UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

Repositorio Digital USM **https://repositorio.usm.cl**

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental Ingeniería Civil Ambiental

2017

EFECTO DEL USO DE HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE PROTEÍNAS DE LEVADURA COMO FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE EL PERFIL MOLECULAR DEL VINO

URBINA URIZAR, CAMILA FRANCISCA

Universidad Técnica Federico Santa María

http://hdl.handle.net/11673/13696

Repositorio Digital USM, UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL

VALPARAÍSO – CHILE

"EFECTO DEL USO DE HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE PROTEÍNAS DE LEVADURA COMO FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE EL PERFIL MOLECULAR DEL VINO"

CAMILA FRANCISCA URBINA URIZAR

Memoria presentada para optar al título de:

INGENIERO CIVIL AMBIENTAL

PROFESORES

DRA. ALEJANDRA URTUBIA

DR. PEDRO VALENCIA

ENERO 2017, VALPARAÍSO

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradecer enormemente a mi familia por todo el apoyo que me brindaron en estos años. Especialmente a mis padres, María Cecilia e Iván, por confiar siempre en mí, por enseñarme valores y por todo el cariño que siempre me han entregado.

A mis amigos y compañeros de carrera por acompañarme en todos estos años de universidad, en momentos buenos y malos.

A mis profesores de memoria, Alejandra Urtubia y Pedro Valencia, por todo el apoyo, los consejos y críticas que me ayudaron en todo el proceso en que desarrollé este trabajo.

A Yolanda Bouzas por el gran aporte que realizó a esta investigación, tanto en el trabajo en laboratorio como en la medición de compuestos que hizo en España, en la Estación de Viticultura y Enología de Galicia. Por último, agradezco a los que formaron parte del panel de evaluación sensorial, especialmente a Georgette, Sebastián y Tatiana.

RESUMEN

El vino es la bebida resultante de la fermentación alcohólica del mosto de uva llevada a cabo por la acción de levaduras, que transforman los azúcares contenidos en el mosto en etanol, dióxido de carbono y otros subproductos. Dentro de estos últimos se encuentran los compuestos volátiles y no volátiles, los cuales son responsables de otorgar al vino características sensoriales y aromáticas. Se ha demostrado que la procedencia del nitrógeno añadido tiene un impacto en el perfil molecular que se genera.

En este estudio se evaluó el efecto del hidrolizado enzimático de proteínas de levadura como fuente de nitrógeno en el perfil molecular del vino. La estrategia propuesta fue obtener una fuente de nitrógeno a partir de levaduras mediante hidrólisis enzimática, primero se esterilizó la solución en autoclave para asegurar la muerte celular , se realizó un pretratamiento con ultrasonido para liberar el contenido celular y finalmente se llevó a cabo la hidrólisis enzimática. Posteriormente, se desarrollaron fermentaciones con distintas fuentes de nutrientes, Fosfato de Amonio Dibásico (DAP) como fuente inorgánica control, una mezcla de aminoácidos (AA), mezcla de hidrolizado enzimático de proteína de levadura y DAP (H50%) e hidrolizado enzimático de proteínas de levaduras (H100%). Se midió acidez total, acidez volátil, pH, grado alcohólico, azúcares reductores en todos los experimentos, los resultados no mostraron mayores diferencias entre ellos. La medición de compuestos volátiles mayoritarios mostró que al utilizar H100% y H50% en la fermentación alcohólica aumenta la producción de 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol y disminuye la producción de 1-propanol en comparación con el uso de DAP.

Se pudo evidenciar que la fermentación se desarrolla de manera efectiva al utilizar hidrolizado enzimático de proteínas de levaduras como fuente de nitrógeno. Además, se confirma que la fuente de nitrógeno influye en la velocidad de fermentación y en la producción de compuestos volátiles. La procedencia del nitrógeno tiene un efecto en el perfil molecular del vino, particularmente el uso de H100% y H50% aumenta la formación de alcoholes superiores y ésteres en comparación con el uso de DAP. La evaluación sensorial permitió concluir que las diferencias obtenidas analíticamente son percibidas por el consumidor, particularmente la acidez. Los vinos en que se adicionó hidrolizado enzimático de proteínas de levadura recibieron mejores calificaciones respecto al que se adicionó DAP y aminoácidos.

ABSTRACT

Wine is the beverage resulting from the alcoholic fermentation of grape must carried out by the action of yeasts, which transform the sugars contained in the must into ethanol, carbon dioxide and other by-products. Within the latter are volatile and non-volatile compounds, which are responsible for giving the wine sensory and aromatic characteristics. It has been shown that the provenance of added nitrogen has an impact on the molecular profile that is generated.

In this study the effect of the enzymatic hydrolyzate of yeast proteins as nitrogen source in the molecular profile of the wine was evaluated. The proposed strategy was to obtain a source of nitrogen from yeast by enzymatic hydrolysis, first the solution was autoclaved to ensure cell death, a pre-treatment with ultrasound was performed to release the cellular content and finally the enzymatic hydrolysis was carried out . Subsequently, fermentations with different nutrient sources, DAP (Ammonium Dibasic Phosphate) as a control inorganic source, a mixture of amino acids (AA), enzyme hydrolyzate mixture of yeast protein and DAP (H50%) and protein enzyme hydrolyzate Of yeast (H100%). Total acidity, volatile acidity, pH, alcoholic, reducing sugars were measured in all experiments, the results showed no major differences between them. Measurement of the most volatile compounds showed that the production of 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-propanol, and decreased production of H100% and H50% Of 1-propanol compared to the use of DAP.

It was evidenced that the fermentation takes place effectively when using enzymatic hydrolyzate of yeast proteins as a source of nitrogen. In addition, it is confirmed that the source of nitrogen influences the rate of fermentation and the production of volatile compounds. The source of nitrogen has an effect on the molecular profile of the wine, particularly the use of H100% and H50% increases the formation of higher alcohols and esters compared to the use of DAP. The sensorial evaluation allowed to conclude that the differences obtained analytically are perceived by the consumer, particularly the acidity. The wines in which enzymatic hydrolyzate of yeast proteins were added received better grades compared to which DAP and amino acids were added.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS II
RESUMEN III
ABSTRACT IV
ÍNDICE V
ÍNDICE DE FIGURAS VIII
ÍNDICE DE TABLAS X
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 2
1.1. Introducción 2
1.2. Objetivos 4
1.2.1. Objetivo general 4
1.2.2. Objetivos específicos 4
2. ANTECEDENTES GENERALES 6
2.1. El vino 6
2.1.1. Definición 6
2.1.2. Industria del vino 6
2.1.3. Proceso de elaboración del vino 8
2.2. Fuente de nutrientes en la fermentación alcohólica 12
2.2.1. Fermentación alcohólica 12
2.2.2. Importancia de la fuente de nutrientes 14
2.3. Potencial fuente de nutrientes a partir de la borra 18
2.3.1. Preparación de la fuente de nutrientes a partir de borra 19
2.4. El aroma y sabor del vino 21
2.4.1. Ácidos 23
2.4.2. Alcoholes 26
2.4.3. Alcoholes superiores 28
2.4.4. Ésteres 30
2.5. Evaluación sensorial 33
3. MATERIALES Y MÉTODOS 36
3.1. Metodología 36
3.2. Materiales y equipos 38
3.2.1. Autoclave 38

3.2.2. Equipo de emisión de ondas de ultrasonido (Sonicador) 38
3.2.3. Autotitulador 39
3.2.4. pH-metro 40
3.2.5. Turbidímetro 40
3.2.6. Refractómetro 41
3.2.7. Cromatógrafo de gases 41
3.2.8. Espectrofotómetro de infrarrojo 42
3.2.9. Espectrofotómetro 42
3.2.10. Reactivos 43
3.2.11. Levaduras 43
3.3. Diseño de experimentos 44
3.4. Preparación fuentes de nitrógeno 45
3.4.1. Fuente orgánica: Hidrolizado enzimático de proteínas 45
3.4.2. Fuente orgánica: Mezcla de aminoácidos 48
3.4.3. Fuente inorgánica: DAP 48
3.5. Fermentaciones 49
3.5.1. Volumen a añadir de fuente de nitrógeno 49
3.5.2. Condiciones de fermentación y monitoreo 51
3.6. Análisis de parámetros generales y compuestos volátiles 53
3.6.1. Determinación de parámetros generales 53
3.6.2. Determinación de compuestos volátiles mayoritarios 53
3.7. Evaluación sensorial 54
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 57
4.1. Generación de hidrolizado enzimático de proteínas de levadura 57
4.2. Monitoreo de la fermentación 57
4.3. Perfil molecular 60
4.3.1. Análisis de parámetros generales 61
4.3.2. Análisis de compuestos volátiles mayoritarios 64
4.4. Evaluación sensorial 73
4.4.1. Entrenamiento 73
4.4.2. Evaluación de muestras 73
5. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES 77
5.1. Conclusión 77
5.2. Recomendaciones y proyecciones 77

6. REFERENCIAS 80
7. ANEXOS 85
7.1. Protocolo de fermentación 85
7.2. Procedimientos 87
7.2.1. Preparación de inóculo 87
7.2.2. Determinación de pH 87
7.2.3. Nitrógeno asimilable 88
7.2.4. SO_2 total y libre 88
7.2.5. Acidez 88
7.2.6. °Brix 89
7.2.7. Turbidez 89
7.2.8. Azúcares reductores 89
7.3. Cuantificación de azúcares reductores mediante análisis DNS 90
7.4. Tablas de resultados experimentales 92
7.4.1. Resultados seguimiento de fermentación 92
7.4.2. Resultados de parámetros generales 96
7.4.3. Resultados de compuestos volátiles mayoritarios 97
7.5. Análisis estadístico de diferencias significativas: Prueba t de Student 98
7.5.1. Procedimiento 98
7.5.2. Resultados 99
7.6. Análisis no paramétrico: estadística de tipo Friedman 103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Producción de vino en Chile. Adaptado de (ODEPA, 2016). 7
Figura 2: Principales países exportadores de vino. Adaptado de (Guitián, 2015). 7
Figura 3: Esquema general proceso de elaboración del vino. Adaptado de Grainger & Tattersall, (2005). 10
Figura 4: Mecanismo de fermentación y respiración (Moreno-Arribas & Polo, 2009). 13
Figura 5: Representación de la influencia que tiene la fermentación alcohólica sobre la generación de compuestos que aportan sabores y aromas al vino. Adaptado de Swiegers et al., 2005. 13
Figura 6: Metabolismo del nitrógeno (Bell & Henschke, 2005). 15
Figura 7: Impacto de exceso de nitrógeno inorgánico en el inicio de la fermentación. Adaptado de (Lallemand, 2010) 17
Figura 8: Diagrama esquemático del impacto que tienen los nutrientes sobre el vino. Adaptado de (Bell & Henschke, 2005) 18
Figura 9: Secuencia del aroma del vino. Adaptado de (Maarse & Groenen, 1975). 22
Figura 10: Síntesis de compuestos de sabor-activo a partir del metabolismo de azúcar, aminoácidos y sulfuro (Swiegers et al., 2005) 23
Figura 11: Estructura química de los principales ácidos orgánicos no volátiles. 24
Figura 12: Formación de ácido acético por Saccharomyces cerevisiae (Moreno-Arribas & Polo, 2009) 25
Figura 13: Estructura química ácido acético. 25
Figura 14: Producción de etanol, glicerol y reacciones asociadas (Bell & Henschke, 2005). 26
Figura 15: Estructura química de principales alcoholes. 27
Figura 16: Formación de alcoholes mediante biosíntesis de azúcar y catabolismo de aminoácidos (Moreno-Arribas & Polo, 2009). 28
Figura 17: Estructura química de alcoholes superiores mayoritarios en vinos. 30
Figura 18: Estructura química de ésteres. 30
Figura 19: Vía de síntesis y degradación para ésteres (Moreno-Arribas & Polo, 2009). 31
Figura 20: Calidad organoléptica del vino: Atributos sensoriales. 33
Figura 21: Esquema de metodología. 36
Figura 22: Equipo Autoclave 38
Figura 23: Equipo ultrasonido. 39
Figura 24: Equipo autotitulador. 39
Figura 25: Equipo pH-metro. 40
Figura 26: Equipo turbidímetro. 40

Figura 27: Equipo refractómetro. 41
Figura 28: Equipo cromatógrafo de gases. 41
Figura 29: Equipo FTIR. 42
Figura 30: Equipo Espectrofotómetro. 42
Figura 31: Esquema para la preparación del hidrolizado de proteínas de levadura. 45
Figura 32: Solución de levaduras autoclavada. 45
Figura 33: Procedimiento de sonicación. 46
Figura 34: Decantación de borra en el vino. 52
Figura 36: Capacitación para panelistas: Prueba de detección de un estímulo y discriminación entre niveles de intensidad. 54
Figura 37: Evaluación sensorial de vinos producidos con distintas fuentes de nitrógeno. 55
Figura 38: Variación de la turbidez para las fermentaciones con distintas fuentes de nitrógeno. 58
Figura 39: Variación de °Brix para fermentaciones con distintas fuentes de nitrógeno. 59
Figura 40: Consumo de nitrógeno para fermentaciones con fuente de nitrógeno DAP y Aminoácidos. 60
Figura 41: Concentraciones de ácido málico y láctico en el vino para cada tratamiento. 63
Figura 42: Concentración de alcoholes superiores producida en los vinos con distintas fuentes de nutrientes. 66
Figura 43: Concentración de lactato de etilo producida en vinos con distintas fuentes de nitrógeno. 70
Figura 44: Concentraciones producidas de acetoína en vinos con distintas fuentes de nitrógeno. 71
Figura 45: Calificaciones obtenidas para cada atributo en evaluación sensorial. 74
Figura 46: Curva de calibración de glucosa para método DNS. 91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características generales de la borra. Basado en (Bustamante et al., 2008).....11
Tabla 2: Relación de los aminoácidos con alcoholes superiores. Adaptado de (Bell & Henschke, 2005). 29
Tabla 3: Descriptores de aroma para cada compuesto. Adaptado de (Swiegers et al., 2005).....32
Tabla 6: Composición de levaduras.....43
Tabla 7: Diseño de experimentos. 44
Tabla 8: Condiciones de operación equipo ultrasonido. 46
Tabla 9: Parámetros de hidrólisis. 47
Tabla 10: Volumen añadido de fuente de nitrógeno para cada experimento. 51
Tabla 11: Valores de pH, grado alcohólico y azúcares reductores de cada vino.....61
Tabla 12: Resultados de acidez total en cada experimento [g ác. Tart/L].....62
Tabla 13: Acidez volátil en cada experimento.....64
Tabla 14: Concentraciones de compuestos volátiles para experimentos con distintas fuentes de nutrientes.....65
Tabla 15: Resultados de análisis estadístico de alcoholes superiores. 66
Tabla 16: Resultado de análisis estadístico de ésteres. 68
Tabla 17: Resultados de análisis estadístico de acetoína. 71
Tabla 18: Resultado de análisis estadístico alcoholes.....72
Tabla 19: Resultados de prueba de detección entre niveles de intensidad de un estímulo. 73
Tabla 20: Análisis estadístico de Friedman para atributos.....74
Tabla 21: Comparación de resultados analíticos con resultados de evaluación sensorial para la acidez. 75
Tabla 22: Variación de turbidez en fermentaciones con distintas fuentes de nutrientes. 92
Tabla 23: Variación de sólidos solubles [°Brix] en fermentaciones con distintas fuentes de nutrientes.....93
Tabla 24: Pendiente de velocidad de variación de sólidos solubles.....94
Tabla 25: Variación de nitrógeno en fermentaciones con DAP y aminoácidos como fuente de nutrientes.....94
Tabla 26: Variación de acidez total en fermentaciones con distintas fuentes de nutrientes 95
Tabla 27: Resultados Acidez Total, Ácido Málico-Láctico-Tartárico, Acidez Volátil. 96
Tabla 28: Resultados Azúcares Reductores.....96
Tabla 29: Resultados de mediciones de Compuestos Volátiles Mayoritarios. 97
Tabla 30: Análisis de significancia t de Student: Acidez Total 99
Tabla 31: Análisis de significancia t de Student: Ácido Málico 99

Tabla 32: Análisis de significancia t de Student: Ácido Láctico 100
Tabla 33: Análisis de significancia t de Student: Ácido Tartárico 100
Tabla 34: Análisis de significancia t de Student: Acidez Volátil 100
Tabla 35: Análisis de significancia t de Student: Grado Alcohólico. 101
Tabla 36: Análisis de significancia t de Student: pH 101
Tabla 37: Análisis de significancia t de Student: 1-Propanol 101
Tabla 38: Análisis de significancia t de Student: 2-Metil-1-Propanol 101
Tabla 39: Análisis de significancia t de Student: 2-Metil-1-Butanol 102
Tabla 40: Análisis de significancia t de Student: 3-Metil-1-Butanol 102
Tabla 41: Análisis de significancia t de Student: Lactato de etilo. 102
Tabla 42: Análisis de significancia t de Student: Succinato de etilo. 102
Tabla 43: Análisis de significancia t de Student: Acetaldehído. 103
Tabla 44: Análisis de significancia t de Student: Acetoína 103
Tabla 45: Resultados entrenamiento: Dulzor 104
Tabla 46: Resultados entrenamiento: Acidez 105
Tabla 47: Resultados entrenamiento: Astringencia 105
Tabla 48: Resultados Evaluación Muestras: Dulzor 106
Tabla 49: Comparación múltiple: Dulzor 106
Tabla 50: Resultados evaluación sensorial: Acidez 106
Tabla 51: Comparación múltiple: Acidez 107
Tabla 52: Resultados evaluación sensorial: Astringencia 107
Tabla 53: Comparación múltiple: Astringencia 107

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

La industria vitivinícola es uno de los sectores productivos más importantes en Chile. Las condiciones climáticas y geográficas favorables para el cultivo de la vid, han permitido que actualmente se encuentre consolidado como el cuarto de los países exportadores y productores de vino a nivel mundial. En los últimos años, el sector vinícola se ha caracterizado por instaurar políticas y desarrollar estudios que permitan reducir el impacto ambiental causado por los residuos generados, tanto en el proceso vitícola como en el de vinificación. Estos se han enfocado en la gestión integral de residuos, en la extracción de compuestos de alto valor añadido y en el desarrollo de diferentes métodos para la evaluación de la huella de carbono e hídrica. Dentro de ellas una de las más novedosas ha sido utilizar el orujo para producir polifenoles, ácido láctico, etanol y ácido tartárico. Mientras que la borra se ha utilizado para recuperar sales como el tartrato (Ventosa, et al., 2011; Trioli, et al., 2015) y se ha investigado su potencial en ser utilizado como suplemento nutricional, debido su alto contenido en hidratos de carbono y compuestos de nitrógeno (Pérez-Bibbins, et al., 2015).

El nitrógeno es uno de los nutrientes esenciales en el proceso de fermentación, tiene un rol fundamental para el desarrollo de las funciones biológicas de los microorganismos involucrados en el proceso fermentativo del vino al ser utilizado para la síntesis de proteínas, además tiene un impacto en la cinética, velocidad y duración de la fermentación (Bell & Henschke, 2005). La mayoría de los mostos de uva no contienen nitrógeno asimilable suficiente para el completo desarrollo de la fermentación alcohólica, por lo que es habitual añadir este nutriente al inicio y/o durante el transcurso de la fermentación.

En la industria el suplemento más utilizado es el DAP, el cual se caracteriza por ser fácilmente asimilado por la levadura y tiene un impacto directo en la cinética de fermentación. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que el uso de esta fuente de nitrógeno tiene influencia en la producción de compuestos sulfurados, dado que el rápido crecimiento de la población celular induce una carencia de nitrógeno por lo que la levadura debe consumir aminoácidos que contienen sulfuro (Bell & Henschke, 2005).

Recientemente se ha estudiado el efecto de utilizar fuentes de nitrógeno orgánica, particularmente, diferentes mezclas de aminoácidos (Barbosa, et al., 2009; Barbosa, Mendes-Faia, et al., 2012; Bell & Henschke, 2005; Eltran, et al., 2005; Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2008; Swiegers, et al., 2005). Los resultados han mostrado que su uso fomenta la producción de compuestos volátiles que aportan positivamente al vino y disminuye la producción de compuestos que aportan negativamente, sin embargo, en el mercado los aminoácidos resultan ser una fuente de nutrientes demasiado costosa. Por esta razón, una interesante alternativa es estudiar la factibilidad de generar una fuente de nutrientes a partir de la borra producida como residuo del proceso de vinificación, mediante el proceso de hidrólisis enzimática, el cual permite obtener un producto rico en péptidos de diferentes tamaños y aminoácidos, denominado hidrolizado enzimático de proteína de levadura (Rojas, 2016). Además, las condiciones de operación permiten que las propiedades nutricionales no se vean afectadas (Pasupuleti & Demain, 2014). No obstante, no se tiene conocimiento aún del efecto que tendría el utilizar este subproducto sobre el perfil molecular del vino. Es por esto que en el presente trabajo se busca evaluar el efecto que tiene el uso del hidrolizado enzimático de proteínas de levaduras sobre la producción de compuestos volátiles, como alcoholes superiores, ésteres, compuestos cetónicos, ácidos volátiles y no volátiles, al ser utilizado como fuente nitrógeno en la fermentación alcohólica.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del uso del hidrolizado enzimático de proteínas de levaduras, como fuente de nitrógeno en la fermentación, sobre el perfil molecular del vino.

1.2.2. Objetivos específicos

- Generar una fuente de nutrientes mediante hidrólisis enzimática de proteínas de levadura.
- Desarrollar y monitorear fermentaciones con distintas fuentes de nitrógeno, DAP, aminoácidos e hidrolizado de proteínas de levaduras.
- Analizar los perfiles moleculares generados en las fermentaciones realizadas con las distintas fuentes de nitrógeno.
- Analizar los resultados obtenidos de la evaluación sensorial de los vinos

CAPÍTULO 2:

ANTECEDENTES GENERALES

ANTECEDENTES GENERALES

2.1. El vino

2.1.1. Definición

De acuerdo a 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 del mosto de uva. Su contenido de alcohol no puede ser inferior a 8,5% vol. Sin embargo, dependiendo de las condiciones del clima, suelo o variedad, el grado alcohólico total podrá ser reducido a 7% vol. de acuerdo a la legislación particular de dicha región (OIV, 2016).

Por otra parte, según la Ley 18.455 Artículo N°16 Chile, el vino sólo podrá obtenerse de la fermentación alcohólica del mosto de uvas frescas o asoleadas de la especie *Vitis vinífera*. Además, el Artículo N°36 establece que el vino envasado, para que pueda ser destinado al consumo directo, deberá tener una graduación alcohólica mínima de 11,5 %vol. con un máximo de 1,5 gramos de acidez volátil por litro (Gobierno de Chile, 2009).

2.1.2. Industria del vino

La elaboración de vino en Chile comienza en el siglo XVI con la llegada de misioneros españoles, quienes trajeron la uva *Vitis vinífera*. Pocos años después, debido a las condiciones climáticas y geográficas favorables para el cultivo de la vid, enólogos de origen francés trajeron a Chile distintas cepas, iniciando así la industria del vino. Sin embargo, es desde la década de los 90 en que la producción de vinos aumenta, esto debido a la importación de nueva tecnología que permitió hacer el proceso de elaboración, transporte y comercialización más eficiente. Sumado a esto, la creación de nuevas viñas y la consolidación en el mercado mundial contribuyó al aumento sostenido de la producción de vino, como se muestra en la Figura 1.

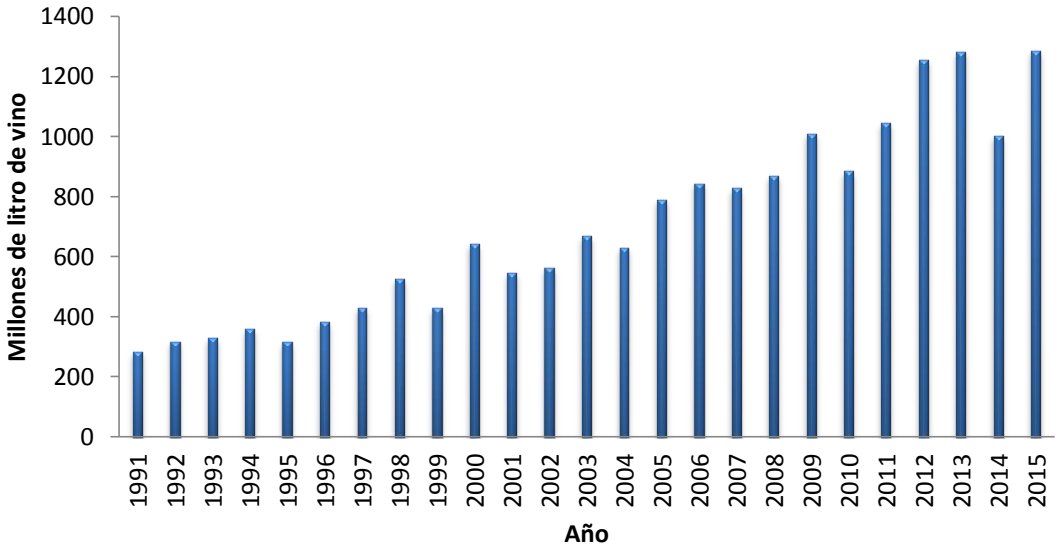

Figura 1: Producción de vino en Chile. Adaptado de (ODEPA, 2016).

Chile se encuentra dentro de los principales productores de vino en el mundo, posicionándose en el noveno lugar de acuerdo a cifras de la OIV, esta participación a nivel de producción está relacionada a que los vinos chilenos son principalmente comercializados en el mercado internacional. Exporta aproximadamente el 80% del total producido, logrando el año 2014 ocupar la cuarta posición entre los principales países exportadores, situación que no ha cambiado al año 2015 y que lo convierte en el principal exportador del "Nuevo Mundo" (Banfi, 2014). La Figura 2 muestra los principales países exportadores de vino.

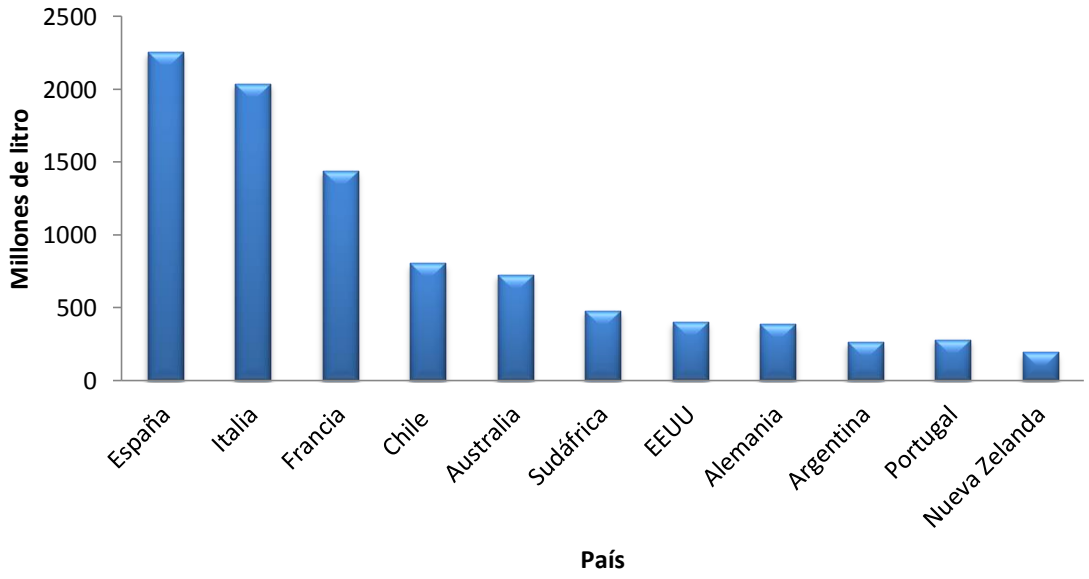

Figura 2: Principales países exportadores de vino. Adaptado de (Guitián, 2015).

2.1.3. Proceso de elaboración del vino

El proceso de elaboración del vino consta de varias etapas, desde que la uva es cosechada hasta que el vino es embotellado. A continuación se describen las etapas que se desarrollan habitualmente en la producción de vino tinto y posteriormente se muestra un esquema de este proceso (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Vendimia: Consiste en la cosecha de la uva cuando ésta alcanza la maduración, depende en gran medida de las condiciones climáticas y del tipo de uva. La cosecha se puede realizar en forma manual o mecánica, en ambos casos se debe tener especial cuidado en que la uva llegue entera, sana y fresca a la bodega, ya que el cuidado en esta etapa tiene gran influencia en la calidad del vino que se obtendrá, es por esto, que al realizar la recogida se separa la fruta dañada y se descarta, ingresando al proceso de vinificación las uvas que se encuentran en buen estado (Kim, 2014).

Despalillado y estrujado: El despalillado consiste en separar las uvas del material vegetal que la acompaña (raspón y hojas), posterior a esto, los granos de uva se estrujan y se extrae el mosto (Grainger & Tattersall, 2005). En este proceso se rompe el hollejo lo que permite que el jugo de la uva se libere con mayor facilidad.

Fermentación alcohólica: En esta etapa las levaduras transforman el azúcar del mosto en etanol, dióxido de carbono y otros compuestos en menor cantidad como ésteres, alcoholes superiores, ácidos, glicerol, entre otras sustancias que aportan sabor, color, olor y textura al vino (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Para que la fermentación se desarrolle óptimamente es necesario que el ambiente proporcione los nutrientes necesarios junto con un entorno físico y químico que permita el crecimiento y desarrollo de la levadura y así evitar fermentaciones lentas o estancadas (Lallemand, 2014). Durante el proceso de fermentación, a medida que se produce dióxido de carbono el líquido tiende a estar en el fondo mientras que el orujo forma una capa en la superficie, es por esto que se realiza el procedimiento de remontaje, en el cual se remueve el orujo de la superficie y el mosto del fondo, permitiendo la aireación.

Descube y prensado: esta etapa ocurre al terminar la fermentación alcohólica, consiste en separar el orujo del líquido, éste último se traslada a un depósito limpio mientras que el orujo es prensado, el líquido obtenido del prensado se traslada al depósito con el resto del vino.

Fermentación maloláctica: Esta fermentación es comúnmente llamada fermentación lenta, es una etapa opcional del proceso de vinificación la que depende del estilo varietal y vinícola que se quiere obtener (Jacobson, 2006). Consiste en la conversión de ácido L-málico a ácido L-láctico mediante una reacción enzimática realizada por las bacterias ácido láctico, la más conocida es la *Oenococcus oeni*. Habitualmente, en bodegas se añaden estas bacterias para asegurar esta fermentación (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Trasiego: Posterior a la fermentación maloláctica, se produce una decantación espontánea formando en el fondo del recipiente una borra. El trasiego consiste en trasladar el vino que se encuentra sobre la borra a un recipiente limpio, con la precaución de no arrastrar los sedimentos (Grainger & Tattersall, 2005).

Crianza: Es el proceso de envejecimiento y maduración del vino, se puede realizar en tanques de acero inoxidable o en barricas de roble. En éste último ocurre una transferencia de sustancias aromáticas y gustativas de la madera hacia el vino, aportando una pequeña cantidad de oxígeno lo que permite que se estabilice su color (Kim, 2014).

Embotellado: Es la etapa final del proceso de elaboración, consiste en almacenar el vino en botellas, en ellas el vino se redondea y alcanza su momento óptimo de consumo (Kim, 2014).

Cada una de estas etapas contribuye al desarrollo de las características organolépticas del vino, ya que son muchos los factores involucrados en cada una de ellas, desde el metabolismo de la uva el cual depende de la variedad, el clima, suelo y técnicas de gestión del viñedo, como también las reacciones que ocurren durante el despalillado y maceración, la actividad metabólica de los microorganismos responsables de las fermentaciones y las reacciones enzimáticas que se producen durante el envejecimiento, esto se profundizará más adelante.

Dentro del sector agrícola, la industria vitivinícola es uno de los sectores que ha mostrado estar más interesado en el tema de la sostenibilidad en los últimos años, instaurando políticas y desarrollando estudios que permitan reducir el impacto ambiental causados por los desechos producidos tanto en el proceso vitícola como en el de vinificación, enfocado en la gestión integral de residuos generando productos de alto

valor añadido (Ventosa, et al., 2011; Trioli, et al., 2015). A esto se suma el interés creciente de los consumidores en adquirir productos que garanticen tener un rol social y ambiental.

Los principales residuos generados en el proceso de vinificación corresponden a raspón (escobajo), orujo y borra. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra esquemáticamente la etapa en que se produce cada uno de ellos. De acuerdo a Oliveira & Duarte (2016), por cada tonelada de uva que entra al proceso de elaboración del vino se generan aproximadamente 0,13 toneladas de orujo, 0,06 toneladas de borra y 0,03 toneladas de raspón.

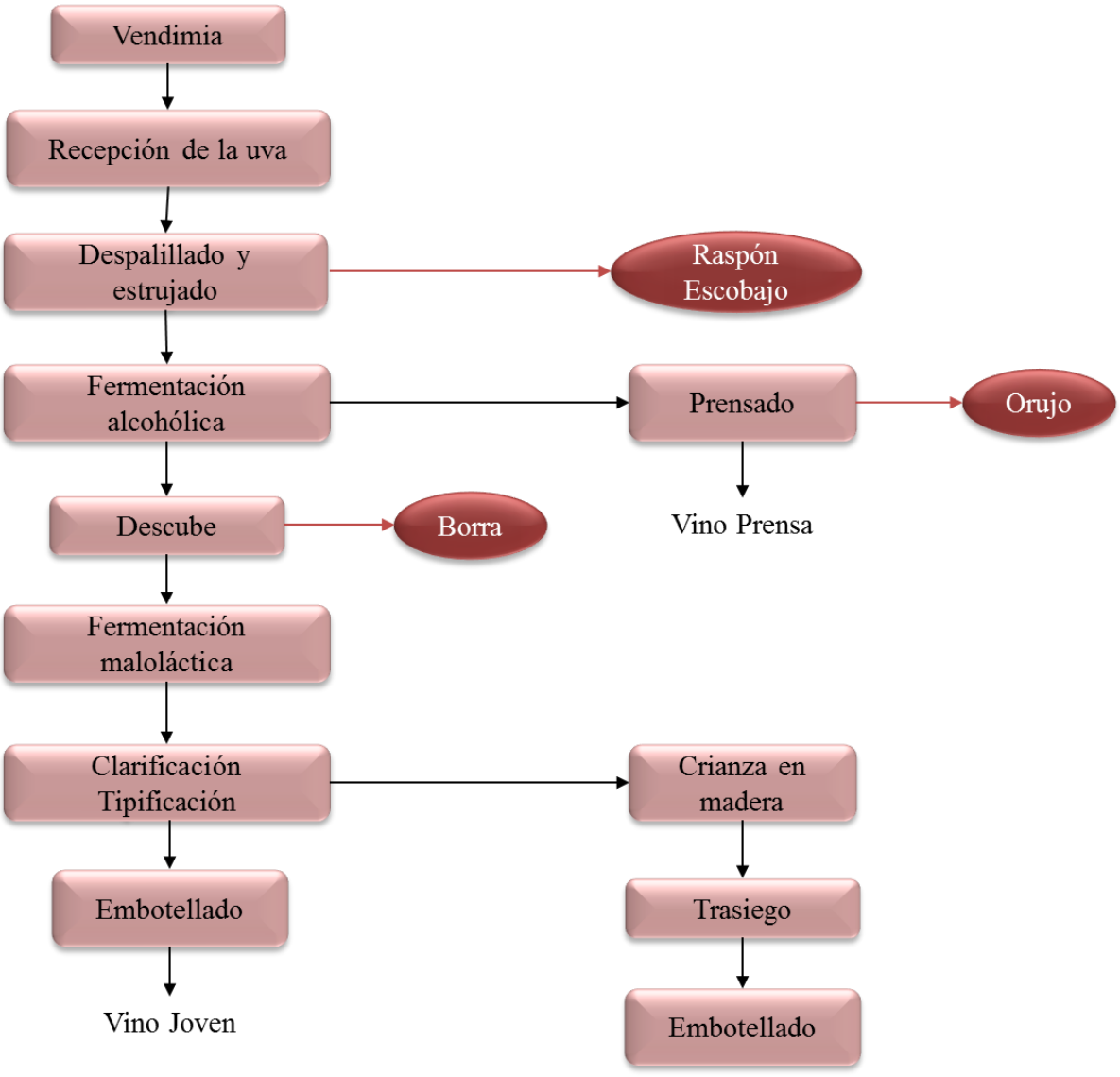

Figura 3: Esquema general proceso de elaboración del vino. Adaptado de Grainger & Tattersall, (2005).

El orujo es el residuo obtenido de la etapa de prensado en la que se separa la fracción líquida (vino) de la fracción sólida (orujo), está compuesto por las pieles, las semillas y pulpa de la uva (Oliveira & Duarte, 2016). Mientras que la borra se define como el producto semilíquido que se obtiene de la fermentación del mosto de uva y de la elaboración del vino, está compuesta por sales de calcio y potasio, sustancias orgánicas, restos de tejido vegetal, levaduras y materia colorante. Debe tener una graduación alcohólica máxima de 5° y concentración de tartratos y extracto seco máximo de 20 g/l y 300 g/l, respectivamente (Gobierno de Chile, 2009).

Hoy en día existen varias técnicas para el aprovechamiento de estos residuos, muchos de ellos están enfocados en darles un valor agregado. El orujo se ha usado para producir polifenoles, ácido láctico, etanol y ácido tartárico, taninos y aceites, debido a que posee alto contenido en estos compuestos (Oliveira & Duarte, 2016).

La borra ha mostrado tener numerosas aplicaciones debido a su composición y características generales (Tabla 1). Puede ser utilizada para recuperar etanol mediante destilación y compuestos polifenólicos para recuperar sales como el tartrato que se encuentra en gran abundancia en las uvas y tiene aplicaciones en la industria de alimentos, en la elaboración de dulces, galletas y bebidas refrescantes.

Tabla 1: Características generales de la borra. Basado en (Bustamante et al., 2008)

Características generales		
pH	3,6 - 7,2	-
Masa orgánica total	598 - 936	[g/kg] (base seca)
Nitrógeno total	44,3 - 16,8	[g/kg] (base seca)
Potasio	17,6 - 158,1	[g/kg] (base seca)
Calcio	9,2 - 15,5	[g/kg] (base seca)

Por otra parte, la borra tiene potencial en ser utilizado como suplemento nutricional, esto debido al alto contenido en hidratos de carbono y compuestos de nitrógeno que posee, los que provienen principalmente de los componentes de la levadura. Se ha estudiado su aplicación en el suelo como fertilizante, sin embargo, los resultados mostraron que los compuestos fenólicos presentes en las borras pueden tener un impacto ambiental negativo en él (Pérez-Bibbins, et al., 2015). En base a estos antecedentes ha resultado interesante investigar otras alternativas para la revalorización

de este residuo y aprovechar el contenido de nutrientes que posee, uno de ellos es la factibilidad de utilizar la borra como fuente de nutrientes en la fermentación alcohólica del vino (Rojas, 2016), esto se profundizará en el punto 2.3.

2.2. Fuente de nutrientes en la fermentación alcohólica

2.2.1. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es la principal etapa en el proceso de elaboración del vino, consiste en la transformación de los principales azúcares de la uva, glucosa y fructosa, en etanol y dióxido de carbono. Este proceso se lleva a cabo por levaduras del género *Saccharomyces*, generalmente *S. cerevisiae* y *S. bayanus* (Boulton, et al., 1998), la primera principalmente por la gran resistencia que tiene a altas concentraciones de etanol.

Las levaduras son microorganismos anaeróbicos facultativos, capaces de metabolizar el azúcar aeróbicamente (respiración) o anaeróbicamente (fermentación). La principal ruta que utilizan para catabolizar el azúcar es la glucólisis, de aquí se obtiene el piruvato el cual se descarboxila a etanal (acetaldehído) mediante la acción de enzimas y posteriormente se reduce a etanol (Boulton et al., 1998), en la Figura 4 se muestra el mecanismo de fermentación y respiración.

Durante el desarrollo de la fermentación, se debe mantener una población suficiente de levaduras viables, de otra manera ésta se puede estancar o ralentizar. Para esto es necesario que en el medio exista un equilibrio nutricional que permita que la levadura se multiplique y una temperatura y pH adecuados en el proceso (Lallemand, 2014).

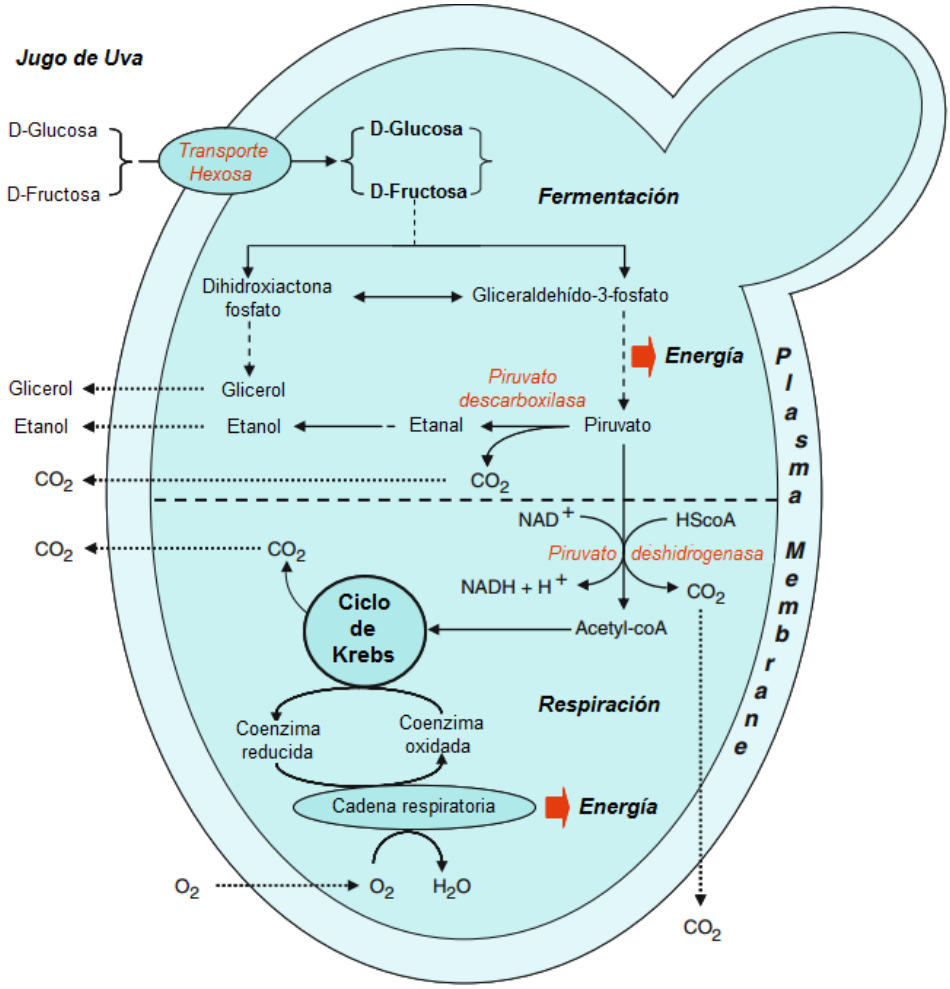

Figura 4: Mecanismo de fermentación y respiración (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Sin embargo, además de etanol y dióxido de carbono, las levaduras producen muchos otros compuestos durante la fermentación, a partir de los componentes que tiene el mosto de uva y que en esta etapa son modificados, generando metabolitos que otorgan propiedades organolépticas al vino (Figura 5).

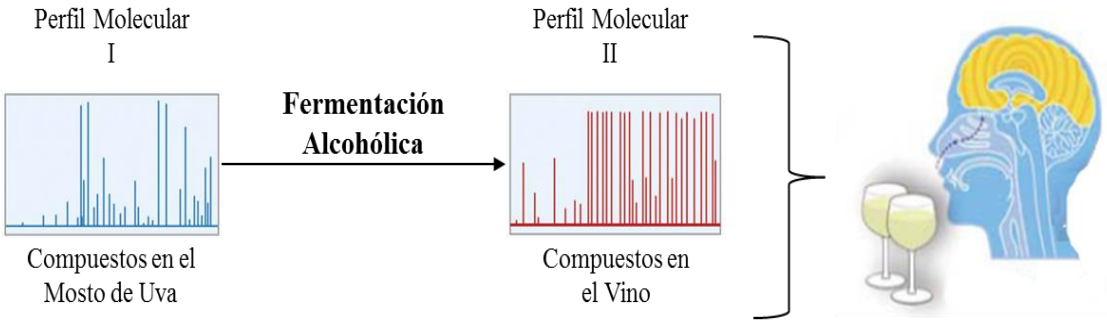

Figura 5: Representación de la influencia que tiene la fermentación alcohólica sobre la generación de compuestos que aportan sabores y aromas al vino. Adaptado de Swiegers et al., 2005.

2.2.2. Importancia de la fuente de nutrientes

Para que la fermentación se desarrolle completamente se debe contar con una población suficiente de levaduras, el crecimiento de estás depende de la disponibilidad de una fuente adecuada de nutrientes, especialmente de nitrógeno (Magasanik & Kaiser, 2002). El nitrógeno es un macronutriente que está presente en el mosto de uva y juega un papel en muchas de las funciones y procesos biológicos de los microorganismos fermentativos, ya que es utilizado para la síntesis de proteínas y además tiene un impacto directo en la cinética, velocidad y duración de la fermentación (Bell & Henschke, 2005). Un déficit de nitrógeno puede causar que la fermentación sea demasiado lenta al final del proceso, ya que las levaduras reducen drásticamente el consumo de azúcar, pudiendo causar que la fermentación se detenga antes de que todos los azúcares hayan sido fermentados (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

El contenido de nitrógeno en el mosto de uva es variable y se encuentra en distintas formas: proteínas, péptidos, iones de amonio y aminoácidos, sin embargo, las levaduras no son capaces de asimilar las proteínas y péptidos de alto peso molecular, ya que carecen de actividad proteolítica extracelular (Bell & Henschke, 2005). La fracción de nitrógeno utilizable se denomina Yeast Assimilable Nitrogen (YAN), incluye a iones de amonio y aminoácidos libres con excepción de la prolina y la hidroxiprolina. Mientras que la fracción no asimilable es denominada como Yeast Non Assimilable Nitrogen (YNAN) e incluye a los péptidos de elevado peso molecular y proteínas. El primer paso en la asimilación del nitrógeno es el transporte dentro de la célula, en la Figura 6 se muestra el metabolismo del nitrógeno de la levadura, el ión amonio es transportado dentro de la célula por difusión facilitada, una vez dentro es incorporado a la reserva de aminoácidos a través de la acción de enzimas, mientras que los aminoácidos son transportados dentro de la célula por diferentes transportadores, hasta la fecha se han identificado 15 sistemas de transporte en *Saccharomyces cerevsiae* (Bell & Henschke, 2005; Moreno-Arribas & Polo, 2009).

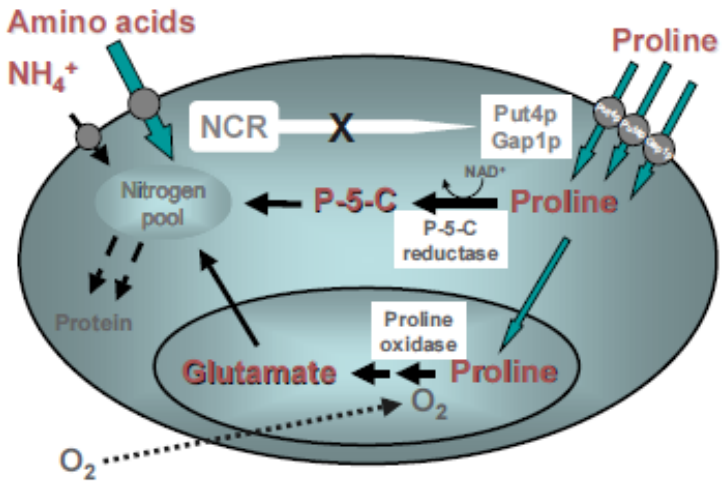

Figura 6: Metabolismo del nitrógeno (Bell & Henschke, 2005).

Las levaduras responden metabólicamente a las diferencias en la disponibilidad de nitrógeno, se asimilan primero las fuentes que son fácilmente asimilables por la levadura porque su metabolismo produce fácilmente amoniaco, glutamato o glutamina, componentes que son claves en el metabolismo del nitrógeno en la levadura ya que suministran el 85% y 15% de la necesidad de nitrógeno de la célula, respectivamente. Esto se explica mediante el mecanismo de Represión Catabólica de Nitrógeno (NCR) de la célula, el cual consiste en la selección de las fuentes fácilmente asimilables por la levadura a través de la expresión de sistemas de transporte adecuados y la degradación de permeasas no apropiadas. Los cambios en los patrones de absorción de nitrógeno influyen en la producción de compuestos de aroma (Eltran et al., 2005), especialmente, en la de alcoholes superiores, ésteres, carbonilos y ácidos.

Habitualmente la fuente de carbono presente en el mosto de uva, principalmente glucosa y fructosa, son muy superiores a la necesidad nutricional de la levadura, por lo que es usual añadir una fuente externa de nutrientes asimilable, al inicio y/o durante la fermentación alcohólica (Barbosa et al., 2012) para evitar un déficit de nitrógeno en el medio, el cual puede ralentizar la síntesis de proteínas y el transporte de azúcar.

Desde hace varias décadas es común suplementar los mostos deficientes de nitrógeno con nitrógeno inorgánico, el más utilizado es el DAP, el cual se compone principalmente por iones de amonio y tiene influencia directa sobre la bioamasa. Se ha estudiado ampliamente la cantidad de nitrógeno y en qué etapa de la fermentación es el momento óptimo de realizar la adición, de acuerdo al estudio realizado por Blateyron & Sablayrolles (2001), el DAP añadido en cualquier etapa durante la fase de crecimiento

de la levadura aumenta el tamaño de la población de levaduras, pero tiene poco efecto si se añade en etapas posteriores. Respecto de la concentración óptima a añadir, se considera que las levaduras necesitan mínimo 140 mg/l de nitrógeno asimilable para completar la fermentación (Torrea, 2003).

Muchos estudios se han enfocado en la importancia e influencia del nitrógeno sobre los productos de la fermentación alcohólica, al utilizar fuentes de nitrógeno inorgánica (DAP) y fuentes de nitrógeno orgánico (aminoácidos libres). Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta (2008) estudiaron el efecto de la adición de diferentes cantidades de aminoácidos y de amonio a un mosto Mozuelo deficiente de nitrógeno, los resultados mostraron una correlación positiva entre la adición de aminoácidos y la formación de tirosol y 2-feniletanol, al igual que la formación de ésteres totales, en este mismo estudio no se encontró ningún efecto para la síntesis individual de los ácidos, concluyendo con esto que los aminoácidos favorecen la formación de compuestos volátiles en el vino. Hernández-Orte, et al., (2005) estudiaron el efecto sobre la absorción de aminoácidos y la generación de aroma durante la fermentación alcohólica al añadir una mezcla de aminoácidos compuesta de fenilalanina, ácido aspártico, treonina y alanina en distintas concentraciones, a un mosto de uva de variedad Merlot, obtuvieron como resultado que la cinética de fermentación fue diferente de acuerdo a la cantidad de aminoácidos añadidos, las fermentación en que se agregó una mayor cantidad tuvieron una mayor velocidad y mayor rendimiento de la fermentación. Además, se obtuvo que los vinos producidos con más aminoácidos fueron mejor evaluados por el panel de catadores porque las notas azufradas disminuyeron significativamente, mientras que las notas florales aumentaron.

En un estudio reciente se muestra que al utilizar una mezcla de aminoácidos hubo un mayor aumento en la producción de algunos ésteres y alcoholes superiores que son responsables de los atributos florales y afrutados en el vino, respecto al uso de DAP (Barbosa et al., 2012). Otro estudio, en el que se compara el perfil sensorial al utilizar DAP, complejos ricos en aminoácidos libres y una mezcla de ellos como nutrientes, muestran que los complejos ricos en aminoácidos libres reducen la producción excesiva de compuestos no deseados como acetato de etilo y hexanol mientras que resalta la expresión compuestos aromáticos positivos como el feniletanol, fenilacetato, terpenos y ésteres (Lallemand, 2010). La Figura 7 muestra el impacto de un exceso SO_2 de

nitrógeno inorgánico en el inicio de la fermentación y la influencia sobre la formación de compuestos sulfurados.

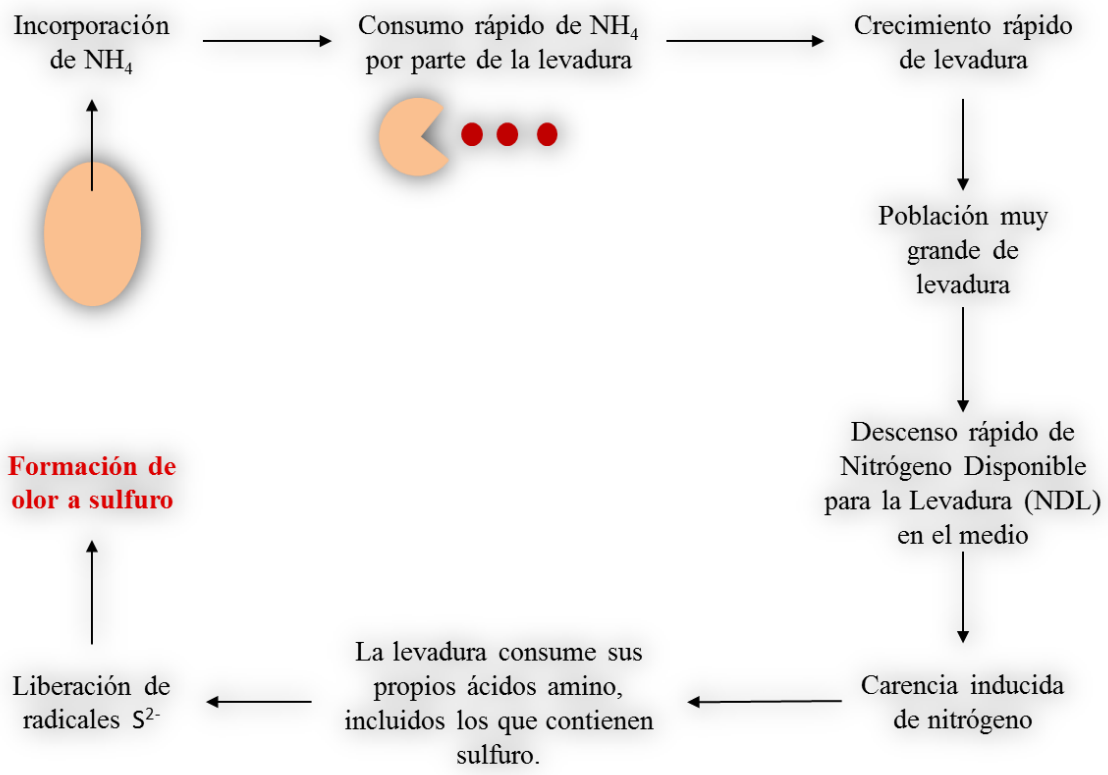

Figura 7: Impacto de exceso de nitrógeno inorgánico en el inicio de la fermentación. Adaptado de (Lallemand, 2010)

Recientemente se estudió la factibilidad de utilizar una fuente de nitrógeno orgánica rica en péptidos de cadena corta y aminoácidos, preparada a partir de proteínas de levadura mediante hidrólisis enzimática (hidrolizado enzimático de proteínas de levaduras). Los resultados mostraron que sí es posible utilizar el hidrolizado enzimático de proteínas de levadura en la fermentación del vino (Rojas, 2016), sin embargo, no se han desarrollado estudios que evalúen el efecto que tiene esta fuente de nitrógeno sobre la formación de los compuestos volátiles.

De acuerdo a los antecedentes mencionados queda en evidencia que la fuente de nitrógeno tiene influencia en la calidad del producto final. En la Figura 8, se muestra un diagrama esquemático del impacto que tiene el nitrógeno sobre la composición del vino obtenido, es decir, en la producción de compuestos que otorgan aromas florales, frutales y cítricos como los ésteres, compuestos que contribuyen a la acidez como los ácidos carboxílicos y ácidos grasos no volátiles, otros que otorgan dulzor y viscosidad como algunos alcoholes, entre otros compuestos que en su conjunto le aportan complejidad.

En el punto 2.4 se describirán estas familias de compuestos y la influencia que tiene la fuente de nitrógeno utilizada sobre la producción de ellos.

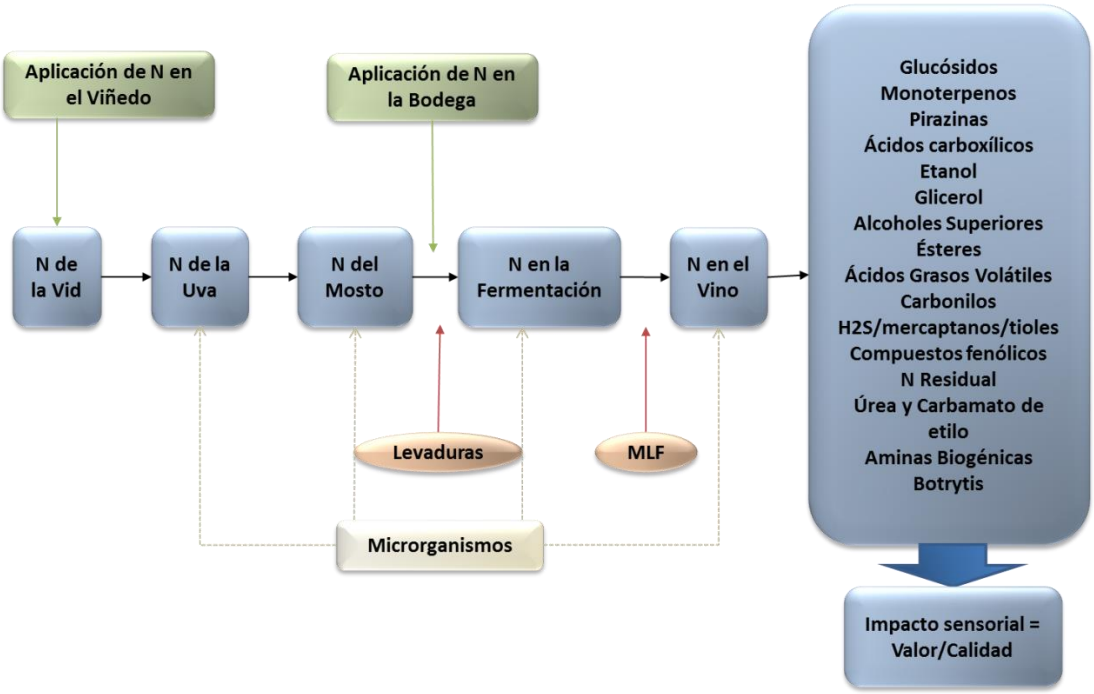

Figura 8: Diagrama esquemático del impacto que tienen los nutrientes sobre el vino. Adaptado de (Bell & Henschke, 2005)

2.3. Potencial fuente de nutrientes a partir de la borra

La borra se compone de nitrógeno, potasio, calcio y alto contenido en materia orgánica, principalmente debido al alto contenido en levadura vínica. Como se mencionó anteriormente, en el proceso de elaboración del vino la borra representa un desecho, sin embargo, dada su composición existen alternativas para su valorización, una de ellas es ser utilizada como fuente de nutrientes en la fermentación vínica.

La borra no puede ser aplicada directamente en la fermentación, primero se debe someter a un proceso que permita liberar el contenido de las células, siendo necesario para esto la disrupción de la membrana celular, además de esto, es necesario lograr que estos nutrientes sean asimilables por la célula de levadura, para esto se deben reducir los componentes liberados a monómeros por acción de enzimas (Pérez-Bibbins et al., 2015).

2.3.1. Preparación de la fuente de nutrientes a partir de borra

Ruptura de la membrana celular

Se han desarrollado diversos métodos y técnicas de ruptura celular con el fin de aprovechar las funciones y propiedades que poseen los componentes intracelulares de células microbianas y que se conserve la integridad de sus componentes. La levadura utilizada comúnmente en la fermentación alcohólica de vinos corresponde a *Saccharomyces cerevisiae*, los componentes intracelulares de este tipo de levadura son proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos (Liu, et al., 2016).

Los métodos para la ruptura de la membrana celular de la levadura se pueden dividir en mecánicos y no mecánicos. Los primeros se caracterizan por no poseer especificidad y ser sencillos en operación y por lo mismo escalable a la industria, entre ellos está el molino de bolas, homogeneizador de alta presión y ultrasonido. Mientras que los métodos no mecánicos son más difíciles de escalar a la industria debido a que los costos pueden aumentar considerablemente, sin embargo, a diferencia de los métodos mecánicos poseen especificidad sobretodo el método enzimático (Maarse & Groenen, 1975).

El método más utilizado en la industria es el ultrasonido, está basado en la fuerza de alto cizallamiento creado por ultrasonido de alta frecuencia, el que causa el colapso de burbujas de cavitación que generan ondas de choque, esto conduce a la ruptura de la pared celular (Liu et al., 2016).

Hidrólisis de proteínas

La hidrólisis es una reacción que implica la ruptura de una molécula usando agua, particularmente, la hidrólisis de proteína se refiere a la ruptura de los enlaces peptídicos que unen a los aminoácidos que conforman la proteína. De acuerdo a McCarthy, et al., (2013) la hidrólisis de proteína implica la ruptura de enlaces peptídico para obtener péptidos de diferentes tamaños y aminoácidos. Existen dos tipos de hidrólisis: química y enzimática.

La hidrólisis química es la que se realiza en presencia de un ácido o una base en alta concentración, el proceso requiere temperatura y pH extremos, esto reduce su calidad

nutricional y además es difícil de controlar. En la hidrólisis ácida generalmente se utiliza el ácido clorhídrico y además altas cantidades de sal. Además, en el proceso de hidrólisis algunos aminoácidos como el triptófano, metionina, cistina y cisteína son destruidos, mientras que otros como glutamina y aspargina se convierten en ácido glutámico y ácido aspártico, respectivamente. Por otra parte, en la hidrólisis básica la base comúnmente utilizada es hidróxido de sodio, al igual que en la hidrólisis ácida algunos aminoácidos son destruidos, la serina y la treonina principalmente (Pasupuleti & Demain, 2014).

La hidrólisis enzimática es el método de fabricación predominante de los hidrolizados de proteínas para aplicaciones en biotecnología, la principal ventaja que presenta es que permite controlar con precisión el grado de hidrólisis debido a que las condiciones de hidrólisis son suaves, se evitan las temperaturas y pH extremos requeridos en la hidrólisis química y no destruye los aminoácidos, esto permite que las propiedades nutricionales no se vean afectadas. Las enzimas utilizadas provienen en su mayoría de fuente animal, vegetal y microbiana, las que se utilizan comúnmente corresponden a pancreatina, tripsina y pepsina de fuente animal, popaína y bromelina de fuente vegetal y proteasas bacterianas y fúngicas. Esta elección depende de las necesidades del usuario final (Pasupuleti & Demain, 2014).

Por otra parte, el hidrolizado de proteínas es el producto obtenido después de la hidrólisis de proteínas, son conocidos como peptonas y péptidos y se definen como "mezclas de polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos producidos a partir de fuentes de proteínas utilizando hidrólisis parcial". En las últimas décadas ha crecido el interés de la preparación de hidrolizados proteicos, se ha demostrado que los péptidos de cadena corta de hidrolizados de proteínas tienen mayor valor nutritivo y puede ser utilizados de una manera más eficiente que una mezcla de aminoácidos (McCarthy et al., 2013).

Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (h) se define como la relación de los enlaces peptídicos en relación a los enlaces peptídicos totales (h_{tot}). Está determinado por las condiciones utilizadas, éstas son, concentración de sustrato, relación enzima/sustrato, tiempo de incubación, pH, temperatura y naturaleza de la enzima (Nielsen, Petersen, & Dambmann, 2001).

$$h\% = \frac{\mathrm{h}}{\mathrm{h}_{tot}} \times 100\%$$

El grado de hidrólisis determina el uso que tendrá, entre el 1% y el 10% se utiliza para la mejora de propiedades funcionales y como saborizantes, mientras que hidrolizados con grado mayor a 10% se utilizan en alimentación especializada.

Existen distintos métodos para medir el grado de hidrólisis, siendo éstos, determinación de los grupos α-amino libres, determinación de nitrógeno soluble, valoración del protón liberado tras la ruptura de un enlace peptídico a determinados valores de pH. La cantidad de grupos α-amino liberados se puede medir utilizando reactivos que reaccionen con grupos amino de tal manera que pueda ser detectado espectrofotométricamente, algunos de estos son nihidrina, ortoftaldialdehído (OPA) y ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), sin embargo, presentan la desventaja de ser reactivos inestables con riesgos de explosión, alto valor de blancos, interferencia de azúcares reductores y amonio. Por otra parte, la determinación del nitrógeno soluble se puede realizar mediante el método Kjedhal, reacción de Biuret o determinación espectrofotométrica en la región UV de péptidos ya sea con grupos aromáticos o con el método pH-stat (Nielsen et al., 2001).

El método de pH-stat consiste en la cuantificación de los protones liberados en la reacción de hidrólisis, este método requiere que el pH se mantenga constante en el sistema, de esta manera, se añade un volumen de una base fuerte cada vez que se rompe un enlace peptídico ya que cuando se produce la ruptura el pH disminuye.

2.4. El aroma y sabor del vino

El aroma y sabor del vino se produce por la combinación de varios compuestos diferentes que en su conjunto juegan un papel definitivo en su calidad y carácter final. Muchos de los componentes de la uva se mantienen intactos durante el proceso de fermentación, otros se metabolizan y forman metabolitos de sabor-activo y otros experimentan reacciones de biotransformación (intra o extracelular) los cuales modifican la contribución al sabor (Anjos, 2008). Estos compuestos se caracterizan por ser volátiles, es decir, de bajo punto de ebullición, hasta la fecha hay más de 680 compuestos volátiles identificados. Pueden ser detectados por el olfato humano. (Swiegers et al., 2005).

De acuerdo a la etapa en la que se forman se pueden distinguir entre aromas varietales, aromas pre-fermentativos (secundarios), aromas fermentativos (bouquet de fermentación) y aromas post fermentativos (bouquet de maduración o envejecimiento) (Rapp & Versini, 1995). En la Figura 9 se muestra un esquema de los aromas producidos en el proceso de vinificación.

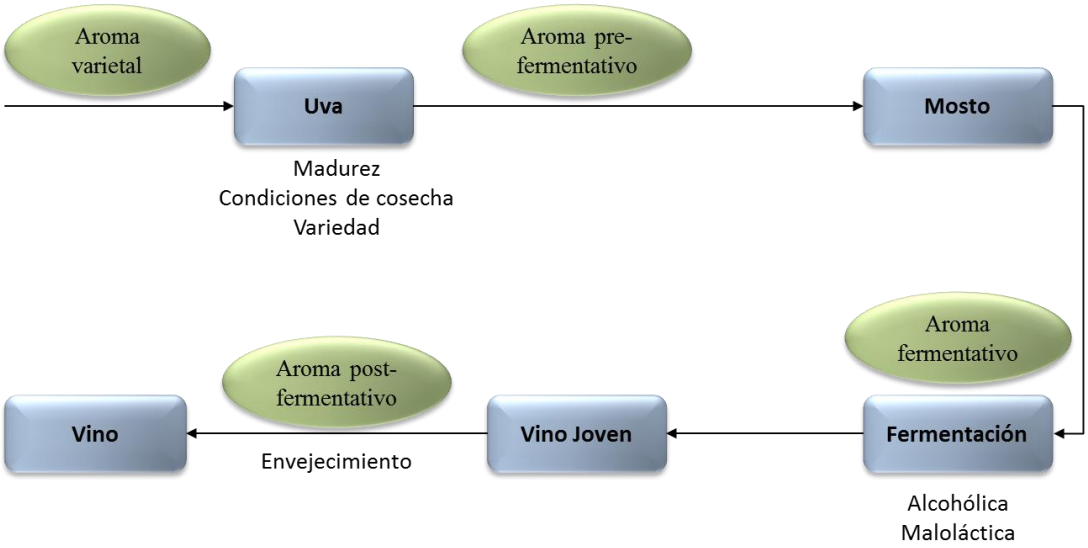

Figura 9: Secuencia del aroma del vino. Adaptado de (Maarse & Groenen, 1975).

El aroma varietal está constituido por compuestos que provienen de la uva y del racimo, estos compuestos constituyen el carácter varietal del vino. Varios estudios han mostrado que los terpenoides son esenciales para la expresión sensorial de este tipo de aroma (Rapp & Versini, 1995). El aroma pre-fermentativo también proviene de la uva, sin embargo, se forma durante la etapa de trituración y maceración ya que en éstas se libera azúcar y otros nutrientes que la levadura necesita para su crecimiento, además también libera compuestos volátiles y no volátiles (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Por otra parte, el aroma fermentativo constituye la fracción principal de los compuestos asociados al sabor y aroma del vino, se producen en la etapa de fermentación alcohólica y también, pero en menor cantidad, durante la fermentación maloláctica ya que en esta etapa disminuye la acidez mejorando así el perfil del sabor. El grupo de compuestos que forma el bouquet de fermentación comprende principalmente ácidos orgánicos y compuestos volátiles como alcoholes superiores, compuestos de azufre orgánico y ésteres los cuales se derivan del metabolismo del azúcar y de los aminoácidos (Swiegers et al., 2005; Bell & Henschke, 2005; Anjos, 2008; Moreno-Arribas & Polo, 2009). Finalmente, el aroma post-fermentativo se compone de los compuestos volátiles

derivados y transformados en el proceso de maduración o envejecimiento, a través de reacciones enzimáticas, químicas y físicas (Rapp & Versini, 1995).

La Figura 10 muestra la síntesis de compuestos que contribuyen al aroma, sabor y sensación en la boca del vino, a partir del metabolismo del azúcar, aminoácidos y sulfuro.

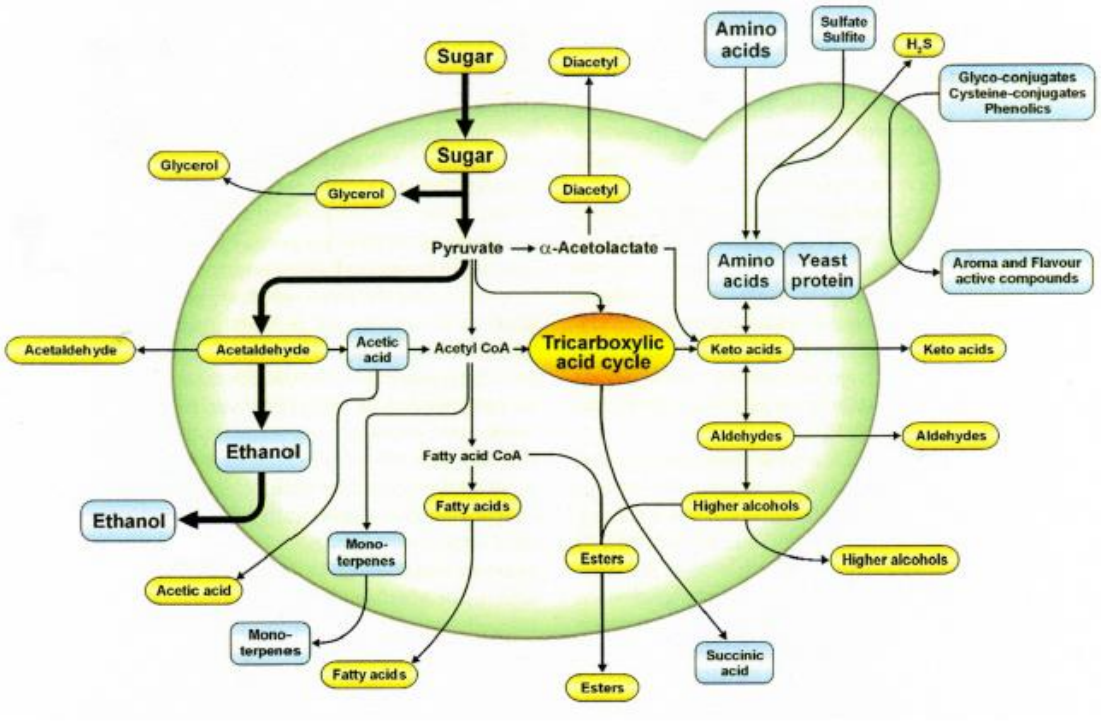

Figura 10: Síntesis de compuestos de sabor-activo a partir del metabolismo de azúcar, aminoácidos y sulfuro (Swiegers et al., 2005)

2.4.1. Ácidos

La acidez en el vino se divide habitualmente en dos categorías: acidez volátil y fija (no volátil), mientras que la acidez total es la combinación de ambas. Habitualmente la acidez total se expresa en términos de ácido tartárico (Swiegers et al., 2005; Jackson, 2008).

- **Ácidos no volátiles**

Tienen un impacto tanto en la calidad sensorial como en la estabilidad microbiana, esto último debido a que regulan el pH del vino y evitan que proliferen microorganismos descomponedores, el pH en vinos tintos es adecuado cuando se encuentra entre 3,3 y 3,6 mientras que en vinos blancos es entre 3,1 y 3,4 (Jackson, 2008).

Los ácidos orgánicos no volátiles que predominan en el vino son el ácido tartárico y el ácido málico, ellos representan cerca del 90% de la acidez fija o no volátil. De acuerdo a Jackson, (2008), el ácido tartárico, ácido málico junto con el ácido cítrico son responsables del balance y sensación en la boca del vino. Es importante que la acidez percibida se mantenga en un balance, ya que excesiva acidez aumenta la percepción de ésta y una baja acidez disminuye la armonía del sabor. Durante la fermentación alcohólica se mantienen relativamente estables, sin embargo, el ácido málico y cítrico son metabolizados por las bacterias ácido lácticas durante la fermentación maloláctica (Bell & Henschke, 2005; Swiegers et al., 2005; Jackson, 2008; Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Además de ácido tartárico, málico y cítrico, la uva contiene pequeñas cantidades de ácido succínico, cetoácidos, pirúvico y α-cetoglutárico, son éstos los que se modifican durante la fermentación alcohólica el ácido succínico es el principal ácido producido durante esta etapa, se caracteriza por tener sabor amargo y ligeramente salado. Estudios realizados en medios sintéticos sugieren que ciertos aminoácidos estimulan su producción, sin embargo, no se han realizado investigaciones en mostos de uva real (Bell & Henschke, 2005). Por otra parte, los cetoácidos se producen por el metabolismo del azúcar y también a partir de los aminoácidos alanina y glutamato a través de la vía de Ehrlich (Swiegers et al., 2005).

Los principales ácidos producidos durante la fermentación maloláctica son el ácido láctico y ácido cítrico, el primero se caracteriza por tener sabor agradable y por sus propiedades conservantes, al finalizar la fermentación maloláctica puede estar presente hasta los 6 g/l. En la Figura 10 se muestra la estructura química de los principales ácidos no volátiles.

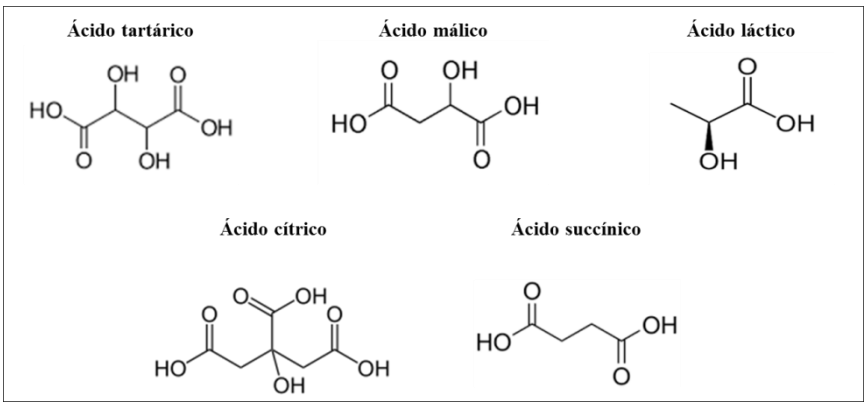

Figura 11: Estructura química de los principales ácidos orgánicos no volátiles.

- **Ácidos volátiles**

La acidez volátil constituye cerca del 10 a 15% de la acidez total en el vino, del cual aproximadamente el 90% corresponde a ácido acético y el resto lo componen otros ácidos como el ácido propiónico y hexanoico, los cuales se producen a partir del metabolismo de ácidos grasos por levaduras y bacterias (Swiegers et al., 2005; Jackson, 2008). El contenido de ácidos volátiles en el vino, se encuentra en el rango de 0,2 g/l a 2,0 g/l y el umbral de sabor entre 0,4 g/l y 1,1 g/l (Bell & Henschke, 2005).

El ácido acético es el ácido volátil principal en el vino, es un subproducto del metabolismo de la levadura y de bacterias, aporta al vino aroma y sabor deseable siempre que se encuentre entre 0,7 g/l y 1,1 g/l, si sobrepasa esta concentración aporta sabores amargos y se asocia su sobreproducción a la contaminación por bacterias. Por otra parte, su principal aporte está en ser el precursor de la formación de ésteres de acetato los cuales otorgan al vino caracteres afrutados bajo los 150 mg/l (Jackson, 2008). En la Figura 11 se muestra la formación de ácido acético por Saccharomyces cerevisiae, a partir de la oxidación de acetaldehído por co-reducción de $NAD(p)^+$. En la Figura 12 se muestra la estructura de ácido acético.

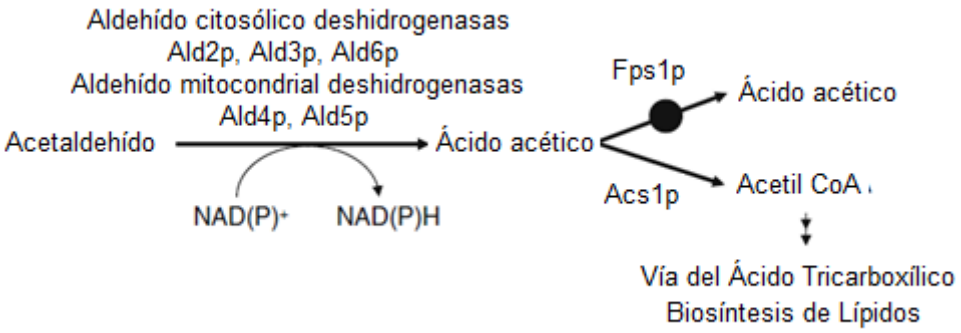

Figura 12: Formación de ácido acético por Saccharomyces cerevisiae (Moreno-Arribas & Polo, 2009)

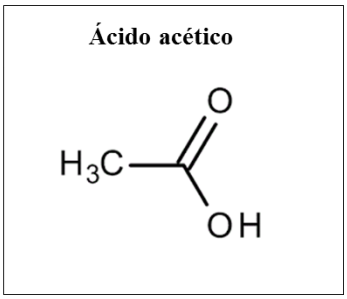

Figura 13: Estructura química ácido acético.

2.4.2. Alcoholes

Etanol

El etanol se produce durante la fermentación alcohólica, su contenido en el vino puede variar desde 8 vol% a 16 vol%, sin embargo, en Chile la ley exige una graduación alcohólica mínima de 11,5 vol% (Gobierno de Chile, 2009). La concentración de etanol en el vino tiene impacto sobre la percepción sensorial de los compuestos que otorgan sabor y aroma, sobre todo influye en el picor, cuerpo, viscosidad, dulzor y acidez que se percibe (Bell & Henschke, 2005; Moreno-Arribas & Polo, 2009).

El nitrógeno y su procedencia tienen influencia en la regulación de azúcar y en el metabolismo de la levadura y altera la formación de glicerol y ácidos orgánicos (Figura 14). La producción de etanol es redox neutral, sin embardo, el metabolismo que se asocia con la producción de biomasa genera NADH neto, el cual se oxida por la producción de glicerol.

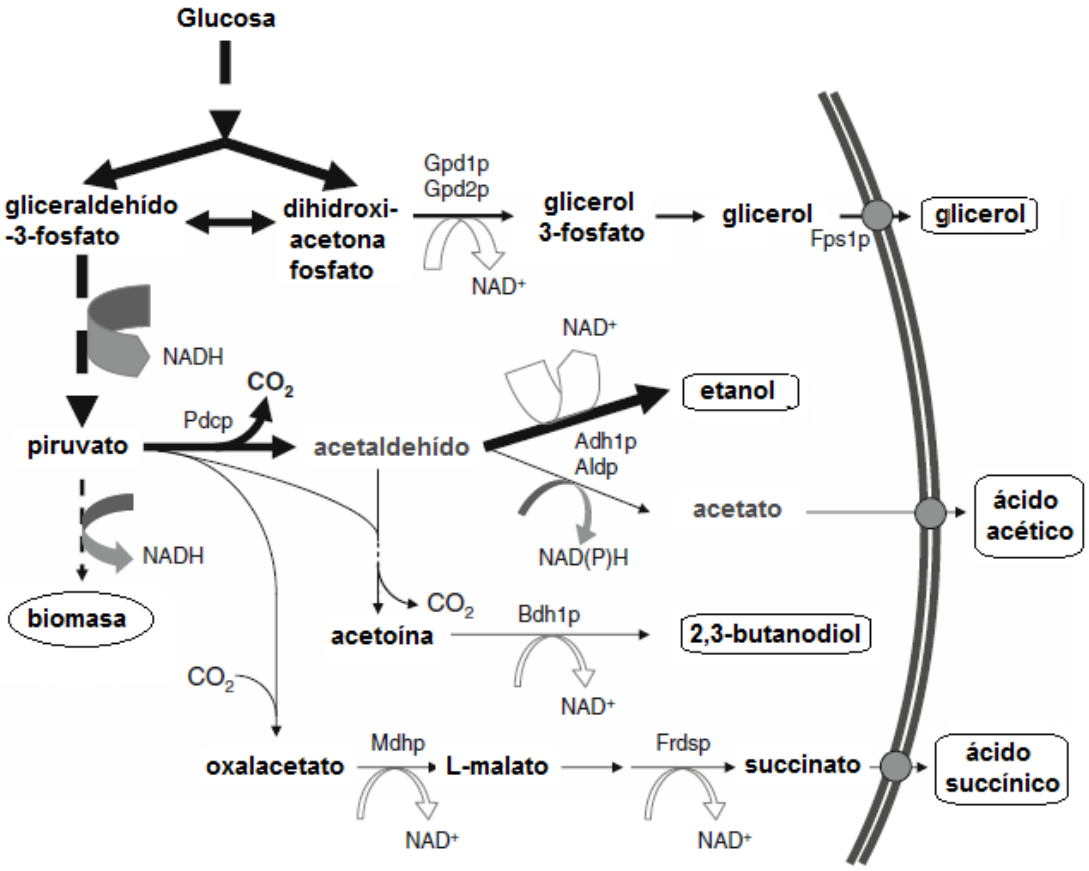

Figura 14: Producción de etanol, glicerol y reacciones asociadas (Bell & Henschke, 2005).

En cuanto a los nutrientes, la elección de nitrógeno puede influir significativamente el rendimiento de etanol alterando la formación de metabolitos especialmente del glicerol y ácidos orgánicos. Cuando la principal fuente de nitrógeno de la levadura son aminoácidos se genera poco NADH asociado ya que limita la necesidad de síntesis de aminoácidos, limitando la reoxidación de NADH el cual es acoplado a la producción de glicerol. Por otra parte, cuando las sales de amonio representan la principal fuente de nitrógeno se requiere la síntesis de nuevos aminoácidos, los cuales resultan en producción significante de glicerol a fin de que se mantenga el balance redox. Se han reportado estudios con resultados contrarios (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Polioles

El principal poliol producido durante la fermentación es el glicerol seguido por 2,3-butanodiol. El glicerol se caracteriza por ser incoloro, inodoro y muy viscoso, su sabor es dulce y genera una sensación en la boca grasosa, sin embargo, de acuerdo a (Swiegers et al., 2005) el glicerol en el vino parece ser de poca importancia sensorial. En los vinos secos se encuentra en concentraciones entre 5 a 14 g/l (Moldes, Vázquez, Domínguez, Díaz-Fierros, & Barral, 2008). Su producción está influenciada por la disponibilidad y procedencia de nutrientes ya que estos afectan el mantenimiento del mecanismo redox, la producción de glicerol proporciona la ruta principal para la reoxidación de NADH bajo condiciones de fermentación anaeróbica. Estudios han mostrado que al utilizar nitrógeno inorgánico se genera NADH debido a que es necesario sintetizar aminoácidos y esto estimula la producción de glicerol (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Por otra parte, el 2,3-butanodiol se caracteriza por otorgar gusto amargo-dulce, posee un umbral de percepción relativamente alto, es por esto que su impacto en el sabor del vino se considera bajo (Jackson, 2008; Moreno-Arribas & Polo, 2009). En la Figura 15 se observa la estructura química de los principales alcoholes.

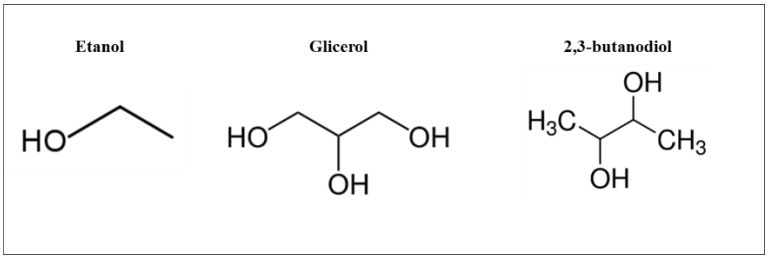

Figura 15: Estructura química de principales alcoholes.

2.4.3. Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores representan cuantitativamente la mayor fracción de los subproductos formados durante la fermentación. Son alcoholes que se caracterizan por tener más de dos átomos de carbono en su esqueleto (Jackson, 2008; Moreno-Arribas & Polo, 2009), se dividen en dos categorías, alifáticos y aromáticos. Dentro de los alifáticos se encuentran 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, hexanol, propanol, mientras que dentro de los alcoholes aromáticos se encuentra el tirosol y 2-feniletanol, siendo éste último el más importante (Swiegers et al., 2005; Jackson, 2008; Moreno-Arribas & Polo, 2009). Su efecto en el sabor del vino no está totalmente claro, de acuerdo a Rapp & Versini, (1995) en concentraciones debajo de los 300 mg/l imparten carácter positivo, mientras que sobre los 400 mg/l tienen un efecto perjudicial sobre la calidad del vino. Además, tiene una influencia indirecta en el desarrollo del bouquet de maduración del vino ya que en la etapa de crianza pueden reaccionar con ácidos orgánicos formando ésteres (Jackson, 2008).

Los alcoholes superiores se pueden formar mediante la biosíntesis a partir de azúcar y mediante el catabolismo de los aminoácidos a través de la ruta de Ehrlich (Rapp & Versini, 1995; Bell & Henschke, 2005; Jackson, 2008; Moreno-Arribas & Polo, 2009) y también a partir de aldehídos derivados de la uva Figura 16.

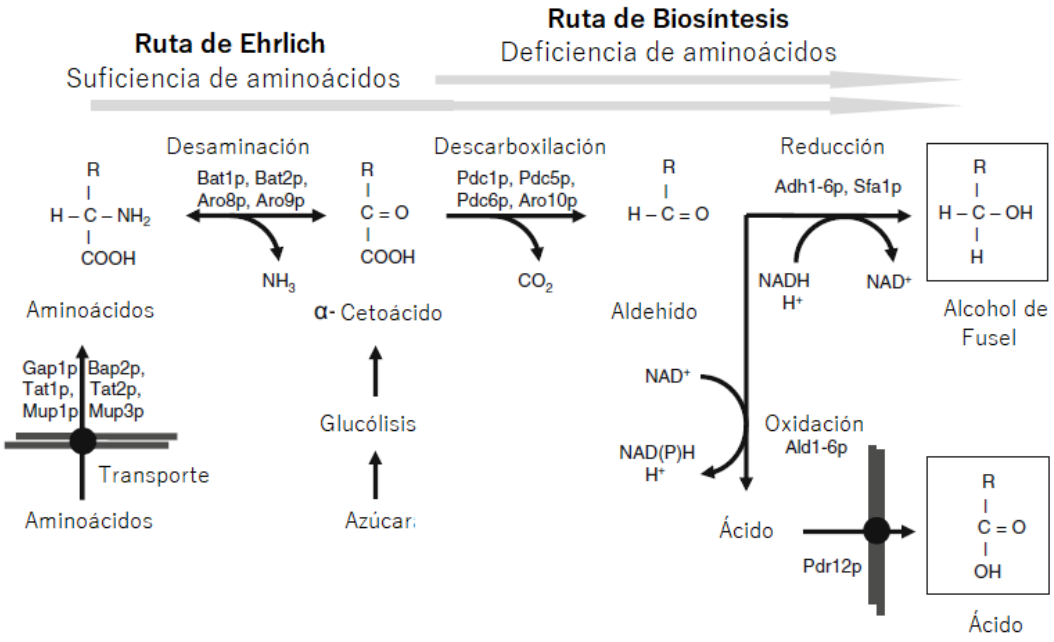

Figura 16: Formación de alcoholes mediante biosíntesis de azúcar y catabolismo de aminoácidos (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

La disponibilidad de nitrógeno en el mosto está estrechamente relacionada con la concentración de alcoholes superiores en el vino. Sobre todo tiene gran influencia la concentración de aminoácidos en el mosto inicial, la concentración total de alcoholes superiores aumenta a medida que aumentan los aminoácidos correspondientes (Bell & Henschke, 2005). En la Tabla 2 se muestran los aminoácidos y sus correspondientes alcoholes superiores.

Tabla 2: Relación de los aminoácidos con alcoholes superiores. Adaptado de (Bell & Henschke, 2005).

Aminoácido	**Cetoácido**	**Aldehído**	**Alcohol**
Alanina	Ácido 2-cetopropiónico	Acetaldehído	Etanol
Treonina	Ácido 2-cetobutírico	Propionaldehído	1-Propanol
Serina	Ácido 3-hidroxi-2-cetopropiónico	Glioxal	Glicol
-	-	Butiraldehído	1-Butanol
-	-	Hexanal	Hexanol
Isoleucina	Ácido 2-ceto-2-metilvalérico	2-Metilbutiraldehído	2-Metil-1-butanol
Leucina	Ácido 2-cetoisocaproico	isovaleraldehído	3-Metil-1-butanol
Fenilalanina	Ácido 3-fenil-2-cetopropiónico	-	2-Feniletanol
Triptofano	-	-	Triptofol
Tirsona	Ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-cetopropiónico	-	Tirosol
Valina	Ácido 2-cetoisovalérico	isobutiraldehído	2-Metil-1-propanol

No solo la disponibilidad tiene un rol importante en la formación de este tipo de compuesto, la procedencia o naturaleza del nitrógeno en el mosto inicial están directamente relacionado con la mayor o menor formación de los alcoholes superiores. En varios estudios se ha mostrado que cuando hay baja concentración de aminoácidos y la fuente de nitrógeno que predomina corresponde a sales de amonio se observa una baja en la producción de alcoholes superiores. Mientras que la presencia de suficientes aminoácidos en el medio conduce a una producción mayor de alcoholes a partir de aminoácido mediante la vía de Ehrlich en relación a los formados a partir de azúcares (ruta biosintética) (Bell & Henschke, 2005).

El n-propanol es una excepción a este tipo de comportamiento, en varios estudios se muestra que su producción no está relacionada con la concentración inicial de nitrógeno ni con el crecimiento de las levaduras (Bell & Henschke, 2005). En la Figura 17 se muestra la estructura de los alcoholes superiores comúnmente encontrados en vinos.

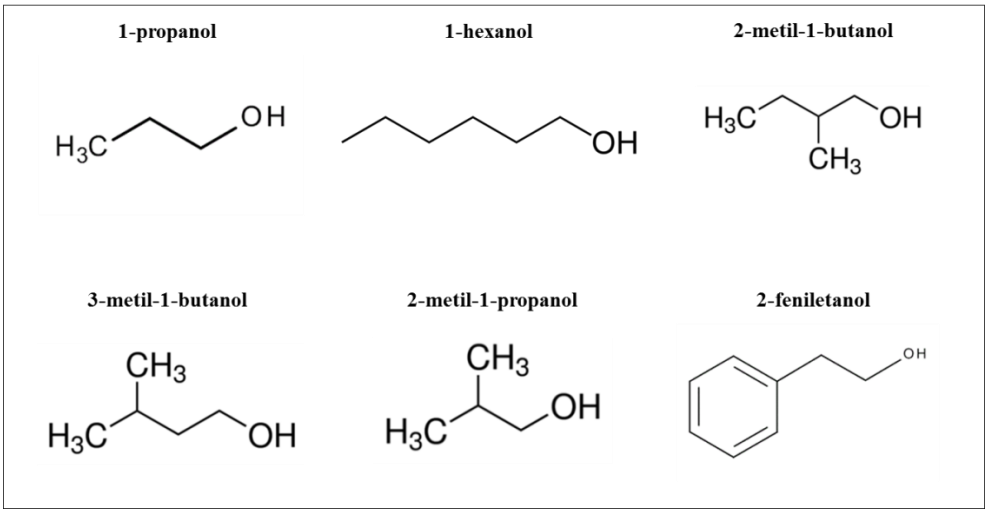

Figura 17: Estructura química de alcoholes superiores mayoritarios en vinos.

2.4.4. Ésteres

Los ésteres se caracterizan porque imparten aromas afrutados y florales al vino, algunos de ellos provienen de la uva por lo que le confieren el carácter varietal, mientras que otros se forman durante la fermentación, contribuyendo a la formación del bouquet. Estos últimos se derivan del metabolismo de los azúcares, aminoácidos y glucósidos de la uva (Bell & Henschke, 2005).

Los principales ésteres derivados de la fermentación son sintetizados enzimáticamente a partir de alcoholes y ácidos grasos y están asociados a la frutosidad. Se pueden dividir en tres categorías: los ésteres de acetato, ésteres de ácidos grasos y ésteres de cadena ramificada, de los cuales los dos primeros se han considerado los más importantes para el aroma percibido en el vino (Jackson, 2008).

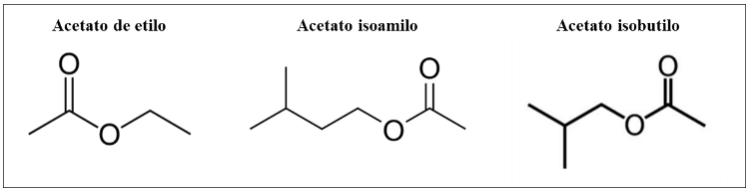

Figura 18: Estructura química de ésteres.

Los ésteres formados en la fermentación y los que provienen de la uva disminuyen en el periodo de envejecimiento y almacenamiento debido a la hidrólisis no enzimática (Rapp & Versini, 1995), es por esto que es más común encontrarlos en vinos jóvenes, y también la razón de que en los vinos blancos sean más percibidos respecto a los vinos tintos.

Los ésteres de acetato se forman mediante la condensación de alcoholes superiores con ácidos grasos activados por una coenzima (Figura 19), mientras que los ésteres de ácidos grasos se derivan en su mayoría del metabolismo de los aminoácidos (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

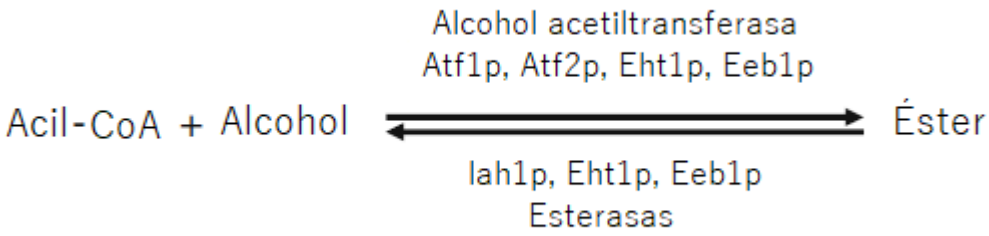

Figura 19: Vía de síntesis y degradación para ésteres (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

La mayoría de los ésteres se producen después de que la división celular. De todos ellos el acetato de etilo es el éster que ha sido más investigado, la principal razón es que es el que alcanza los mayores niveles de producción al terminar la fermentación en comparación con otros que se producen (Bell & Henschke, 2005). Niveles indeseables de acetato de etilo en el vino (sobre 150 mg/l) está asociado a bacterias de ácido acético presentes en la uva, mosto y/o contaminación del vino, éstas pueden producir directamente el acetato de etilo y además producir ácido acético el cual al reaccionar con el etanol forma acetato de etilo (Jackson, 2008).

A continuación, se muestra una tabla de los descriptores de aroma de los compuestos que se más se han estudiado, en ella se observa la concentración que se encuentran en el vino habitualmente, el umbral de aroma y el aporte individual que otorgan al producto (Tabla 3).

Tabla 3: Descriptores de aroma para cada compuesto. Adaptado de (Swiegers et al., 2005)**.**

Compuesto	Concentración en el vino [mg/l]	Umbral de aroma [mg/l]	Descriptor de aroma
Acetato de etilo	22,5 - 63,5	7,5 (10% etanol)	Esmalte de uñas, floral
Acetato isoamilo	0,1 - 3,4	0,03 (10% etanol)	Banana, pera
Acetato 2-feniletilo	0 - 18,5	0,25 (10% etanol)	Floral, rosa, frutal
Acetato isobutilo	0,01 - 1,6	1,6 (cerveza)	Banana, frutal
Acetato de hexilo	0 - 4,8	0,7 (vino)	Dulce, perfume
Butanoato de etilo	0,01 - 1,8	0,02 (10% etanol)	Floral, frutal
Hexanoato de etilo	0,03 - 3,4	0,05 (10% etanol)	Manzana verde
Octanoato de etilo	0,05 - 3,8	0,02 (10% etanol)	Jabón dulce
Decanoato de etilo	0 - 2,1	0,2 (vino sintético)	Flora, jabón
Propanol	9,0 - 68	500 (vino)	Acre, duro
Butanol	0,5 - 8,5	150 (10% etanol)	Fusel, espirituoso
Isobutanol	9,0 - 174	40 (10% etanol)	Fusel, espirituoso
Alcohol isoamilo	6,0 - 490	30 (10% etanol)	Duro, esmalte de uñas
Hexanol	0,3 - 12,0	4 (vino)	Césped verde
2-Feniletanol	4,0 - 197	10 (10% etanol)	Floral, rosa, frutal
Ácido acético	100 - 1150	280 (10% etanol)	Vinagre
Acetaldehído	10,0 - 75,0	100 (vino)	Sherry, nuez, manzana magullada
Diacetilo	<5	0,2 (vino) / 2,8 (vino tinto)	Mantecoso
Glicerol	5,0 - 14 [g/L]	5,2 g/l (vino)	Inodoro (sabor ligeramente dulce)
Linalool	0,0017 - 0,010	0,0015 (agua) / 0,025 (vino sintético)	Rosa
Geraniol	0,001 - 0,044	5, (agua) /30 (10% etanol)	Rosa
Citronellol	0,015 - 0,042	8 (agua) /100 (10% etanol)	Citronela
2-Acetil-1-pirrolina	Traza	0,0001 (agua)	Ratoncito
2-Acetil tetrahidropiridina	0,0048 - 0,1	0,0016 (agua)	Ratoncito
4-Etilfenol	0,012 - 6,5	0,14 (10% etanol) /0,6 (vino tinto)	Medicina, corral
4-Etil guaiacol	0,001 - 0,44	0,033 (agua) / 0,11 (vino tinto)	Fenólico, dulce
4-Vinil fenol	0,04 - 0,45	0,02 (agua)	Farmacéutico
4-Vinil guaiacol	0,0014 - 0,71	10 (agua)	Clavo de olor, fenólico

2.5. Evaluación sensorial

A diferencia de otras industrias alimenticias en donde existe poca variación de lote a lote, la industria del vino presenta muchas diferencias provenientes de distintas fuentes, como la cosecha, variedades de uva, regiones, entre otros. En este sentido, la evaluación sensorial proporciona herramientas para medir estas diferencias al analizar la manera en que son percibidos los productos por la vista, olfato, gusto, tacto e incluso audición.

En la Figura 20 se muestra un esquema con algunos de los atributos que pueden ser determinados en una evaluación sensorial de acuerdo al sentido involucrado ya sea la vista, aroma (olfato), paladar (gusto y tacto).

Así, las pruebas sensoriales permiten establecer el valor de un producto y su aceptabilidad. El principal uso de estas pruebas es para el control de calidad, la investigación de características en determinados vinos como también para determinar si existen defectos en ellos, proporcionando información que puede ser comparada con datos analíticos. Las pruebas sensoriales, se llevan a cabo por un panel de catadores. Estos pueden tener o no experiencia, dependiendo del objetivo planteado en un principio.

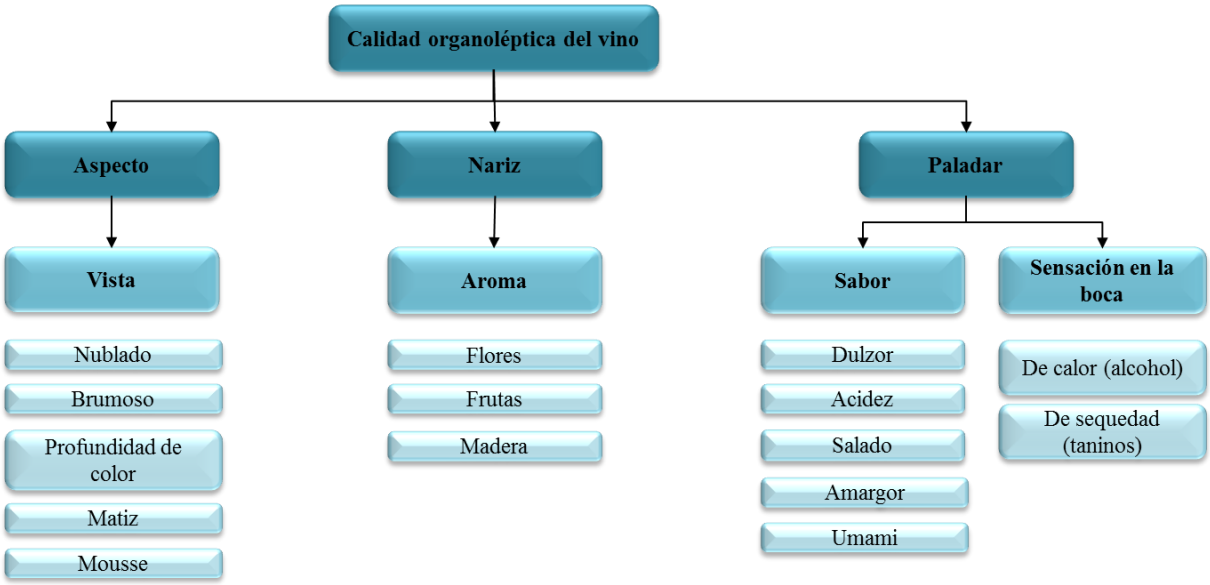

Figura 20: Calidad organoléptica del vino: Atributos sensoriales.

Existen diferentes pruebas para evaluar sensorialmente los vinos, dentro de las principales se encuentran la prueba hedónica, utilizada para probar el gusto del consumidor en un producto específico. Las pruebas de diferencias son utilizadas para identificar si dos vinos son significativamente diferentes y las pruebas de preferencia es empleada para saber si una porción significativa de consumidores prefiere un vino sobre otro, esta última se suele realizar posterior a la prueba de diferencia. Además, existe el análisis descriptivo, el que es utilizado para caracterizar sabores y aromas del vino, debido a su complejidad debe ser realizado por paneles entrenados (Meilgaard, et al., 2007). Como se explicó anteriormente, las pruebas pueden ser realizar por paneles entrenados o no entrenados. El primero es particularmente útil en las que los efectos del tratamiento pueden haber producido cambios en el producto y que no pueden caracterizarse simplemente por uno o dos atributos. Sin embargo, para que los resultados sean confiables se requiere un mínimo de 50 sujetos evaluadores. Por otra parte, una evaluación con panel no entrenado resulta muy útil en el desarrollo de productos nuevos, sin embargo, se requiere construir una metodología de capacitación inicial para asegurar que entreguen resultados confiables.

Es por esto, que para realizar una evaluación sensorial de manera óptima, primero se debe determinar el objetivo del proyecto y el objetivo de la prueba. Junto a esto, se debe tener información acerca de las propiedades sensoriales de las muestras a ser evaluadas, lo que permite elegir el método de prueba a realizar y así tener en cuenta cualquier sesgo sensorial introducido por las muestras. Posterior a esto, se diseña la prueba de acuerdo a los objetivos planteados, definiendo el ámbito de preparación, la manera en que se prepararán las muestras y se presentarán al panel, de qué manera se capacitarán y se seleccionarán los panelistas, junto con el detalle del procedimiento de la prueba y los requerimientos físicos necesarios.

CAPÍTULO 3:

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Metodología

La metodología consta de dos partes fundamentales, las cuales se aprecian en el siguiente esquema (Figura 21).

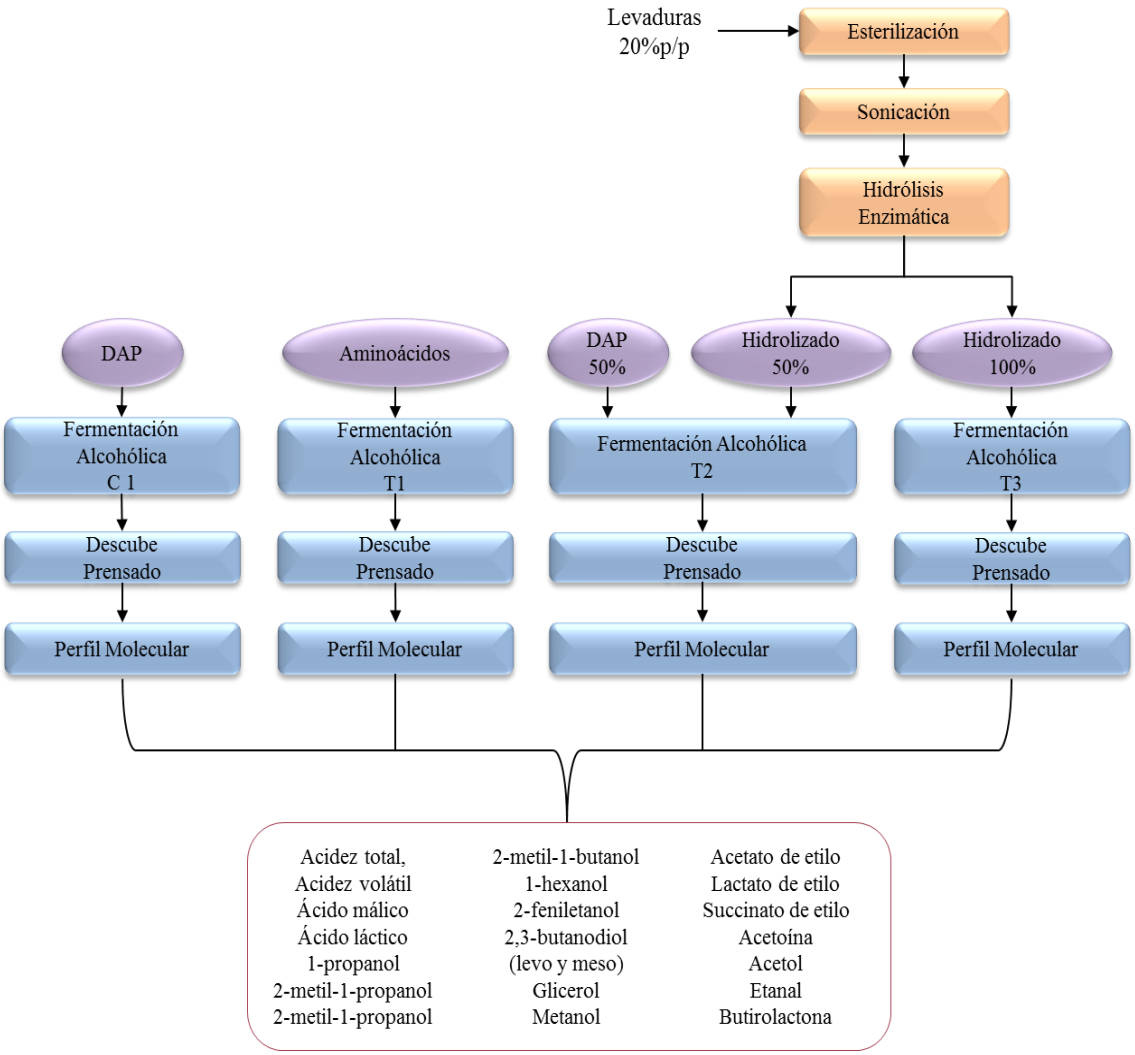

Figura 21: Esquema de metodología.

Primero fue necesario obtener la fuente de nitrógeno a partir de las levaduras mediante hidrólisis enzimática. Se determinó que es necesario asegurar la muerte celular para evitar que éstas afectaran el curso de la fermentación, para esto las levaduras se sometieron a un proceso de autoclave. Posterior a esto, se realizó un pretratamiento con el objetivo de romper la membrana y la pared celular que conforma las células y de esta manera permitir la liberación de las proteínas junto a sus otros organelos que la

constituyen. Finalmente se realizó la hidrólisis enzimática de las proteínas de levaduras (grado de hidrólisis de 15%) para obtener así una fuente de nutrientes que posteriormente se utilizará en la fermentación alcohólica.

La segunda etapa de esta investigación consistió en desarrollar fermentaciones con distintas fuentes de nitrógeno con el fin de comparar los vinos obtenidos en cada una de ellas. Se utilizaron cuatro fuentes de nitrógeno diferentes, se añadió DAP como fuente de nitrógeno inorgánica al experimento control (DAP), una mezcla de aminoácidos esenciales al segundo experimento (AA), al tercero se le añadió una mezcla de dos fuentes de nitrógeno, DAP con hidrolizado enzimático de proteínas, en la misma proporción cada una (H50%) y finalmente al último experimento se le añadió hidrolizado de proteínas de levadura (H100%). Todas las fermentaciones se realizaron en duplicado. Se realizó monitoreo de las fermentaciones para el correcto desarrollo de éstas. Al terminar las fermentaciones se realizó descube y prensado, fermentación maloláctica y posteriormente trasiego. Finalmente se obtienen perfiles moleculares para cada fermentación y se comparan los resultados obtenidos para cada tratamiento con el control.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Autoclave

Equipo Autoclave, marca AMILAB, capacidad 21 litros y presión máxima 20 psi, cuenta con temperatura y pulsador variables. Utilizado en la preparación de H100% y H50%, específicamente en la etapa de esterilización para asegurar la muerte celular. En la Figura 22 se puede observar el equipo utilizado.

Figura 22: Equipo Autoclave

3.2.2. Equipo de emisión de ondas de ultrasonido (Sonicador)

Equipo sonicador marca SONICS (Figura 23), es un procesador de ultrasonido que cuenta con una potencia fija de 130 W y una frecuencia fija de 20 kHz. Además, cuenta con temporizador y pulsador para procesar una variedad de materiales orgánicos e inorgánicos. El temporizador es variables desde 1 s a 10 h, mientras que el pulsador cuenta con ciclo de encendido y apagado que se puede controlar de forma independiente desde 1 s a 59 s. La capacidad de procesamiento va desde 50 ml hasta 150 ml. La sonda estándar (vástago) está hecho de una aleación de titanio Ti-6A1-4V, tiene un diámetro de 6 mm, un largo de 113 mm y una capacidad de procesamiento desde 10 ml a 50 ml. Utilizado en la preparación del hidrolizado de proteínas de levadura, específicamente en el pretratamiento.

Figura 23: Equipo ultrasonido.

3.2.3. Autotitulador

El titulador utilizado es el potenciómetro Compact Titrator, modelo G20, marca Mettler Toledo (Figura 24),éste cuenta con una interfaz de usuario One Click™ lo que otorga simplicidad y fiabilidad. Además, se caracteriza tener automatización sencilla, manipulación segura de productos químicos, seguridad con software para PC, equipado con sensor Plug & Play DGi115-SC, unidad de bureta integrada y agitador compacto. La bureta posee una capacidad de 20 ml en volumen con una resolución de 1 µl, un rango de medición de potenciómetro de ±2000 mV y un rango de medición de termocupla de -20 °C a 130 °C. Utilizado en la preparación del hidrolizado de proteínas de levadura, específicamente en la etapa de hidrólisis enzimática.

Figura 24: Equipo autotitulador.

3.2.4. pH-metro

El equipo es un medidor de pH marca Bante Instrument, modelo PHS-3BW (Figura 25) ,cuenta con una pantalla LCD con retroiluminación blanca, con calibración con pulsador de dos puntos con reconocimiento automático del buffer, con compensación automática de temperatura. El rango de pH va desde 0,00 a 14,00 ±0,01, el rango de temperatura va desde 0 [°C] a 100 [°C] ±1 [°C]. Utilizado en el monitoreo de la fermentación, para la medición y regulación de pH.

Figura 25: Equipo pH-metro.

3.2.5. Turbidímetro

Equipo HANNA Instrument, modelo HI 83749 (Figura 26), entrega valores en Nephelometric Turbidity Unit (NTU), el rango de medición va desde 0,00 a 9,99 NTU, de 100 a 1200 NTU y con una resolución de 2%. La fuente luminosa consiste en una lámpara de tungsteno, el sensor de fotocélula de silicio y la calibración es de 2,3 ó 4 puntos. Utilizado en el monitoreo de las fermentaciones, para la medición indirecta de biomasa.

Figura 26: Equipo turbidímetro.

3.2.6. Refractómetro

Instrumento óptico que mide el índice de refracción para obtener el contenido de azúcar, marca Hanna Instruments, modelo HI96811 (Figura 27), el rango de medición para el contenido de azúcar va desde 0 a 50% Brix con una resolución de ±0,1% Brix y una precisión de ±0,2% Brix. Utilizado en el monitoreo de la fermentación, para la medición de los grados brix, medida indirecta del contenido de azúcar en el sistema.

Figura 27: Equipo refractómetro.

3.2.7. Cromatógrafo de gases

Equipo para la separación y análisis de mezclas de sustancias volátiless, marca Agilent modelo 7890ª (Figura 28), este equipo soporta simultáneamente dos entradas, tres detectos y cuatro señales de detector. Utilizado para la medición de compuesos volátiles mayoritarios del vino.

Figura 28: Equipo cromatógrafo de gases.

3.2.8. Espectrofotómetro de infrarrojo

Equipo que permite identificar grupos funcionales de materiales orgánicos, pinturas y determinadas estructuras de muestras sólidas y líquidas por transmisión espectroscópica de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). Marca SHIMDZU, modelo FTIR 8400S (Figura 29). Utilizado para la medición de ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico y acidez volátil y total.

Figura 29: Equipo FTIR.

3.2.9. Espectrofotómetro

Espectrofotómetro UV/VIS, marca Mecasys, modelo Optizen Pop (Figura 30). Cuenta con rango de longitud de onda entre 190 a 1100 ±1 nm, fotometría de -3 a 3 AB ± 0,003 [ABS] y fuente de luz de tungsteno-halógeno y deuterio 220 V. Utilizado para la medición de azúcares reductores una vez terminada las fermentaciones.

Figura 30: Equipo Espectrofotómetro.

3.2.10. Reactivos

- Solución de NaOH de grado analítico (PA) distribuido por Winkler, se utiliza como titulante en el desarrollo de la hidrólisis y para determinar YAN y ácidez total.
- Enzima ALCALASE distribuida por Novoenzymes, actividad nominal 3000 mAU/l, utilizada para hidrólisis de proteínas de levadura.
- DAP de grado analítico (PA), preparado en solución de 300 mg/l, se utiliza como fuente de nitrógeno en experimento control.
- Ácido tartárico de grado analítico, utilizado para ajustar pH, preparado en solución de 200 g/l.
- Carbonato de potasio de grado analítico, utilizado para ajustar pH, preparado en solución de 100 g/l.
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico, utilizado para procedimiento de medición de azúcares reductores.

3.2.11. Levaduras

La levadura utilizada corresponde al tipo *Saccharomyces cerevisiae*, marca LALVIN EC118 de Lallemand Health Solutions, sus principales características son el bajo requerimiento de oxígeno especialmente a baja temperatura, bajo requerimiento en nitrógeno asimilable, baja producción de acidez volátil, ácido sulfhídrico y alta tolerancia al alcohol. La composición de este tipo de levadura se muestra en la Tabla 4 de acuerdo al análisis proximal realizado a muestras de levadura LALVIN EC1118.

Tabla 4: Composición de levaduras.

Componente	Levadura
Humedad (%p/p)	8,2
Proteína (%p/p)	32,53
Grasa total (%p/p)	0,64
Hidratos de carbono (ENN) (%p/p)	53,68
Fibra cruda (%p/p)	0,63
Ceniza (%p/p)	4,32
Total (%p/p)	100

3.3. Diseño de experimentos

El diseño de experimentos que se plantea consta de dos partes. La primera corresponde a la elaboración del hidrolizado de proteínas de levadura, con un grado de hidrólisis del 15% y la elaboración de la mezcla de aminoácidos, ambas fuentes de nitrógeno orgánico.

Para la segunda etapa, se realizó un diseño de experimento considerando tres fuentes de nitrógeno, siendo éstas AA, H100% y H50%, más el experimento de la fermentación control DAP. De esta manera se tienen en total cuatro experimentos, en duplicado cada uno de ellos. Esto se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Diseño de experimentos.

Número de fermentación	Fuente de nutrientes
C1	DAP (1)
C2	DAP (2)
F1	AA (1)
F2	AA (2)
F3	H50% (1)
F4	H50% (2)
F5	H100% (1)
F6	H100% (2)

3.4. Preparación fuentes de nitrógeno

3.4.1. Fuente orgánica: Hidrolizado enzimático de proteínas

De acuerdo a la metodología planteada, el primer paso consiste en elaborar la fuente de nitrógeno a través del proceso de hidrólisis enzimática, mostrado en el esquema de Figura 31.

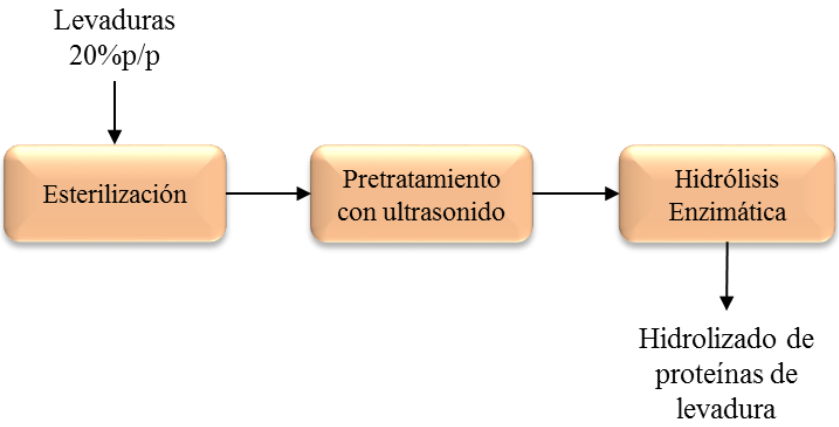

Figura 31: Esquema para la preparación del hidrolizado de proteínas de levadura.

Esterilización de levaduras

Se prepara una solución al 20% p/p de levadura con agua destilada, esta solución se llevó a autoclave durante un tiempo de 15 min a una temperatura de 121 °C, con el objetivo de asegurar la muerte de las levaduras y de que no interfieran posteriormente en el proceso de fermentación. En la Figura 32 se muestra la solución de levaduras autoclavada.

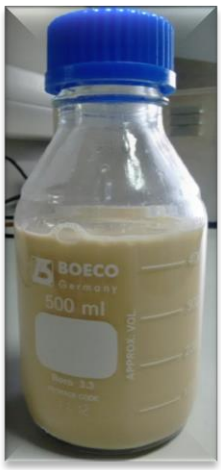

Figura 32: Solución de levaduras autoclavada.

Pretratamiento con ultrasonido

La solución autoclavada se somete al pretratamiento con ultrasonido con el objetivo de romper la estructura celular y permitir la liberación de las proteínas y el resto de organelos contenidos en la célula. Se utilizó el equipo de emisión de ondas Sonicador (Figura 33). Las condiciones de operación en que se desarrolló el pre tratamiento se muestran en la Tabla 6. Se obtuvo un volumen de 467,06 ml de solución.

Tabla 6: Condiciones de operación equipo ultrasonido.

Tiempo total	4 [min]
Pulso	45 [s] activo y 15 [s] detenido
Amplitud	60%
Potencia	130 [W]
Frecuencia	20 [kHz]
Profundidad vástago	1 [cm]

Figura 33: Procedimiento de sonicación.

Hidrólisis enzimática de proteínas

Se llevan la solución de levaduras pre tratadas a hidrólisis enzimática hasta alcanzar un grado de hidrólisis del 15%. El primer paso es preparar la solución enzimática que se añadirá a la solución de levaduras, la enzima utilizada es ALCALASE cuya concentración original es de 3 U/ml. Este preparado se diluye cinco veces quedando con una concentración de 0,6 U/ml. Para 487,06 gramos de solución de levaduras se necesitan agregar 5,83 ml de la solución diluida de enzima. Posteriormente se debe

determinar el volumen de titulante que se debe añadir para obtener un grado de hidrólisis del 15%, esto se calcula a partir de la ecuación de grado de hidrólisis, según:

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

Se reemplazan con los parámetros que se indican en la Tabla 7.

Tabla 7: Parámetros de hidrólisis.

Parámetro	Valor
DH	15%
α	0,888
h_t	346,9 [meq]
C NaOH	2

El parámetro h_t se determina de la siguiente manera:

Se calculan los gramos de nitrógeno que hay en 487, 06 g de levadura tratada, esto corresponde a 4,857 g de nitrógeno. Posteriormente se calculan los moles de nitrógeno que equivalen a 4,857 g de nitrógeno, aquí se obtienen 346,9 moles de nitrógeno. Este valor corresponde al parámetro h_t. Reemplazando, se obtiene que para alcanzar un grado de hidrólisis del 15% es necesario añadir un volumen de NaOH igual a 23,09 ml.

$$V_{NaOH} = \frac{15 \times 0{,}888 \times 346{,}9}{2 \times 100} = 23{,}09\ [mL]$$

Teniendo la solución enzimática y conociendo el volumen de NaOH necesario para alcanzar el DH% se inicia el equipo. Se espera a que la solución de levaduras tratadas alcance un pH = 8, una temperatura de 50 °C y agitación de 240 rpm, posteriormente se añade la preparación de enzima y se espera a que se añadan los 23,09 ml de NaOH. Una vez terminado esto se inactiva la enzima en un baño termorregulado con agua a una temperatura de 85 °C.

3.4.2. Fuente orgánica: Mezcla de aminoácidos

La fuente AA se preparó en base a las cantidades utilizadas en el estudio de (Barbosa et al., 2012), se mezclaron 0,4 g Alanina, 3,64 g Arginina,0,68 g Asparagina-H_2O, 1,40 g Ácido aspártico, 2,49 g Ácido glutámico-HCL, 0,80 g Isoleucina, 1,20 g Leucina, 1,248 g Lisina-HCL, 0,60 g Fenilalanina, 2,00 g Prolina, 1,60 g Serina, 1,40 g Treonina, 0,4 g Triptofano, 0,08 g Tirosina y 0,8 g Valina con agua destilada en un matraz aforado de 200 ml, éste se agitó hasta obtener una mezcla homogénea.

3.4.3. Fuente inorgánica: DAP

Se prepararon 500 ml de esta fuente inorgánica en una concentración de 300 mg/l, para esto se pesaron 0,15 g del reactivo sólido amonio fosfato dibásico (DAP) y se mezclaron con 500 ml de agua.

3.5. Fermentaciones

De acuerdo a la metodología establecida, el procedimiento parte con la recepción de la uva de cepa Cabernet Sauvignon, proveniente de la Región del Maule, la uva es despalillada y se pesan 2,5 kg de uva para cada fermentador. Posteriormente, la uva es estrujada y se deja macerar durante 12 horas antes de añadir el inóculo de levaduras e iniciar la fermentación. Se obtiene un volumen mosto de 1,375 litros. Luego de la maceración se realiza la caracterización del mosto de acuerdo al protocolo establecido en el laboratorio de biorreactores (Anexo 7.1) y se ajusta el pH a 3,45 y la concentración de SO_2 a 50 ppm. Posteriormente se ajusta el nitrógeno, esto consiste en medir en cada fermentador el contenido de nitrógeno asimilable por la levadura presente en el mosto y ajustar a 250 mg/l cada tratamiento con la correspondiente fuente de nutrientes, el procedimiento seguido para la adición de cada fuente de nitrógeno se detalla a continuación.

3.5.1. Volumen a añadir de fuente de nitrógeno

El nitrógeno asimilable se midió en el equipo TitroLine, mediante el Método Sorensen, la muestra de mosto se titula con una solución de NaOH hasta llegar a pH 8, posteriormente se adicionan 2 ml de formaldehído y se titula nuevamente hasta llegar a pH 8, se registra el volumen gastado y se calcula la concentración de nitrógeno asimilable mediante la siguiente expresión:

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

Posteriormente se determinó la concentración de nitrógeno asimilable que faltaría añadir para completar los 250 [mg/L], esto se determina mediante la siguiente expresión:

$$C_{N\ faltante}\left[\frac{mg}{L}\right] = 250\ \left[\frac{mg}{L}\right] - C_{N\ asimilable}\left[\frac{mg}{L}\right]$$

- **DAP**

El volumen que se debe añadir de DAP se calculó mediante la siguiente expresión:

$$V_{DAP}[ml] = \frac{C_{N\ faltante}\left[\frac{mg}{L}\right] \times V_{mosto} \times \frac{1}{14}\left[\frac{mol\ N}{g}\right] \times \frac{1}{2}\left[\frac{mol\ DAP}{mol\ N}\right] \times \frac{132{,}06}{1}\left[\frac{g\ DAP}{mol\ DAP}\right]}{300\left[\frac{mg}{L}\right]}$$

El volumen añadido para el experimento control se muestra en la Tabla 8Tabla 8.

- **AA**

La solución de aminoácidos tiene una concentración de 18,97 [mg/L] de nitrógeno asimilable por la levadura, en base a esto se calculó el volumen necesario para alcanzar una concentración de 250 [mg/L], esto se muestra en la Tabla 8.

- **Hidrolizado de proteínas de levadura (H50% y H100%)**

De acuerdo al análisis que se hizo a las levaduras, éstas contienen un 32,53%p/p de proteínas, además en 6,25 g de proteínas hay 1 g de nitrógeno, a partir de esto se determina que por 1g de levaduras se tiene 0,052 g de nitrógeno. Considerando que el hidrolizado de proteínas de levadura obtenido mediante la hidrólisis enzimática se encontraba en 20%p/p, se determina que 1000 g de solución contienen 10,41 g de nitrógeno.

En base a esto se calculó el volumen a añadir de hidrolizado mediante la siguiente expresión, asumiendo que la densidad de éste es aproximadamente igual a la densidad del agua:

$$V_{H100\%} = V_{mosto}[L] \times C_{Nfaltante}\left[\frac{mgN}{L}\right] \times \frac{1}{1000}\left[\frac{g}{mg}\right] \times \frac{1}{10{,}41}\frac{L\ hidrolizado}{g\ nitrógeno} \times \frac{1000}{1}\left[\frac{ml}{L}\right]$$

$$V_{H50\%} = \frac{V_{mosto}[L] \times C_{Nfaltante}\left[\frac{mgN}{L}\right] \times \frac{1}{1000}\left[\frac{g}{mg}\right] \times \frac{1}{10{,}41}\frac{L\ hidrolizado}{g\ nitrógeno} \times \frac{1000}{1}\left[\frac{ml}{L}\right]}{2}$$

A continuación de se muestra una tabla resumen del volumen añadido de cada fuente de nitrógeno en cada tratamiento (Tabla 8).

Tabla 8: Volumen añadido de fuente de nitrógeno para cada experimento.

Experimento		Nitrógeno Asimilable inicial	Nitrógeno Asimilable faltante	Volumen añadido de fuente de nitrógeno	Tipo de fuente de nitrógeno
C1	C1.1	90,86 mg/L	159,1 mg/L	3,44 ml	DAP
	C1.2	100,1 mg/L	149,9 mg/L	3,24 ml	
F1	F1.1	117,04 mg/L	133 mg/L	9,64 ml	AA
	F1.2	84,7 mg/L	165,3 mg/L	11,98 ml	
F2	F2.1	109,34 mg/L	140,7 mg/L	10,91 ml H 1,52 ml DAP	H50%
	F2.2	112,42 mg/L	137,6 mg/L	9,12 ml H 1,49 ml DAP	
F3	F3.1	95,48 mg/L	154,5 mg/L	10,213 ml	H100%
	F3.2	117,04 mg/L	133 mg/L	8,79 ml	

3.5.2. Condiciones de fermentación y monitoreo

Las fermentaciones se realizaron en recipientes de plástico, el volumen de mosto que se obtuvo fue de 1,375 l, el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y sin agitación, la adición de la fuente de nitrógeno se realizó al tiempo 0 horas, tiempo en que se adicionó también el inóculo previamente preparado y acondicionado.

Para el monitoreo de fermentación se tomaron muestras cada 12 horas los primeros 4 días y posteriormente cada 24 horas, en cada una de ellas se midió y ajustó pH, se midió acidez total, turbidez y °Brix, temperatura del sistema y temperatura del ambiente. Para el caso de fermentaciones con DAP y AA se midió nitrógeno asimilable (YAN), cada procedimiento realizado se encuentra detallado en Anexo 7.3.

Una vez terminada las fermentaciones se realizó descube y prensado para separar el vino del orujo, el vino obtenido de cada experimento fue almacenado en botellas dejándolas en una posición fija durante dos semanas para que decantara la borra (Figura 34), al finalizar las dos semanas se realizó trasiego, es decir, la separación del vino con la borra sedimentada al fondo del recipiente.

Figura 34: Decantación de borra en el vino.

Posteriormente, para la decantación de tartratos, se dejó el vino durante un mes a bajas temperatura (refrigerador) como muestra la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, posterior a esto se realizó un nuevo trasiego. Finalmente se tomaron muestras del vino obtenido y se midieron compuestos volátiles mayoritarios en vinos y parámetros generales, estas mediciones se detallan a continuación.

3.6. Análisis de parámetros generales y compuestos volátiles

3.6.1. Determinación de parámetros generales

Grado alcohólico, pH, acidez total y volátil, ácidos tartárico, málico y láctico se determinaron mediante espectrometría de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) utilizando un analizador Bacchus II calibrado de acuerdo a los métodos oficiales de análisis (Reglamento del consejo EC). Los azúcares reductores se midieron utilizando el método de DNS para cuantificación de glucosa (Anexo 6.4).

3.6.2. Determinación de compuestos volátiles mayoritarios

Se midió la concentración de 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, 2-feniletanol, glicerol, metanol, acetato de etilo, lactato de etilo, succinato de etilo, acetoína, acetol, etanal y butirolactona. Estas mediciones se llevaron a cabo por cromatografía de gases (Agilent modelo 7890A) con detector de ionización de llama[1] (FID). El análisis de estos compuestos se realizó mediante inyección directo con división "Split"[2] y con el uso de 50 mg/l de 4-metil-2-pentanol como patrón interno, marca Merck. El procedimiento consistió en tomar 5 ml de muestra filtrada y se añaden 50 µl de patrón interno preparado en matriz hidroalcohólica, esto se mezcla con agitación y se inyectan 2 µl de esta mezcla en el cromatógrafo. La separación se realizó con una temperatura inicial del horno de 40 °C durante 5 min, aumentando 4 °C cada un minuto hasta llegar a 200 °C, ésta última se mantiene durante 15 min.

El cromatógrafo utilizado contiene una columna CPWAX 57 CB, marca Agilent, de dimensiones 50 m x 0,32 mm x 0,20 µm. El gas portador empleado fue hidrógeno, con un flujo de 3,3 ml/min y como gas auxiliar se utilizó nitrógeno, con un flujo de 30 ml/min. La velocidad de flujo en el detector para el hidrógeno fue de 40 ml/min, mientras que para el aire fue de 400 ml/min. El flujo de purga fue de 5,2 ml/min y Split de 125 ml/min, con atenuación de 1.

[1] Detector de ionización de llama: Es un detector utilizado en cromatografía de gases, consiste en la adición de gas hidrógeno al efluente que sale de la columna (gas portador y analito).

[2] Inyección con división de muestra: Se conoce más como inyección "Split", cuenta con un sistema de división de flujo a la salida de la cámara de mezcla.

3.7. Evaluación sensorial

El objetivo de la evaluación sensorial fue determinar si las diferencias en atributos de aroma, acidez, dulzor, astringencia y color son percibidas por un panel no experto, para esto se realizó una prueba comparativa entre las muestras de vino de acuerdo a un atributo.

La prueba utilizada fue la Prueba de Clasificación Simple: Análisis de Friedman – Diseño de bloques aleatorizado descrito en Meilgaard et al., (2007), debido a que es un método que suele ser utilizado para comparar varias muestras de acuerdo con un solo atributo. Además, es la forma más sencilla de realizar comparaciones obteniendo datos ordinales y sobre todo es ideal cuando el panel no es experto.

La primera parte de la prueba consistió en la capacitación de los panelistas, ya que éstos no contaban con experiencia previa en evaluación sensorial. La capacitación consistió en una prueba para la detección de un estímulo y una prueba de discriminación entre niveles de intensidad (Figura 35). Para esto se prepararon soluciones de ácido tartárico, sacarosa y ácido tánico, en la primera prueba se presentó una muestra de cada solución y en la segunda 4 muestras codificadas, las que debían ordenar de menor a mayor intensidad. Los resultados se anotaron en la hoja de respuestas.

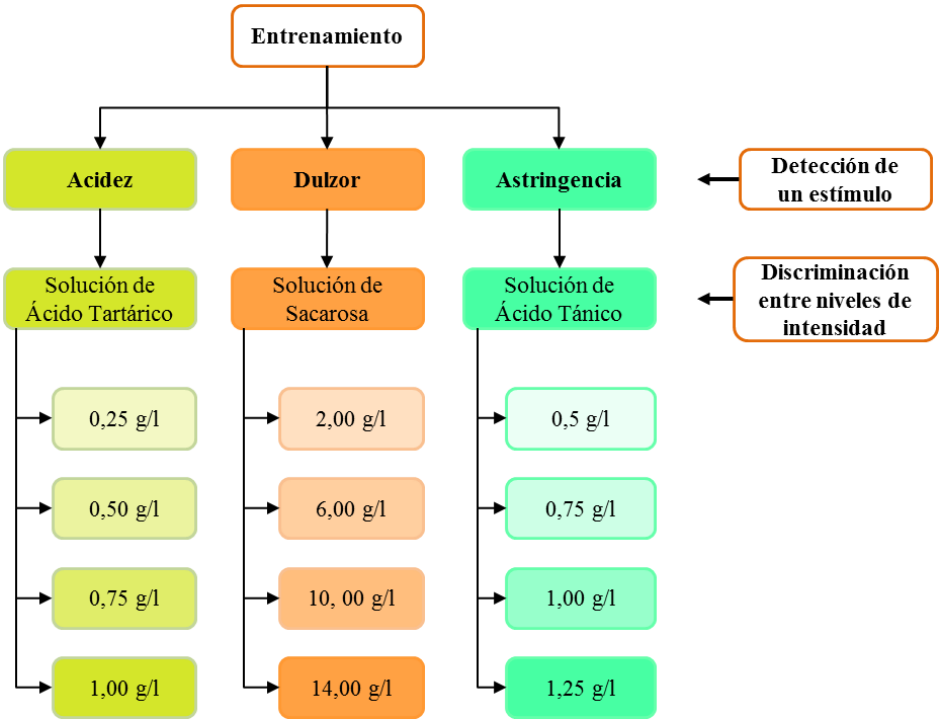

Figura 35: Capacitación para panelistas: Prueba de detección de un estímulo y discriminación entre niveles de intensidad.

Posteriormente se realizó la evaluación para las muestras de vino, la cual consistió en presentar el conjunto de muestras a cada panelista en orden aleatorio y equilibrado (Figura 36), las muestras fueron enumeradas con códigos de tres dígitos para evitar sesgos. Se les pidió a los panelistas que clasificaran las muestras según el atributo de interés, esta clasificación consistió en ordenar las muestras de menor a mayor intensidad de acuerdo a cada atributo, para esto se les proporcionó una hoja para cada tipo de evaluación (acidez, dulzor, astringencia, color y aroma).

Los resultados de estas pruebas se analizan mediante el método paramétrico usando estadística de tipo Friedman, si el resultado da diferencias significativas se realiza el procedimiento de comparación múltiple para determinar cuál de las muestras difiere significativamente, el detalle de los cálculos se encuentra en el Anexo 6.5.5.

Figura 36: Evaluación sensorial de vinos producidos con distintas fuentes de nitrógeno.

CAPÍTULO 4:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Generación de hidrolizado enzimático de proteínas de levadura

Se obtuvo una solución de hidrolizado enzimático de proteínas. De acuerdo a las condiciones de operación utilizadas en su preparación y a las características de la levadura utilizada, tanto la concentración de la solución de levaduras como el contenido de proteínas y de nitrógeno en ellas, la preparación cuenta con 10,41 g de nitrógeno por litro de solución.

4.2. Monitoreo de la fermentación

La fermentación alcohólica tuvo una duración de 7 días, se realizaron mediciones desde el momento de la inoculación hasta el día número 10. A continuación se muestran los resultados obtenidos en el transcurso del proceso para cada tratamiento, éstos se detallan en el Anexo 6.6.1.

- Variación de la biomasa

La turbidez representa una medida indirecta de la biomasa, es decir, del crecimiento celular en el medio. En base a esto se puede tener una idea del crecimiento de las levaduras y en este caso, cómo varía según la fuente de nitrógeno utilizada en la fermentación (Figura 37). La turbidez inicial del mosto es de aproximadamente 3000 NTU para cada tratamiento, a medida que avanza la fermentación aumenta paulatinamente hasta alcanzar un punto máximo y comenzar a disminuir, esto último se registra a las 179 horas para el experimento DAP y a las 200 horas para el tratamiento con AA y H100%. Respecto a los valores más altos de biomasa, se puede observar que correspondió a los experimentos realizados con fuentes de nitrógeno orgánico, AA, H50% y H100%. Durante el transcurso de la fermentación, también es posible observar que en el tratamiento con AA, la turbidez se mantiene en valores por sobre el resto de los otros tratamientos.

Por otra parte, también es posible observar que las variaciones de turbidez en las fermentaciones presentan un comportamiento desigual para cada tratamiento, esto se

atribuye a las condiciones de operación del proceso, debido a que el medio de fermentación se realizó sin agitación por lo que no se aseguró la homogeneidad.

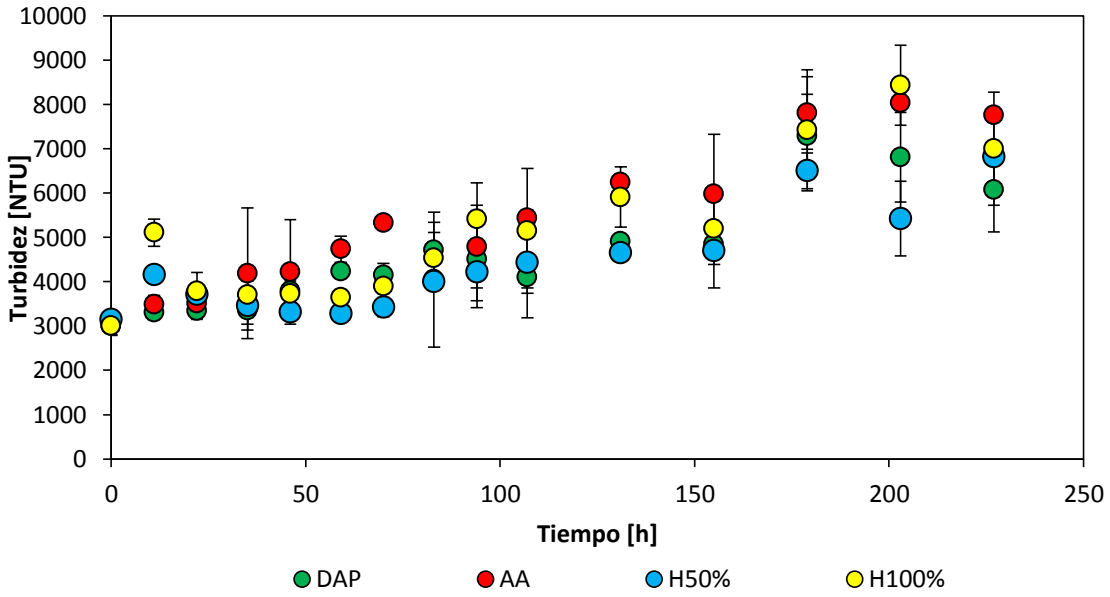

Figura 37: Variación de la turbidez para las fermentaciones con distintas fuentes de nitrógeno.

- Variación de sólidos solubles

El monitoreo de los sólidos solubles durante la fermentación, mediante la medición de °Brix, permite medir indirectamente el azúcar presente en el mosto en el transcurso del proceso. A medida que la fermentación avanza se observa una disminución de °Brix, esto representa el consumo de azúcares por las levaduras para transformarlas en etanol. En la Figura 38 se observa la evolución en el tiempo de esta variable para cada tratamiento. En ella se observa que la mayor disminución de °Brix ocurre entre las 50 y 150 horas. Se observa que en la fermentación con AA es la primera en que dejan de variar los °Brix (150 h), mientras que en el esto ocurre a la hora 200, lo cual implica que las fermentaciones con AA tienen una duración menor que al utilizar DAP, H50% o H100%. Además, la pendiente que se observa en la variación de °Brix es más pronunciada que en el resto de las fermentaciones, lo cual se condice con lo observado en la variación de turbidez, en la que en el transcurso de la fermentación la variación de ésta se mantiene por sobre el resto de los demás. Esto se podría estar relacionado con el nitrógeno y su absorción, ya que al utilizar fuentes de nitrógeno que tienen diferente

asimilación por la levadura, conducirá también a un variación en el crecimiento de la biomasa debido a que tiene un impacto en la cinética, velocidad y duración de la fermentación, de acuerdo a Bell & Henschke, (2005) y por ende en una variación de los sólidos solubles. Este comportamiento se explica de mejor manera a través del mecanismo de Represión Catabólica de Nitrógeno (NCR) de la célula, se asimilan más rápido las fuentes fácilmente asimilables por lo que el crecimiento de la biomasa debiera ser más rápido y así también el consumo de azúcar (Bell & Henschke, 2005; Eltran et al., 2005). De acuerdo a esto, la asimilación de aminoácidos es más rápida por lo que el azúcar se consume más rápido que la de H50%, seguido del H100%, ya que estas últimas están compuestas por péptidos, por lo que la levadura para poder asimilarlos debe primero romper los enlaces peptídicos. Sin embargo, al observar la tasa de consumo de azúcar se debiera esperar que el tratamiento control hubiese tenido una mayor disminución en los °Brix y por el contrario, obtuvo la menor tasa de consumo de azúcar.

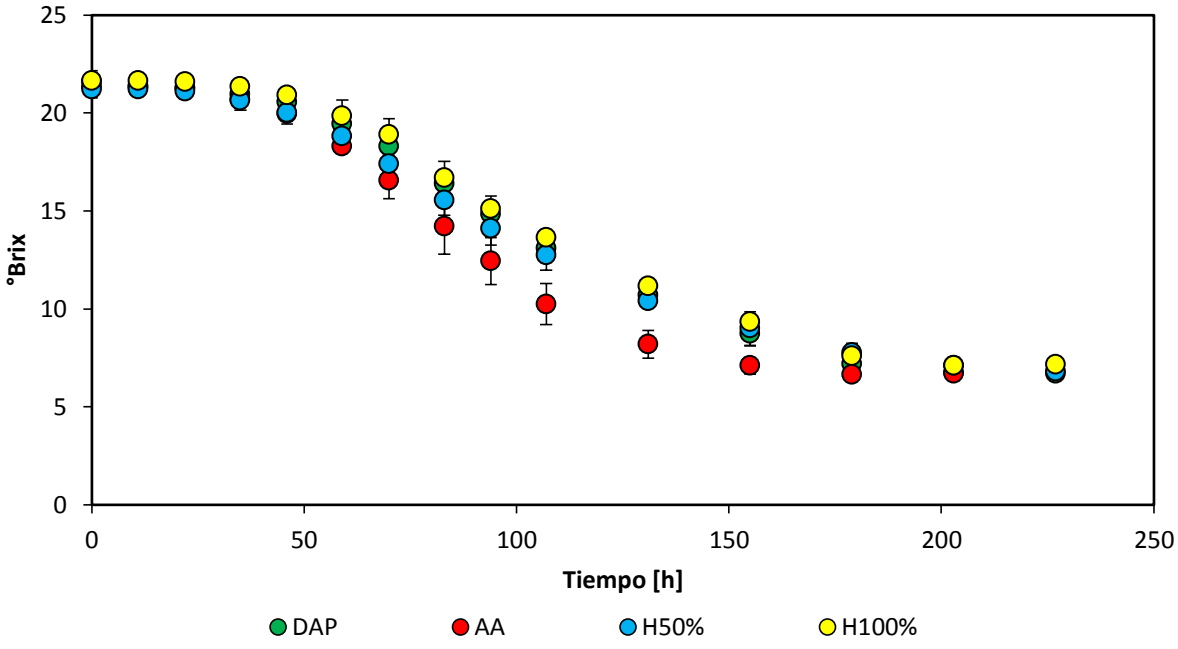

Figura 38: Variación de °Brix para fermentaciones con distintas fuentes de nitrógeno.

- Variación de nitrógeno

Al comparar el consumo de nitrógeno entre las fermentaciones con fuente de nitrógeno AA y DAP (Figura 39), se observa que éste cesa a la hora 150 y 170, respectivamente. Esto coincide con el momento en que los °Brix se estabilizan, lo que permite inferir que efectivamente a esa hora los experimentos cesaron de fermentar.

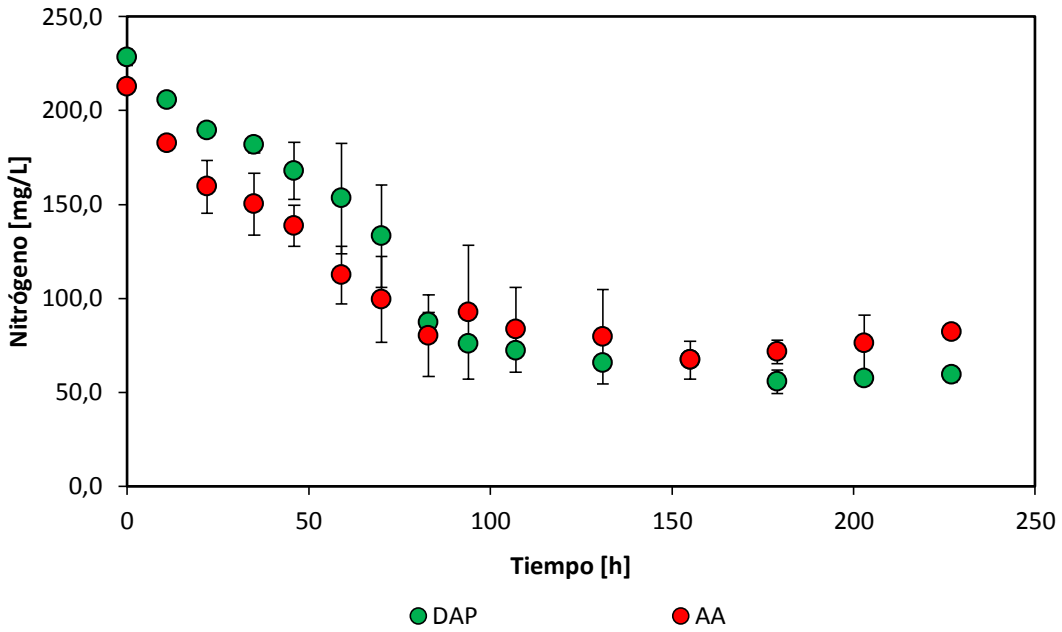

Figura 39: Consumo de nitrógeno para fermentaciones con fuente de nitrógeno DAP y Aminoácidos.

Además, muestran que posterior al término de la fermentación la disponibilidad de nitrógeno aumenta, esto se puede asociar al fenómeno de autolisis que ocurre cuando las levaduras mueren, el que consiste en una autodegradación enzimática de los constituyentes celulares, entre ellos se liberan compuestos nitrogenados, lo que explicaría que el nitrógeno disponible aumente al finalizar la fermentación (Alexandre et al., 2001).

4.3. Perfil molecular

Para estudiar si el uso del hidrolizado de proteínas de levaduras, como fuente de nutrientes tiene efectos sobre el perfil molecular del vino respecto a los otros tratamientos, se realizó un análisis estadístico t de Student para cada uno de los compuestos y así determinar si existían diferencias significativas entre tratamientos, el detalle de los cálculos realizados se muestra en el Anexo 6.6.

4.3.1. Análisis de parámetros generales

- pH, grado alcohólico y azúcares reductores

Los valores de pH, grado alcohólico y concentración de azúcares reductores medidos en cada vino se muestran en la Tabla 9 junto con su desviación estándar muestral, los resultados obtenidos se encuentran en el rango esperado. El grado alcohólico en todos los experimentos fue superior a 11,5 %vol., el cual es el mínimo grado que exige la Ley 18.455 (Gobierno de Chile, 2009). Respecto al pH, los valores obtenidos en todos los experimentos se encuentran en el rango adecuado de acuerdo a Jackson, (2008).

Tabla 9: Valores de pH, grado alcohólico y azúcares reductores de cada vino.

Experimento	pH [-]	Grado alcohólico [% Vol.]	Azúcares Reductores [g/L]
DAP	3,51 ± 0,01	11,95 ± 0,07	1,43 ± 0,08
AA	3,54 ± 0,00	12,00 ± 0,28	1,46 ± 0,20
H50%	3,58 ± 0,01	12,10 ± 0,14	1,41 ± 0,17
H100%	3,55 ± 0,01	12,00 ± 0,49	1,42 ± 0,08

Respecto a la concentración de azúcares reductores final, ésta oscila entre 1,41 y 1,46 g/l. El análisis estadístico entregó como resultado que las diferencias en este parámetro no son significativamente diferentes entre los tratamientos por lo que se puede concluir que la fuente de nitrógeno no tuvo influencia en el consumo de azúcar. De acuerdo al estudio realizado por Vilanova et al., (2007), las fermentaciones con niveles bajos de nitrógeno asimilable produjeron fermentaciones estancadas debido a que la población de levaduras no fue suficiente, y por ende se obtuvo una concentración de azúcares reductores elevada debido a que no se consumieron por completo los azúcares atribuyendo esto a la baja biomasa generada. Con esto se puede corroborar que las fermentaciones ocurrieron completamente y además, que el uso de hidrolizado enzimático de proteínas de levadura como fuente de nitrógeno proporciona a la levadura los nutrientes necesarios para que pueda consumir los azúcares presentes en el mosto.

- Acidez total

Los valores de acidez total, representada en ácido tartárico, se encuentran en la Tabla 10. De acuerdo al análisis estadístico, los experimentos no presentaron diferencias entre ellos para la acidez total. De acuerdo a Jackson, (2008), las concentraciones obtenidas se encuentran en el rango adecuado.

Tabla 10: Resultados de acidez total en cada experimento [g ác. Tart/L]

Experimento	Acidez Total [g ác. Tart/L]
DAP	5,10 ± 0,28
AA	4,85 ± 0,64
H50%	4,45 ± 0,07
H100%	5,55 ± 0,21

Además, resulta importante mencionar que estudios realizados previamente, en el que se evalúa el efecto de utilizar diferentes fuentes de nutrientes, aminoácidos y DAP, han mostrado resultados similares. En la investigación realizada por Hernández-Orte, et al. (2005), tampoco se encontraron efectos significativos en la acidez total, acidez volátil y azúcares reductores al añadir diferentes cantidades de aminoácidos en mosto de uva de variedad Merlot.

- Ácido málico y ácido láctico

Se midieron las concentraciones de ácido málico y ácido láctico obtenidas en el vino en cada experimento. El vino con AA presentó valores muy diferentes en sus duplicados por lo que se analizaron por separado, en la Figura 40 se observan los resultados obtenidos.

Las concentraciones de ácido málico y láctico son notoriamente diferentes entre tratamientos, en especial los vinos con fuente de nitrógeno DAP y AA (1) respecto de H50%, AA (2) y H100%. Estas diferencias pueden tener relación con el proceso de fermentación maloláctica, ya que en esta etapa es donde los ácidos orgánicos no volátiles sufren modificaciones por medio de bacterias específicas. Al terminar la fermentación alcohólica no se aseguraron las condiciones óptimas para el desarrollo de la fermentación maloláctica al no añadir un inóculo de la bacteria que realiza esta transformación, se asumió que el medio contaba con lo necesario para que este proceso

ocurriera de manera espontánea. Por lo tanto, no se puede establecer que la fuente de nitrógeno AA haya influenciado el desarrollo de la fermentación maloláctica y con ellos la transformación del ácido málico en láctico. Esto puede tener influencia en los resultados del panel sensorial.

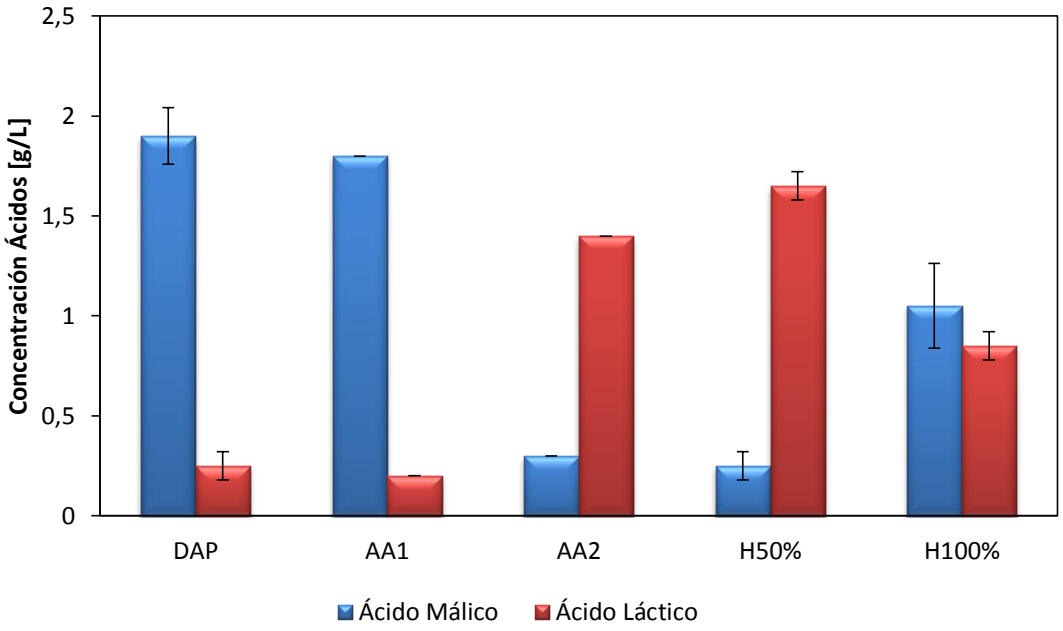

Figura 40: Concentraciones de ácido málico y láctico en el vino para cada tratamiento.

Además, es importante agregar que las bacterias ácido lácticas son sensibles al etanol y a los valores bajos de pH por lo que durante la fermentación alcohólica su población disminuye, ya finalizada la fermentación alcohólica, las que logran sobrevivir se comienzan a multiplicar en la medida en que el medio se lo permite. Si este medio presenta condiciones desfavorables para su reproducción la fermentación maloláctica será lenta o se estancará. A parte de ser sensibles a bajos pH y a altas concentraciones de etanol, la temperatura, concentraciones de SO_2 y la disponibilidad de nutrientes afectan su crecimiento (Moreno-Arribas & Polo, 2009), es por esto último que no se puede descartar que el uso de hidrolizado de proteínas de levadura tenga un efecto en la producción mayor o menor de ácido láctico, a pesar de que en esta investigación los resultados no hayan sido concluyentes.

- Acidez volátil

La concentración de acidez volátil está representada en gramos de ácido acético por litro, en la Tabla 11 se observan los resultados obtenidos para este parámetro. El experimento H50% presentó el mayor valor en concentración de acidez volátil con un

valor de 0,71 g ác. acético/l, seguido por los experimentos AA y H1005, con valores de 0,68 y 0,66 g ác. acético/l, mientras que el experimento control DAP presentó el valor más bajo de acidez volátil con 0,46 g ác. acético/l.

Tabla 11: Acidez volátil en cada experimento.

Experimento	Acidez Volátil [g ác. acético/L]
DAP	0,455 ± 0,02
AA	0,675 ± 0,04
H50%	0,71 ± 0,06
H100%	0,66 ± 0,01

El test de significancia entregó como resultado que las diferencias en los valores obtenidos para la acidez volátil son significativas entre el experimento control DAP y el resto de los tratamientos. No se encontró diferencias significativas entre el tratamiento AA y H50% o H100%. Sin embargo, todos los valores se encuentran en el rango aceptado de acuerdo a la Ley 18.455, artículo N°16, Chile.

Respecto al umbral de percepción, de acuerdo a la investigación realizada por Bell & Henschke, (2005), el umbral de sabor de ácidos volátiles se encuentra en el rango de 0,4 g/l y 1,1 g/l y añade complejidad al vino si es que se encuentra sobre 0,7 g/l. De esto se infiere que todos los vinos obtenidos tienen una acidez volátil sobre el nivel de percepción, sin embargo, se encuentran en el rango en que otorgan complejidad al vino sólo los que se produjeron con una fuente de nitrógeno orgánica (AA, H50% y H100%), debido a que en estos experimentos la acidez volátil se encuentra sobre los 0,7 g/l y bajo los 1,1g/l.

4.3.2. Análisis de compuestos volátiles mayoritarios

Los compuestos volátiles mayoritarios en vinos fueron medidos mediante cromatografía de gases con detector de llama (FID). Se midieron los principales alcoholes superiores producidos en vinos, estos son 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-feniletanol y 1-hexanol. En la Tabla 12 se muestran las concentraciones obtenidas de cada compuesto para cada experimento que se realizó.

Tabla 12: Concentraciones de compuestos volátiles para experimentos con distintas fuentes de nutrientes.

Concentración [mg/L]	DAP	AA	H50%	H100%
1-Propanol	67,83	59,52	52,28	46,64
2-Metil-1-Propanol	71,48	91,69	94,01	76,77
2-Metil-1-Butanol	60,50	54,75	62,25	73,29
3-Metil-1_Butanol	231,16	189,32	236,82	260,09
2-Feniletanol	62,77	38,73	68,43	68,40
1-Hexanol	2,16	2,65	2,28	2,25
Metanol	91,69	92,21	97,52	94,47
Glicerol [g/L]	8,62	8,02	9,27	8,83
Acetato de etilo	109,24	183,29	143,55	134,24
Lactato de etilo	4,26	6,51	10,17	3,89
Acetaldehído	75,79	93,47	-	90,69
Acetoína	5,60	8,80	12,51	7,01

- Alcoholes Superiores

En la Figura 41 se puede observar la variación que se obtuvo en la formación de los principales alcoholes superiores que se pueden encontrar en vinos, en cada tratamiento. De acuerdo a la figura, se puede observar que la concentración de todos los alcoholes superiores resultaron ser diferentes en todos los vinos, a excepción del 1-hexanol, cuya producción es baja en comparación al resto.

Se realizó el análisis estadístico para determinar si el efecto de la fuente de nitrógeno es significativo, los resultados mostraron que sí existen diferencias al comparar el tratamiento control DAP con el resto de las fuentes de nitrógeno utilizadas. En la Tabla 13 se muestra un resumen, en el que "Si" significa que las concentraciones obtenidas son significativamente diferentes y "No" significa que no se encontraron diferencias significativas.

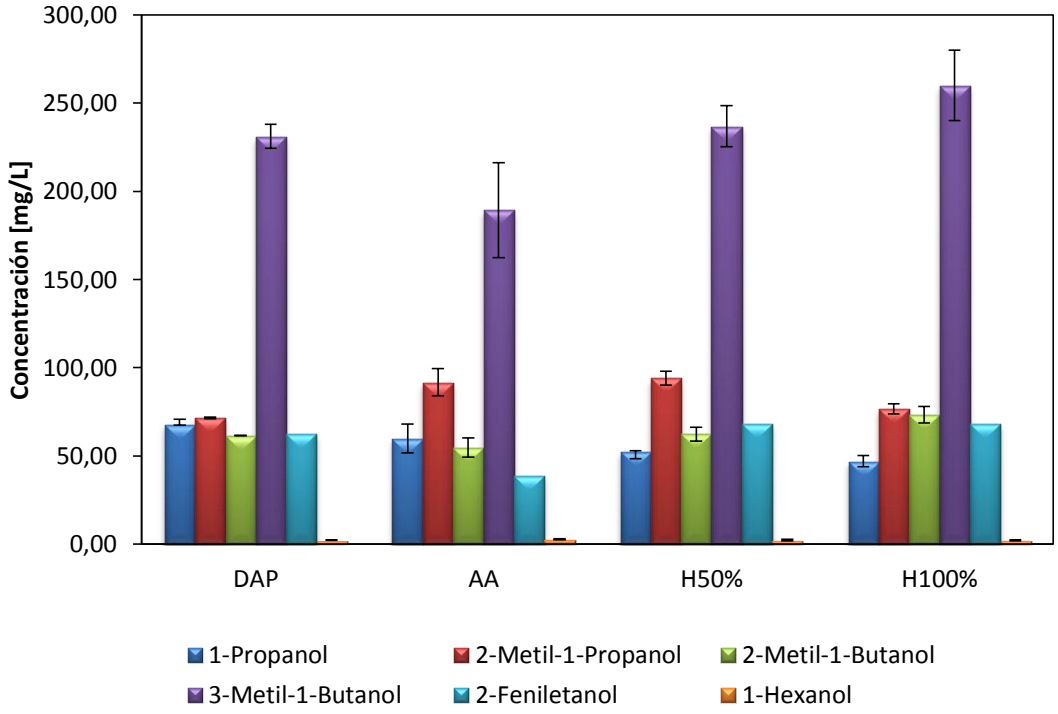

Figura 41: Concentración de alcoholes superiores producida en los vinos con distintas fuentes de nutrientes.

Tabla 13: Resultados de análisis estadístico de alcoholes superiores.

Compuesto	DAP AA	Aumenta Disminuye	DAP H50%	Aumenta Disminuye	DAP H100%	Aumenta Disminuye
1-Propanol	No	-	Si	Disminuye	Si	Disminuye
2-Metil-1-Propanol	Si	Aumenta	Si	Aumenta	No	-
2-Metil-1-Butanol	No	-	No	-	Si	Aumenta
3-Metil-1-Butanol	Si	Disminuye	No	-	Si	Aumenta
1-Hexanol	Si	Aumenta	No	-	No	-
2-Feniletanol	Si	Aumenta	No	-	No	-

Al comparar la formación de alcoholes superiores entre el experimento control con el tratamiento hidrolizado 100% como fuente de nitrógeno, se encontraron diferencias significativas en la producción de 1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol, sin embargo, no se encontró diferencia entre estos en la producción de 2-metil-1-propanol, 1-hexanol y 2-feniletanol.

Respecto a los niveles de alcoholes superiores obtenidos, la concentración de 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 2-fenietanol en el control con DAP se encuentra en el rango esperado de acuerdo al estudio realizado por Vilanova et al., (2007), no así para el 3-metil-1-butanol, el cual en el estudio mencionado se obtienen concentraciones en el rango de 50 a 60 mg/l. Sin embargo, en el estudio realizado por Hernández-Orte et al.,

(2005) la fermentación control presentó una concentración cercana a los 250 mg/l de 3-metil-1-butanol, valor cercano al obtenido en este trabajo.

Por otra parte, para los niveles de alcoholes superiores obtenidos en el tratamiento con aminoácidos, las concentraciones obtenidas de 3-metil-1-butanol y 2-feniletanol están dentro del rango esperado de acuerdo a otras investigaciones en que se utilizaron mezclas de aminoácidos (Hernández-Orte et al., 2005; Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2008; Barbosa et al., 2009), no así para el 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 1-hexanol, cuyas concentraciones obtenidas en los estudios mencionados son inferiores a las que se presentaron en este trabajo. Estas diferencias, tanto para el tratamiento control como para el con aminoácidos, pueden ser asociadas a que en todos los estudios se utilizan diferentes mostos de uva, con diferentes ubicaciones geográficas entre ellas.

En el estudio realizado por Hernández-Orte et al., (2005), se obtuvieron concentraciones de 1-hexanol no fueron diferentes al utilizar mezclas de aminoácidos en diferentes concentraciones y el control (sin adición de nitrógeno), lo cual es consistente con los resultados que se obtuvieron en este trabajo, por lo que se presume que la formación de este compuesto no depende de la concentración de nitrógeno en el mosto de uva. Respecto a la formación de 2-feniletanol y 3-metil-1-butanol, el vino que obtuvo la menor concentración fue el que utilizó aminoácidos como fuente de nutrientes, esto coindice con la investigación realizada por Hernández-Orte et al., (2005) en la que una de sus conclusiones es que la adición de aminoácidos al mosto reduce el contenido de 2-feniletanol, metanol y 3-metil-1-butanol.

Para las fermentaciones en que se utilizó H100% como fuente de nitrógeno, se obtuvo un aumento en la concentración de 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol, y una disminución en la concentración de 1-propanol al compararla con el tratamiento control (DAP). Este efecto puede ser explicado en base al conocimiento que existe de que los alcoholes superiores se forman a partir de los aminoácidos y del azúcar, en particular el 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol y 1-propanol pueden ser formados a partir de los aminoácidos isoleucina, leucina y treonina, respectivamente[3] .Por lo que se podría inferir que el hidrolizado de proteínas de levadura que se utilizó como fuente de

[3] Ver Tabla 2: Relación de los aminoácidos con alcoholes superiores. Adaptado de (Bell & Henschke, 2005).

nitrógeno contiene mayores concentraciones de estos aminoácidos lo que explicaría el aumento de la formación de sus respectivos alcoholes.

De esta manera, es posible evidenciar que la procedencia de la fuente de nitrógeno sí tiene un efecto sobre el perfil molecular de alcoholes superiores. La explicación de este fenómeno radica en el metalismo asociado a su formación. Los alcoholes superiores se forman a partir de la ruta de Ehrlich, la que consiste en la desaminación y descarboxilación de los aminoácidos en donde se forman los cetoácidos como intermediarios de reacción y posteriormente son reducidos formando los alcoholes de fusel (Bell & Henschke, 2005). Además, los alcoholes superiores también pueden ser sintetizados a partir del azúcar, a través de la ruta biosintética, ésta se utiliza en su mayoría cuando el medio no dispone de suficientes nutrientes ya que esto activa la síntesis de α-cetoácidos, si es que no hay suficiente nitrógeno disponible para las reacciones de transaminación, los excedentes de α-cetoácidos se excretan en forma de alcoholes superiores siguiendo la ruta biosintética.

Por otra parte, es sabido que concentraciones bajo los 300 mg/l de alcoholes superiores, contribuyen a la complejidad aromática del vino y que niveles superiores (sobre los 400 mg/l) sus olores enmascaran los aromas (Rapp & Versini, 1995; Ribéreau-Gayon, et al., 2006), lo que significa que en todos los vinos obtenidos en esta investigación sobrepasan los límites, por lo que su contribución no es positiva.

- Ésteres

En la Tabla 12 se encuentran las concentraciones obtenidas de acetato de etilo, lactato de etilo y succinato de etilo. El análisis estadístico, entregó como resultado diferencias entre los tratamientos al compararlos con el control, esto se muestra en la Tabla 14. También se realizó el análisis de comparación entre el tratamiento AA y el H50% y H100% para cada uno de ellos, no se encontraron efectos significativos.

Tabla 14: Resultado de análisis estadístico de ésteres.

Compuesto	DAP AA	Aumenta Disminuye	DAP H50%	Aumenta Disminuye	DAP H100%	Aumenta Disminuye
Acetato de etilo	Si	Aumenta	Si	Aumenta	Si	Aumenta
Lactato de etilo	Si	Aumenta	Si	Aumenta	No	-

De los ésteres medidos, el acetato de etilo es el que alcanza los niveles más altos de producción, esto es consistente a las revisiones publicadas por otros autores (Bell & Henschke, 2005; Jackson, 2008) en los que el alto nivel de producción respecto a otros ésteres se atribuye a que es formado a partir del etanol y ácido acético. El primero es el principal producto de la fermentación alcohólica y el segundo es el ácido volátil mayoritario en vinos, de acuerdo a Jackson, (2008) y Swiegers et al., (2005) el ácido acético representa cerca del 90% de la acidez volátil. Respecto a la cantidad de acetato de etilo producida en los vinos, si bien la concentración aumenta al utilizar una fuente de nitrógeno orgánica respecto al uso de DAP, los niveles se encuentran en el rango aceptado para este compuesto (<150 mg/l), a excepción del tratamiento AA. En este último se obtuvo una concentración superior a los 150 mg/l, lo cual es un nivel indeseable ya que imparte al vino un olor desagradable parecido al vinagre (Swiegers et al., 2005; Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2008). Este nivel de producción está asociado a bacterias de ácido acético presentes en la uva, mosto y/o contaminación del vino, las cuales son capaces de producir directamente acetato de etilo y ácido acético (Jackson, 2008) provocando de esta manera la sobreproducción de acetato de etilo. Por otra parte, la medición de la concentración de acetato de etilo presentó gran variabilidad entre los duplicados en cada tratamiento, por lo que no es posible concluir que la fuente de nitrógeno utilizada haya influido en su formación. En la investigación realizada por Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, (2008) se obtuvo que la concentración de acetato de etilo en los vinos finales no se correlacionó con la concentración de aminoácidos añadidos al mosto. De acuerdo a Ribéreau-Gayon, et al., (2006) el parámetro que afecta considerablemente la formación de este compuesto es la velocidad de fermentación, por lo que una explicación a las diferencias encontradas en la producción de acetato de etilo podría ser asociada a este factor.

El lactato de etilo es un éster etílico que se forma a partir de etanol y el ácido láctico (Jackson, 2008), en la Figura 42 se pueden apreciar las concentraciones de este compuesto producidas en cada vino.

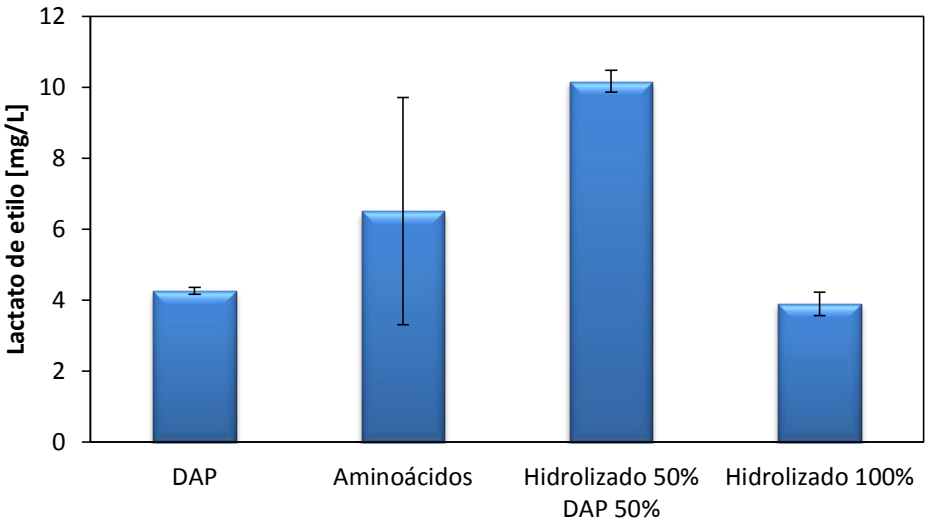

Figura 42: Concentración de lactato de etilo producida en vinos con distintas fuentes de nitrógeno.

Se puede observar que el tratamiento con aminoácidos resultó con alta desviación en su duplicado, en la primera réplica con aminoácidos se obtuvo una concentración de lactato de etilo de 3,73 mg/l y en la segunda de 9,28 mg/l. De acuerdo a Robinson, (2011) y Jackson, (2008), el lactato de etilo está ligado a la concentración de ácido láctico producido en la fermentación maloláctica, en esta etapa las bacterias ácido lácticas producen esterasas lo que repercute en un aumento de la concentración de algunos ésteres, especialmente el lactato de etilo. Lo mencionado anteriormente, puede explicar la variabilidad de la concentración de lactato de etilo obtenida en las réplicas con AA, dado que la cantidad de ácido láctico que se produjo en la primera réplica fue mucho menor al ácido láctico obtenido en la segunda réplica Figura 40.

- Compuestos cetónicos

En el vino se producen varios compuestos cetónicos diferentes, sin embargo, pocos tienen significancia sensorial, a excepción del diacetilo y la acetoína (3-hiddroxibutanona). En la Figura 43 se muestran las concentraciones de acetoína producida en los vinos, a simple vista se puede observar que la producción de este compuesto presentó diferencias al utilizar distintas fuentes de nitrógeno.

Los valores obtenidos de compuestos cetónicos se muestran en la Tabla 12, se observa que tanto la acetoína y el acetol se produjeron en mayor cantidad al utilizar H50%-DAP50% como fuente de nutrientes con 12,51 mg/l y 14,43 mg/l, respectivamente. El test de significancia entregó como resultado que estas diferencias son significativas

entre el tratamiento control DAP y el resto de los tratamientos con distintas fuentes de nitrógeno, a excepción del experimento con DAP y H100% para el compuesto acetoína. Se observa además, que los menores valores de acetoína se obtienen al utilizar DAP, de esto se puede deducir que la adición de una fuente de nitrógeno orgánica provoca que aumente la generación de este compuesto.

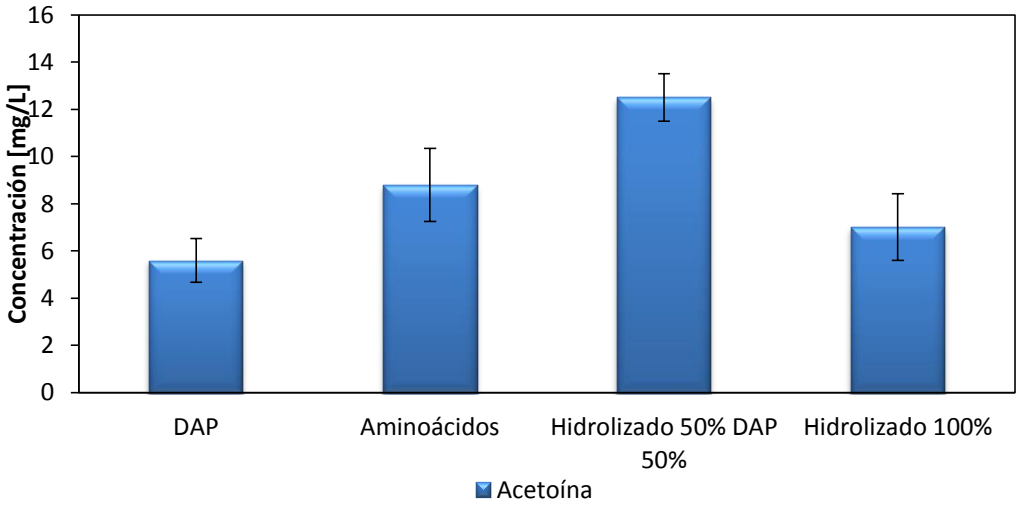

Figura 43: Concentraciones producidas de acetoína en vinos con distintas fuentes de nitrógeno.

El análisis de diferencias entregó como resultado que sí hubo efectos significativos en su producción. En la Tabla 15 se muestra lo obtenido de este análisis, en el que se puede apreciar que al utilizar una fuente de nitrógeno orgánica se produce un aumento en la formación de acetoína.

Tabla 15: Resultados de análisis estadístico de acetoína.

Compuesto	DAP Aminoácidos	Aumenta Disminuye	DAP H50%-DAP50%	Aumenta Disminuye	DAP/H100%	Aumenta Disminuye
Acetoína	Si	Aumenta	Si	Aumenta	Si	Aumenta

La acetoína es un compuesto producido por la levadura en la fermentación alcohólica, se forma al condensar dos moléculas de ácido pirúvico y su posterior descarboxilación. En la revisión realizada por Jackson, (2008) se atribuye que la sobreexpresión de la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (proceso de glucólisis) da lugar a un aumento en la producción de glicerol, acetaldehído piruvato y acetoína. Por lo que se podría inferir que la fuente de nitrógeno orgánica tiene influencia en la sobreexpreción de esta enzima, explicando así los resultados obtenidos de acetoína. Por otra parte, la acetoína también es formada en la fermentación maloláctica, en la fase estacionaría tardía,

cuando la fuente de energía para las bacterias ácido lácticas es el ácido cítrico (Shimazu, et al., 1985), por lo que resultaría interesante conocer la concentración de ácido cítrico durante la etapa de fermentación alcohólica y maloláctica vs la formación de acetoína.

- Alcoholes

Se obtuvo además, la concentración de metanol y glicerol producido, no presentaron grandes variaciones entre los tratamientos, esto se comprueba con el test de significancia (Tabla 16). El metanol es un compuesto que está presente en los vinos en pequeñas cantidades (a diferencia del glicerol), depende de la maceración de los sólidos de la uva, ya que se forman a partir de la hidrólisis enzimática de los grupos metoxilo de las pectinas durante la fermentación, éstas se encuentran en gran cantidad en las pieles de la uva. En los vinos tintos, el contenido de metanol aceptado se encuentra en concentraciones del orden de 150 mg/l, lo que indica que los vinos obtenidos se encuentran en el rango aceptado, ninguno sobrepasa los 150 mg/l (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Tabla 16: Resultado de análisis estadístico alcoholes.

Compuesto	DAP Aminoácidos	Aumenta Disminuye	DAP H50%-DAP50%	Aumenta Disminuye	DAP/H100%	Aumenta Disminuye
Metanol	No	-	No	-	No	-
Glicerol	No	-	No	-	No	-

Por otra parte, el glicerol es el subproducto más importante de la fermentación alcohólica, los vinos presentaron concentraciones en el rango de 8,0 a 9,3 mg/l. De acuerdo a la bibliografía, es producido por la levadura como una forma de asegurar la reoxidación de la coenzima NADH+, la concentración mínima de glicerol en el vino es de 5 g/l y los valores máximos pueden alcanzar los 15-20 g/l (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

De esta manera, se puede concluir que la procedencia del nitrógeno tiene efecto sobre los compuestos que otorgan sabores y aromas al vino, especialmente los que son metabolizados por la levadura, ya que los nutrientes influyen directamente en su reproducción y metabolismo. En particular, el hidrolizado enzimático de proteínas de

levadura (H100%) tuvo influencia en la producción de alcoholes superiores y ésteres al comparar los resultados con la fuente de nitrógeno control.

4.4. Evaluación sensorial

4.4.1. Entrenamiento

Los resultados obtenidos de la capacitación para la detección de un estímulo realizado a los panelistas presentó un 100% de respuestas correctas, todos los panelistas pudieron distinguir entre el sabor dulce, ácido.

Respecto a la prueba para la detección entre niveles de intensidad de estímulo, los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: Resultados de prueba de detección entre niveles de intensidad de un estímulo.

Atributo	Cantidad de Panelista	Total Respuestas	Total Respuestas Correctas	Total Respuestas Erróneas
Dulzor	8	32	32	0
Acidez	8	32	26	6
Astringencia	8	32	22	10

Los resultados muestran que el atributo de dulzor obtuvo el 100% de respuestas correctas entre los niveles de intensidad. Sin embargo, para la acidez se obtuvieron 26 respuestas correctas de un total de 32, lo que corresponde a un 81,25% de respuestas y un 18,75% de respuestas incorrectas. Para la astringencia se presentaron mayores errores, se obtuvo un total de 22 correctas lo que corresponde a 68,5% de respuestas correctas.

4.4.2. Evaluación de muestras

Los resultados obtenidos en la evaluación sensorial se muestran en la Figura 44. Se observa que el vino obtenido con hidrolizado 50% - DAP 50% como fuente de nitrógeno presentó las calificaciones más bajas de astringencia y acidez, y la mayor calificación para dulzor.

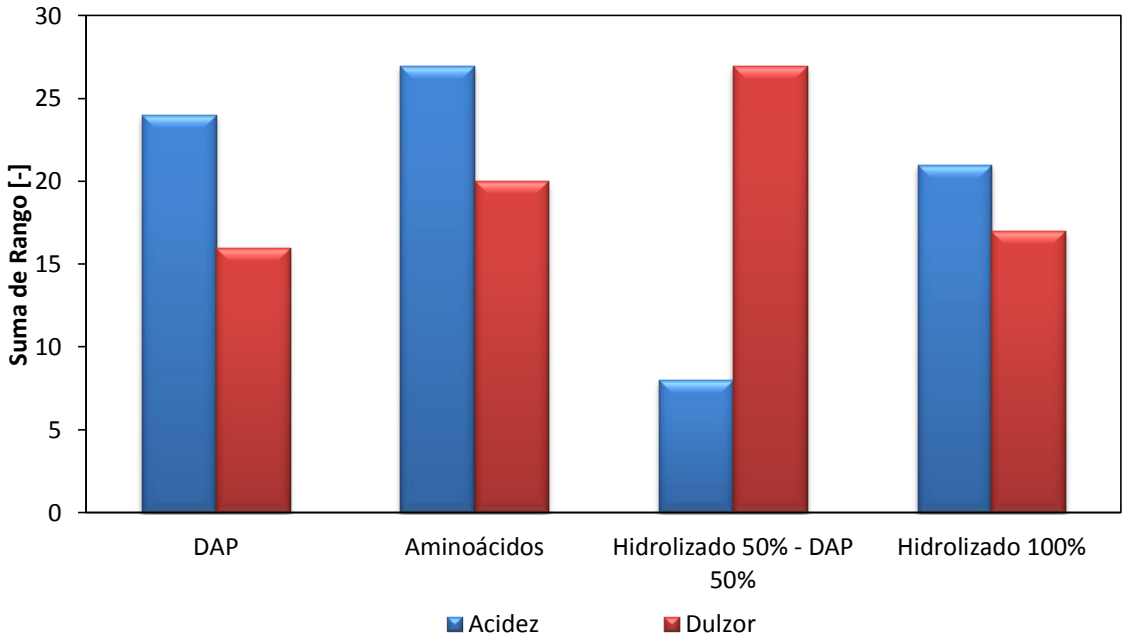

Figura 44: Calificaciones obtenidas para cada atributo en evaluación sensorial.

Se realizó el análisis estadístico de Friedman para determinar si son significativas las diferencias observadas, en la Tabla 18 se encuentran los resultados.

Tabla 18: Análisis estadístico de Friedman para atributos.

Atributo	T	T tabla	Resultado
Acidez	15,75	7,81	Significativo
Dulzor	5,55	7,81	Significativo

Al realizar la comparación múltiple, se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento con H50%-DAP50% y el DAP, aminoácidos y H100% para la acidez. De acuerdo a esto, se percibe más ácido el vino producido con aminoácidos, seguido del DAP, H100% y H50%-DAP50%.

Al contrastar estos resultados con los obtenidos analíticamente para la acidez total (Tabla 19), se observa que el vino percibido como menos ácido coincide con el que obtuvo menor acidez total, correspondiente a H50%-DAP50% (4,45 mg/l de acidez total). Sin embargo, el resto de los resultados difieren. Esto puede tener explicación con los valores de ácido málico y láctico obtenido, en el que el tratamiento con aminoácidos y DAP presentaron las mayores concentraciones de ácido málico, un ácido que se caracteriza por ser percibido con mayor intensidad que el ácido láctico.

Tabla 19: Comparación de resultados analíticos con resultados de evaluación sensorial para la acidez.

	Ácido Málico [mg/L]	Orden de acidez
DAP	1,9	4
Aminoácidos	1,2	3
H50%-DAP50%	0,25	1
H100%	1,05	2

Por otra parte, el dulzor puede ser asociado a la concentración de alcoholes, glicerol y etanol. Al medir el grado alcohólico, el vino que presentó el mayor valor fue el que se produjo utilizando H50%-DAP50%. De la misma manera, el vino que presentó la mayor concentración de glicerol fue en el que se utilizó esta misma fuente. A pesar de que el análisis estadístico entregó como resultado que la concentración obtenida de estos alcoholes no era significativa, se puede apreciar que estas diferencias sí fueron percibidas por los panelistas. Esto podría sugerir que las cantidades obtenidas en otros compuestos que no presentaron efectos significativos estadísticamente sí podrían otorgan diferencias sensoriales al ser evaluados sensorialmente.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

5.1. Conclusión

Se pudo confirmar, a través de los resultados obtenidos en el monitoreo de la fermentación, que ésta se desarrolla de manera efectiva al utilizar hidrolizado enzimático de proteínas de levadura como fuente de nitrógeno.

Además, se pudo apreciar que la fuente de nitrógeno y su procedencia influye en el consumo de azúcar y en la velocidad de fermentación, particularmente se mostraron diferencias al utilizar una fuente de nitrógeno inorgánica de una orgánica, atribuyéndolo a las diferencias en la asimilación del nitrógeno por parte de la levadura.

La procedencia del nitrógeno tiene un efecto en el perfil molecular del vino, se obtuvieron diferencias al comparar los vinos producidos con DAP, AA, H50% y H100% como fuente de nitrógeno. Particularmente tuvo influencia en la formación de alcoholes superiores como 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol. También en la formación de ésteres como acetato de etilo y lactato de etilo.

La evaluación sensorial permitió concluir que las diferencias en la concentración de ácidos, obtenidas analíticamente, son percibidas por el consumidor. Además, sugiere que el uso del hidrolizado enzimático de proteínas influye positivamente en la calidad del vino obtenido, ya que los vinos en que se utilizó esta fuente de nitrógeno presentaron mejor calificación que el resto de los experimentos.

5.2. Recomendaciones y proyecciones

Para futuras investigaciones, se recomienda establecer una estrategia que permita asegurar una mayor repetitividad en los experimentos, temperatura controlada, agitación y trampa de dióxido de carbono principalmente, dando paso así a estudiar el efecto que tiene integrar tiempos de aireación y el tiempo de adición de la fuente de nutrientes sobre el perfil molecular que resulta al utilizar hidrolizado de proteínas de levadura. Además, se recomienda asegurar el desarrollo completo de la fermentación maloláctica inoculando la población de bacterias adecuada. Por último, se recomienda realizar una evaluación sensorial con un panel entrenado, para así establecer si existen diferencias en

la producción de compuestos volátiles, alcoholes superiores y ésteres en particular, los cuales se caracterizan por aportar en aromas y sabores, florales, frutales, entre otros.

Como proyecciones de esta investigación, se sugiere estudiar cómo la adición de esta fuente de nitrógeno, hidrolizado enzimático de proteínas de levadura, afecta el desarrollo de la fermentación. Para esto se propone, la medición de los alcoholes superiores y ésteres correspondientes a medida que se lleva a cabo la fermentación alcohólica y maloláctica, para así evidenciar de mejor forma cómo la adición de nitrógeno y la procedencia de éste afectan a la síntesis de estos compuestos de aroma.

En esta investigación se obtuvo un aumento en la producción de alcoholes superiores, como 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butano, 2-metil-1-propanol y 1-propanol. Teniendo en cuenta de que estos compuestos se generan a partir del catabolismo de los aminoácidos, se podría inferir que el uso de hidrolizado enzimático de proteína provoca que la ruta predominante en la formación de alcoholes superiores sea a partir del catabolismo de estos aminoácidos.

CAPÍTULO 6

REFERENCIAS

REFERENCIAS

Alexandre, H., Heintz, D., Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Charpentier, C., & Feuillat, M. (2001). Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *26*(4), 235–40.

Anjos, G. (2008). *Characterisation of the aroma components of clonal grapes and wines from Aragonez and Trincadeira Vitis viniferra L. cultivars*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Banfi, S. (2014). Boletín de vinos y pisco: producción, precios y comercio exterior.

Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2009). Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by Saccharomyces cerevisiae wine strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *108*(2), 99–104.

Barbosa, C., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2012). The nitrogen source impacts major volatile compounds released by Saccharomyces cerevisiae during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *160*(2), 87–93.

Bell, S. J., & Henschke, P. a. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(3), 242–295.

Blateyron, L., & Sablayrolles, J. M. (2001). Stuck and slow fermentation in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *91*, 184–189.

Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., & Kunkee, R. (1998). *Principles and practices of winemaking*. Meryland: Aspen.

Bustamante, M. A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., & Pérez-Murcia, M. D. (2008). Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management*, *28*(2), 372–380.

Eltran, G. E. B., Arzoso, B. R. E. S., & Oze, N. I. R. (2005). Influence of the Timing of Nitrogen Additions during Synthetic Grape Must Fermentations on Fermentation Kinetics and Nitrogen Consumption, 996–1002.

Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2008). Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, *41*(3), 501–510.

Gobierno de Chile. (2009). Ley 18.455: Fija normas sobre producción, elaboración y comercialización de alcoholes etílicos, bebidas alcohólicas y vinagres. *Diario Oficial*. Retrieved from https://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=29859

Grainger, K., & Tattersall, H. (2005). *Wine Production: Vine to Bottle*. Oxford: Blackwell.

Guitián, C. (2015). Principales exportadores de vino en 2014. Retrieved August 12, 2016, from http://www.elmundo.es/grafico/economia/2015/03/23/55105e8522601d2b7a8b4580.html

Hernández-Orte, P., Ibarz, M. J., Cacho, J., & Ferreira, V. (2005). Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chemistry*, *89*(2), 163–174.

Jackson, R. S. (2008). *Wine science: Principles and applications* (3rd ed.). Academic Press, Elsevier.

Jacobson, J. (2006). *Introduction to Wine Laboratory Practices and Procedures*. New York, USA: Springer.

Kim, M. (2014). Five stages of the wine winemaking process. Retrieved August 12, 2016, from http://laurelgray.com/5-stages-wine-making-process/

Lallemand. (2010). Winemaking update, *3*(2), 1–2.

Lallemand. (2014). *The state of the Art: Yeast Nutrition and Protection for Reliable Alcoholic Fermentation*.

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

Maarse, H., & Groenen, P. J. (1975). Aroma Research. In *Proceedings of the International Symposium on Aroma Research held at the Central Institute for Nutrition and Food Research TNO*.

Magasanik, B., & Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in Saccharomyces cerevisiae. *Gene*, *290*, 1–18.

McCarthy, A., O'Callaghan, Y., & O'Brien, N. (2013). Protein Hydrolysates from Agricultural Crops—Bioactivity and Potential for Functional Food Development. *Agriculture*, *3*(1), 112–130.

Meilgaard, M. C., Carr, B. T., & Civille, G. V. (2007). *Sensory Evaluation Techniques, Fourth Edition* (3rd ed.). CRC Press.

Moldes, A. B., Vázquez, M., Domínguez, J. M., Díaz-Fierros, F., & Barral, M. T. (2008). Negative effect of discharging vinification lees on soils. *Bioresource Technology*, *99*(13), 5991–5996.

Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). *Wine chemistry and biochemistry*. Madrid: Springer.

Nielsen, P. m., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, *66*(5), 642–646.

ODEPA. (2016). Vides: Superficie y Producción. Retrieved August 12, 2016, from http://www.odepa.cl/vides-superficie-y-produccion-3/

OIV. (2016). Código Internacional de Prácticas Enológicas. Retrieved August 12, 2016, from http://www.oiv.int/public/medias/3752/f-code-i-31es.pdf

Oliveira, M., & Duarte, E. (2016). Integrated approach to winery waste: waste generation and data consolidation. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, *10*(1), 168–176.

Pasupuleti, V., & Demain, A. (2014). *Protein Hydrolysate in Biotechnology*. *Igarss 2014*. USA: Springer.

Pérez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Salgado, J. M., Oliveira, R. P. de S., & Domínguez, J. M. (2015). Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. *Waste Management*, *40*, 72–81.

Rapp, A., & Versini, G. (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Developments in Food Science*, *37*(C), 1659–1694.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Duboudieu, D. (2006). *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition*. *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition* (Vol. 2).

Robinson, A. (2011). *Environmental Influences on Grape Aroma Potential*. The University of

Western Australia.

Rojas, P. (2016). *Factibilidad del uso de hidrolizado enzimático de levaduras como fuente de nitrógneo orgánica en la fermentación vínica*. Universidad Técnica Federico Santa María.

Shimazu, Y., Uehara, M., & Watanabe, M. (1985). Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. *Agriculture and Biological Chemistry*, *49*(7), 2147–2157.

Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. a., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(2), 139–173.

Torrea, D. (2003). Production of volatile compounds in the fermentation of Chardonnay musts inoculated with two strains of Saccharomyces cerevisiae with different nitrogen demands. *Food Control*, *14*(8), 565–571.

Trioli, G., Sacchi, A., Corbo, C., & Trevisan, M. (2015). Impacto Mediambiental de los Recursos Utilizados en Cultivo de Vid y Producción de Vino: Estudio a Nivel Europeo. *Revista Internet de Viticultura Y Enología*, *8/1*. Retrieved from http://www.infowine.com/es/art_culos_tecnicos/impacto_medioambiental_de_los_recursos_utilizados_en_cultivo_de_vid_y_producci_n_de_vino_estudio_a_nivel_europeo_sc_12788.htm

Ventosa, E., Clemente, R., & Pereda, L. (2011). *Gestión Integral de Residuos y Análisis del ciclo de vida del sector vinícola: De residuos a productos de alto valor añadido.* Retrieved from www.haprowine.eu

Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S., & Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(1), 145–157.

CAPÍTULO 7:

ANEXOS

ANEXOS

7.1. Protocolo de fermentación

A continuación se detalla el protocolo seguido para llevar a cabo las fermentaciones.

- **Preparación de materiales**

Todo el material de vidrio para análisis y almacenamiento de muestras debe esterilizarse en Autoclave por 18 min a 121 °C. Para el caso de material no autoclavable, que se encuentre en contacto directo o indirecto con el mosto debe someterse a una higienización con metabisulfito, para esto se prepara una solución de 2% de metabisulfito de potasio, se sumergen en totalidad los implementos o materiales dentro la solución y se dejan reposar durante 12 h, posteriormente se vierte agua hirviendo y finalmente se lavan los instrumentos con agua destilada.

- **Preparación y acondicionamiento del mosto**
  - **Sulfitado**

Se determina la concentración de sulfito en el mosto (medición SO_2 total y libre), luego se debe añadir al mosto SO_2 en forma de $K_2S_2O_5$ hasta lograr una concentración mayor o igual a 30 mg/L.

  - **Ajuste de nitrógeno asimilable**

Se determina la cantidad de nitrógeno asimilable por la levadura (YAN) presente en el mosto y se ajusta para llegar a una concentración superior a los 200-250 mg/L para asegurar el crecimiento y la reproducción de las levaduras. En la industria el reactivo más utilizado para ajustar nitrógeno asimilable corresponde a DAP.

- Ajuste pH

El pH se debe ajustar a 3,45 con soluciones ácidas o básicas, las más utilizadas corresponden a ácido tartárico y carbonato de sodio.

- **Preparación del inóculo**

La dosis de levadura recomendada es cercana a 0,1 a 0,2 gramos de levadura seca por litro de mosto, dando una concentración inicial de 10^6 células/ml. Se mezcla la levadura

con una mezcla de mosto y agua destilada en razón 1:1, se dejan reactivar por 30 min, agitando a los 5, 10 y 15 min. Antes de inocular la levadura al fermentador se debe verificar que la diferencia de temperatura entre la levadura y el mosto dentro del fermentador sea menor a 5 °C.

- **Fermentación**

La fermentación comienza cuando la levadura entra en contacto con el mosto en el fermentador. Los parámetros operacionales se deben mantener en los rangos de trabajo por lo que se deben ajustar si es que no se posee control automático de ellos.

Habitualmente la concentración inicial de azúcar se encuentra entre 220 a 240 g/l, lo que equivale entre 22 a 24 °Brix, la fermentación alcohólica completa se produce a los 7 días cuando los azúcares residuales fermentables en el vino llegan a menos de 2 g/l.

- **Seguimiento de la fermentación**

Durante la fermentación se determinan distintas variables, las más comunes son: densidad, °Brix, azúcares reductores, etanol o grado alcohólico, acidez total y volátil, células totales y viables, YAN, SO_2 total y libre. La frecuencia de la toma de muestras depende del estudio.

7.2. Procedimientos

7.2.1. Preparación de inóculo

Materiales:

- Vaso precipitado
- Termómetro

Procedimiento:

Se tomaron 20 ml de mosto y 20 ml de agua en un vaso precipitado, se calienta la mezcla en una placa calefaccionada hasta llegar a los 37,5 °C, se añaden 4 g de levadura. Durante 5 min se mantiene entre los 36 °C y los 39 °C, al finalizar los 5 min se revuelve la mezcla y se deja durante 10 min sin volver a revolver en el mismo rango de temperatura. Al finalizar los 10 min se revuelven y se repite el mismo procedimiento 15 min después.

7.2.2. Determinación de pH

Materiales:

- pH-metro
- Buffer de calibración
- Solución ácido tartárico
- Solución carbonato de potasio
- gotario

Procedimiento:

- Calibración: Se calibra el electrodo antes de medir, esto se realiza con soluciones estándares de pH 4 y 7. Se coloca el electrodo y la termocupla dentro de la solución pH 4, se presiona “cal”, posteriormente el electrodo se lava con agua destilada y se seca, se introduce en la solución pH 7 y se presiona “enter”.
- Medición: Una vez calibrado se puede realizar la medición, esto se realiza insertando el electrodo y la termocupla en el recipiente que contiene el mosto, se registran los valores de pH y temperatura.
- Ajuste de pH: La corrección de pH se realiza con un gotario, se añaden gotas de solución ácida si el pH se encuentra por sobre 3,45 y se añaden gotas de carbonato de potasio si el pH se encuentra por debajo de 3,45.

7.2.3. Nitrógeno asimilable

Esta medición se realiza con un titulador automático (marca LabTec) a través del Método de Sörensen, el procedimiento seguido se describe a continuación.

Procedimiento:

- Calibración: Se realiza con los estándares de pH 7 y 10. Se presiona "CAL" y se siguen las instrucciones que indica el equipo, una vez calibrado se entrega el valor de error.
- Medición: Se toman 3 ml de mosto en un vaso plástico y se añade agua destilada hasta completar los 60 ml. Se establece como set point pH 8 y se comienza la titulación con NaOH. Una vez alcanzado el pH 8 se añaden 2 ml de Formol y se lleva a pH 8 nuevamente. Se registra el valor del segundo volumen añadido.

7.2.4. SO_2 total y libre

Se utilizó el equipo mini titulador de sulfuroso libre y total HI 84100, HANNA.

Procedimiento:

- Calibración: Se titula el reactivo 84100-50 y se deja purgar unas gotas para asegurar la limpieza de la manguera. Se miden 50 ml de estándar en el vaso que utiliza el equipo. Se añaden 20 ml de reactivo ácido HI 84100-53 y un sobre de HI 84100-54. Se coloca el electrodo dentro de esta solución y un agitador magnético. Se inserta la punta de dosificación en la solución y se presiona el botón CAL para iniciar la calibración.
- Medición: Se transfiere al vaso de medición 50 ml de mosto y se realiza el mismo procedimiento que en calibración. Se presiona "Start/Stop" para iniciar o detener medición. Registrar el valor que muestra el equipo.

7.2.5. Acidez

- Calibración: Se realiza con los estándares de pH 7 y 10. Se presiona "CAL" y se siguen las instrucciones que indica el equipo, una vez calibrado se entrega el valor de error.

- Medición: Se toman 3 ml de mosto en un vaso plástico y se añade agua destilada caliente hasta completar los 60 ml, se deja enfriar. Se establece como set point pH 7 y se comienza la titulación con NaOH. Se registra el valor de volumen añadido.

7.2.6. °Brix

Materiales:

- Refractómetro
- Gotario

Procedimiento:

- Se calibra el equipo con agua destilada.
- Se toma la muestra con un gotario y se coloca en el prisma del refractómetro.
- Presionar "read" y registrar el valor. Repetir el mismo procedimiento dos veces.

7.2.7. Turbidez

Esta medición se realiza con un turbidímetro, se entregan los resultados en unidad NTU, se recomienda realizar la medición en duplicado.

Procedimiento:

- Se calibra el equipo según manual.
- El equipo cuenta con pequeños frascos de vidrio en donde se realizan las mediciones, se diluye la muestra con agua destilada en estos frascos de acuerdo a lo deseado.
- Se limpia la superficie del frasca, se agita y luego se presiona "Read".
- Se registra el valor y se continúa con el mismo procedimiento para las otras muestras.
- Se apaga el equipo al terminar.

7.2.8. Azúcares reductores

Se realiza según el método DNS, el protocolo de preparación del reactivo DNS se encuentra en Anexo 6.5.

Procedimiento:

- Preparar la curva de calibración.

- Preparar la dilución de las muestras de acuerdo al rango de absorbancia indicado por la calibración.
- Se toma 1 ml de muestra y se transfiere a un tubo falcon de 15 ml, se añaden 3 gotas de solución de NaOH al 10% y 1 ml de solución de reactivo DNS.
- Homogeneizar la solución de cada tubo y dejar en baño a ebullición por 5 min.
- Retirar del agua caliente y enfriar en baño con hielo por 5 min.
- Traspasar a matraz de aforo de 10 ml y aforar con agua destilada.
- Dejar reposar durante 15 min.
- Leer la absorbancia, la muestra y el blanco de reactivo a una longitud de onda de 540 nm, frente a un blanco de agua.

7.3. Cuantificación de azúcares reductores mediante análisis DNS

El método consiste en que al combinar un azúcar reductor con el ácido 3,5-dinitrosalicílico, el grupo funcional aldehído (glucosa) o cetónico (fructosa) del azúcar, son oxidados a grupos carboxilos, mientras que el ácido 3,5-dinitrasalicílico es reducido a ácido 3-amino,5-nitrosalicílico, el cual tiene una coloración naranja cuya intensidad es proporcional a la concentración del azúcar. La determinación de la absorbancia se realiza a una longitud de onda de 540 nm.

- **Preparación del reactivo DNS:**

Se disuelven 8 gramos de NaOH en 200 ml de agua destilada y se agita hasta que se disuelva completamente. Posteriormente se añaden 250 gramos de tartrato de sodio de potasio mientras se agita y se aumenta la temperatura entre 30 y 40 °C]. Además, se añade agua paulatinamente hasta 400 ml, se agita hasta que se disuelva. Finalmente, se agregan 5 gramos de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) lentamente hasta que se disuelva, una vez disuelto se trasvasija y se completa hasta 500 ml con agua destilada.

- **Curva de calibración:**

Se prepara una solución de glucosa 0,01 M, a partir de esto se toman alícuotas de 5, 10,15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 ml. Se traspasa a matraz de aforo de 50 ml y se afora con agua destilada. La concentración de glucosa en los matraces corresponde a 0,001; 0,002; 0,003; 0,004; 0,005; 0,006; 0,007 y 0,008 M, respectivamente.

Transferir 1 ml de cada una de las soluciones de calibración a diferentes tubos falcon, además de un blanco de reactivo. A cada tuvo adicionar 3 gotas de solución de NaOH al 10% y 1 ml de solución de reactivo DNS. Se homogeniza la solución de cada tubo y se lleva a un baño de ebullición por 5 min, se retira del agua caliente y se deja enfriar en un baño con hielo por 5 min. Posteriormente, se traspasa a matraz de aforo de 10 ml y se afora con agua destilada. Se deja reposar por 15 min y se mide la absorbancia de cada punto de la curva y el blanco de reactivo a una longitud de onda de 540 nm frente a un blanco con agua.

- **Medición de muestras:**

El procedimiento de medición es análogo al realizado para obtener curva de calibración.

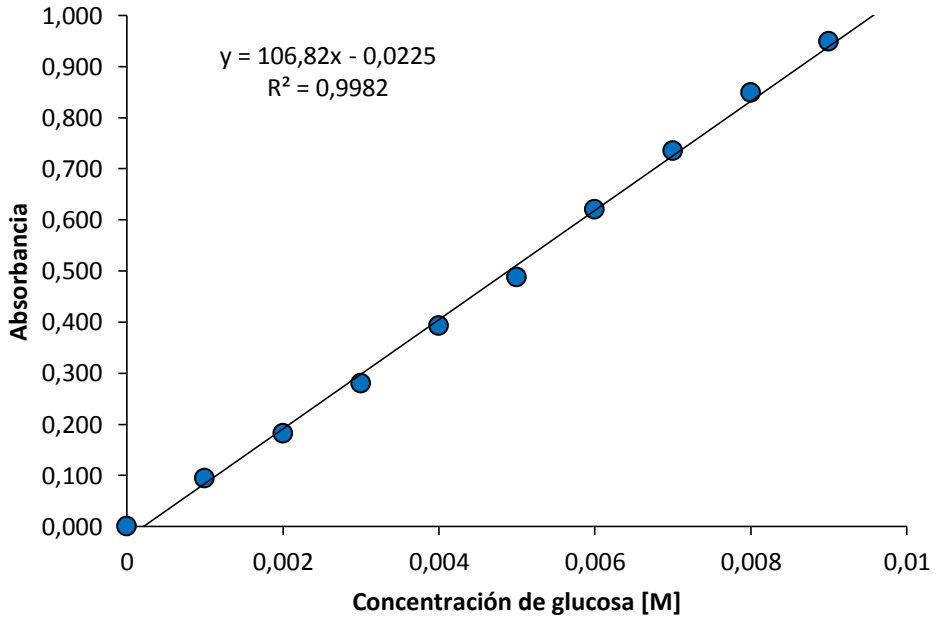

Figura 45: Curva de calibración de glucosa para método DNS.

7.4. Tablas de resultados experimentales

7.4.1. Resultados seguimiento de fermentación

A continuación se informan las tablas de los resultados obtenidos durante la fermentación alcohólica utilizando distintas fuentes de nutrientes.

Tabla 20: Variación de turbidez en fermentaciones con distintas fuentes de nutrientes.

Turbidez [NTU]				
Tiempo	**DAP**	**AA**	**H 50%**	**H 100%**
0	3005	3073	3150	3003
11	3305	3488	4163	5108
22	3348	3505	3720	3793
35	3360	4188	3460	3698
46	3783	4220	3315	3728
59	4228	4735	3285	3638
70	4153	5325	3425	3895
83	4718	4048	4005	4533
94	4513	4790	4223	5415
107	4095	5443	4440	5148
131	4903	6248	4653	5913
155	4843	5983	4708	5198
179	7293	7810	6505	7420
203	6810	8033	5425	8433
227	6073	7760	6828	7008
Desviación Estándar				
Tiempo	**DAP**	**AA**	**H 50%**	**H 100%**
0	78	279	163	202
11	35	202	46	308
22	159	361	127	414
35	318	1474	552	131
46	343	1181	163	286
59	25	297	85	103
70	258	78	219	134
83	619	1524	198	583
94	1092	933	647	813
107	905	180	580	1404
131	124	53	81	682
155	979	1347	322	46
179	937	820	403	1365
203	1011	46	841	902
227	951	92	909	1276

Tabla 21: Variación de sólidos solubles [°Brix] en fermentaciones con distintas fuentes de nutrientes.

Sólidos Solubles [°Brix]				
Tiempo	**DAP**	**AA**	**H 50%**	**H 100%**
0	22	21	21	22
11	21	21	21	22
22	21	21	21	22
35	21	21	21	21
46	21	20	20	21
59	19	18	19	20
70	18	17	17	19
83	16	14	16	17
94	15	12	14	15
107	13	10	13	14
131	11	8	10	11
155	9	7	9	9
179	7	7	8	8
203	7	7	7	7
227	7	7	7	7
Desviación Estándar				
Tiempo	**DAP**	**AA**	**H 50%**	**H 100%**
0	1	0	0	1
11	0	0	0	1
22	0	0	0	1
35	0	0	0	1
46	1	0	1	1
59	1	0	1	1
70	1	1	1	1
83	1	1	1	1
94	1	1	1	1
107	1	1	1	1
131	0	1	0	1
155	1	0	1	0
179	1	0	0	0
203	0	0	0	0
227	0	0	0	0

Tabla 22: Pendiente de velocidad de variación de sólidos solubles

Pendiente de velocidad			
DAP	**AA**	**H 50%**	**H 100%**
-0,033	-0,049	-0,039	-0,028
-0,050	-0,082	-0,065	-0,047
-0,079	-0,120	-0,094	-0,080
-0,106	-0,146	-0,115	-0,109
-0,125	-0,166	-0,126	-0,128
-0,125	-0,172	-0,139	-0,147
-0,112	-0,163	-0,142	-0,159
-0,095	-0,135	-0,137	-0,158
-0,076	-0,097	-0,124	-0,145
-0,125	**-0,172**	-0,142	-0,159

Tabla 23: Variación de nitrógeno en fermentaciones con DAP y aminoácidos como fuente de nutrientes.

	Nitrógeno			
	DAP		Aminoácidos	
Tiempo	**Promedio**	**Desviación**	**Promedio**	**Desviación**
0	228,4	4,3	212,6	3,2
11	205,6	3,3	182,6	1,3
22	189,4	2,2	159,4	14,2
35	181,7	4,4	150,2	16,3
46	167,9	15,2	138,6	10,9
59	153,2	29,4	112,4	15,2
70	133,2	27,2	99,3	22,9
83	87,0	5,4	80,1	21,8
94	75,8	1,3	92,6	35,7
107	72,0	1,3	83,3	22,5
131	65,5	0,0	79,5	25,1
155	67,1	2,5	67,1	10,0
179	55,6	6,2	71,5	6,2
203	57,4	1,2	76,0	15,0
227	59,2	3,7	82,1	1,2

Tabla 24: Variación de acidez total en fermentaciones con distintas fuentes de nutrientes

Acidez Total				
Tiempo	**DAP**	**AA**	**H 50%**	**H 100%**
0	4,5	4,6	4,1	4,5
11	4,9	4,9	5,0	4,9
22	5,2	5,2	5,2	5,0
35	5,4	5,7	5,3	5,1
46	5,3	5,3	5,4	5,3
59	5,6	5,6	5,7	5,6
70	5,8	5,7	5,9	5,7
83	6,3	5,8	6,1	5,8
94	7,9	7,7	6,2	6,3
107	8,1	7,6	6,1	6,1
131	8,0	7,9	6,2	6,5
155	7,5	7,2	6,6	6,5
179	8,5	8,0	7,2	6,7
203	8,5	7,9	7,1	6,9
227	8,5	8,2	7,5	7,4
Desviación Estándar				
Tiempo	**DAP**	**AA**	**H 50%**	**H 100%**
0	0,1	0,4	0,4	0,4
11	0,2	0,4	0,3	0,4
22	0,1	0,5	0,3	0,3
35	0,1	0,9	0,4	0,2
46	0,4	0,4	0,5	0,4
59	0,0	0,3	0,5	0,2
70	0,1	0,6	0,4	0,2
83	0,4	0,3	0,3	0,3
94	0,2	0,4	0,5	0,3
107	0,3	0,5	0,3	0,4
131	0,1	0,6	0,1	0,4
155	0,4	0,6	0,3	0,4
179	0,0	0,1	0,2	0,4
203	0,2	0,6	0,2	0,9
227	0,1	0,3	0,5	0,9

7.4.2. Resultados de parámetros generales

Tabla 25: Resultados Acidez Total, Ácido Málico-Láctico-Tartárico, Acidez Volátil.

	DAP	Aminoácidos (1)	Aminoácidos (2)	Hidrolizado 50% DAP 50%	Hidrolizado 100%
Acidez Total [g ác. Tart./L]	5,1	5,3	4,4	4,45	4,95
Ácido Málico [g/L]	1,9	1,8	0,3	0,25	1,05
Ácido Láctico [g/L]	0,25	0,2	1,4	1,65	0,85
Ácido Tartárico [g/L]	1,4	1,60		1,45	1,6
Ácidez Volátil [g ác. Acét./L]	0,455	0,68		0,71	0,66

DESVIACIONES

	DAP	Aminoácidos (1)	Aminoácidos (2)	Hidrolizado 50% DAP 50%	Hidrolizado 100%
Acidez Total [g ác. Tart./L]	0,28	-	-	0,30	0,91
Ácido Málico [g/L]	0,14	-	-	0,07	0,21
Ácido Láctico [g/L]	0,07	-	-	0,07	0,07
Acido Tartárico [g/L]	0,00	0,00		0,07	0,14
Acidez Volátil [g ác. Acét./L]	0,02	0,04		0,06	0,01

Tabla 26: Resultados Azúcares Reductores.

Muestras	Absorbancia	Modelo	Dilución	Concentración [g/L]
DAP 1	0,42	0,00414	2	1,49
DAP 2	0,39	0,00381	2	1,37
Aminoácidos 1	0,45	0,00445	2	1,60
Aminoácidos 2	0,37	0,00366	2	1,32
Hidrolizado50%-DAP50% 1	0,43	0,00424	2	1,53
Hidrolizado50%-DAP50% 2	0,36	0,00358	2	1,29
Hidrolizado100% 1	0,42	0,00411	2	1,48
Hidrolizado100% 2	0,38	0,00381	2	1,37

7.4.3. Resultados de compuestos volátiles mayoritarios

Tabla 27: Resultados de mediciones de Compuestos Volátiles Mayoritarios.

	Promedios			
Concentración	**DAP**	**Aminoácidos**	**Hidrolizado 50% DAP 50%**	**Hidrolizado 100%**
1-Propanol [mg/L]	67,83	59,52	52,28	46,64
2-Metil-1-Propanol [mg/L]	71,48	91,69	94,01	76,77
2-Metil-1-Butanol [mg/L]	61,48	54,75	62,25	73,29
3-Metil-1_Butanol [mg/L]	231,16	189,32	236,82	260,09
2-Feniletanol [mg/L]	62,77	38,73	68,43	68,40
1-Hexanol [mg/L]	2,16	2,65	2,28	2,25
Metanol mg/L]	0,09	0,09	0,10	0,09
Glicerol [g/L]	8,62	8,02	9,27	8,83
Acetato de etilo [mg/L]	109,24	183,29	143,55	134,24
Lactato de etilo [mg/L]	4,26	6,51	10,17	3,89
Succinato de etilo [mg/L]	1,20	1,56	1,93	1,58
Acetaldehído	75,79	93,47		90,69
Acetoína	5,60	8,80	12,51	7,01
	Desviación Estándar			
	DAP	**Aminoácidos**	**Hidrolizado 50% DAP 50%**	**Hidrolizado 100%**
1-Propanol [mg/L]	2,81	8,54	0,50	3,59
2-Metil-1-Propanol [mg/L]	0,40	7,77	4,02	2,90
2-Metil-1-Butanol [mg/L]	0,15	5,32	3,98	4,71
3-Metil-1_Butanol [mg/L]	6,91	26,97	11,57	19,98
2-Feniletanol [mg/L]	2,46	8,21	4,22	6,11
1-Hexanol [mg/L]	0,14	0,28	0,33	0,27
Metanol mg/L]	0,01	0,02	0,00	0,00
Glicerol [g/L]	0,54	0,24	0,04	0,05
Acetato de etilo [mg/L]	28,83	28,31	21,67	18,50
Lactato de etilo [mg/L]	0,10	3,21	0,31	0,33
Succinato de etilo [mg/L]	0,19	0,71	0,27	0,56
Acetaldehído	5,57	0,38		5,68
Acetoína	0,93	1,54	1,01	1,41

7.5. Análisis estadístico de diferencias significativas: Prueba t de Student

7.5.1. Procedimiento

Para determinar si existe relación entre la fuente de nitrógeno utilizada y cada parámetro se realizó un test de significancia, en el que se quiere averiguar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Se utilizó la prueba t, ésta consiste establecer una hipótesis nula H_0 y una hipótesis contraria H_1.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Se calcula un valor estadístico t_0 y se compara con el valor de una distribución t de Student $t_{\frac{\alpha}{2};n_1+n_2-2}$. De tal manera que:

Si $|t_0| > t_{\frac{\alpha}{2};n_1+n_2-2}$ entonces se rechaza H_0 y se concluye que los resultados son significativamente distintos.

$$t_0 = \frac{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}{S_p\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde $\bar{y}_1$ e $\bar{y}_2$ representan el promedio de los experimentos, n_1 y n_2 el tamaño de las muestras y S_p se calcula de la siguiente manera:

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

Donde S_1^2 y S_2^2 son las varianzas muestrales.

7.5.2. Resultados

Parámetros generales

Tabla 28: Análisis de significancia t de Student: Acidez Total

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencias son significativas?
DAP/Aminoácidos (1)	0,58	4,3	No
DAP/Aminoácidos (2)	2,02	4,3	No
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	3,15	4,3	No
DAP/Hidrolizado 100%	0,60	4,3	No
Aminoácidos (1)/Hidrolizado 50% DAP 50%	9,81	4,3	Si
Aminoácidos (1)/Hidrolizado 100%	1,35	4,3	No
Aminoácidos (2)/Hidrolizado 50% DAP 50%	0,58	4,3	No
Aminoácidos (2)/Hidrolizado 100%	2,12	4,3	No
Hidrolizado 50% DAP 50%/Hidrolizado 100%	3,16	4,3	No

Tabla 29: Análisis de significancia t de Student: Ácido Málico

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencias son significativas?
DAP/Aminoácidos (1)	1,00	4,3	No
DAP / Aminoácidos (2)	16,00	4,3	Si
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	14,76	4,3	Si
DAP/Hidrolizado 100%	4,710	4,3	Si
Aminoácidos (1) / Hidrolizado 50% DAP 50%	31,00	4,3	Si
Aminoácidos (1) / Hidrolizado 100%	5,00	4,3	Si
Aminoácidos (2) / Hidrolizado 50% DAP 50%	1,00	4,3	No
Aminoácidos (2) / Hidrolizado 100%	5,00	4,3	Si
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	-5,06	4,3	Si

Tabla 30: Análisis de significancia t de Student: Ácido Láctico

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencias son significativas?
DAP/Aminoácidos (1)	1,00	4,3	No
DAP / Aminoácidos (2)	23,00	4,3	Si
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	19,80	4,3	Si
DAP/Hidrolizado 100%	8,49	4,3	Si
Aminoácidos (1) / Hidrolizado 50% DAP 50%	29,00	4,3	Si
Aminoácidos (1) / Hidrolizado 100%	11,00	4,3	Si
Aminoácidos (2) / Hidrolizado 50% DAP 50%	5,00	4,3	Si
Aminoácidos (2) / Hidrolizado 100%	11,00	4,3	Si
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	11,31	4,3	Si

Tabla 31: Análisis de significancia t de Student: Ácido Tartárico

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencias son significativas?
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	1,00	4,3	No
DAP/Hidrolizado 100%	2,00	4,3	No
Aminoácido / Hidrolizado 50% DAP 50%	3,00	4,3	No
Aminoácidos / Hidrolizado 100%	0	4,3	No
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	1,34	4,3	No

Tabla 32: Análisis de significancia t de Student: Acidez Volátil

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencias son significativas?
DAP/Aminoácidos	7,55	4,3	Si
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	5,97	4,3	Si
DAP/Hidrolizado 100%	11,37	4,3	Si
Aminoácido / Hidrolizado 50% DAP 50%	0,74	4,3	No
Aminoácidos / Hidrolizado 100%	0,56	4,3	No
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	1,21	4,3	No

Tabla 33: Análisis de significancia t de Student: Grado Alcohólico.

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencias son significativas?
DAP/Aminoácidos	0,24	4,3	No
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	1,34	4,3	No
DAP/Hidrolizado 100%	0,14	4,3	No
Aminoácidos / Hidrolizado 50% DAP 50%	0,45	4,3	No
Aminoácidos / Hidrolizado 100%	0,00	4,3	No
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	0,27	4,3	No

Tabla 34: Análisis de significancia t de Student: pH

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencias son significativas?
DAP/Aminoácidos	7,00	4,3	Si
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	3,35	4,3	No
DAP/Hidrolizado 100%	1,26	4,3	No
Aminoácidos / Hidrolizado 50% DAP 50%	4,00	4,3	No
Aminoácidos / Hidrolizado 100%	0,33	4,3	No
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	1,94	4,3	No

Compuestos volátiles mayoritarios

Tabla 35: Análisis de significancia t de Student: 1-Propanol

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencia es significativa?
DAP/Aminoácidos	1,85	2,45	No
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	10,90	2,45	Si
DAP/Hidrolizado 100%	9,30	2,45	Si
Aminoácidos / Hidrolizado 50% DAP 50%	1,69	2,45	No
Aminoácidos / Hidrolizado 100%	2,78	2,45	Si
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	3,12	2,45	Si

Tabla 36: Análisis de significancia t de Student: 2-Metil-1-Propanol

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencia es significativa?
DAP/Aminoácidos	3,47	2,78	Si
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	7,47	2,78	Si
DAP/Hidrolizado 100%	2,42	2,78	No
Aminoácidos / Hidrolizado 50% DAP 50%	0,53	2,45	No
Aminoácidos / Hidrolizado 100%	3,60	2,45	Si
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	6,96	2,45	Si

Tabla 37: Análisis de significancia t de Student: 2-Metil-1-Butanol

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencia es significativa?
DAP/Aminoácidos	2,53	2,45	No
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	0,39	2,45	No
DAP/Hidrolizado 100%	5,01	2,45	Si
Aminoácidos / Hidrolizado 50% DAP 50%	2,26	2,45	No
Aminoácidos / Hidrolizado 100%	5,22	2,45	Si
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	3,58	2,45	Si

Tabla 38: Análisis de significancia t de Student: 3-Metil-1-Butanol

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencia es significativa?
DAP/Aminoácidos	3,01	2,45	Si
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	0,84	2,45	No
DAP/Hidrolizado 100%	2,74	2,45	Si
Aminoácidos / Hidrolizado 50% DAP 50%	3,24	2,45	Si
Aminoácidos / Hidrolizado 100%	4,22	2,45	Si
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	2,02	2,45	No

Tabla 39: Análisis de significancia t de Student: Lactato de etilo.

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencia es significativa?
DAP/Aminoácidos 1	7,05	2,78	Si
DAP/Aminoácidos 2	-20,32	2,78	Si
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	-36,37	2,45	Si
DAP/Hidrolizado 100%	2,12	2,45	No
Aminoácidos 1 / Hidrolizado 50% DAP 50%	27,68	2,78	Si
Aminoácidos 1 / Hidrolizado 100%	0,66	2,78	No
Aminoácidos 2 / Hidrolizado 50% DAP 50%	-3,63	2,78	Si
Aminoácidos 2 / Hidrolizado 100%	20,75	2,78	Si
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	27,69	2,45	Si

Tabla 40: Análisis de significancia t de Student: Succinato de etilo.

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencia es significativa?
DAP/Aminoácidos 1	1,49	2,78	No
DAP/Aminoácidos 2	5,84	2,78	Si
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	4,50	2,45	Si
DAP/Hidrolizado 100%	1,30	2,45	No
Aminoácidos 1 / Hidrolizado 50% DAP 50%	4,51	2,78	Si

Aminoácidos 1 / Hidrolizado 100%	1,46	2,78	No
Aminoácidos 2 / Hidrolizado 50% DAP 50%	1,03	2,78	No
Aminoácidos 2 / Hidrolizado 100%	1,36	2,78	No
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	1,36	2,45	No

Tabla 41: Análisis de significancia t de Student: Acetaldehído.

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencia es significativa?
DAP/Aminoácidos	-4,23	2,78	Si
DAP/Hidrolizado 100%	-3,74	2,45	Si
Aminoácidos/Hidrolizado 100%	0,65	2,78	No

Tabla 42: Análisis de significancia t de Student: Acetoína

Comparación	Valor t_0	Valor t	¿Diferencia es significativa?
DAP/Aminoácidos	3,56	2,45	Si
DAP/Hidrolizado 50% DAP 50%	10,04	2,45	Si
DAP/Hidrolizado 100%	1,66	2,45	No
Aminoácidos / Hidrolizado 50% DAP 50%	4,02	2,45	Si
Aminoácidos / Hidrolizado 100%	1,72	2,45	No
Hidrolizado 50% DAP 50% / Hidrolizado 100%	6,33	2,45	Si

7.6. Análisis no paramétrico: estadística de tipo Friedman

Los datos se ordenan con los rangos asignados a las muestras por cada panelista, se calcula el estadístico de Friedman para los datos de rango mediante:

$$T = \left(\left[\frac{12}{bt(t+1)} \right] \sum_{j}^{t} x_j^2 \right) - 3b(t+1)$$

El procedimiento consiste en rechazar la hipótesis nula de que no hay diferencias de muestra en el nivel de significación α si el valor T excede el valor obtenido en la tabla $X^2_{\alpha,t-1}$ y acepta H_0 de otra forma.

Se calcula el valor T y posteriormente se utiliza la Tabla: Punto de probabilidad superior-α de Distribución X^2 para encontrar el valor crítico del 5% superior de una X^2 con los grados de libertad correspondientes (t-1). Si el valor T es mayor al que se encuentra en dicha tabla, se concluye que las muestras son significativamente diferentes.

Si es que la estadística X^2 es significativamente diferente, se realiza el procedimiento de comparación múltiple para determinar cuál de las muestras difiere significativamente. El análogo paramétrico al LSD de Fisher para las sumas de rango de un diseño de bloques al azar (completo) es:

$$LSD_{rango} = Z_{\alpha/2}\sqrt{\frac{bt(t+1)}{6}}$$

$$LSD_{rango} = t_{\alpha/2,\infty}\sqrt{\frac{bt(t+1)}{6}}$$

Se declara que dos muestras son significativamente diferentes en el nivel α si sus sumas de rango difieren más que el valor del rango de LSD.

Resultados entrenamiento

Tabla 43: Resultados entrenamiento: Dulzor

N° Sujeto	Muestra 602	Muestra 107	Muestra 933	Muestra 654
1	1	2	3	4
2	1	2	3	4
3	1	2	3	4
4	1	2	3	4
5	1	2	3	4
6	1	2	3	4
7	1	2	3	4
8	1	2	3	4
Suma Rango	**8**	**16**	**24**	**32**

Tabla 44: Resultados entrenamiento: Acidez

N° Sujeto	Muestra 886	Muestra 341	Muestra 665	Muestra 226
1	1	2	3	4
2	1	2	3	4
3	1	3	2	4
4	1	2	3	4
5	1	2	3	4
6	1	3	2	4
7	1	2	4	3
8	1	2	3	4
Suma Rango	**8**	**18**	**23**	**31**

Tabla 45: Resultados entrenamiento: Astringencia

N° Sujeto	Muestra 381	Muestra 766	Muestra 111	Muestra 925
1	1	3	4	2
2	2	1	4	3
3	1	3	2	4
4	1	2	3	4
5	1	2	3	4
6	1	3	2	4
7	1	2	3	4
8	1	2	4	3
Suma Rango	**9**	**18**	**25**	**28**

Resultados muestras

- **Dulzor**

Tabla 46: Resultados Evaluación Muestras: Dulzor

N° Sujeto	Muestra DAP	Muestra Aminoácidos	Muestra DH50%-DAP50%	Muestra DH100%
1	1	3	4	2
2	1	4	3	2
3	4	2	1	3
4	2	1	4	3
5	2	1	4	3
6	1	3	4	2
7	2	4	3	1
8	3	2	4	1
Suma Rango	**16**	**20**	**27**	**17**

Tabla 47: Comparación múltiple: Dulzor

Comparación	Suma Rango 1	Suma Rango 2	Resta	LSD Rank	Resultado
DAP/Aminoácidos	16	20	4	10,12	No
DAP/DH50%-DAP50%	16	27	11	10,12	Si
DAP/DH100%	16	17	1	10,12	No
Aminoácidos/DH50%-DAP50%	20	27	-7	10,12	No
Aminoácidos/DH100%	20	17	3	10,12	No
DH50%-DAP50%/DH100%	27	17	10	10,12	No

- **Acidez**

Tabla 48: Resultados evaluación sensorial: Acidez

N° Sujeto	Muestra DAP	Muestra Aminoácidos	Muestra Hidrolizado50%-DAP50%	Muestra Hidrolizado100%
1	2	4	1	3
2	2	4	1	3
3	4	3	1	2
4	3	4	1	2
5	3	4	1	2
6	4	2	1	3
7	3	2	1	4
8	3	4	1	2
Suma Rango	**24**	**27**	**8**	**21**

Tabla 49: Comparación múltiple: Acidez

Comparación	Suma Rango 1	Suma Rango 2	Resta	LSD Rank	Resultado
DAP/Aminoácidos	24	27	3	10,12	No
DAP/DH50%-DAP50%	24	8	16	10,12	Si
DAP/DH100%	24	21	3	10,12	No
Aminoácidos/DH50%-DAP50%	27	8	19	10,12	Si
Aminoácidos/DH100%	27	21	6	10,12	No
DH50%-DAP50%/DH100%	8	21	13	10,12	Si

- **Astringencia**

Tabla 50: Resultados evaluación sensorial: Astringencia

N° Sujeto	Muestra DAP	Muestra Aminoácidos	Muestra Hidrolizado50%-DAP50%	Muestra Hidrolizado100%
1	2	3	1	4
2	3	4	2	1
3	3	4	1	2
4	4	3	1	2
5	2	4	1	3
6	2	4	1	3
7	1	2	4	3
8	3	4	2	1
Suma Rango	**20**	**28**	**13**	**19**

Tabla 51: Comparación múltiple: Astringencia

Comparación	Suma Rango 1	Suma Rango 2	Resta	LSD Rank	Resultado
DAP/Aminoácidos	20	28	8	10,12	No
DAP/DH50%-DAP50%	20	13	7	10,12	No
DAP/DH100%	20	19	1	10,12	No
Aminoácidos/DH50%-DAP50%	28	13	15	10,12	Si
Aminoácidos/DH100%	28	19	9	10,12	No
DH50%-DAP50%/DH100%	13	19	6	10,12	No