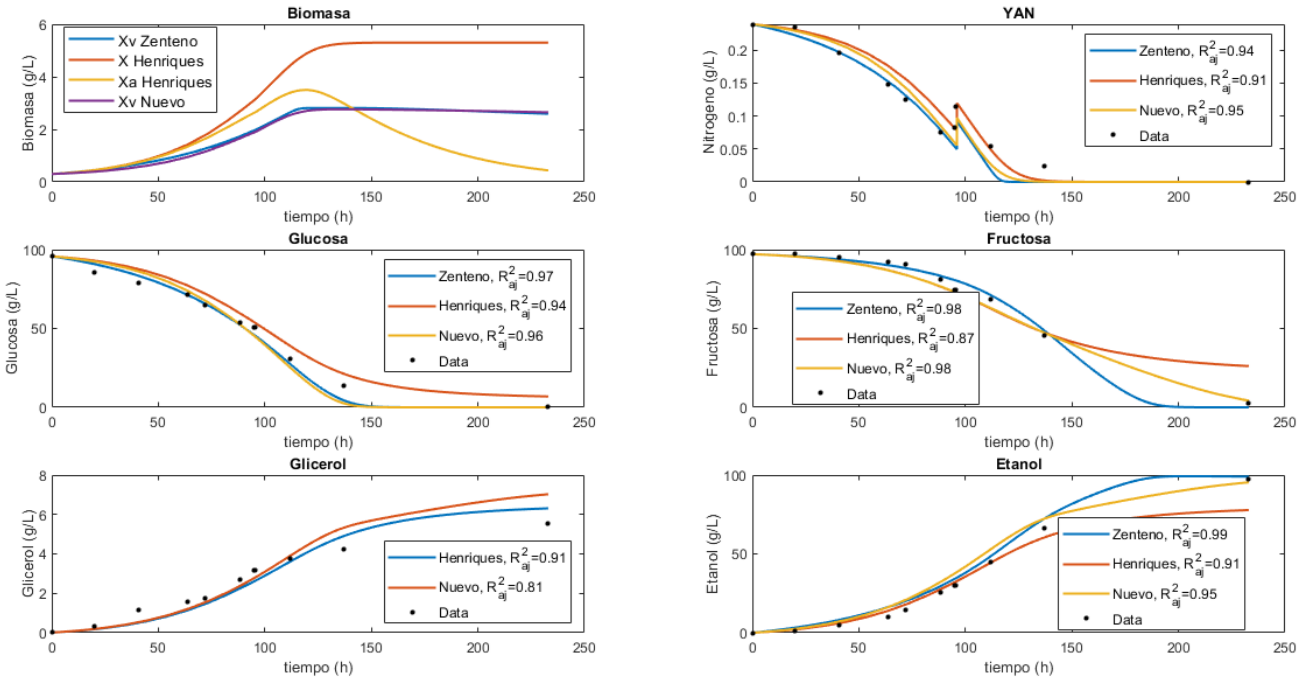
Tabla 7.3: Valores iniciales de los parámetros de los modelos Zenteno y Nuevo para fermentación de mostos Chardonnay y Sauvignon Blanc a escala piloto.

	Zenteno	Nuevo	LB	UB
a_0	-	0,34601	0,0001	1
β_{F0}	0,42608	-	0,2	30
β_{G0}	0,43125	-	0,2	30
k_{D0}	0,0003935	0,000279	0,00001	1
k_{F0}	7,6059721	7,605972	0,00001	1
k_{G0}	8,8380804	8,83808	0,00001	1
k_{ie0}	198,33846	76,1	0	200
k_{ig0}	38,209593	-	0	200
k_{N0}	0,0102493	0,0782	0,00001	1
μ_0	0,055263	0,098723	0	1
$v_{max,F0}$	-	0,62963	0,3	30
$v_{max,G0}$	-	1,362	0,3	30
$Y_{E/F}$	0,51889	-	0	1
$Y_{E/G}$	0,54462	-	0	1
$Y_{E/S}$	-	0,50545	0	1
$Y_{Gly/S}$	.	0,037173	0	1
$Y_{X/F}$	1,4082776	-	1	30
$Y_{X/G}$	1,6621225	-	1	30
$Y_{X/N}$	8,936	8,83808	1	30

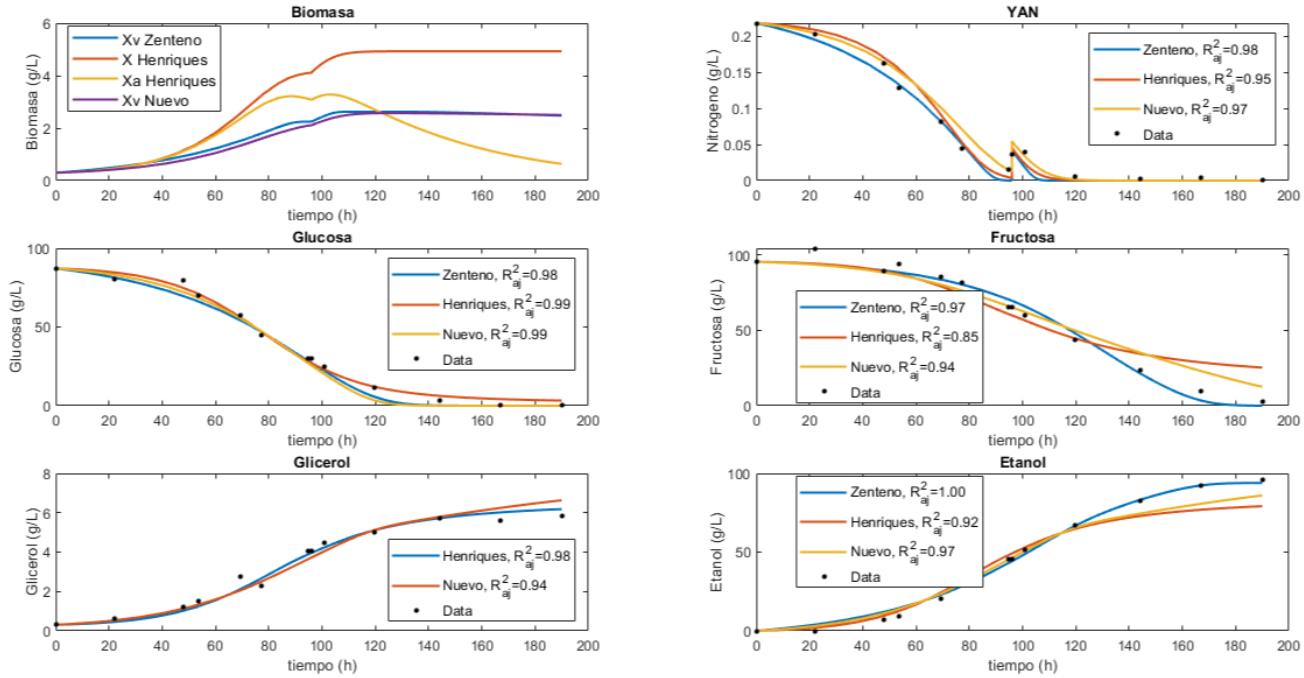
Los parámetros iniciales que se dan a conocer en la Tabla 7.3 son obtenidos a partir de las calibraciones realizadas a escala de laboratorio.

7.3 Anexo C: Simulación de los modelos.

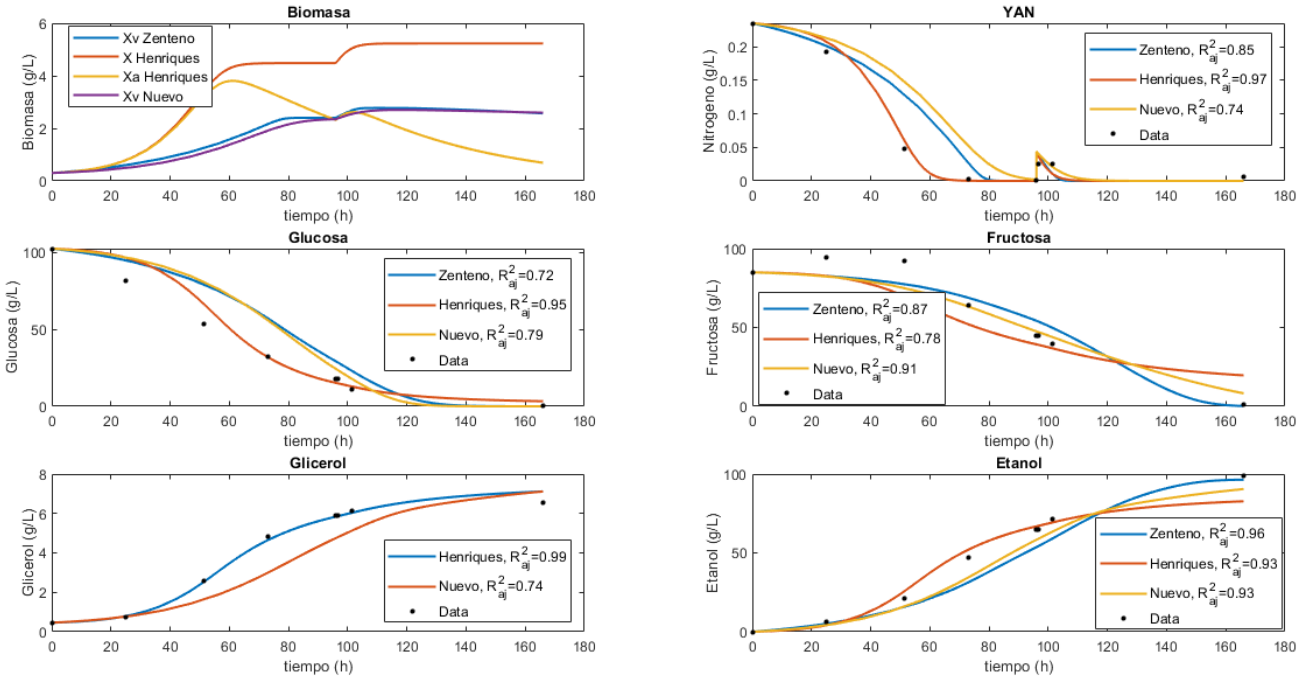
7.3.1 Fermentación de mosto Chardonnay a escala Laboratorio.



(Experimento a 15 °C)



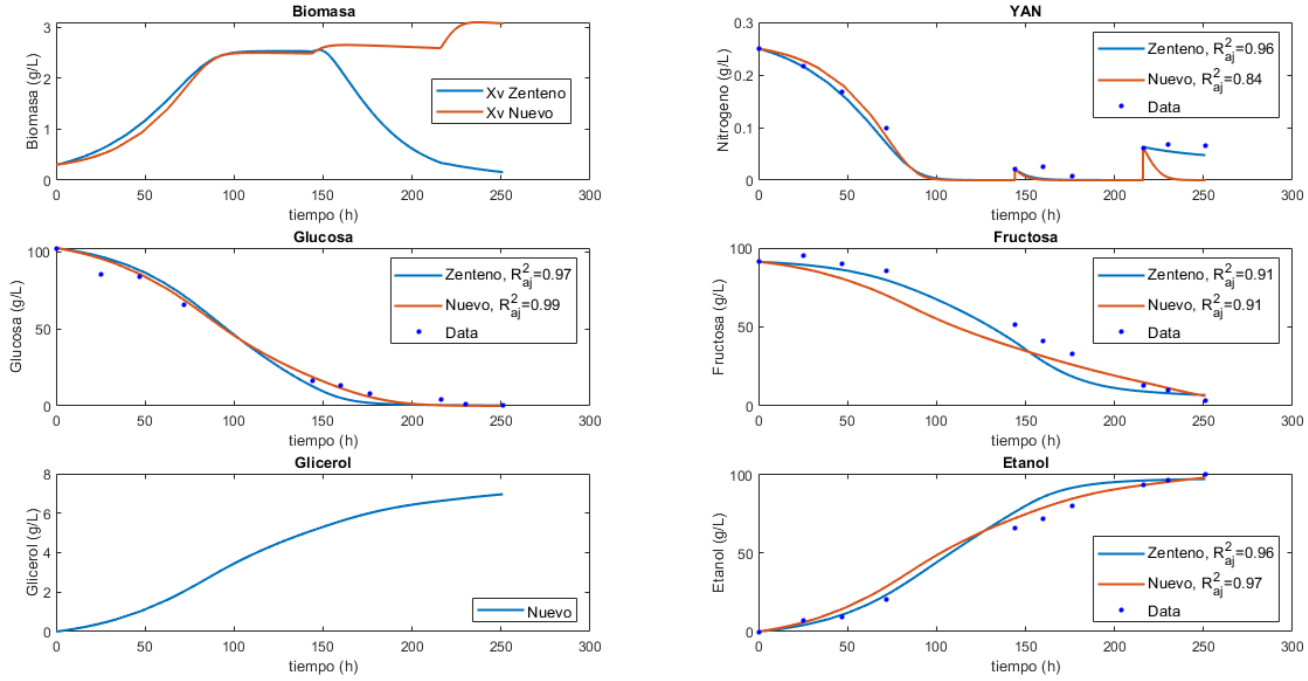
(Experimento a 17 °C)



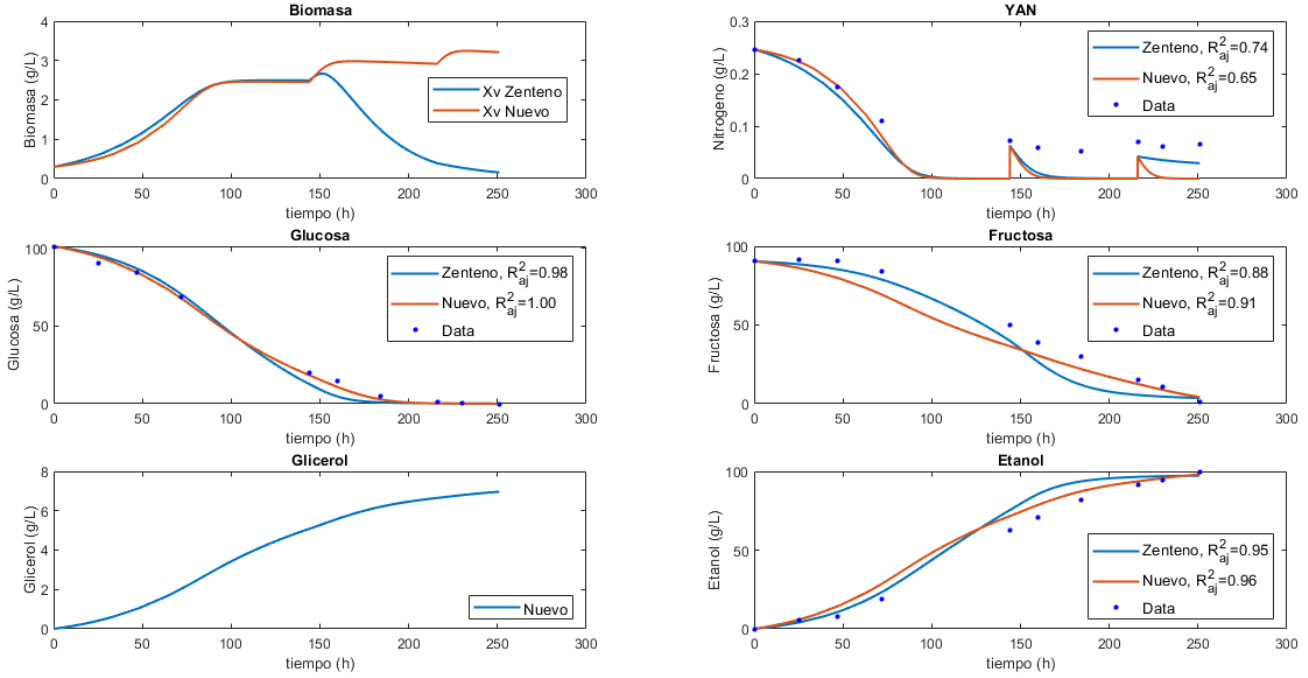
(Experimento a 19 °C)

Figura 7.1: Simulación de modelos Zenteno, Henriques y modelo Nuevo.

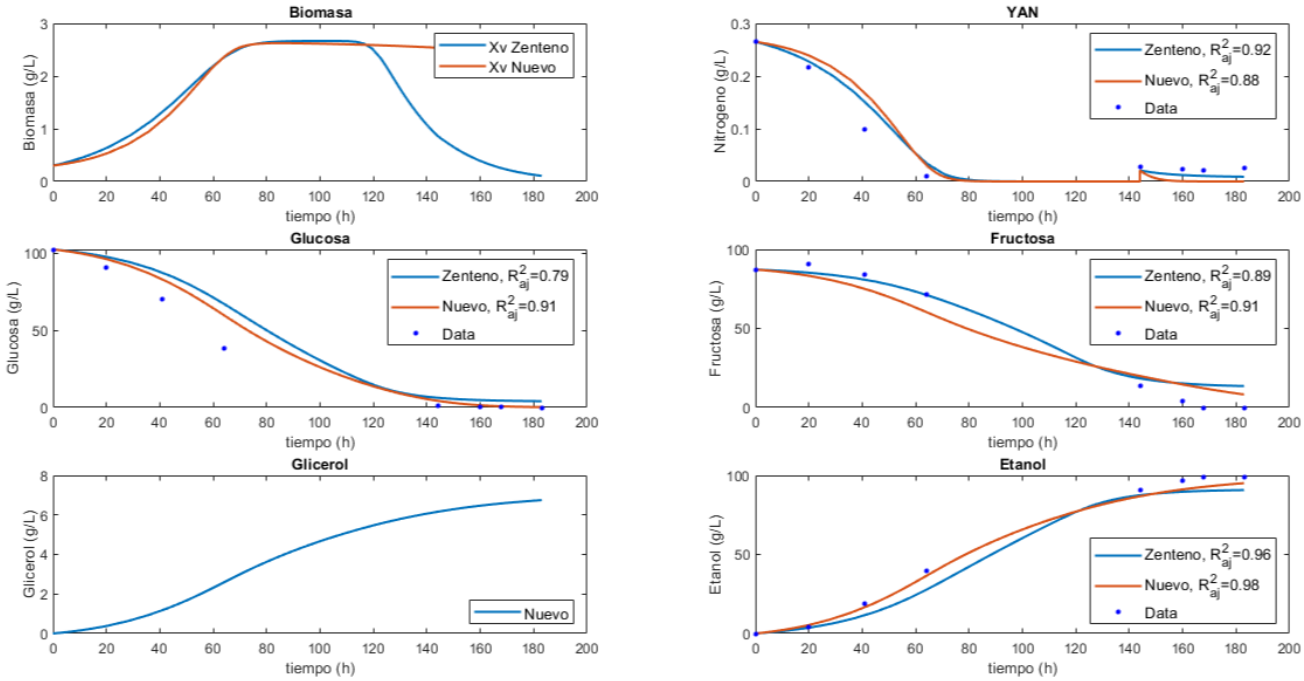
7.3.2 Fermentación de mosto Chardonnay a escala piloto.



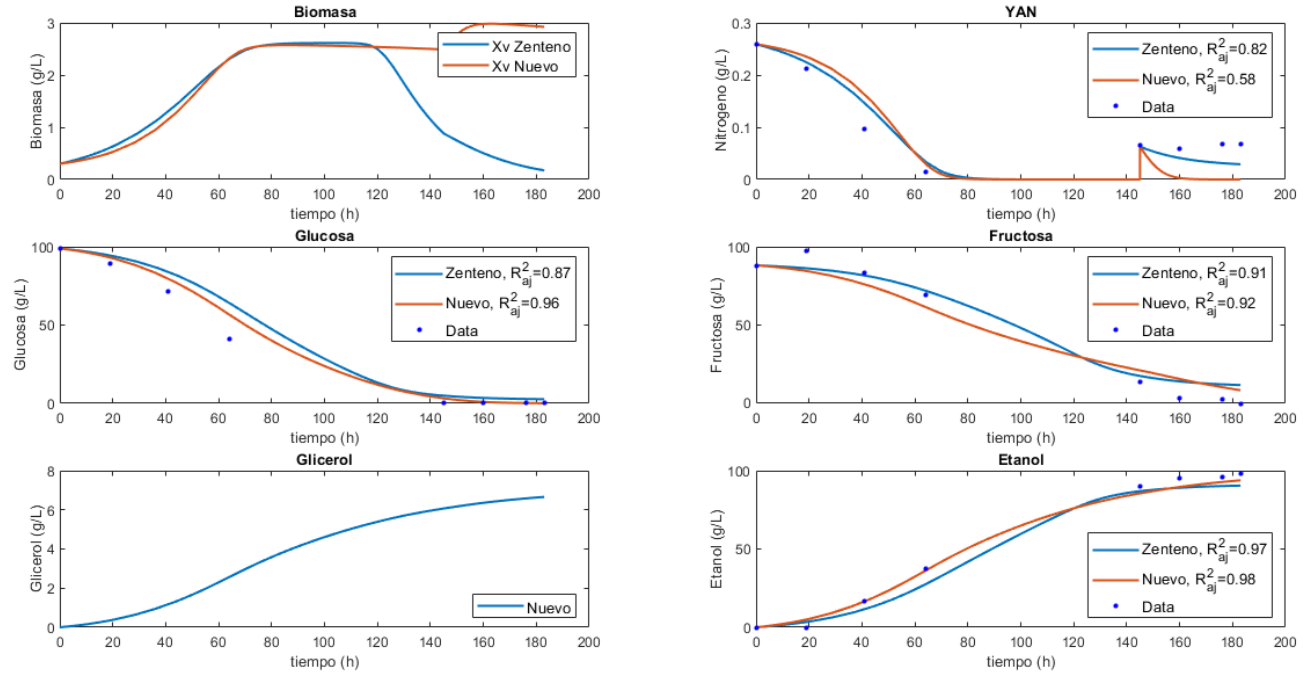
(Experimento 1 a 15 °C)



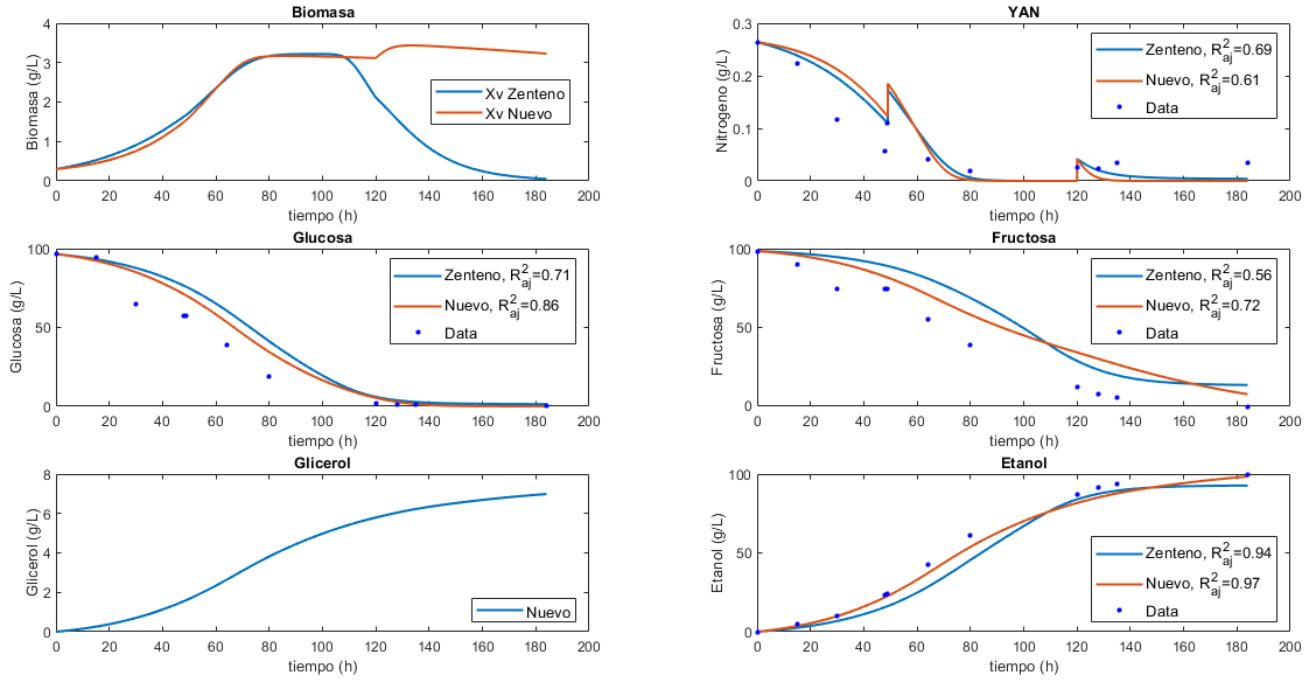
(Experimento 2 a 15 °C)



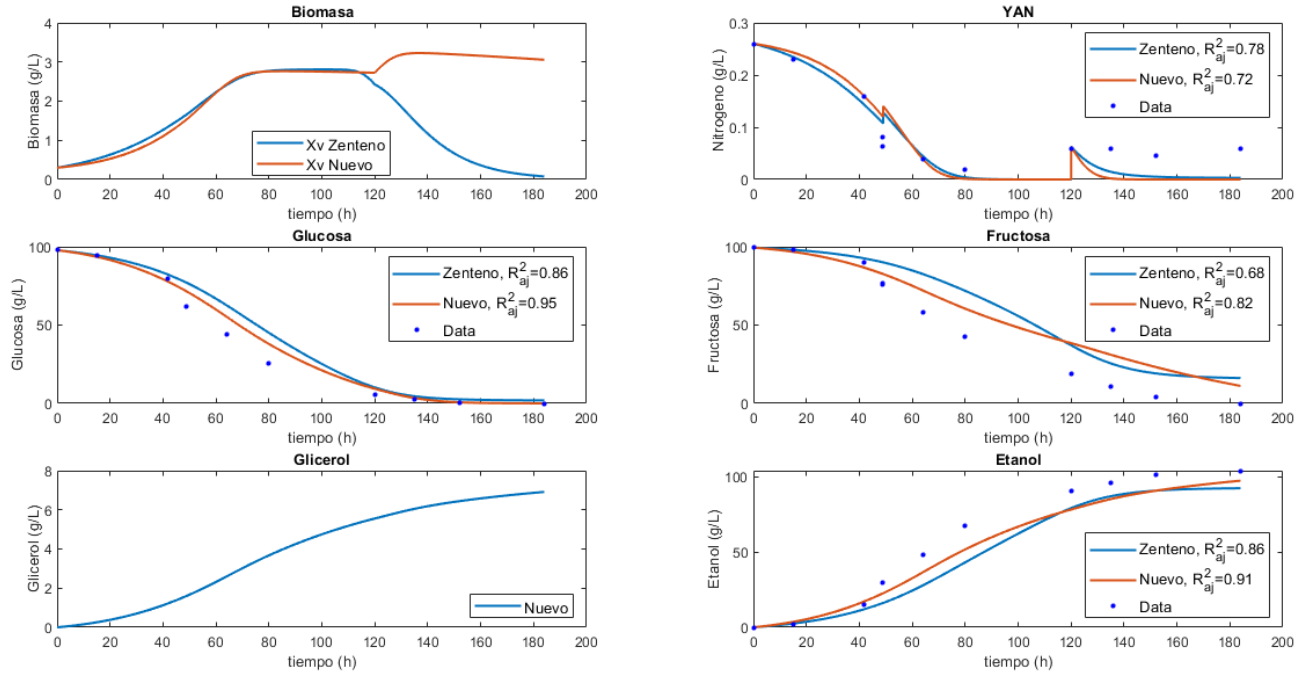
(Experimento 3 a 19 °C)



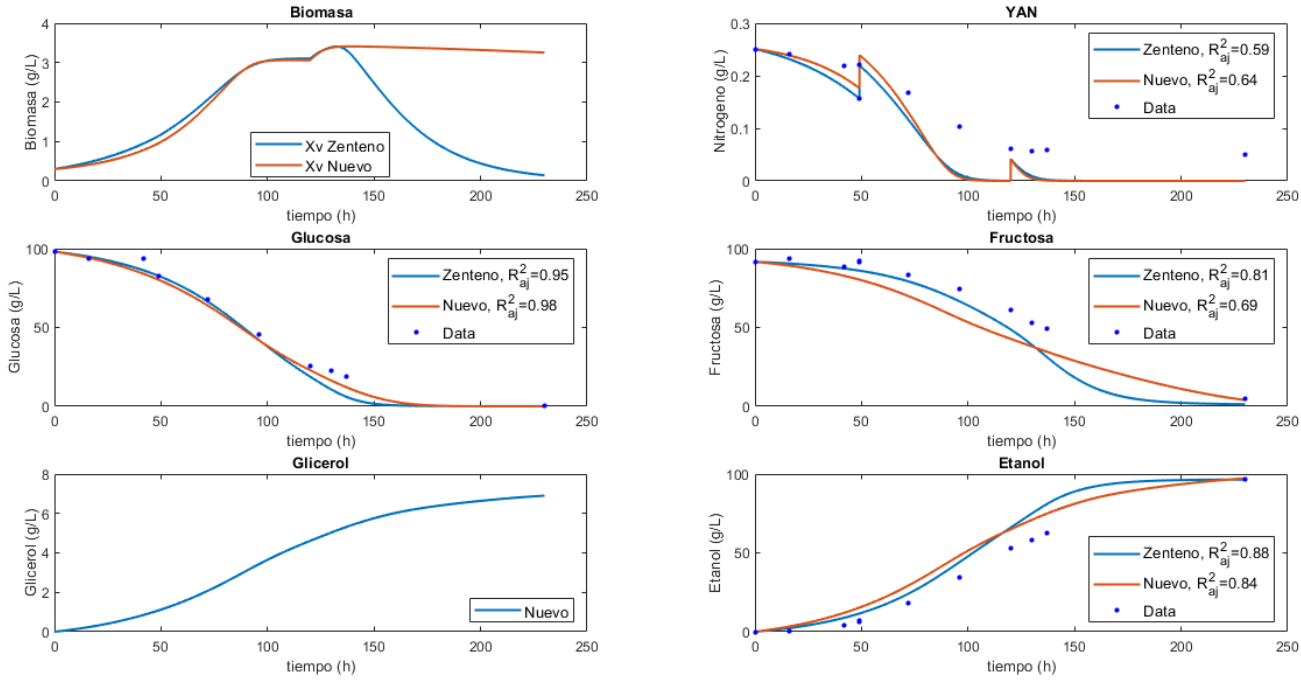
(Experimento 4 a 19 °C)



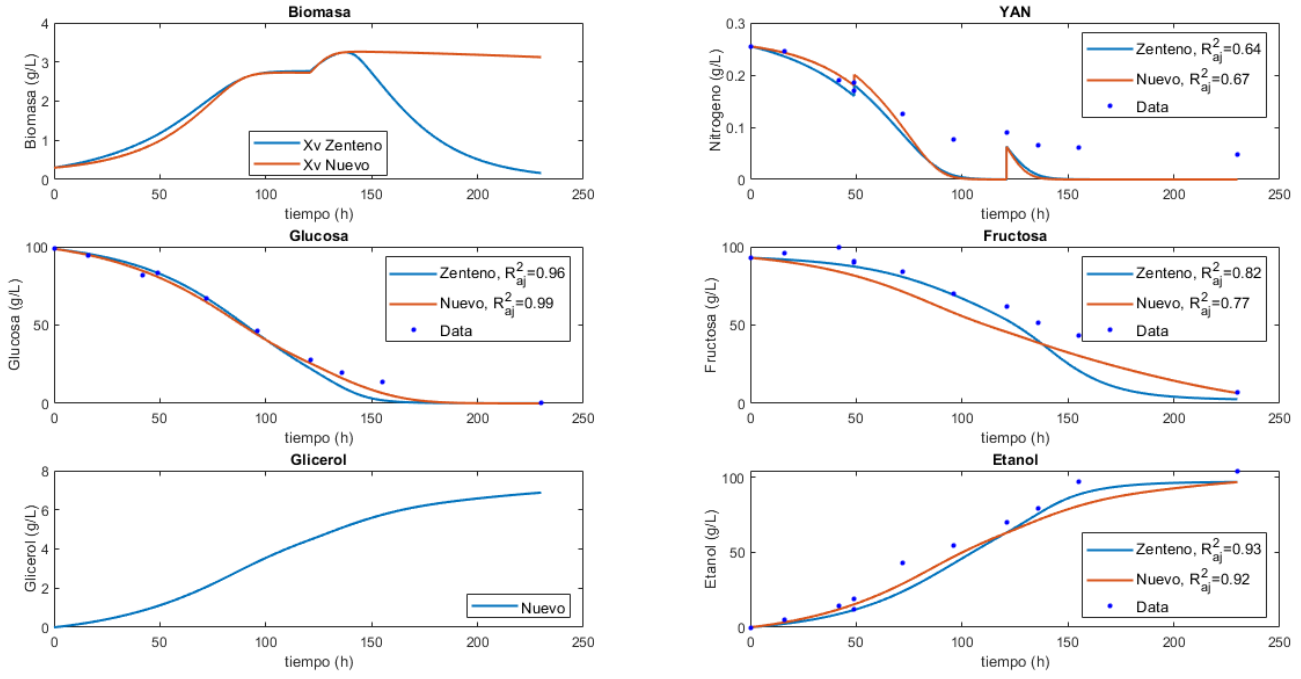
(Experimento 5 a 19 °C)



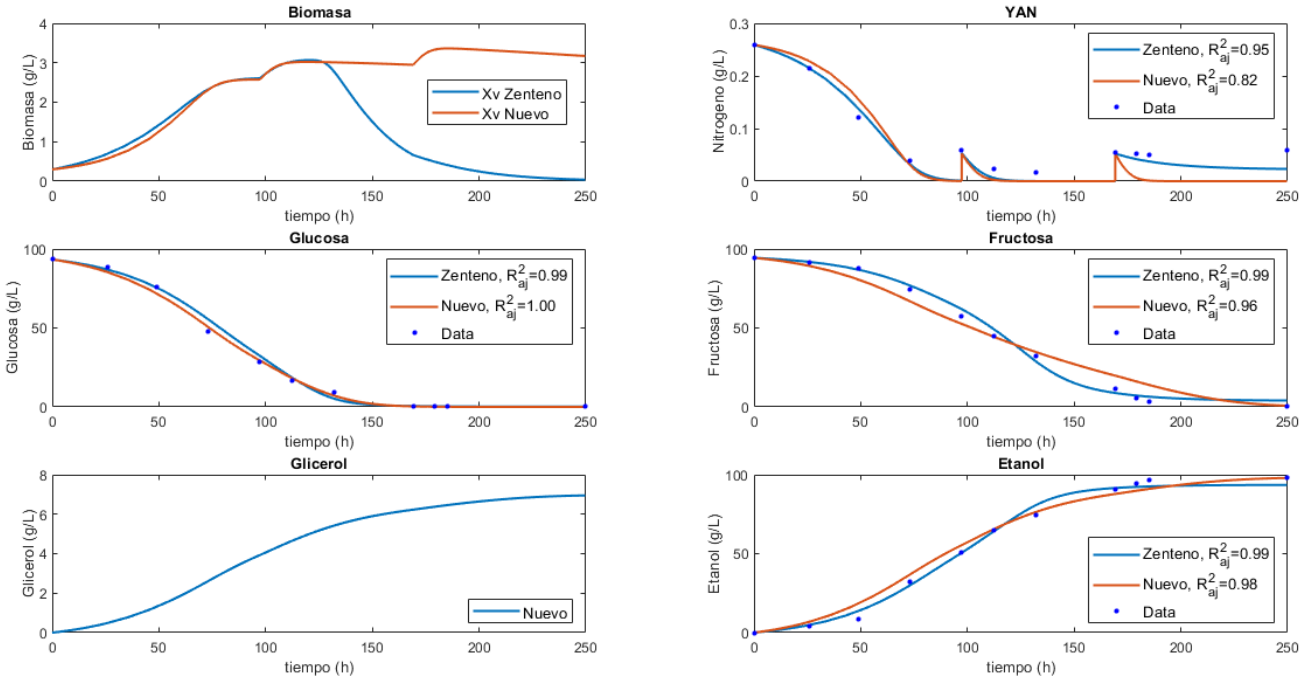
(Experimento 6 a 19 °C)



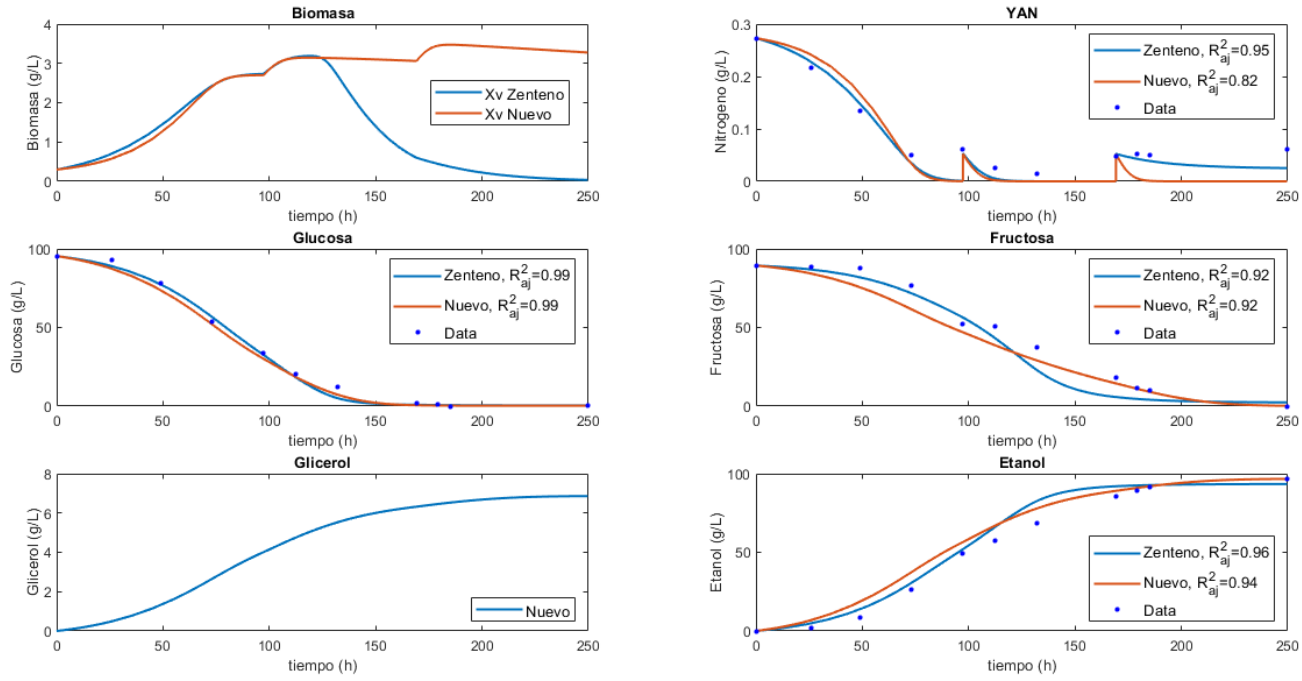
(Experimento 7 a 15 °C)



(Experimento 8 a 15 °C)



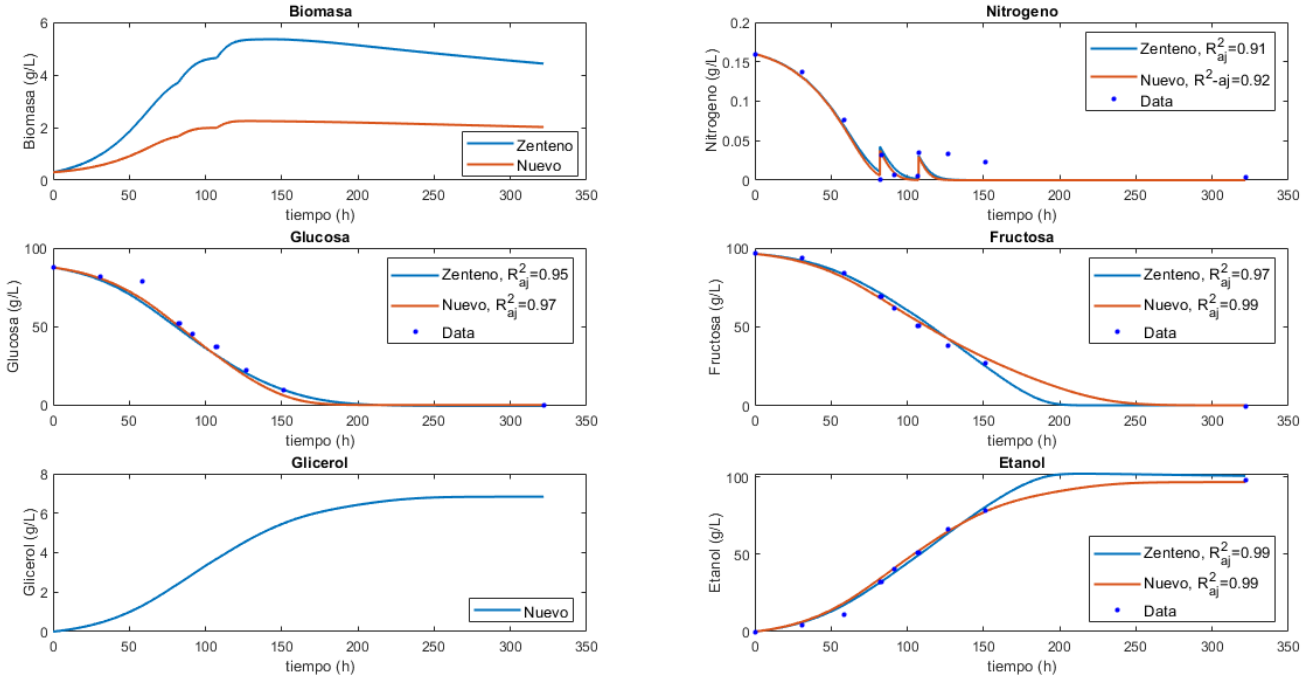
(Experimento 9 a 17 °C)



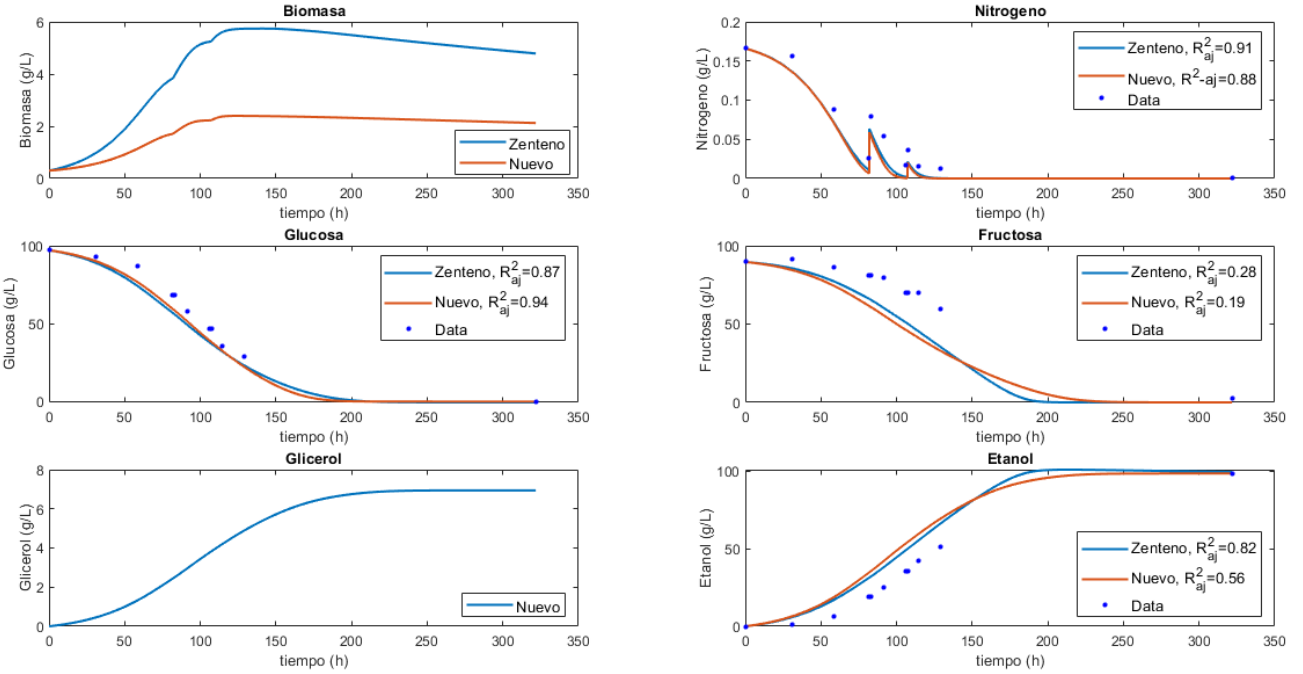
(Experimento 10 a 17 °C)

Figura 7.2: Simulación de modelos Zenteno y modelo Nuevo para experimentos realizados con Mosto Chardonnay a escala piloto

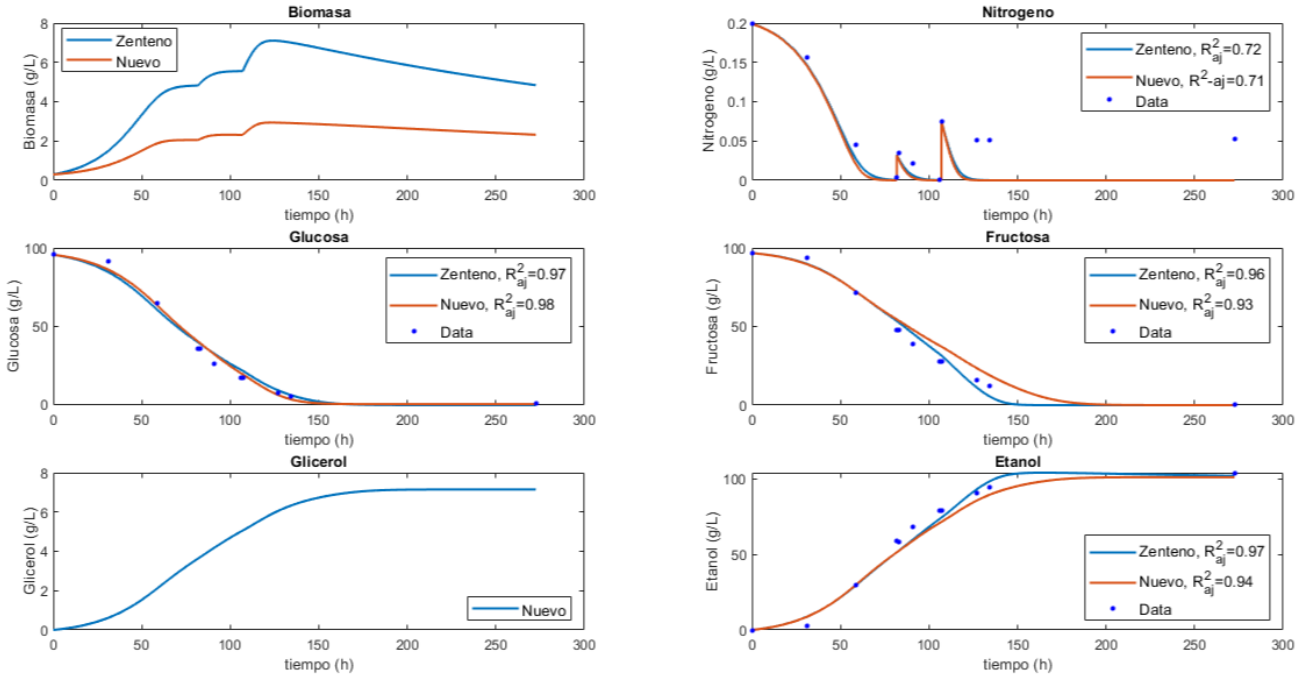
7.3.3 Fermentación de mosto Sauvignon Blanc a escala piloto.



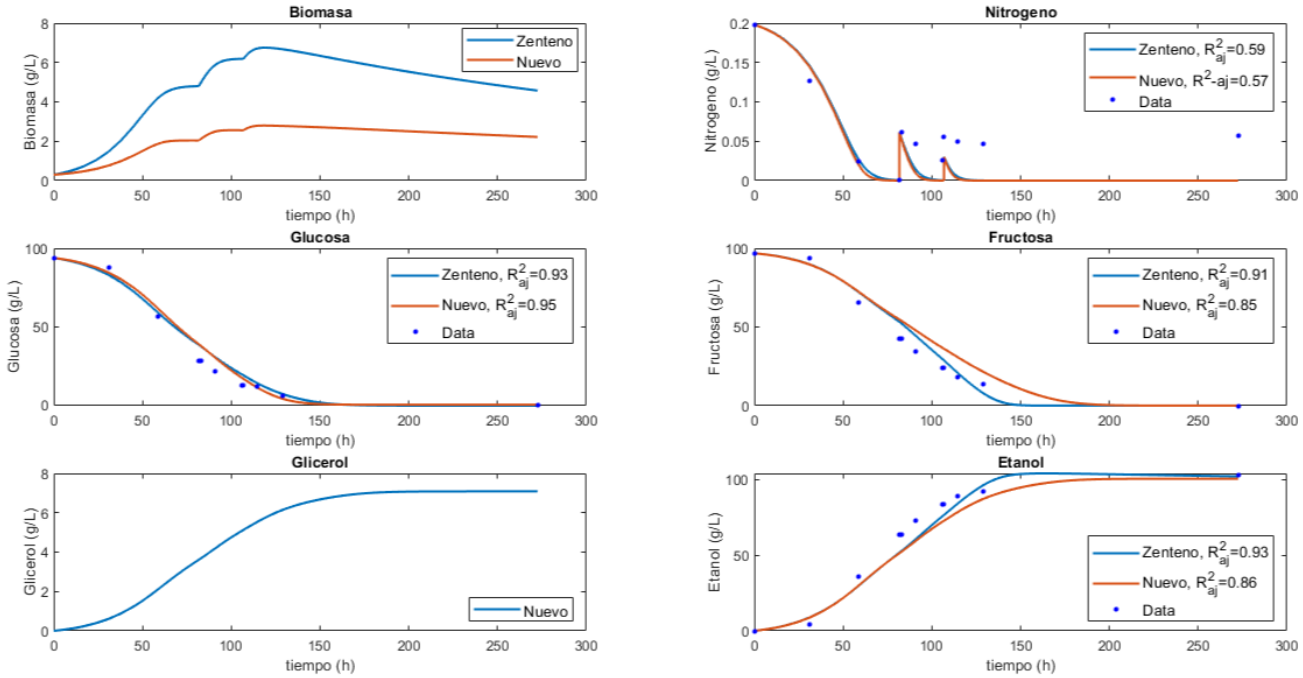
(Experimento 1 a 15 °C)



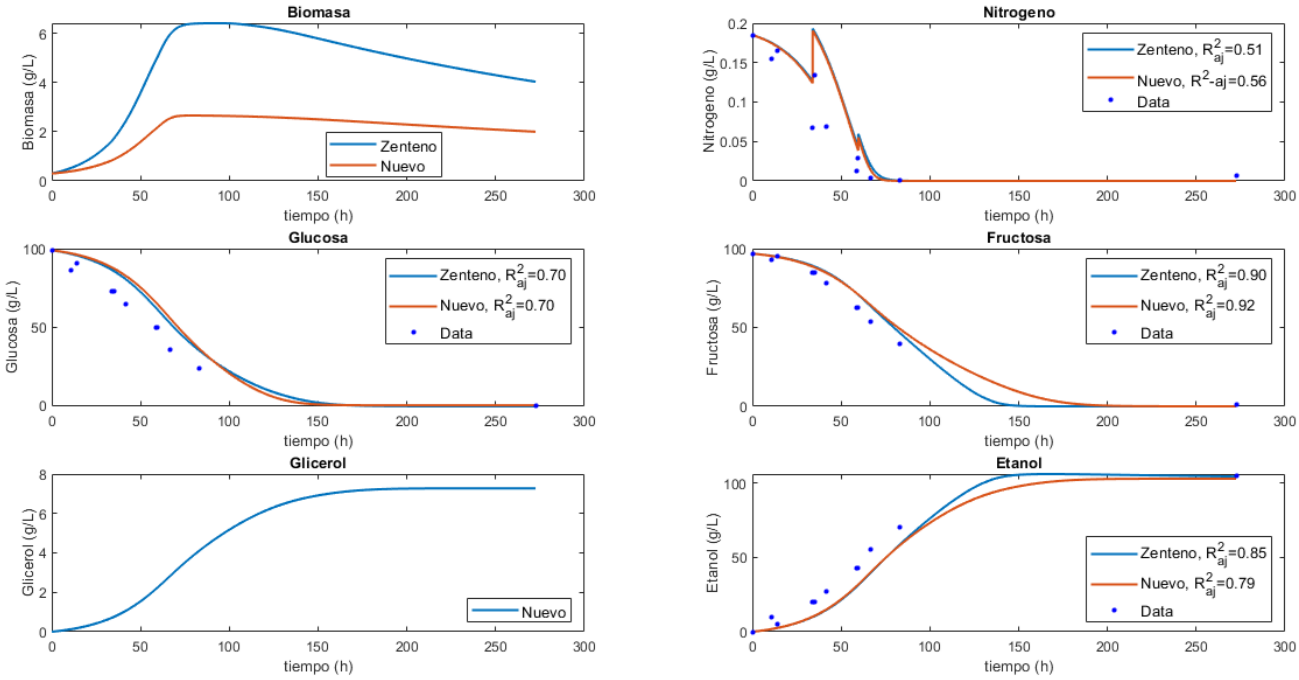
(Experimento 2 a 15 °C)



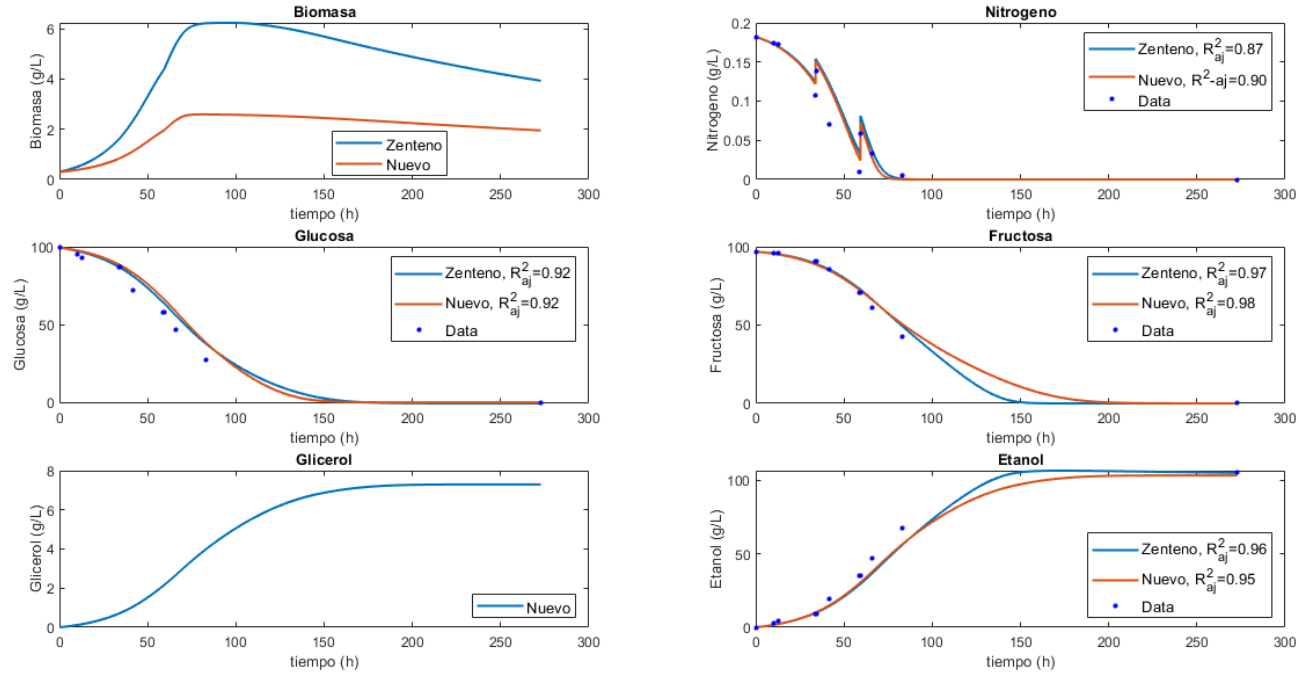
(Experimento 3 a 19 °C)



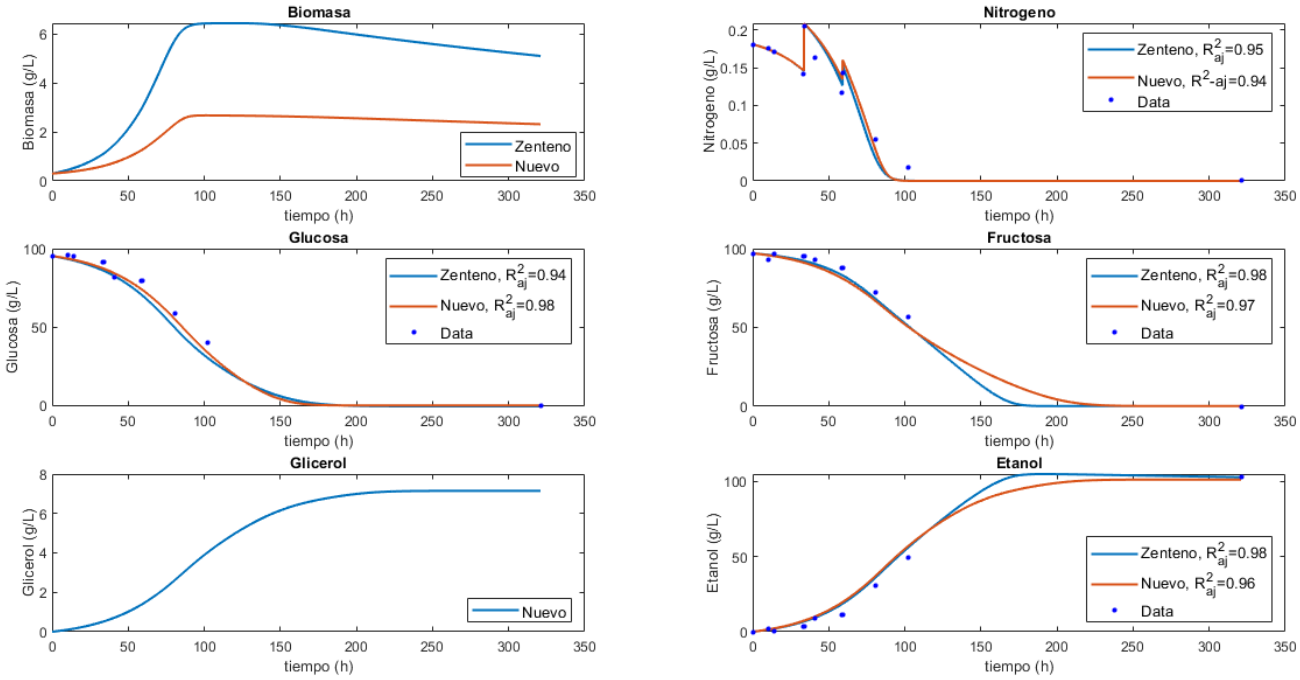
(Experimento 4 a 19 °C)



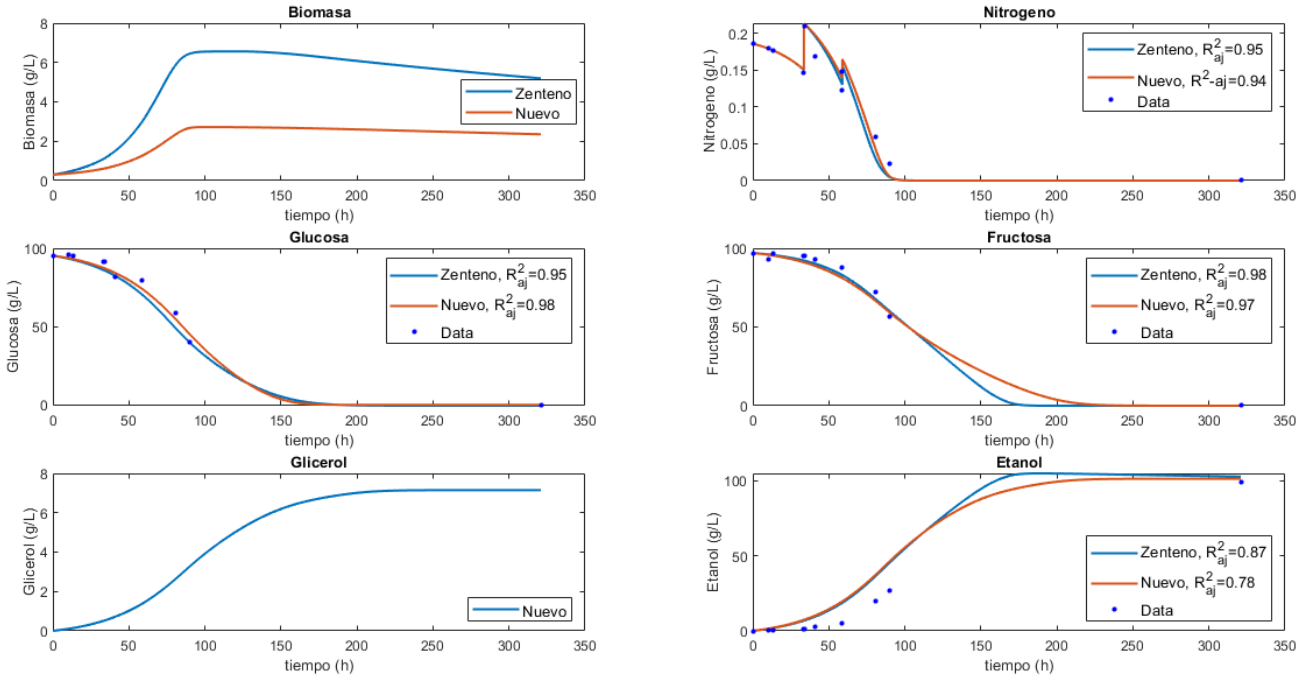
(Experimento 5 a 19 °C)



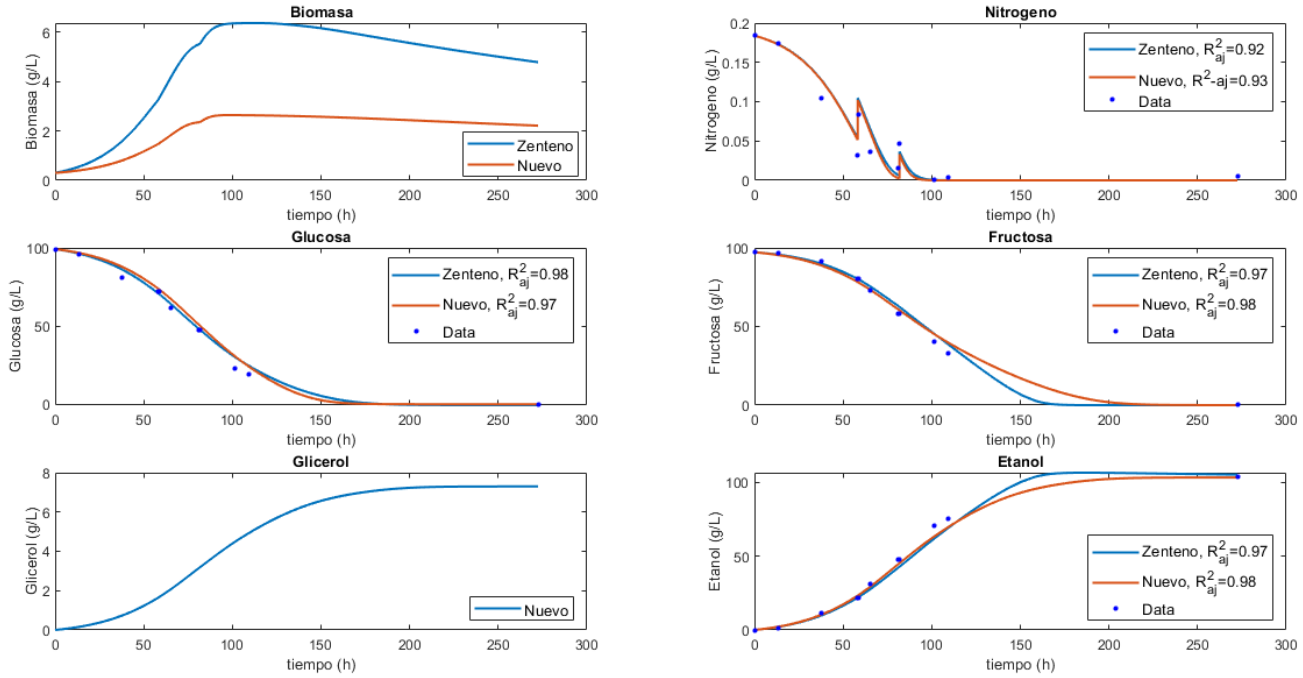
(Experimento 6 a 19 °C)



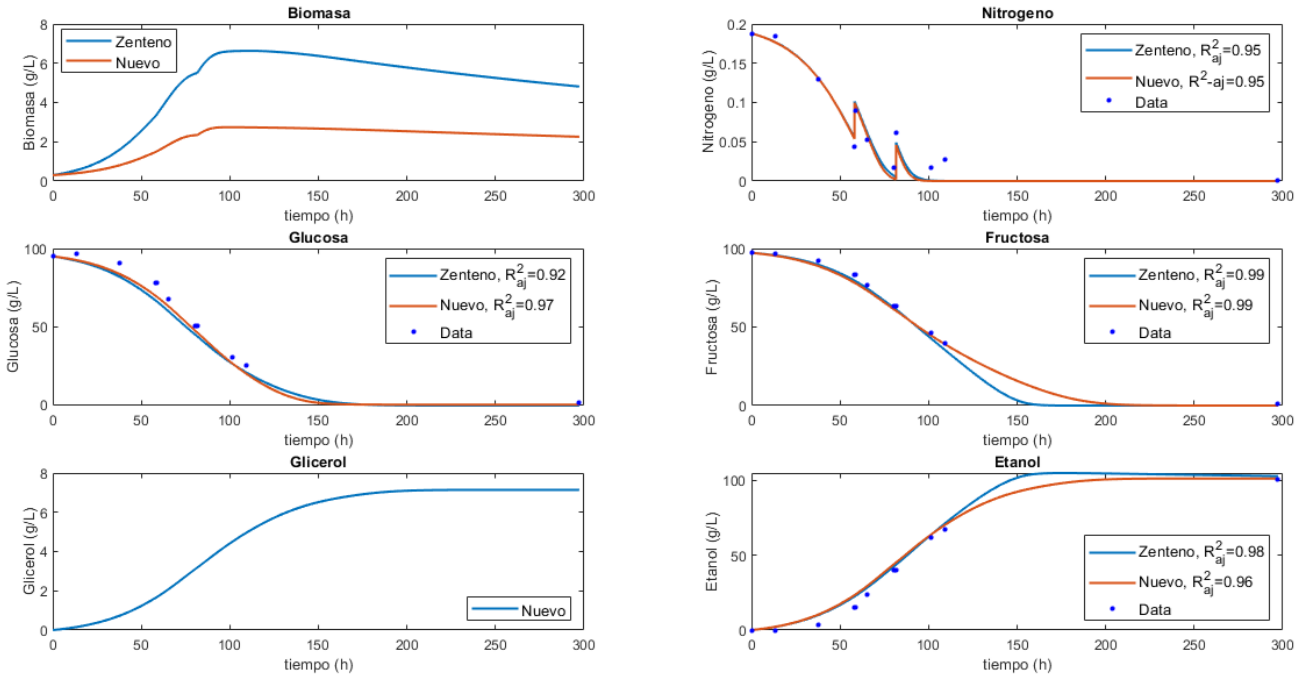
(Experimento 7 a 15 °C)



(Experimento 8 a 15 °C)



(Experimento 9 a 17 °C)

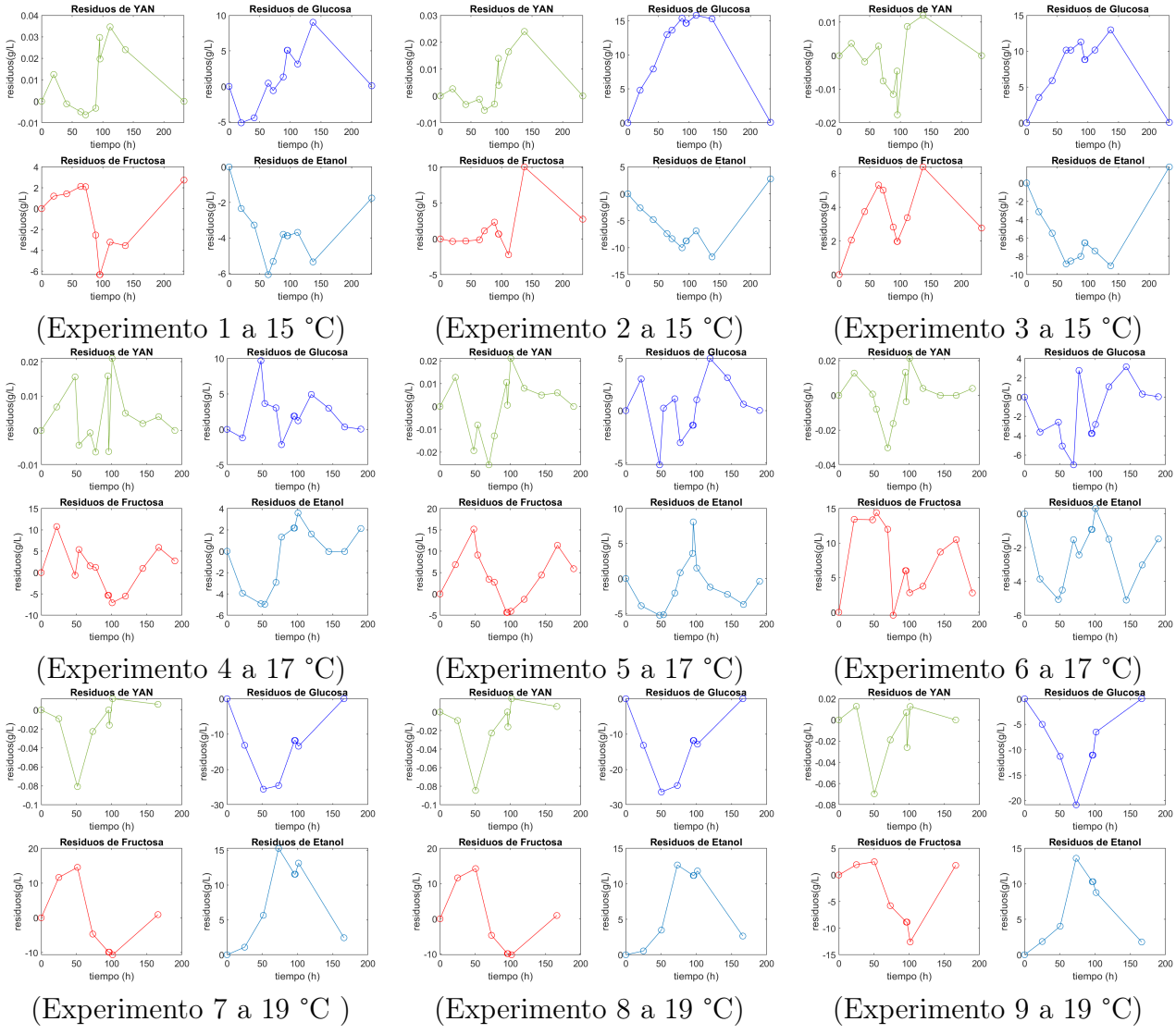


(Experimento 10 a 17 °C)

Figura 7.3: Simulación de modelos Zenteno y modelo Nuevo para experimentos realizados con Mosto Sauvignon Blanc a escala piloto

7.4 ANEXO D: Residuos de los modelos.

7.4.1 Fermentación de mosto Chardonnay a escala Laboratorio.

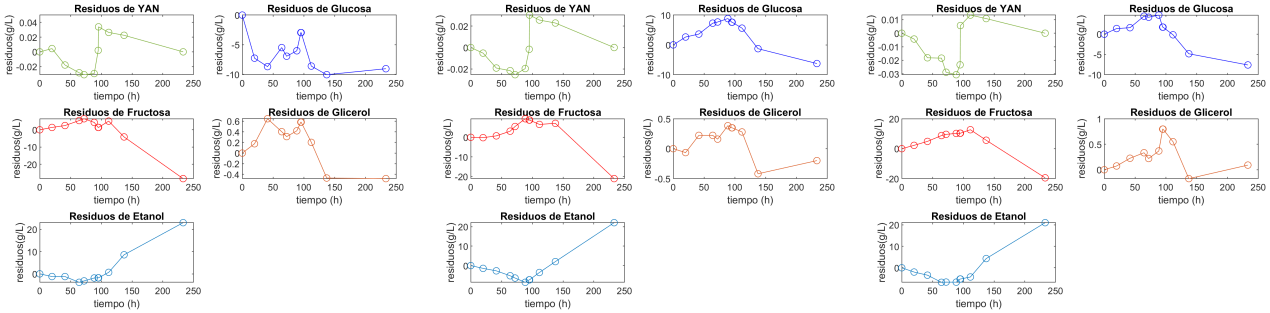


(Experimento 1 a 15 °C) (Experimento 2 a 15 °C) (Experimento 3 a 15 °C)

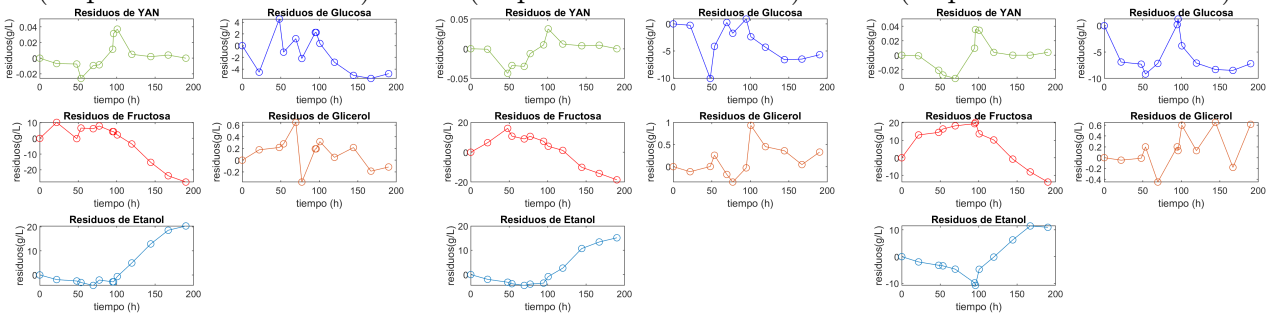
(Experimento 4 a 17 °C) (Experimento 5 a 17 °C) (Experimento 6 a 17 °C)

(Experimento 7 a 19 °C) (Experimento 8 a 19 °C) (Experimento 9 a 19 °C)

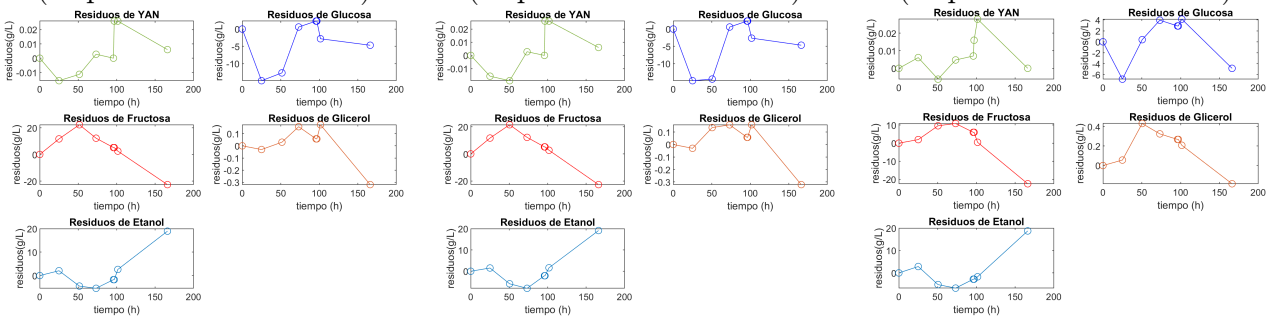
Figura 7.4: Análisis de error Modelo Zenteno



(Experimento 1 a 15 °C) (Experimento 2 a 15 °C) (Experimento 3 a 15 °C)

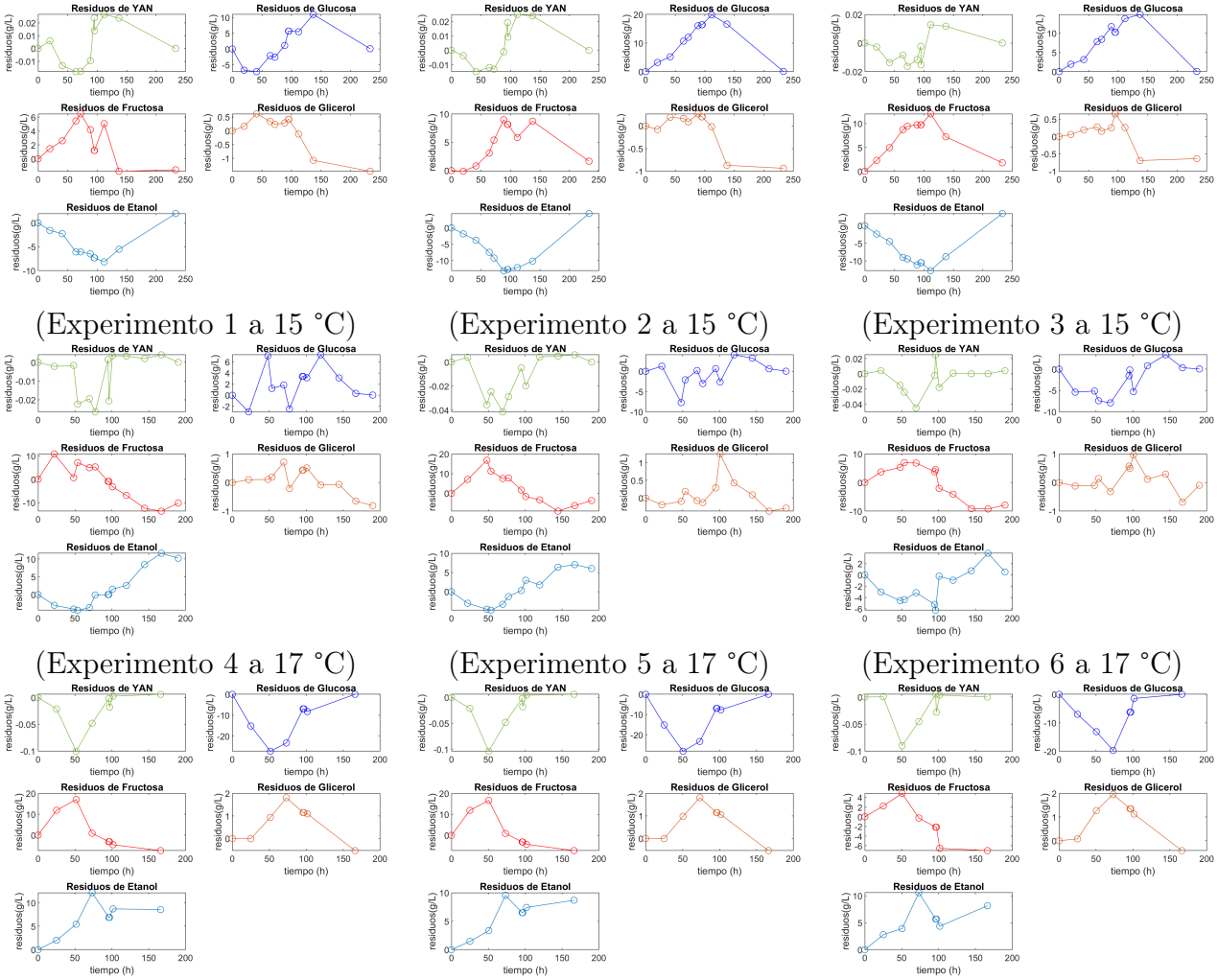


(Experimento 4 a 17 °C) (Experimento 5 a 17 °C) (Experimento 6 a 17 °C)



(Experimento 7 a 19 °C) (Experimento 8 a 19 °C) (Experimento 9 a 19 °C)

Figura 7.5: Análisis de error Modelo Henriques



(Experimento 1 a 15 °C) (Experimento 2 a 15 °C) (Experimento 3 a 15 °C)

(Experimento 4 a 17 °C) (Experimento 5 a 17 °C) (Experimento 6 a 17 °C)

(Experimento 7 a 19 °C) (Experimento 8 a 19 °C) (Experimento 9 a 19 °C)

Figura 7.6: Análisis de error Modelo Nuevo.

7.4.2 Fermentación de mosto Chardonnay a escala piloto.

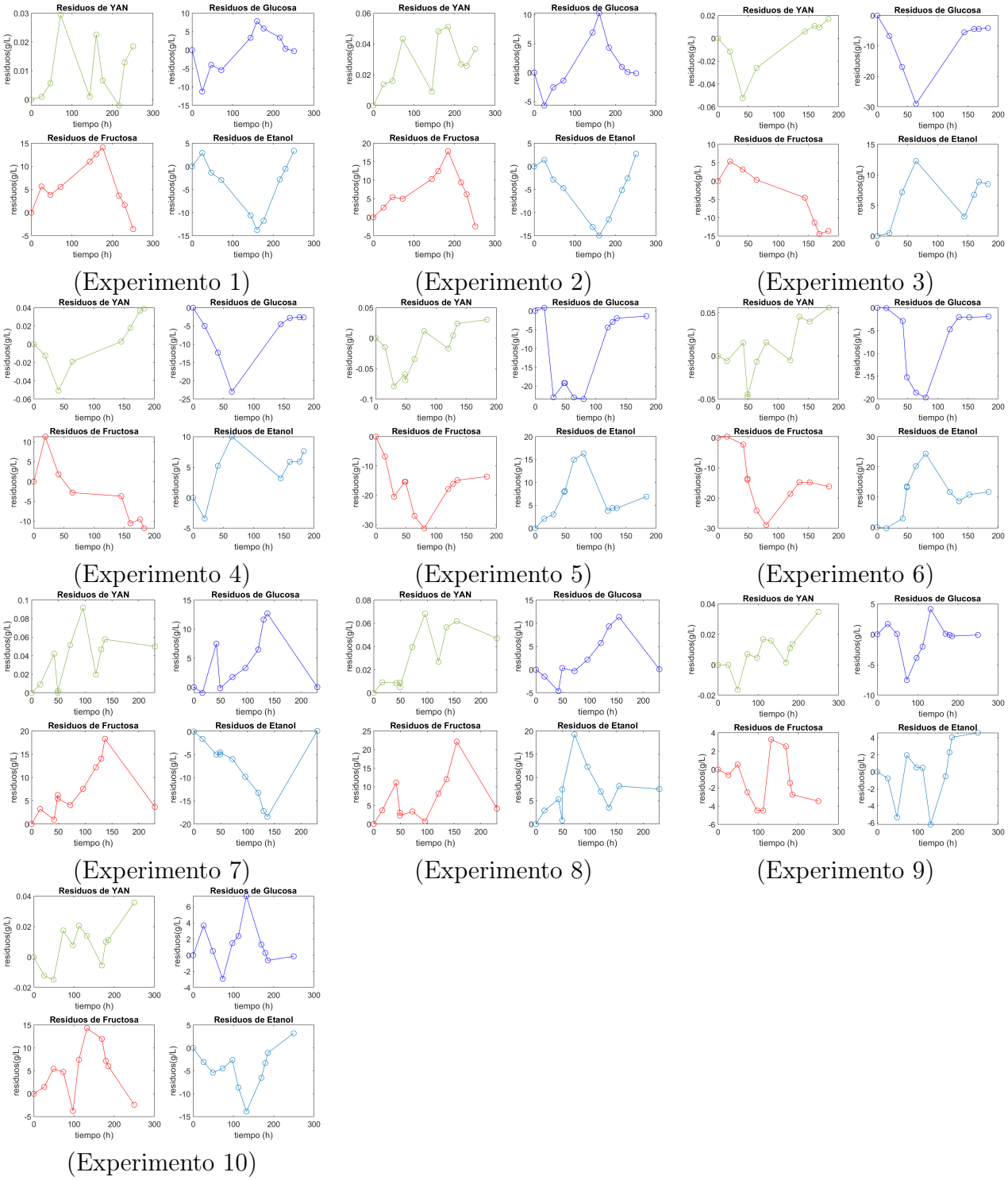
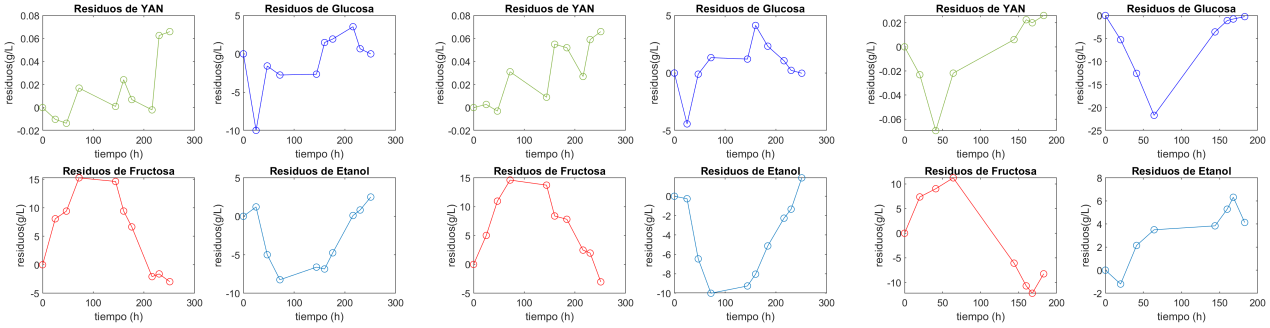


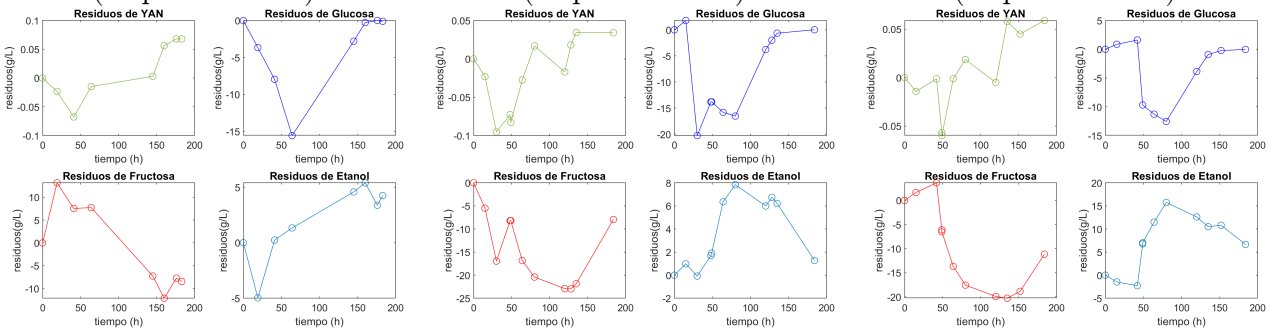
Figura 7.7: Distribución de error modelo Zenteno.



(Experimento 1)

(Experimento 2)

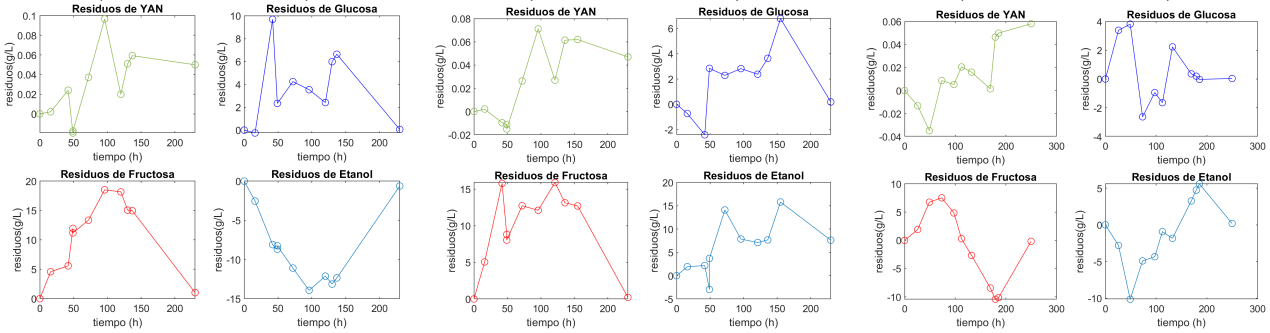
(Experimento 3)



(Experimento 4)

(Experimento 5)

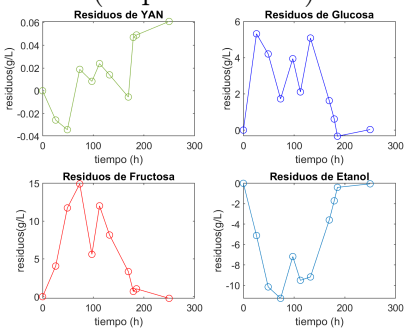
(Experimento 6)



(Experimento 7)

(Experimento 8)

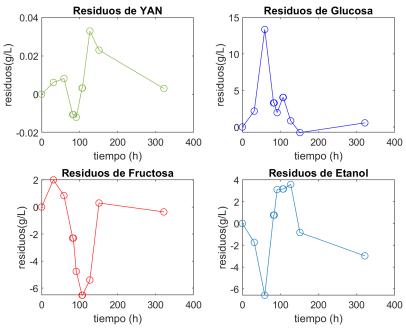
(Experimento 9)



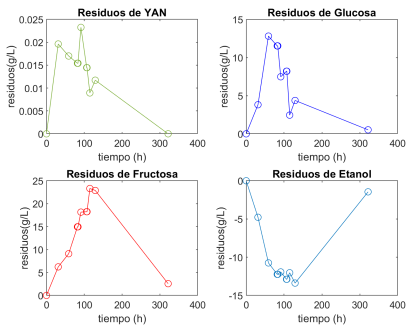
(Experimento 10)

Figura 7.8: Distribución de error modelo Nuevo.

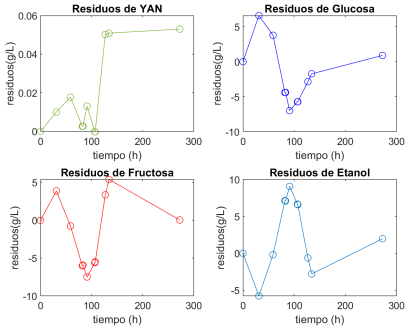
7.4.3 Fermentación de mosto Sauvignon Blanc a escala piloto.



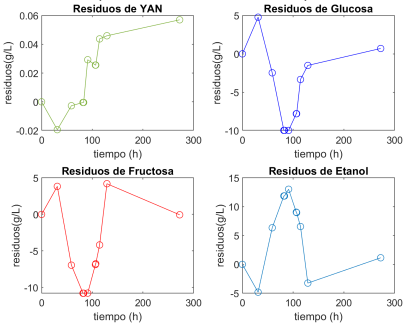
(Experimento 1)



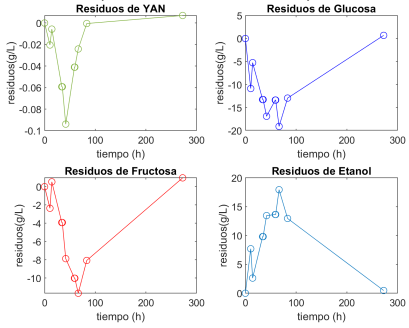
(Experimento 2)



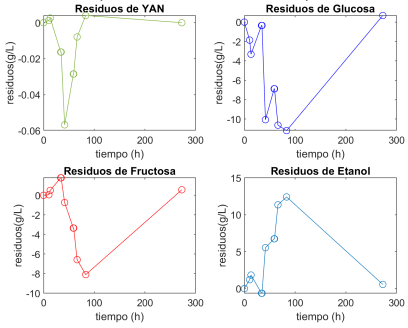
(Experimento 3)



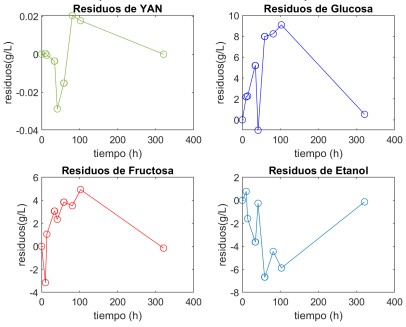
(Experimento 4)



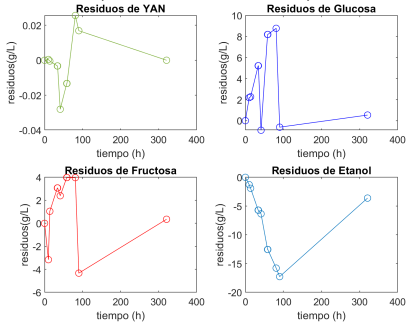
(Experimento 5)



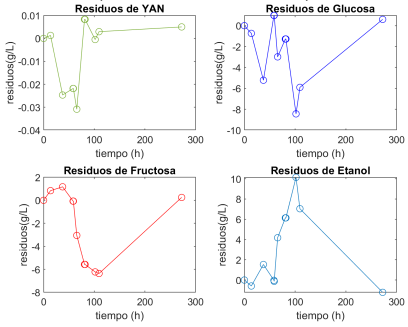
(Experimento 6)



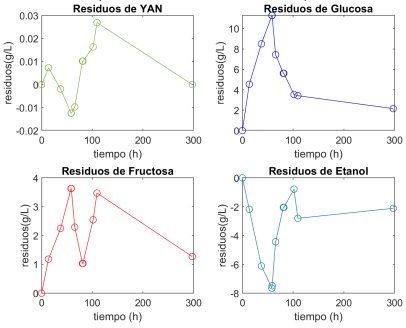
(Experimento 7)



(Experimento 8)

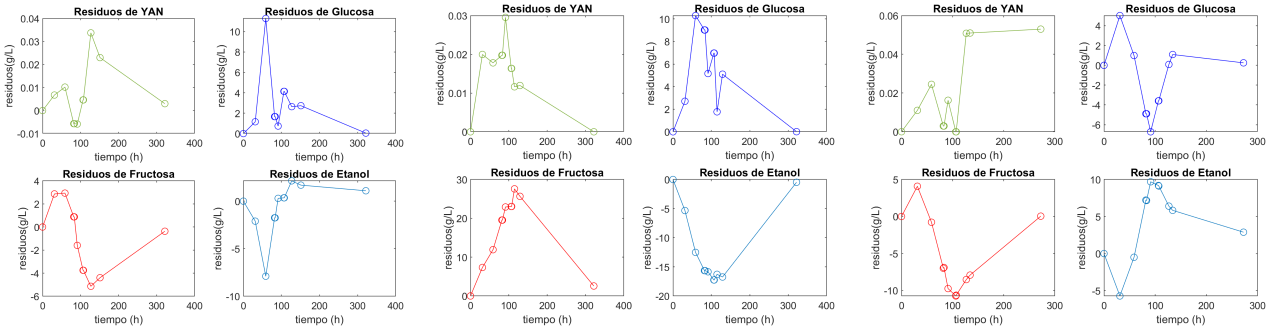


(Experimento 9)

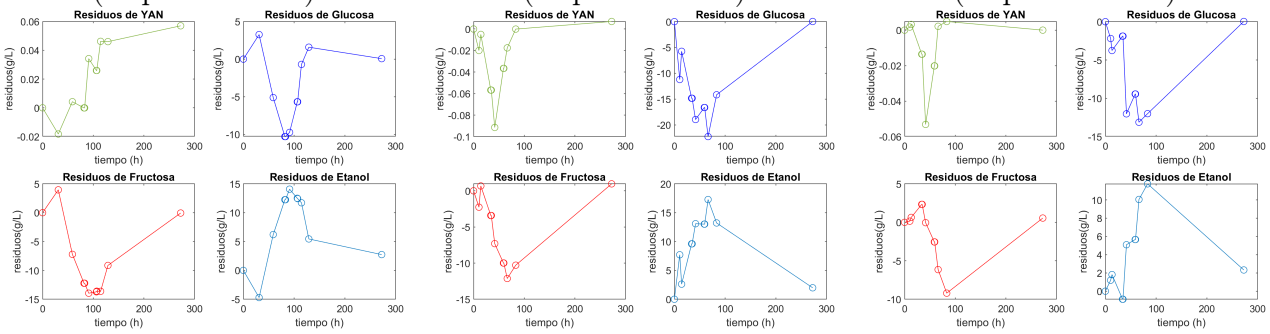


(Experimento 10)

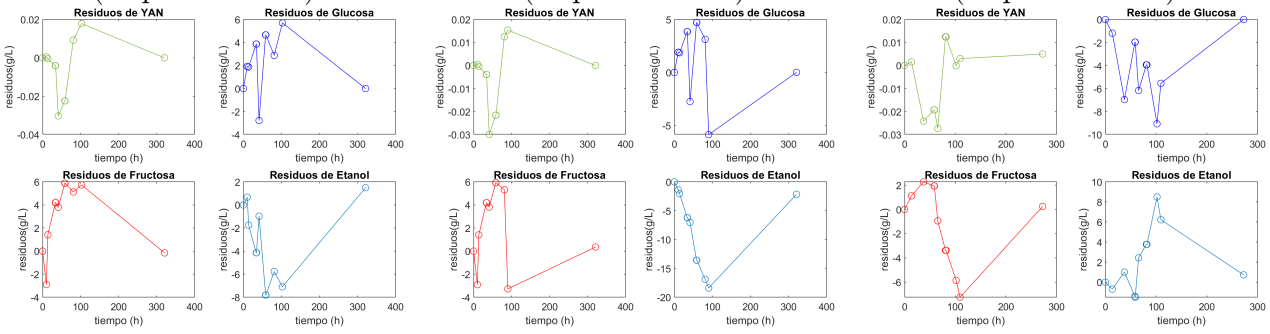
Figura 7.9: Distribución de error modelo Zenteno.



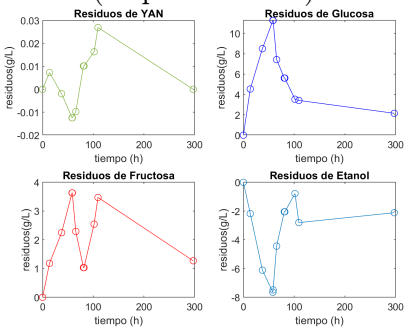
(Experimento 1) (Experimento 2) (Experimento 3)



(Experimento 4) (Experimento 5) (Experimento 6)



(Experimento 7) (Experimento 8) (Experimento 9)



(Experimento 10)

Figura 7.10: Distribución de error modelo Nuevo.