



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

ESCUELA DE INGENIERÍA

**BALANCES DE MASA DURANTE LA
VINIFICACIÓN DE SAUVIGNON BLANC**

MARÍA ISABEL MOENNE VARGAS

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:

Eduardo Agosín Trumper

Santiago de Chile, Diciembre 2008

© 2008, María Isabel Moenne Vargas

*A mis Padres, Juan Carlos y Silvia por su incondicional amor y respaldo,
a mi hermano Cristóbal, a mis abuelos René y Melita, y a mi tía Edith,
los que me han apoyado mucho en todo este largo camino que he vivido
hasta ahora.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres por su incondicional amor y apoyo en todo lo que he emprendido, a mi hermano por estar siempre a mi lado y ayudarme en todos estos años de estudio. Agradezco a mis abuelos René y Melita por creer en mí, apoyarme y quererme desde mis primeros años, a mi tía Edith por su preocupación y afecto.

Agradezco a mi profesor supervisor Eduardo Agosin, por sus consejos, paciencia y apoyo desde el comienzo de esta tesis, lo que me ayudó en su realización. Quiero agradecer también a los profesores Ricardo Pérez, Edmundo Bordeu y Alfonso Otero por sus valiosos comentarios.

Agradezco a quienes han sido mis compañeros de laboratorio durante todo este tiempo. Especialmente a Felipe, Víctor y Francisco por su amistad, apoyo y guía. A Cristián, Pía, Carlos, Marcelo y Anita por darme siempre todo su apoyo, amistad y valiosos comentarios.

A Marcial, Juan Pablo, Ana María, Mane y Lenka por su apoyo en el desarrollo de los experimentos de GC-MS.

Finalmente quisiera agradecer también a los integrantes del Departamento de Química y Bioprocesos: Verónica, Sra. Hilda, Sra. Rosa y Don Ricardo, por su valiosa ayuda.

RESUMEN

La realización de fermentaciones implica recolectar múltiples datos para poder estudiar el comportamiento del sistema. Si la información recolectada presenta errores de medición, pero ellos no son detectados y corregidos, las conclusiones inferidas serán erróneas. Basado en la aplicación de balances macroscópicos para la identificación de errores de medición, se desarrolló un método sistemático empleando Matlab, capaz de detectar la presencia de dichos errores y localizar la fuente de error a través de un test estadístico, en fermentaciones con mosto Sauvignon blanc. El sistema de evaluación de datos experimentales desarrollado, permite generar conocimiento para analizar, evaluar y optimizar procesos fermentativos mediante una correcta toma de decisiones.

Para demostrar la utilidad del sistema de evaluación de datos, se realizaron 3 fermentaciones a pequeña escala con 30 litros de mosto S. blanc a una temperatura de 18°C, empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. Posteriormente, los datos corregidos se emplearon para estudiar la similitud entre fermentaciones industriales y a escala de laboratorio. Al comprobar que los parámetros fermentativos se comportan de manera similar, se analizó la evolución de compuestos volátiles producto del metabolismo de la levadura durante la vinificación.

Durante el análisis de consistencia, se determinó la presencia de un único error de medición en el flujo de CO₂, el cual fue corregido empleando Matlab. De los compuestos volátiles estudiados, los ésteres presentan la mayor diferencia entre fermentaciones de laboratorio e industriales. Aproximadamente un 20% de los ésteres etílicos y de acetato se pierden por la corriente gaseosa, sin embargo, los ésteres etílicos en el vino final elaborado a escala de laboratorio quintuplica la concentración desarrollada en fermentaciones industriales. Los resultados mostraron que realizar un análisis de consistencia previo a la interpretación de los resultados, permite enfocarse en datos que no presentan errores de medición. La revisión de parámetros fermentativos mostró que a 18°C no existen diferencias significativas entre fermentaciones de laboratorio e industriales, lo que permite su comparación.

Palabras claves: Análisis de consistencia, aroma, compuestos volátiles, Sauvignon blanc

ABSTRACT

Wine fermentation execution implies to gather numerous data in order to study the system behavior. If the collected information presents measurement errors, but they are not detected and corrected the inferred conclusions will be wrong. Based on the application of the macroscopic balances for detecting the presence of measurement errors a systematic method using Matlab was developed. This method is capable of both detecting and locating the measurement errors through statistical test in fermentation with Sauvignon blanc must. The evaluation system of experimental data will allow to generate knowledge to analyze, evaluate and optimize fermentative process through making decisions correctly. To demonstrate the benefits of the evaluation system data was realized three fermentations in low scale with 30 liter of Sauvignon blanc must at 18°C, using *Saccharomyces cerevisiae* EC11180 yeast. After that, the correct data was employed for similarity studies between industrial and laboratory fermentations. When was proved that the fermentive parameters are behaved in a similar way, the volatile compounds evolution product yeast metabolism during fermentation was analyzed.

During consistency analysis was determinate only one measurement error in CO₂ flow, which was corrected using Matlab. Of the volatile compounds which were studying Esters constituted the main class of compounds. They showing differences between industrial and laboratory fermentations. The results suggested that 20% of the ethyl and acetate esters are lost by the gas flow, however ethyl esters in final wine using a laboratory scale fermentation had 5 times more concentration than the industrial fermentation.

The results indicated that made a consistency analysis before data interpretation allow to focus in data which does not present measurement errors. The fermentative parameter review showed that there is not significant differences between industrial and laboratory fermentation at 18°C. This fact allows compare them.

Key words: consistency analysis, aroma, volatile compounds, S. blanc

NOMENCLATURA

A Matriz elemental que posee sólo los compuestos medidos

$\alpha, \beta, \delta, \sigma, \tau, \varphi, \rho$ Coeficientes estequiométricos en mol; α en mol de sustrato/C-mol biomasa; β en mol de NH_3 /C-mol biomasa; δ en mol de glicerol/C-mol biomasa; σ en mol de etanol/C-mol biomasa; τ en mol de acetato/C-mol biomasa; φ en mol de CO_2 /C-mol biomasa; ρ en mol de succinato/C-mol biomasa

C_i Concentración del compuesto i en el fermentador

c_i Concentración de cada compuesto volátil (gr/L)

CV Coeficiente de variación

δ Errores de medición de las tasas específicas

ε Vector de residuos

E Matriz elemental de dimensión $m \times n$

E_c Matriz de compuestos cuyas tasas no han sido medidas

E_c^* Matriz de la pseudo-inversa de la matriz E_c

E_m Matriz de las tasas medidas experimentalmente

$E(Z)$ Esperanza de una variable aleatoria Z

F Matriz de varianza-covarianza de los errores de medición δ

f_i Medición acumulada de la variable i

H test que permite evaluar si la ecuación 1.18 posee diferencias significativas de 0

m Número de ecuaciones

m Número de mediciones de CO_2 acumuladas

m_i Masa de cada compuesto volátil (gr)

M Número de productos

n Número de compuestos totales analizados

n moles

N Número de sustratos

P Matriz de varianza de los residuos ε

P Presión en atmosferas

P_i Representación de productos

r Vector de las tasas específicas

r_a Tasa específica de producción de acetato en mol acetato/C-mol biomasa · hr

r_c Tasa específica de producción de CO₂ en mol CO₂/C-mol biomasa · hr

r_c Vector de tasas específicas no medidas experimentalmente

r_e Tasa específica de producción de etanol en mol etanol/ C-mol biomasa · hr

r_g Tasa específica de producción de glicerol en mol glicerol/ C-mol biomasa · hr

r_i Tasa de reacción del compuesto i

r_m Vector de las tasas específicas reales

$\overline{r_m}$ Vector de las tasas específicas medidas experimentalmente

r_n Tasa específica de consumo de nitrógeno en mol nitrógeno/ C-mol biomasa · hr

r_s Tasa específica de consumo de sustrato (glucosa y fructosa) en mol sustrato/ C-mol biomasa · hr

r_{succ} Tasa específica de consumo de succinato en mol succinato/ C-mol biomasa · hr

$r_x; \mu$ Tasa de crecimiento de biomasa en 1/hr

R Constante de los gases ideales en unidades de (atmosfera · litros)/(mol · K)

S_i Representación de sustratos

T Temperatura en Kelvin

v Vector de rendimientos

V Volumen en Litros

V_d Volumen de diclorometano empleado para la extracción de los compuestos volátiles (L)

$Var(Z)$ Varianza de una variable aleatoria Z

X_i Representación de biomasa

Y_{xa} Coeficiente de rendimiento en mol acetato/C-mol biomasa o también C-mol acetato/C-mol biomasa

Y_{xc} Coeficiente de rendimiento en mol CO_2 /C-mol biomasa

Y_{xe} Coeficiente de rendimiento en mol etanol/C-mol biomasa o también C-mol etanol/C-mol biomasa

Y_{xg} Coeficiente de rendimiento en mol glicerol/C-mol biomasa o también C-mol glicerol/C-mol biomasa

Y_{xn} Coeficiente de rendimiento en mol nitrógeno/C-mol

Y_{xs} Coeficiente de rendimiento en mol (glucosa+fructosa)/C-mol biomasa o también C-mol (glucosa+fructosa)/C-mol biomasa

Y_{xsucc} Coeficiente de rendimiento en mol succinato/C-mol biomasa o también C-mol succinato/C-mol biomasa

$\Delta t+$ Intervalo de tiempo $[t_i, t_{i+1}]$

Δt - Intervalo de tiempo $[t_{i-1}, t_i]$

Δt_1 Intervalo de tiempo $|t_i - t_{i\pm 1}|$

Δt_2 Intervalo de tiempo $|t_{i\pm 1} - t_{i\pm 2}|$

χ^2 distribución de probabilidad Chi-cuadrado

1 INTRODUCCIÓN

"... Constituido por un sistema complejo de cientos de compuestos que interaccionan entre si en secreta armonía, el aroma es una de las cualidades más misteriosas del vino; y a pesar de ello, nuestros sentidos son capaces de inspirar su efluvio, y desvelar su verdadera esencia"...

Anónimo, 1946.

1.1 Motivación

El mundo actual está rodeado de datos, muchos de los cuales son adquiridos experimentalmente. La información que obtenemos del procesamiento de estos datos es importante para dirigir desde actividades tan cotidianas como pagar una cuenta hasta aquellas más complejas como sistemas de control en procesos industriales. Un análisis utilizando resultados erróneos puede repercutir en pérdidas millonarias, sin contabilizar el tiempo perdido en el procesamiento de estos datos.

En la industria del vino se realizan diferentes tipos de mediciones, para cuantificar la evolución de parámetros como etanol, biomasa, azúcares. Si los resultados de las mediciones son incorrectos y por tanto los datos obtenidos erróneos, la proyección de los resultados no será adecuada. Un ejemplo de ello, es no considerar las pérdidas por stripping en los balances de masa, lo que provoca una subestimación en la producción de ciertos compuestos como el etanol.

Para abordar este problema, el estudio consideró un área poco desarrollada en procesos de fermentación vínica conocida como análisis de consistencia de datos. Éste es un análisis estadístico que permite detectar la presencia de errores de medición y localizar el o los compuestos que causan dichos errores, convirtiéndose en una poderosa herramienta en el procesamiento de datos. Debido a la cantidad de datos a procesar, se desarrolló una herramienta

computacional que permite cuantificar los errores de manera más fácil y rápida.

Descripción matemática de las principales variables de un sistema biológico se puede lograr utilizando balances elementales en un sistema denominado caja negra. En éste sistema, todas las reacciones son agrupadas en una reacción química simple, cuyos coeficientes estequiométricos corresponden a los rendimientos. Los balances elementales son aplicados directamente desde datos empíricos de etanol, biomasa, sustrato, CO₂ y glicerol, arrastrando errores que influyen por ejemplo, en el balance de masa final.

En una fermentación para la elaboración de vinos blancos, además de los balances elementales, es de interés conocer la evolución de ciertos compuestos volátiles; dentro de estos compuestos, el estudio de los aromas, enfocado a determinar las etapas claves de su producción y liberación, permite implementar estrategias orientadas a mejorar la calidad del vino final.

Para entender la evolución de los compuestos volátiles, se emplean técnicas de análisis analíticas que permiten separar, identificar y cuantificar estos compuestos, tal como cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) y técnicas estadísticas como el análisis de componentes principales (PCA) que permite observar patrones en un set de datos que posee un gran número de variables.

El aporte de este trabajo en términos de compuestos volátiles se focaliza en comparar los resultados obtenidos en fermentaciones de vino blanco a pequeña escala con aquellos que se obtienen en fermentaciones industriales, afín de poder extrapolar el conocimiento adquirido en el análisis de los experimentos de laboratorio.

2 ESTADO DEL ARTE

2.1 Proceso de Obtención de vino blanco

Las levaduras son los microorganismos que conducen la fermentación alcohólica, luego de su inoculación en el mosto (jugo de uva). Poseen un papel relevante al contribuir positivamente en la generación de aromas del vino. Producen etanol, CO₂, glicerol, enzimas que transforman los precursores de aroma neutro de las uvas en aromas activos y cientos de metabolitos secundarios, tales como ácidos, alcoholes, ésteres, fenoles (Fleet, 2003; Swiegers et al., 2005), convirtiendo al vino en una mezcla de compuestos, que provienen tanto de las uvas como del proceso de elaboración del vino o fermentación (Conde et al., 2007)

La vinificación del vino blanco sigue 6 etapas principales desde la cosecha de uva (Figura 2-1):

1. Recepción de la uva. La uva que se recepciona en las bodegas proviene de la cosecha, la cual se puede realizar de forma manual o automática, dependiendo de las prácticas de cada viña. Una vez recibidos los racimos de uva pueden pasar directamente a la prensa (disminuye el daño mecánico de la uva, aumenta el rendimiento de prensado, pero disminuye la capacidad de la prensa) o ser sometidas al proceso de despalillado¹ y molienda.

2. Despalillado y Molienda. Esta etapa es opcional y consiste en separar las bayas del escobajo, empleando un cilindro perforado y luego molerlas mediante rodillos.

3. Prensado. Se reciben los racimos enteros o la uva que proviene del despalillado y molienda, para separar el jugo de las pieles. Este proceso se realiza mediante una prensa neumática, la que genera presión para lograr la separación. En esta etapa se puede agregar anhídrido sulfuroso (SO₂) para evitar contaminación microbiana e inhibir la oxidación

¹ Despalillado: Separar el escobajo o racimo del mosto

4. Clarificación en frío del mosto. Este proceso se realiza entre 8° y 10°C aproximadamente, para evitar la oxidación y pérdida de aromas. La decantación del mosto se realiza para eliminar impurezas, las que al precipitar forma lo que se denomina borras o sólidos decantados. Las borras pueden ser posteriormente filtradas para recuperar el mosto que se encontraba retenido en ellas.

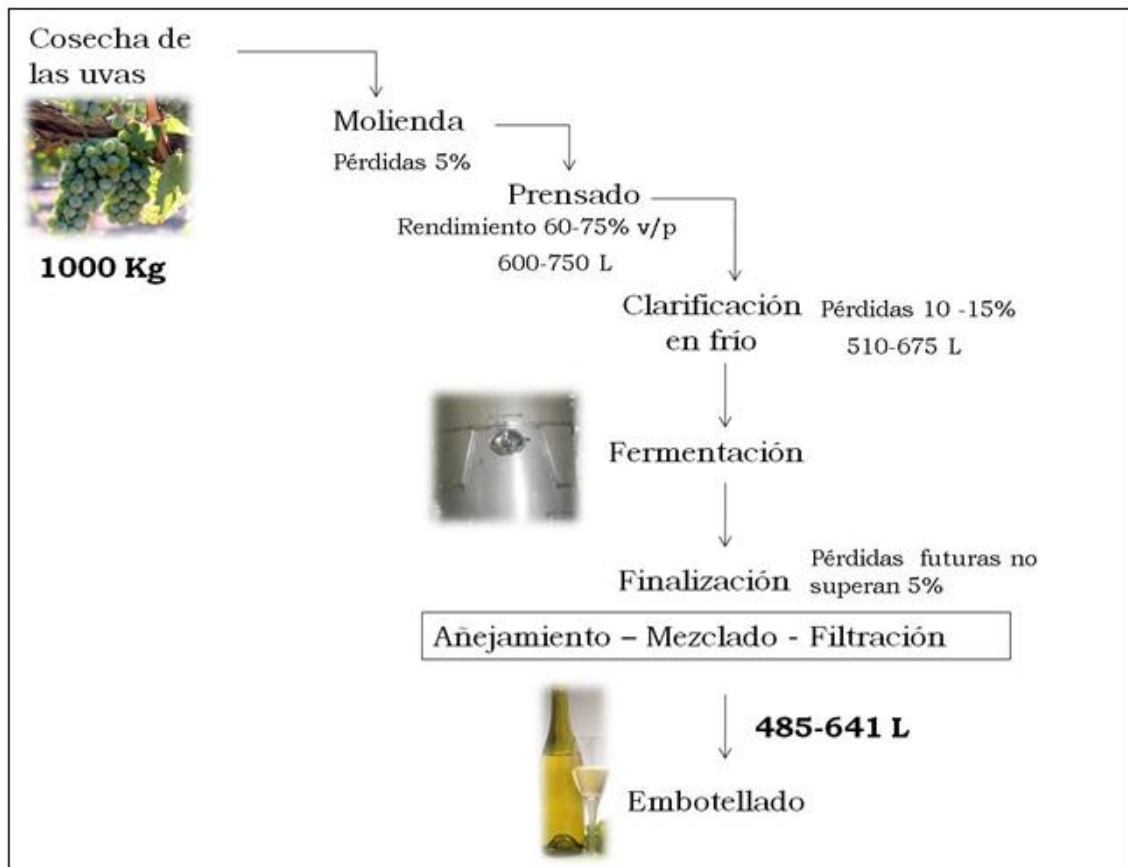
5. Fermentación. El mosto decantado se incorpora en una cuba de acero inoxidable o concreto, en la cual se controla que la temperatura se encuentre en el rango óptimo para fermentación de vinos blancos (12°-19°C). Antes de comenzar la fermentación se deben medir algunos parámetros importantes como el pH, sulfuroso libre, nitrógeno, acidez total, entre otros; y realizar las correcciones necesarias del mosto (agregar vitaminas, ácido tartárico, etc.). Cuando los parámetros de importancia se encuentran en las condiciones deseadas se inicia la fermentación, generalmente inoculando con una levadura seleccionada. El criterio de término de fermentación es mediante la cantidad de azúcar residual; cuando ésta se encuentra bajo 2gr/L, se puede dar por terminada la fermentación.

6. Etapa post-fermentación o finalización. Se baja la temperatura del vino y se trasiega² con borra fina a la cuba de destino donde, 5 a 7 días después, se corrige con SO₂ hasta alcanzar una concentración de 30-35 mg/L. Para eliminar las borras del vino resultante y estabilizar las proteínas, se debe realizar clarificación. Este proceso consiste en añadir bentonita³ (40-100 gr/hr·L) o Ictiocola (2gr/hr·L), los cuales “capturan” las borras. El vino, posteriormente, se filtra con tierras para obtener un producto más limpio. Antes de introducir el vino a las líneas de embotellado, se filtra mediante la utilización de un filtro de placas (0.45 micras) esterilizante, chequeando que no exista turbidez (NTU finales ≈ 0), se ajusta el SO₂ libre a 30 ppm y se envasa el vino.

Figura 2-1: Esquema del proceso de fabricación de vino blanco con despalillado. En las pérdidas futuras se consideran trasiegos, pérdidas en filtros, mermas operativas y similares.

² Trasiego: Operación en bodega que consiste en airear el vino y separarlo de las lías que se depositan en los envases de almacenamiento

³ Bentonita: Compuesto (arcilla) empleado para clarificar los vinos



2.2 Análisis de Consistencia

El estudio cuantitativo de una fermentación, requiere conocer el mayor número de variables involucradas directamente en el proceso, para determinar tasas de reacción química y rendimientos. Se han estudiado parámetros involucrados en el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la degradación del sustrato presente en el medio y la formación de productos mayoritarios como etanol, glicerol y CO₂. La medición de estos datos experimentales no se encuentra libre de ruido (problemas en las mediciones manuales, calibración de equipos, toma de muestras etc.) y errores en sus mediciones redundarán en un set de datos que no satisfacen completamente los balances de masa. Si los balances no se validan, no se podrá asegurar la veracidad de los datos utilizados en el análisis cuantitativo del proceso fermentativo del vino. Por tanto, al utilizar estos datos para controlar y optimizar fermentaciones industriales como la

fermentación vínica, pueden resultar soluciones alejadas del óptimo (Wang y Stephanopoulos, 1983).

El método empleado para detectar la presencia de errores de medición y localizar la fuente de dicho error en un conjunto de datos fermentativos, se llama análisis de consistencia, para el cual existen 2 formas de realización. La primera se basa en un modelo metabólico simple, denominado modelo de caja negra, donde todas las reacciones químicas son agrupadas en una sola y el método consiste básicamente en validar los balances elementales. La segunda forma de realizar el análisis de consistencia es empleando modelos metabólicos, los que consideran más detalles bioquímicos para la conversión de sustratos a biomasa y productos metabólicos (Stephanopoulos et al., 1998).

El enfoque del Análisis de Consistencia en éste trabajo en particular, es encontrar las tasas específicas reales de consumo de sustrato (azúcares, amonio) y formación de productos (etanol, glicerol, CO₂, succinato, acetato, biomasa), lo que justifica, en este caso, el empleo del modelo de caja negra. En este análisis se utilizan los balances elementales y macroscópicos aplicados a la fermentación vínica, según la ecuación:

$$X + \sum_{i=1}^M Y_{xp_i} P_i - \sum_{i=1}^N Y_{xs_i} S_i = 0 \quad (1.0)$$

Donde X es la biomasa, P_i son los productos, S_i son los sustratos, M el número de productos generados y N el número de sustratos consumidos. Y_{xpi} e Y_{xsi} corresponden a los rendimientos en base a la biomasa y son calculados utilizando las derivadas de las concentraciones medidas en función del tiempo.

Para poder aplicar el análisis de consistencia, los datos utilizados deben ser completos, lo cual no requiere que todos los sustratos y productos metabólicos deban ser medidos, sino que deben ser:

- 1.- Suficientes para validar los balances de carbono y nitrógeno.
- 2.- Balanceables, lo que implica que pueden ser calculados desde otras tasas medidas (utilizando las ecuaciones de balance de masa).
- 3.- Medidos simultáneamente.

Un sistema que cumpla con los 3 requisitos se puede considerar sobredeterminado, debido a que el número de variables medidas es mayor a las necesarias para identificar completamente el sistema con las restricciones disponibles. De este modo, la redundancia de datos es utilizada para la identificación sistemática de errores gruesos de medición o la identificación de un elemento en particular responsable de la inconsistencia observada (Stephanopoulos et al., 1998; van der Heijden et al., 1994a).

Las 4 etapas principales al desarrollar un Análisis de Consistencia son:

1. Selección de Compuestos. Cuando se inicia el análisis, se enumeran los compuestos más relevantes (glucosa-fructosa, etanol, CO₂, biomasa, glicerol, acetato, amonio, succinato). Luego se dividen los compuestos en medidos y no medidos, dependiendo de los compuestos que se desean analizar.

2. Cálculo Tasas de Reacción Química. Estas se calculan utilizando las derivadas de las concentraciones en el tiempo, mediante el ajuste de curvas para productos y sustratos.

3. Diagnóstico Errores de Medición. La técnica para determinar los errores de medición se basa en las ecuaciones de conservación de masa para cada set de datos empleados. Con las ecuaciones de balances elementales se construye un vector de residuos (la resta entre productos y sustratos puede no ser 0, debido a la presencia de errores en las mediciones), el cual se relaciona con el error de medición.

4. Detección Fuente de Error y Estimación Tasas Corregidas. Si se presentan errores, se puede identificar el compuesto o los compuestos responsables. El método empleado para detectar la fuente de error se conoce como eliminación seriada, en la cual una medida a la vez cambia a la clasificación de compuesto no medido, evaluando el efecto de tal elección. Posteriormente se estiman las nuevas tasas, corregidas en base a los errores determinados.

2.3 Compuestos aromáticos del vino blanco

"No sólo percibimos en una copa los aromas propios de la uva; un sinnúmero de otros compuestos comúnmente asociados a otras variedades sirven para describir la expresión y tipicidad

de los vinos. La relación entre vino y frutas es directa, franca y profunda. Es poesía, pero también una compleja correlación de elementos químicos” (Brethauer, 2006).

El vino es una solución hidroalcohólica que contiene cientos de compuestos interactuando entre sí, otorgándole su identidad. Sin lugar a dudas, dentro de los compuestos volátiles más relevantes, los aromas caracterizan el vino, a pesar que su presencia sólo se encuentre entre los µg/L y los ng/L. Los compuestos volátiles, pueden ser derivados de la uva, producidos durante la fermentación del mosto o desarrollados durante la crianza⁴. Cada vino es influenciado por una amplia variedad de compuestos volátiles, principalmente alcoholes, esterres, terpenos y ácidos volátiles (Howell et al., 2004; Mestres et al., 2000; Wilker et al., 2004). Sin embargo, la importancia de cada compuesto en el aroma final depende de la correlación entre la composición química y los umbrales de percepción, porque la mayoría de los compuestos volátiles están presentes a concentraciones cercanas o bajo su umbral de percepción individual (Falqué et al., 2001).

Según su origen, los aromas pueden clasificarse en (Belancic y Agosin, 2002; Francis y Newton, 2005; Rapp, 1998):

1. Aromas varietales: provienen del metabolismo propio de la uva y su concentración depende de la variedad, el suelo, el clima y el «terroir⁵».

2. Aromas pre-fermentativos: los compuestos clasificados en esta categoría son obtenidos a partir de procesos físicos o de procesos bioquímicos de oxidación e hidrólisis durante la extracción del jugo y su maceración.

3. Aromas fermentativos: producidos por el metabolismo de la levadura durante la fermentación alcohólica, modificando y multiplicando el aporte aromático inicial del mosto.

⁴ Crianza: Envejecimiento controlado de un vino, en barrica o en botella.

⁵ Terroir: vinos típicos de un terreno o suelo determinado, el que traslada al vino sus características

4. Aromas post-fermentativos: formados durante la crianza del vino y el envejecimiento a través de reacciones químicas y/o enzimáticas.

Distintas variables pueden afectar los compuestos volátiles (sean percibidos por el consumidor o no) presentes en el vino. Los aromas varietales pueden ser influenciados por el medio ambiente (clima, suelo), la variedad de la uva, el grado de madurez, etc. Los aromas fermentativos, en cambio, pueden potenciarse al modificar las condiciones de fermentación como la temperatura y la levadura utilizada (Rapp, 1998).

De las variedades víticas presentes en Chile, los vinos blancos toman cada vez mayor fuerza, representando un 28% del total de vinos con denominación de origen elaborados en 2008, 4.6% superior a igual período del año 2006 (Servicio-Agrícola-Ganadero, 2008). Dentro de las variedades blancas, Sauvignon blanc es el vino que se produce en mayor cantidad y su carácter aromático lo convierten en ideal para estudiar los compuestos volátiles involucrados en su aroma.

Los principales descriptores del vino Sauvignon blanc son pomelo, fruta de la pasión, "box tree", pipí de gato, hojas de tomate, los que le otorgan características únicas, distintas de otras variedades. Estos descriptores son otorgados por los tioles, los que se desarrollan básicamente durante la fermentación. (Augustin et al., 2006; Swiegers et al., 2005; Swiegers et al., 2006). Distintos tioles han sido identificados como componentes particulares del aroma de vinos Sauvignon blanc: 4-metil-4-mercaptopentan-2-ona (4MMP), 3-mercaptohexan-1-ol (3MH), acetato de 3-mercaptohexanol (A3MH). Estos compuestos se encuentran almacenados como aminoácidos conjugados, en forma de precursores cisteinilados no volátiles. La volatilización se produce por acción de las enzimas β -liasas, presentes en las levaduras. El estudio de los tioles, es relevante por el potencial aromático que se encuentra disponible en sus precursores, sin embargo, en estos momentos no se cuenta con un método apropiadamente montado y optimizado para su medición, por lo que se deja propuesto su estudio, como un objetivo importante en trabajos futuros.

2.3.1 Aromas Fermentativos

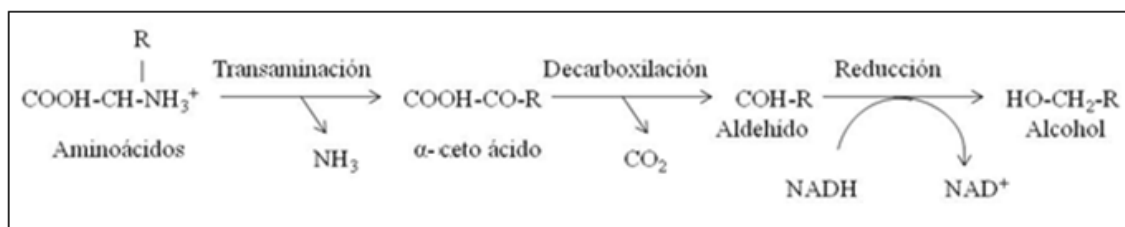
El trabajo, se enfoca en los compuestos desarrollados durante la fermentación, por acción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta sintetiza una variedad de compuestos volátiles, mayoritariamente alcoholes, ácidos y ésteres, responsables de aromas frutales y dulces. Además, permite liberar aquellos compuestos que se encuentran ligados a precursores como los tioles.

2.3.1.1 Alcoholes Superiores

Los alcoholes superiores (Fusel Alcohols) corresponden a metabolitos secundarios, de los cuales, posiblemente tres cuartos provienen de la degradación de aminoácidos mediante la vía de Ehrlich (Figura 2-2) y un cuarto desde intermediarios del metabolismo de azúcares a través de reacciones anabólicas, mecanismo por el cual se obtendría un α -ceto ácido.

Los alcoholes superiores pueden tener impactos positivos o negativos en el aroma del vino, pero al presentarse en las cantidades adecuadas (<350-400 mg/L), otorgan carácter frutal (Dekker, 1991; Swiegers et al., 2005).

Figura 2-2: Síntesis de alcoholes superiores mediante la vía de Ehrlich. 2 feniletanol, isobutanol, isoamil alcohol y 3 metil butanol son sintetizados mediante la vía de Ehrlich a partir de fenilalanina, valina, leucina e isoleucina respectivamente (Molina, 2008).



Los alcoholes superiores se dividen en 2 categorías: alcoholes alifáticos y alcoholes aromáticos. Los alcoholes alifáticos incluyen propanol, isoamil alcohol e isobutanol y los alcoholes aromáticos 2-feniletanol y tirosol (Abbas, 2006; Swiegers et al., 2005).

El alto nivel de amonio o asparragina, una baja temperatura de fermentación y una estricta anaerobiosis inducen una disminución en la concentración de alcoholes superiores, principalmente 3-metil butanol y 2-fenil etanol. Esto quiere decir que las condiciones que

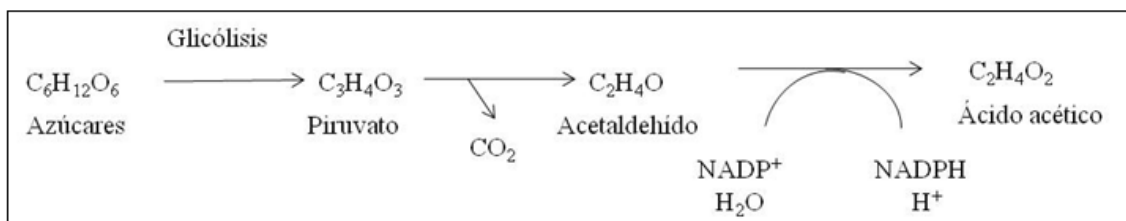
incrementan la velocidad de fermentación, favorecen la formación de estos compuestos, de modo opuesto a lo que sucede con los ésteres (Dekker, 1991).

2.3.1.2 Ácidos Volátiles

Algunos importantes aromas de bebidas alcohólicas resultado de la presencia de ácidos volátiles de cadena corta como ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido hexanóico, etc. (Abbas, 2006; Swiegers et al., 2005) Su concentración en vinos se encuentra usualmente entre 100 y 500 mg/L, de los cuales cerca de un 90% corresponde a ácido acético (Abbas, 2006).

El ácido acético es de particular importancia, pues a concentraciones elevadas (0,7-1,1 gr/L) imparte aroma a vinagre. Aunque la levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede producir este compuesto (Figura 2-3), excesivas concentraciones en el vino son resultado del metabolismo de etanol por bacterias acéticas (Swiegers et al., 2005).

Figura 2-3: Síntesis de Ácido acético a partir de azúcares



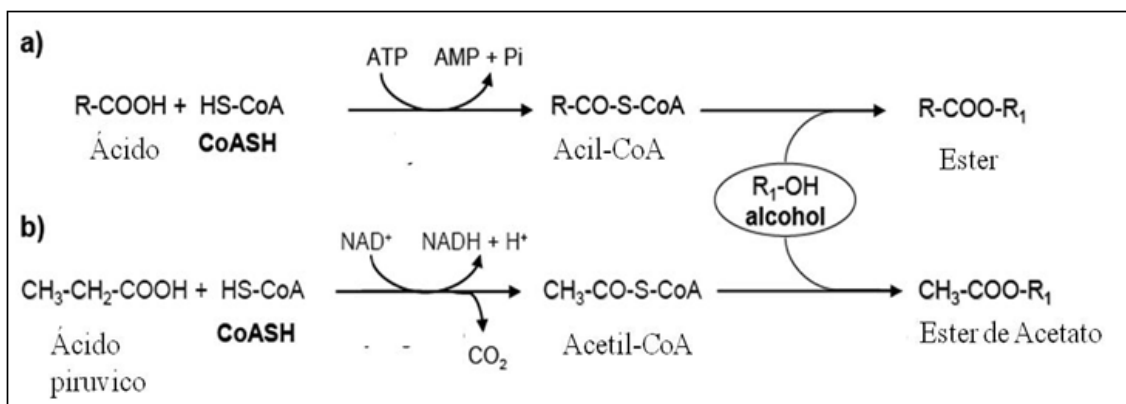
Un punto importante a considerar es que la cantidad de algunos ácidos volátiles producidos depende de la temperatura empleada en la fermentación. A baja temperatura (< 15°C) se sintetizaría una mayor cantidad de ácidos volátiles que a alta temperatura (> 25°C) (Abbas, 2006).

2.3.1.3 Ésteres

Los ésteres son el grupo mayoritario de compuestos aromáticos producidos por las levaduras durante la fermentación. Su producción tiene un efecto significativo en el aroma frutal de un vino (Abbas, 2006; Dekker, 1991; Lara, 2006; Swiegers et al., 2005). No todos los ésteres superan el umbral de percepción, pero pueden contribuir en un vino final, debido al efecto de aditividad de sus aromas individuales (Dekker, 1991).

Los ésteres se dividen en 2 familias: esteres etílicos y esteres de acetato. Su origen es el metabolismo secundario de la levadura, por condensación de un alcohol y acil-CoA⁶, durante la fermentación alcohólica (Figura 2-4) (Dekker, 1991; Swiegers et al., 2005).

Figura 2-4: Síntesis de ésteres durante la fermentación alcohólica con *S. cerevisiae*. a) Ésteres son producidos por condensación de un alcohol y un ácido activado. Cuando el alcohol es etanol, se forma un etil éster. b) Ésteres de acetato son formados por la condensación de un alcohol y acetil-CoA. Los etil acetato se forman cuando el alcohol que participa en la reacción es etanol (Molina, 2008).



Estos compuestos destacan por presentar descriptores de pera madura, plátano, manzana, piña, miel y flores (Lara, 2006; Swiegers et al., 2005). Generando carácter frutal en vinos *S. blanc*.

2.3.1.4 Fenoles Volátiles

Los fenoles volátiles presentan relativamente bajos umbrales de percepción (Tabla 2-1) y por tanto, pueden ser detectados fácilmente por el consumidor. Aunque pueden contribuir positivamente al aroma de algunos vinos, son más bien conocidos por su contribución negativa (establo, parche curita), lo cual resulta de las altas concentraciones de los etil fenoles 4-etilguiacol y 4-etilfenol en particular. La existencia de otro grupo de fenoles, conocidos como vinilfenoles, especialmente el 4-vinilguiacol y 4-vinilfenol, producen aromas farmacéuticos, especialmente en vino blanco (Swiegers et al., 2005).

⁶ CoA: coenzima A

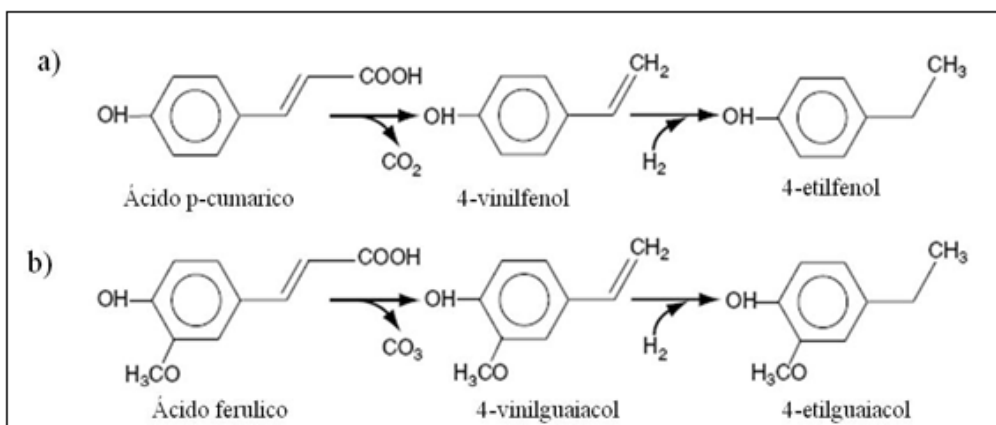
Tabla 2-1: Umbral de detección de fenoles volátiles (Escudero et al., 2007).

Fenoles Volátiles	Umbral de Detección (µg/L)
4-vinilfenol	180
4-vinilguaiacol	40
4-etilfenol	440
4-etilguaiacol	33

Estos compuestos son producidos mayoritariamente por la levadura durante la fermentación, a pesar de que se encuentran trazas en el mosto de uva.

Los fenoles se forman a partir de la decarboxilación de ácidos, así la decarboxilación de ácido *p*-cumárico y ferúlico por *S. cerevisiae* permite la formación de 4-vinilguaiacol y 4-vinilfenol, respectivamente (Figura 2-5) (Swiegers et al., 2005).

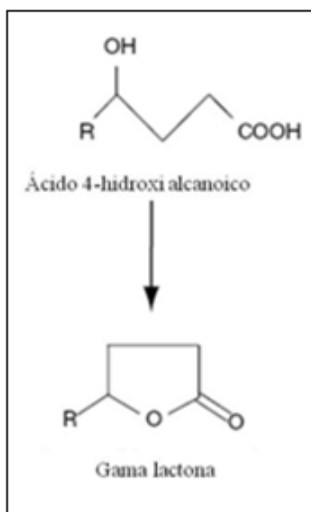
Figura 2-5: Síntesis de fenoles volátiles. a) y b) Decarboxilación de ácidos para formar derivados 4-vinil los que luego se reducen a derivados 4-etil (Abbas, 2006).



2.3.1.5 Lactonas y Compuestos azufrados

Las lactonas son un grupo importante de compuestos, impartiendo aromas a fruta madura (pera, durazno, coco). Son formadas por esterificación intramolecular, entre el grupo hidroxilo y carboxilo de un hidroxi ácido (Figura 2-6) (Abbas, 2006).

Figura 2-6: Síntesis de lactonas mediante la esterificación de un hidroxi ácido (Abbas, 2006).



Los compuestos azufrados, en cambio, generalmente son considerados negativos para la calidad de un vino, al presentar descriptores de cebolla, papa o coliflor. Sin embargo, algunos compuestos azufrados pueden contribuir activamente al aroma varietal. En general, su presencia en vinos se origina por degradación de aminoácidos que contienen sulfuro. De esta manera, por ejemplo, la metionina es metabolizada para formar metionol (Mestres et al., 2000).

2.4 Medición y Detección de Aromas

Los compuestos volátiles pueden ser detectados porque activan el sistema olfativo, el cual nos ayuda a identificar las cualidades del vino (positivas o negativas), cuando la concentración sobrepasa el umbral de detección (Axel y Buck, 2004). Cuando esto sucede los compuestos volátiles se consideran compuestos aromáticos o aromas.

Los umbrales de percepción de distintos compuestos presentes en el vino, han sido determinados experimentalmente mediante la sensibilidad de un panel de jueces a diferentes concentraciones conocidas de los compuestos volátiles en una solución acuosa con, generalmente, 10% de etanol (Guth, 1997).

Para estimar la contribución potencial de un compuesto volátil, se utilizan las unidades aromáticas (odor activity value: OAV), calculadas como la concentración de un compuesto dividido por su umbral de percepción (Falqué et al., 2001; Francis y Newton, 2005; Gil et al., 2006). Al basarnos en las unidades aromáticas, los compuestos con $OAV \geq 1$ se consideran con contribución activa al aroma.

Sin embargo, el OAV no toma en cuenta los efectos antagonistas y/o sinérgicos de los compuestos volátiles (interacciones entre compuestos), pero se convierte en una primera aproximación de la contribución potencial de cada compuesto al aroma global (Gil et al., 2006).

Para cuantificar e identificar los compuestos volátiles que se encuentran en el vino a bajas concentraciones, se emplea cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS: gas chromatography - mass spectrometry). La cromatografía gaseosa permite la separación de los compuestos volátiles basado en sus propiedades químicas y físicas. Los compuestos son retenidos diferencialmente por la fase estacionaria de la columna, mientras un gas inerte lleva la muestra a través de la columna, causando la salida de compuestos a diferentes tiempos. Cuando los compuestos salen de la columna cromatográfica, son capturados por un espectrómetro de masa, el cual rompe las moléculas en fragmentos ionizados, los que son detectados utilizando la razón carga-masa. Posteriormente, los compuestos pueden ser identificados, comparando los espectros de masa con una base de datos. Para la cuantificación de los compuestos estudiados, se relaciona el área del espectro de masas con el área correspondiente a una concentración conocida de estándar interno, el cual tiene propiedades químicas similares a los compuestos de interés, no se encuentra presente inicialmente en la muestra y no reacciona o se degrada durante los pasos previos a la cuantificación (Molina, 2008).

3 HIPÓTESIS

La industria vínica evoluciona para satisfacer los gustos de millones de consumidores alrededor del mundo, transformando en necesidad la búsqueda de mecanismos, que permitan tomar decisiones adecuadas para mejorar el proceso de vinificación, basadas en datos verídicos.

De este modo, la hipótesis de trabajo fue la siguiente:

A partir del Análisis de Consistencia de Datos se busca obtener valores experimentales fidedignos, confiables y reproducibles para el estudio cuantitativo de procesos fermentativos.

4 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar un Sistema de Análisis de Datos Experimentales (SADE) que se obtienen de una fermentación vínica. Este sistema permitirá generar conocimiento para analizar, evaluar y proyectar las fermentaciones a través de una correcta toma de decisiones

Los objetivos específicos son:

Realizar Análisis de Consistencia para determinar la presencia y magnitud de errores en las mediciones de parámetros fermentativos.

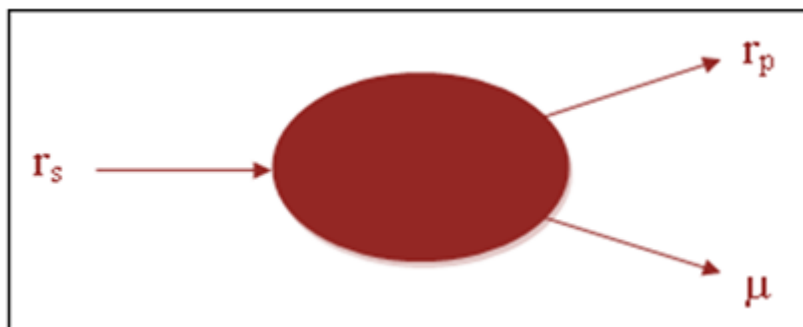
Determinar y comparar la evolución temporal de compuestos volátiles durante la vinificación de Sauvignon blanc a nivel de laboratorio e industrial.

5 Análisis de Consistencia

5.1 Modelo Macroscópico o de Caja Negra

Para el análisis de consistencia de datos experimentales se utiliza el modelo de caja negra, en el cual la célula se considera como una caja que intercambia material con el medio ambiente (Figura 5-3), considerando sólo los procesos de conversión y por consiguiente el microorganismo se especifica en relación a su composición elemental (Noorman et al., 1991).

Figura 5-1: Representación del modelo de caja negra. La célula se considera como la caja negra y los flujos que entran y salen de la célula, son los únicos que se miden. Los flujos de sustrato que entran a la célula forman parte del vector r_s , y los flujos de productos metabólicos que salen de la célula son elementos del vector r_p , la formación de biomasa presenta una tasa específica de crecimiento de μ .



Al asumir el modelo de caja negra, se puede representar el proceso como una ecuación química en el que el sustrato es transformado a biomasa y producto, con los coeficientes estequiométricos dados por los coeficientes de rendimiento, de la forma mostrada en la ecuación (1.0)

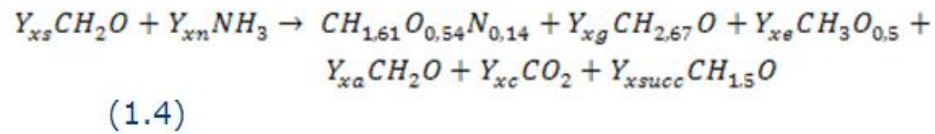
Los coeficientes de rendimiento son designados por 2 subíndices, Y_{ij} para denotar la masa de j formada o consumida por masa de i formada o consumida. Estos coeficientes son definidos como:

$$Y_{s[i]p_j} = \frac{r_{p,j}}{r_{s,i}} = \frac{\Delta p_j}{\Delta s_i} \quad (1.1)$$

$$Y_{s[i]x_j} = \frac{r_{x,j}}{r_{s,i}} = \frac{\mu}{r_{s,i}} \quad (1.2)$$

$$Y_{ij} = \frac{1}{Y_{ji}} \quad (1.3)$$

El modelo macroscópico considerado en C-mol para el análisis de consistencia se define en la ecuación (1.4) a partir de la ecuación (1.0), las características del sistema son mostradas en la Tabla 5-1.



La composición de la biomasa es $CH_{1.61}O_{0.54}N_{0.14}$, sólo se consideran C, H, O y N como elementos relevantes.

Tabla 5-1: Característica del modelo caja negra para *S. cerevisiae*

Compuest o relevante	Símbolo	Tasa de conversión neta	Rendimiento	Composición elemental C- mol
Biomasa	x	r_x	1	$CH_{1.61}O_{0.54}N_{0.14}$
Sustrato ^{**}	s	r_s	Y_{xs}	CH_2O
Acetato ^{**}	a	r_a	Y_{xa}	CH_2O
CO ₂	c	r_c	Y_{xc}	CO_2
Amonio	n	r_n	Y_{xn}	NH_3
Glicerol	g	r_g	Y_{xg}	$CH_{2.67}O$
Etanol	e	r_e	Y_{xe}	$CH_3O_{0.5}$
Succinato	$succ$	r_{succ}	Y_{xsucc}	$CH_{1.5}O$

* La fórmula del sustrato en moles es $C_6H_{12}O_6$

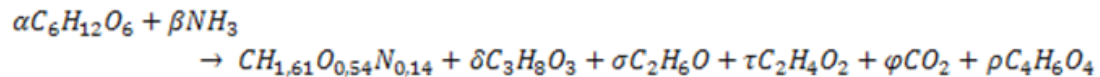
** La fórmula del acetato en moles es $C_2H_4O_2$

Para revisar si en el proceso fermentativo se midió correctamente las variables y determinó la validez del modelo de caja negra, se debe realizar un balance de carbono utilizando los rendimientos globales. Dichos rendimientos, utilizan la diferencia entre el valor máximo alcanzado y el valor inicial para productos. En el caso de los sustratos se obtiene de la diferencia entre el valor inicial y el final.

5.1.1 Balances Elementales

Los balances elementales permiten relacionar al sistema biológico con la descripción matemática, en el modelo de caja negra, de la siguiente manera:

Balances elementales en mol



$$\text{Carbono: } -6\alpha + 1 + 3\delta + 2\sigma + 2\tau + \varphi + 4\rho = 0 \quad (1.6)$$

$$\text{Hidrógeno: } -12\alpha - 3\beta + 1,61 + 8\delta + 6\sigma + 4\tau + 6\rho = 0 \quad (1.7)$$

$$\text{Oxígeno: } -6\alpha + 0,54 + 3\delta + \sigma + 2\tau + 2\varphi + 4\rho \quad (1.8)$$

$$\text{Nitrógeno: } -\beta + 0,14 = 0 \quad (1.9)$$

Donde $\alpha, \delta, \sigma, \tau, \varphi, \rho$ corresponden a los coeficientes estequiométricos.

Estos balances pueden ser escritos formando la matriz elemental E:

$$E = \begin{pmatrix} \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \end{pmatrix}$$

$\longrightarrow$
 $\longrightarrow$
 $\longrightarrow$
 $\longrightarrow$

Carbono
 Hidrógeno
 Oxígeno
 Nitrógeno

$$E = \begin{pmatrix} 6 & 0 & 1 & 3 & 2 & 2 & 1 & 4 \\ 12 & 3 & 1,61 & 8 & 6 & 4 & 0 & 6 \\ 6 & 0 & 0,54 & 3 & 1 & 2 & 2 & 4 \\ 0 & 1 & 0,14 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad v = \begin{pmatrix} Y_{xs} \\ Y_{xn} \\ 1 \\ Y_{xg} \\ Y_{xe} \\ Y_{xa} \\ Y_{xc} \\ Y_{xsucc} \end{pmatrix}$$

La matriz E no tiene signos, debido a que en las tasas se considera si el compuesto se está formando o consumiendo. Se pueden utilizar los coeficientes de rendimiento o las tasas específicas, las cuales se logran al multiplicar el vector v por un escalar r. En este caso, los rendimientos se normalizan con respecto a la biomasa, la cual posee su coeficiente estequiométrico igual a 1. Durante el proceso de normalización todos los coeficientes estequiométricos son divididos por la biomasa, distribuyéndose el error de medición de biomasa en los otros coeficientes, sin embargo, los errores de medición de biomasa se consideran aleatorios, por lo que la normalización no afecta el resultado final (Wang y Stephanopoulos, 1983).

$$v \cdot r_r = \begin{pmatrix} Y_{xs} \cdot r_r \\ Y_{xn} \cdot r_r \\ r_r \\ Y_{xg} \cdot r_r \\ Y_{xe} \cdot r_r \\ Y_{xa} \cdot r_r \\ Y_{xc} \cdot r_r \\ Y_{xsucc} \cdot r_r \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} r_s \\ r_n \\ r_x \\ r_g \\ r_e \\ r_a \\ r_c \\ r_{succ} \end{pmatrix} = r$$

Se debe notar que las tasas específicas utilizadas en el análisis se encuentran en mol compuesto/C-mol biomasa*hr. Por tanto, se puede decir que (Noorman et al., 1996; van der Heijden et al., 1994a):

$$E \cdot v \cdot r_r = E \cdot r = 0 \quad (1.10)$$

Los grados de libertad del sistema son 4 (G.L.=compuestos-4 ecuaciones del balance elemental), pero 7 compuestos son generalmente medidos en una fermentación (glucosa+fructosa, CO₂, etanol, acetato, succinato, biomasa, glicerol), por lo que el sistema posee más variables medidas que grados de libertad. En este caso

ciertas tasas medidas pueden ser calculadas a partir de otras tasas medidas, lo que permite clasificar el sistema como redundante (van der Heijden et al., 1994a). Las ecuaciones redundantes se pueden utilizar para calcular las tasas que no se pueden medir y para incrementar la exactitud de las mediciones disponibles e identificar si existe una fuente de errores gruesos en las mediciones realizadas (Stephanopoulos et al., 1998; van der Heijden et al., 1994b).

5.1.2 Ecuaciones necesarias para realizar análisis de consistencia

El análisis de los datos es efectivo debido a que emplea simultáneamente todos los balances para el cálculo de las tasas no medidas y para el análisis de consistencia de los datos.

Para desarrollar el análisis de consistencia se utiliza la matriz de los balances elementales:

$$E \cdot r = E_c \cdot r_c + E_m \cdot r_m \quad (1.11)$$

Donde E_c corresponde a la matriz de los compuestos cuyas tasas no han sido medidas y deben ser calculadas, mientras que E_m corresponde a la matriz que agrupa a las tasas que han sido medidas experimentalmente (Noorman et al., 1996; van der Heijden et al., 1994a).

Si la cantidad de variables medidas son iguales a los grados de libertad, se tienen bastantes ecuaciones para determinar las tasas no medidas. Las tasas no medidas pueden ser calculadas a partir de la ecuación (1.11), debido a que E_c es una matriz cuadrada (requisito necesario para poder invertir la matriz), así la ecuación queda de la siguiente forma:

$$r_c = -E_c^{-1} \cdot E_m \cdot r_m \quad (1.12)$$

Si E_c es una matriz cuadrada el sistema se llama observable, existiendo las ecuaciones necesarias para determinar las tasas desconocidas. El problema en dicha situación es que no se puede hacer un análisis de consistencia, pues el sistema está determinado. Así, si más tasas son medidas, las tasas desconocidas son calculadas

utilizando una combinación de los balances disponibles, incrementando la exactitud de los datos estimados.

Cuando se tienen más variables medidas, la matriz E_c obtenida puede que no sea cuadrada, lo que impediría determinar su inversa. Un método para lograr invertir la matriz E_c , es multiplicar la ecuación (1.11) por E_c^T para que así $E_c \bullet E_c^T$ al ser cuadrada, sea invertible (van der Heijden et al., 1994a). El superíndice T indica que la matriz correspondiente es traspuesta.

$$E \cdot r \cdot E_c^T = E_c^T(E_c \cdot r_c) + E_c^T(E_m \cdot r_m) = (E_c^T \cdot E_c) \cdot r_c + (E_c^T \cdot E_m) \cdot r_m = 0 \quad (1.13)$$

La solución para r_c en este caso corresponde a (van der Heijden et al., 1994a):

$$r_c = -E_c^* \cdot E_m \cdot r_m \quad (1.14)$$

$$E_c^* = (E_c^T \cdot E_c)^{-1} E_c^T \quad (1.15)$$

La matriz E_c^* se conoce como la pseudo-inversa de la matriz E_c . La ecuación (1.14) es el estimador de las tasas no medidas contenidas en el vector r_c , donde se han utilizado todos los balances medidos para su obtención.

Para los sistemas sobredeterminados, después de medir las tasas desconocidas o no medidas (r_c), se pueden utilizar los balances que no fueron empleados, para chequear la consistencia de las tasas medidas. Así la ecuación (1.14) es insertada dentro de la ecuación 1.11, obteniéndose una expresión que sólo depende de las variables medidas (van der Heijden et al., 1994a):

$$E r_m = 0 \quad (1.16)$$

$$E = E_m - E_c E_c^* E_m \quad (1.17)$$

La matriz E tiene todos los coeficientes estequiométricos, pero existen compuestos no medidos, los que deben ser eliminados de la matriz E . La nueva matriz se conoce como A (van der Heijden et al., 1994a; Wang y Stephanopoulos, 1983).

$$Ar_m = 0 \quad (1.18)$$

5.1.3 Cálculo de tasas de reacción

Para poder realizar el análisis de consistencia descrito anteriormente, se deben obtener las tasas específicas de reacción que conforman la matriz r_m de manera precisa, para lo que se utilizarán balances de masa dinámicos.

5.1.3.1 Balances de masa dinámicos

Las tasas de reacción química, para el sustrato consumido y productos metabólicos formados, pueden ser obtenidas experimentalmente a partir de las concentraciones medidas. Para esto se debe considerar la dinámica del fermentador en el cual son realizadas las mediciones.

Las mediciones son realizadas en un reactor batch, en este caso el flujo de entrada y salida valen cero, por tanto, el volumen se puede considerar constante. Si se toma el fermentador como volumen de control para realizar las ecuaciones, se obtiene la siguiente ecuación para el cálculo de las tasas de reacción química en función de la concentración de los compuestos en el fermentador (Rosenblitt, 1999).

$$r_i = \frac{dC_i}{dt} \quad (1.19)$$

Donde:

r_i : tasa de reacción química del compuesto i (mol/L·hr)

C_i : concentración del compuesto i en el fermentador (mol/L)

Como se aprecia en la ecuación (1.19), se deben emplear derivadas numéricas. Para disminuir el ruido de los datos, es importante obtener derivadas suavizadas. Mediante el método de Taylor, se emplea la derivada central con 3 puntos, lo que permite obtener datos más suavizados (Rosenblitt, 1999).

$$\left(\frac{\partial f}{\partial t}\right)_i = \frac{f_{i+1}\Delta t_-^2 - f_i(\Delta t_-^2 - \Delta t_+^2) - f_{i-1}\Delta t_+^2}{\Delta t_+ \Delta t_- (\Delta t_+ + \Delta t_-)} + O(\Delta t)^2 \quad (1.20)$$

Donde f_i corresponde a la medición acumulada de cualquier variable y Δt_+ y Δt_- a los intervalos de tiempo $[t_i, t_{i+1}]$ y $[t_{i-1}, t_i]$ respectivamente.

Para la derivada forward o backward se utiliza la siguiente ecuación (Rosenblitt, 1999):

$$\left(\frac{\partial f}{\partial t}\right)_i = \frac{\mp f_i(2\Delta t_+ + \Delta t_-)\Delta t_- \pm f_{i+1}(\Delta t_+ + \Delta t_-)^2 \mp f_{i+2}\Delta t_+^2}{\Delta t_+ \Delta t_- (\Delta t_+ + \Delta t_-)} + O(\Delta t)^2 \quad (1.21)$$

$$\Delta t_1 = |t_i - t_{i+1}|$$

$$\Delta t_2 = |t_{i+1} - t_{i+2}|$$

El problema de este sistema es que utiliza puntos discretos y no un ajuste de la curva, lo que puede provocar resultados poco satisfactorios, por este motivo se emplearán las derivadas obtenidas mediante el ajuste de las curvas con el programa Tablecurve 2D, cuando sea posible (Anexo A).

5.1.3.2 Coeficiente de variación, varianza de variables acumuladas y de tasas de reacción química

Para el análisis de consistencia, se emplean diferentes matrices de varianza, las cuales a su vez se derivan de los coeficientes de variación. En esta sección se presentaran las ecuaciones necesarias para su desarrollo.

La varianza de las tasas de reacción química no se puede obtener en forma directa, pues dichas tasas se obtienen de una derivada numérica que combina mediciones del compuesto a evaluar en 3 instantes de tiempo (mediciones acumuladas). Obtener la varianza de la matriz r_m , implica aplicar correctamente el teorema de la suma de varianzas a la ecuación (1.20) utilizando como valores de f_i las varianzas de mediciones acumuladas (Rosenblitt, 1999).

$$Var\left(\frac{\partial f}{\partial t}\right)_i = \frac{\Delta t_+^4 \cdot Var(f_{i+2}) + (\Delta t_-^2 - \Delta t_+^2)^2 \cdot Var(f_i) + \Delta t_+^4 \cdot Var(f_{i-2})}{\Delta t_+^2 \Delta t_-^2 (\Delta t_+ + \Delta t_-)^2} \quad (1.22)$$

Coeficientes Variación

Los fabricantes de equipos, usualmente entregan el error de medición en la forma de coeficiente de variación (CV) o error relativo y no de

varianza. La definición del CV de una variable aleatoria Z se define como (Rosenblitt, 1999):

$$CV_z = 100 \frac{\sqrt{Var(Z)}}{E(Z)} \quad (1.23)$$

A partir de lo anterior, se puede concluir que si se conoce el CV de la tasa de reacción, será sencillo conocer la varianza, reordenando la ecuación (1.23)

Coeficientes Variación y Varianzas de Mediciones Acumuladas

Como se menciona anteriormente, las tasas de reacción química se calculan en base a los valores acumulados de las variables, y por este motivo, se debe estudiar dicha medición.

Usualmente las muestras experimentales se realizan en duplicado y triplicado. Los CV de duplicados y triplicados no corresponden a los de la muestra única.

Si se tiene una muestra en n-plicado, Z_n , lo que quiere decir que la muestra se obtiene por un promedio de n muestras, su varianza se escribe por (Rosenblitt, 1999):

$$Var(Z_n) = Var\left(\frac{\sum_{i=1}^n Z_i}{n}\right) = \frac{1}{n^2} \sum_{i=1}^n Var(Z_i) = \frac{n}{n^2} Var(Z_i) = \frac{Var(Z_i)}{n} \quad (1.24)$$

Manipulando la ecuación (1.24), se obtiene el CV de duplicados o triplicados, cuando se tiene el CV de una medición única:

$$CV_{Z_n} = \frac{CV_{Z_i}}{\sqrt{n}} \quad (1.25)$$

Si los datos se conforman por multiplicaciones o divisiones, el cálculo de los CV se realiza de la siguiente manera (Rosenblitt, 1999):

$$u = \frac{x \cdot y \cdot z \cdot \dots \dots}{p \cdot q \cdot r \cdot \dots \dots}$$

$$CV_u^2 = CV_x^2 + CV_y^2 + CV_z^2 + CV_p^2 + CV_q^2 + CV_r^2 + \dots \quad (1.26)$$

Coeficiente de variación y varianza de CO₂ acumulado

El CO_2 acumulado es obtenido por integración de mediciones instantáneas. El coeficiente de variación corresponde a (Rosenblitt, 1999):

$$CV_{\text{CO}_2} = \frac{CV_{F_{\text{gas}}}}{\sqrt{m}} \quad (1.27)$$

Donde m corresponde al número de mediciones instantáneas utilizadas en la integración para obtener el CO_2 acumulado. $CV_{F_{\text{gas}}}$ es el coeficiente de variación de la medición del CO_2 gaseoso.

Coeficiente de variación y varianza de biomasa y productos

La biomasa y productos corresponden a la medición por método de secado y HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) respectivamente.

$$CV_i = \frac{CV_{im}}{\sqrt{n}} \quad (1.28)$$

Donde el subíndice i corresponde al compuesto y CV_{im} es el CV del compuesto i medido; n corresponde a la cantidad de veces que se tomo la muestra, por ejemplo, si fue realizada en triplicado.

Coeficientes de variación de las tasas de reacción química

Una vez medidos los CV de las mediciones acumuladas de los compuestos de interés, se debe obtener el CV de cada tasa de reacción química aplicando el teorema de suma de varianzas:

$$Var(aX \pm bY) = a^2 Var(X) + b^2 Var(Y) \quad (1.29)$$

Aplicar correctamente este teorema implica que los CV de las mediciones acumuladas deben ser convertidas a varianza según la ecuación (Rosenblitt, 1999).

5.1.4 Valor real de las tasas de reacción química

Normalmente los datos experimentales están cubiertos con ruido y en algunos casos pueden ser errores sistemáticos. Como consecuencia de tales errores en la ecuación 1.16 no es exacta. Por este motivo es

mejor expresar el vector de tasas esperadas como la suma entre el vector de tasas medidas ($\bar{r}_m$) y sus errores de medición (δ) (van der Heijden et al., 1994a; Wang y Stephanopoulos, 1983).

$$r_m = \bar{r}_m + \delta \quad (1.30)$$

De acuerdo a esto, la ecuación 1.18 queda como:

$$\varepsilon = -A\bar{r}_m = -A(r_m + \delta) = -A\delta \quad (1.31)$$

Donde ε es el vector de los residuos.

En todos los set de datos, existe ruido en las mediciones y por tanto, el vector de residuos es distinto de 0, la mejor estimación de las tasas es la que minimiza la magnitud de los residuos. Asumiendo que el que el vector error distribuye normal con media 0 y la matriz de varianza-covarianza F; los residuos (ε) también distribuyen normal con media 0 y matriz de varianza P, el mejor estimador para las tasas medidas es (van der Heijden et al., 1994a; Wang y Stephanopoulos, 1983):

$$\hat{r}_m = \bar{r}_m + \hat{\delta} = \bar{r}_m + FA^T P^{-1} \varepsilon \quad (1.32)$$

Donde P corresponde a $AF A^T$. La marca $\hat{\cdot}$ significa que la variable es una cantidad estimada.

Se asume que los errores son independientes entre sí y no correlacionados, por lo que la matriz de varianza-covarianza se considera diagonal (Wang y Stephanopoulos, 1983). De este modo, F es una matriz con valores distintos de cero en la diagonal, los que corresponden al cuadrado de la multiplicación entre CV y la tasa medida de un compuesto determinado.

5.1.5 Test de Hipótesis

Antes de estimar el valor real de la ecuación (1.32) se debe saber si los valores medidos de las tasas específicas están dentro de los valores razonables o si el vector de residuos es muy alto y por tanto, alguna de las mediciones tiene un error grueso de medición o el modelo empleado es incorrecto. Para cuantificar la afirmación: "diferencias significativas desde cero" en la ecuación (1.18), se

emplea el estadístico H . (Stephanopoulos et al., 1998; van der Heijden et al., 1994b; Wang y Stephanopoulos, 1983).

$$H = \varepsilon^T P^{-1} \varepsilon \quad (1.33)$$

La mejor distribución que caracteriza al estadístico H es la χ^2 , debido a que las medidas brutas son no correlacionadas. Los grados de libertad de esta distribución son iguales al rango de P y A , lo que corresponde al número de restricciones independientes. Con esto es posible determinar errores sistemáticos con un nivel de confianza dado (van der Heijden et al., 1994b; Wang y Stephanopoulos, 1983).

Se debe comparar el valor del estadístico H con el valor de la distribución χ^2 (Tabla 5-2). Una vez encontrados los valores de la distribución, utilizando para ello los grados de libertad del rango de la matriz A y el nivel de confianza que se desea, los datos serán aceptados como correctos o sin errores gruesos de medición, si el valor de H es menor que el valor de la distribución encontrada. Si el valor de H es mayor que el valor de χ^2 se puede concluir que con el nivel de confianza escogido existe un error grueso en la medición de las tasas específicas (van der Heijden et al., 1994b; Wang y Stephanopoulos, 1983). Si existe un error de medición, se debe buscar cual es la fuente de dicho error.

5.1.6 Detección Fuentes de Error

El método de detección de error utilizado, corresponde a la eliminación seriada. Este método consiste en remover una tasa medida de r_m e incorporarla a la matriz r_c . Luego, con esta definición, se procede a calcular el nuevo estadístico H en relación a la distribución χ^2 . Si con la eliminación de una cierta tasa medida, se obtiene un valor de H menor que el valor de χ^2 , con el nivel de confianza definido, se puede concluir que esa tasa contiene un error grueso de medición. Si al eliminar una sola tasa de reacción química no se observan cambios sustanciales en H , esta operación puede repetirse con 2 o más variables a la vez. El límite de las variables a eliminar depende del número de grados de libertad disponibles (Wang y Stephanopoulos, 1983).

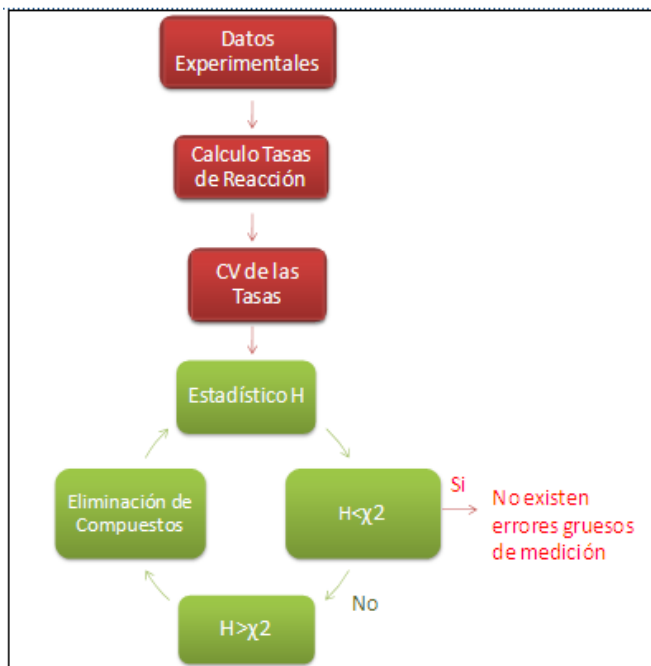
Tabla 5-2: Valores de la distribución χ^2 (Stephanopoulos et al., 1998)

Nivel de Confianza						
Grados de Libertad	0.5	0.75	0.9	0.95	0.975	0.99
1	0.46	1.32	2.71	3.84	5.02	6.63
2	1.39	2.77	4.61	5.99	7.38	9.21
3	2.37	4.11	6.25	7.81	9.35	11.3
4	3.36	5.39	7.78	9.49	11.1	13.3
5	4.35	6.63	9.24	11.1	12.8	15.1

5.1.7 Desarrollo Algoritmo Computacional para Análisis de Consistencia de Datos

Al tener múltiples puntos de muestreo, realizar un análisis de consistencia manual resulta tedioso. Por lo cual, se desarrolló un algoritmo en el programa computacional Matlab (Figura 5-3).

Figura 5-2: Diagrama de bloques para determinar la existencia de errores en la medición de compuestos de interés



Los datos experimentales que se ingresan al sistema corresponden a las tasas específicas tanto de consumo como formación de compuestos; además, se debe ingresar la matriz A y el nivel de confianza con el que se trabajará.

Las tasas específicas se obtienen mediante la utilización del programa TableCurve 2D, el cual ajusta la mejor curva a los datos experimentales (Anexo A)

En la rutina del programa se incluyen los CV⁷ de las mediciones experimentales. A partir de dichos valores, se obtienen los CV de las tasas específicas consumo/formación de compuestos. El CV de las tasas es importante, pues permite calcular la matriz de varianza-covarianza, empleada para la construcción del estadístico H.

Utilizando las ecuaciones explicitadas en las secciones 5.1.1 a 5.1.6, se calcula el valor del estadístico H y se compara con la distribución χ^2 . Si no existen errores gruesos de medición se termina la rutina de ejecución, entregando las tasas reales correspondientes a las tasas experimentales corregidas. De existir errores, el programa sigue con el método de eliminación seriada.

⁷ CV: Coeficiente de Variación

En la eliminación en serie, el programa elimina un compuesto a la vez de la matriz A, calculando el nuevo valor del estadístico H y comparándolo posteriormente con la distribución χ^2 .

6 MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

6.1 Recolección y Conservación de los Mostos

Los mostos de Sauvignon blanc fueron recolectados en la bodega de la Viña Morande, ubicada al sur de Santiago, Chile. La muestra corresponde al clon 5 y fue tomada de la cuba de decantación en fase clara a nivel de turbidez de 60-65 NTU la cual contenía aproximadamente 7000 Litros. A medida que se saca el mosto, este se coloca en recipientes de plástico de 3, 5 y 10 L previamente lavados con detergente y etanol. Durante el transporte, se cubrieron con hielo seco, para evitar fermentación espontánea.

Para conservar el mosto entre fermentaciones, se congeló en una cámara de -20°C, ubicada en el Departamento de Ingeniería Química y Bioprocesos, Pontificia Universidad Católica de Chile.

6.2 Cepa de levadura y Condiciones de Cultivo

La cepa correspondiente a *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (Lalvin, Switzerland), disponible comercialmente, fue utilizada en este estudio. Las células fueron re-hidratadas antes de la inoculación según el protocolo descrito en el Anexo B.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en un bioreactor (Bioengineering, Wald, Switzerland) con aproximadamente 30 litros de mosto, el cual fue inoculado para obtener una densidad inicial de 10^6 cel/ml. La temperatura se conservó a $18 \pm 0,2$ °C. El mosto se mantuvo agitado 12 hrs después de la inoculación para que las células se incorporen homogéneamente al mosto y se mantengan suspendidas, después se dejó de agitar. Antes de terminar la fase exponencial, se adicionó aire a 180 ml/min (considerando que para 20 litros se agrega aire 2 min). Las muestras para determinar parámetros fermentativos fueron recolectadas desde el mosto inicial (antes de la inoculación), y 3 veces al día posterior a la inoculación. Para las muestras de aromas, se guardó 1 litro de mosto inicial y

durante la fase exponencial se recolectan muestras diarias. Las fermentaciones batch consideradas para estudiar los compuestos volátiles y parámetros fermentativos en este trabajo se realizaron en triplicado..

6.3 Técnicas Analíticas de Medición

La evolución de CO₂ en el bioreactor fue determinada con un medidor de flujo volumétrico Gallus 1000 (Schlumberger, Buenos Aires, Argentina). Este equipo es testeado por la compañía que lo fabrica, comparando el volumen medido en el contador con un sistema de referencia estándar. El error del medidor es calculado de acuerdo a las regulaciones existentes.

El espacio de cabeza del reactor se encuentra saturado en CO₂, por lo que el volumen de este gas producido, se midió directamente del medidor de flujo. Para determinar la concentración de CO₂ producido en gramos por litro de solución, se siguen 3 pasos:

Dividir los litros de CO₂ por los litros de solución

Calcular los moles de CO₂ que existen en los litros de CO₂ medido, empleando la ley de los gases ideales:

$$PV = nRT$$

Donde P es la presión (1 atm), V es el volumen del gas en litros, n son los moles de gas, R es la constante de los gases ideales (0.082 atm L/mol K) y T es la temperatura en Kelvin (18°C equivalen a 291K). En estas condiciones 1 mol de gas representa 23.89 litros.

Para calcular los gramos de CO₂ producido a partir de los moles determinados, se utiliza el peso molecular del CO₂ (44 gr/mol), obteniéndose la concentración del dióxido de carbono producido.

Para establecer el comportamiento de la fermentación, se tomaron muestras de cultivo periódicamente (3 veces por día) (Figura 6-1). Se determinó peso seco de las levaduras, densidad óptica y concentración de azúcares. Muestras diarias de cultivo durante la fase exponencial, fueron recolectadas para el análisis de la evolución de compuestos aromáticos durante la fermentación alcohólica y medición de densidad.

El peso seco fue estimado de la siguiente forma: luego de filtrar las levaduras y lavarlas 2 veces con 10 ml de agua destilada, la preparación fue secada hasta alcanzar peso constante en una balanza infrarroja a 85°C (Precisa HA 300). La densidad óptica se midió a 660 nm (Spectronic 20 Genesys). La concentración de azúcares y ácidos orgánicos fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columna de alta resolución Bio-Rad HPX-87H® (Bio-Rad, California, USA) con un flujo de 5 ml/min de una solución 5mM de H₂SO₄ a una temperatura de columna de 55 °C. Para determinar el porcentaje de variación de la columna, la compañía que las fabrica (Bio-Rad), compara la inyección 1 y 200 en una columna estándar para ácidos orgánicos (HPX-87H), encontrándose un porcentaje de variación de 1.9 a 6.3% respectivamente.

Figura 6-1: Reactor utilizado en la investigación, en el cual se indican los puntos de obtención de muestras durante la fermentación alcohólica de mosto de Sauvignon blanc cosecha 2007.



6.3.1 Análisis de Compuestos Volátiles: cromatografía gaseosa- espectrometría de masa (GC/MS)

Los compuestos aromáticos presentes en vino pueden ser separados, identificados y cuantificados por GC/MS. El cromatógrafo utilizado es un Agilent 6890 conectado a un detector de masas Agilent 5972 (Agilent Technologies, Santa clara, CA, USA). La inyección fue realizada mediante un inyector automático con un volumen de 3 μ l a una temperatura de 180°C en el puerto de inyección. El horno se maneja automáticamente con una rampa de temperatura: inicialmente la temperatura es de 40°C la que se mantiene 5 minutos, le sigue una rampa creciente de temperatura de 3°C/min hasta alcanzar los 240°C, la que se mantiene por 25 min. El gas de transporte es helio (pureza 99,999%) con flujo de 1,9 ml/min. Para obtener el espectro de masas, se emplea la ionización de impacto electrónico a 70eV.

El ensayo se realizó en triplicado y la cuantificación de los compuestos se realizó usando el método del estándar interno (nonanol), considerando un factor de respuesta igual a 1. La repetitividad del método desarrollado fue determinada analizando 3 muestras diferentes de un mismo vino, bajo condiciones idénticas. El área del peak obtenido para cada compuesto identificado, en cada uno de los 3 diferentes análisis fue tabulado, y se calculó el coeficiente de variación (CV en %). Los valores considerados deben poseer un CV < 10%, considerando al menos 2 de los valores tabulados.

Los compuestos principales fueron cuantificados en las muestras analizadas, comparando los espectros de masa de los compuestos con 3 bibliotecas disponibles (NIST98, Wiley, AROMLIB), mediante el uso del programa ChemStation® (ChemStation software para GC, Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany).

6.4 Trampa de Aromas

Consiste en el desarrollo de un sistema para capturar los aromas volátiles que se pierden por la corriente gaseosa durante la fermentación. El sistema consiste en instalar 2 condensadores a -5°C para capturar agua y etanol, de modo de no saturar la trampa final. Esto cobra interés pues la trampa final de aromas se encuentra a una temperatura muy inferior a los 0°C, por tanto, el agua que se

encuentra presente en la corriente gaseosa se congelaría impidiendo el paso del CO₂ (Figura 6-2).

Luego de los condensadores se ubica la trampa final de aromas (rodeada por hielo seco), para condensar los compuestos que arrastra el CO₂. El tiempo de captura es entre 6 y 14 hrs. Transcurrido este tiempo, se extrae con 20ml de diclorometano (Merck, rectificado) y se almacena la muestra a -80°C (Anexo C).

Las muestras son recolectadas periódicamente durante la fase exponencial, que es la fase donde se produce la mayor cantidad de CO₂.

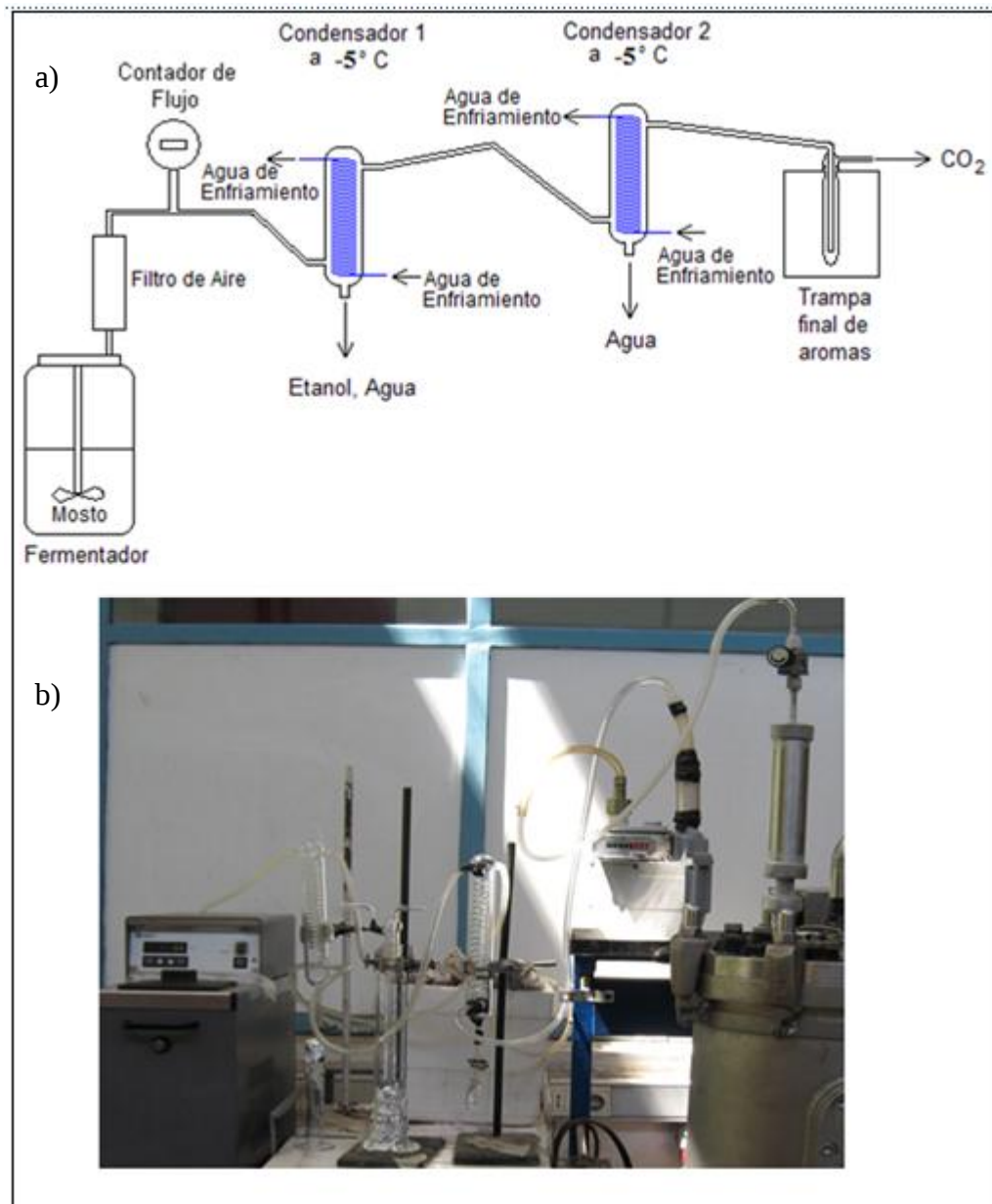
La masa de cada compuesto volátil en la corriente gaseosa se obtiene de la siguiente manera:

$$m_i = c_i \cdot V_d$$

Con m_i la masa del compuesto estudiado, c_i la concentración del compuesto obtenido por GC/MS y V_d el volumen de diclorometano empleado para la extracción.

Las pérdidas de etanol por stripping son medidas utilizando el sistema mencionado anteriormente, recolectando la muestra en la base del condensador 1 (externo al fermentador). Las muestras fueron analizadas por HPLC, en las mismas condiciones indicadas en la sección 6.3. Se debe medir el volumen del líquido condensado, para poder determinar la cantidad total de etanol (gramos) en el lapso de tiempo en el cual la muestra fue realizada.

Figura 6-2: Diagrama de la trampa para capturar aromas, a) esquema del proceso de captura de compuestos aromáticos, b) esquema real de la disposición realizada durante la fermentación alcohólica de mosto S. blanc cosecha 2007.



Con respecto al equipo, las mangueras que conectan el fermentador y los condensadores, no deben ser demasiado largas para facilitar el flujo de CO_2 . Se emplean mangueras de baja permeabilidad al gas de diámetro interno 6.4 mm (Masterflex® Tygon® chemical pump tubing, USA) para que no se produzcan pérdidas de CO_2 .

Los condensadores son fabricados en vidrio con un serpentín interior (basados en el modelo utilizado en el trabajo de Lara (2006)), por el cual circula el agua de enfriamiento (agua + etanol al 50%) a una

temperatura constante de a -5°C , empleando el equipo MultiTemp III, General Electric Healthcare. El fermentador posee un filtro de aire previo a la salida del CO_2 , para evitar la contaminación por microorganismos.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante la investigación y para el fermentador utilizado, no es necesario el empleo de un segundo condensador, pues el agua y etanol presente en la corriente gaseosa condensa totalmente en el condensador previo, a la temperatura de -5°C .

7 RESULTADOS

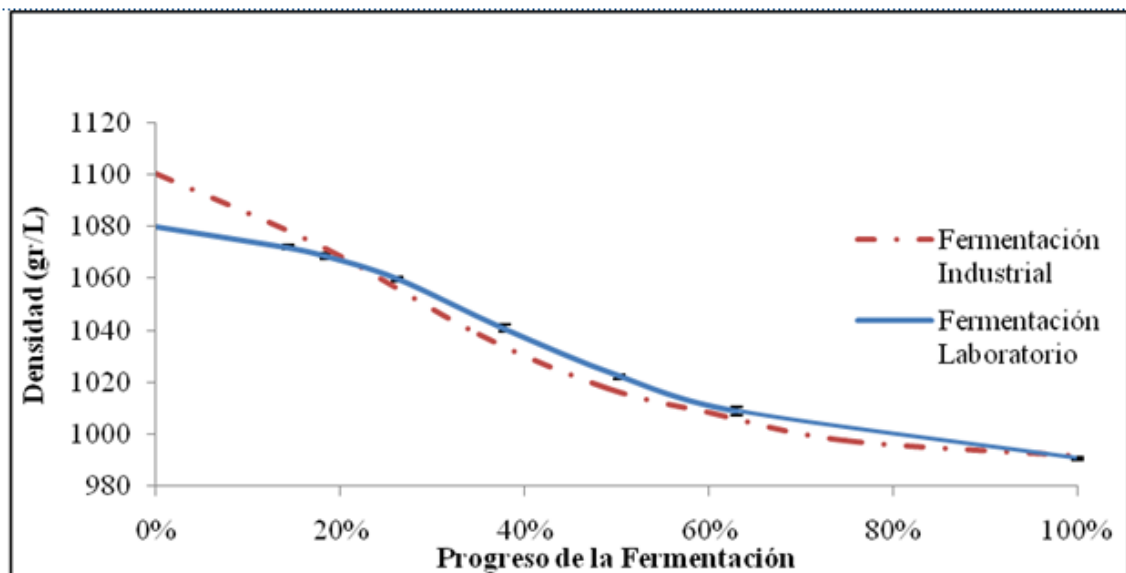
Se cuantificaron parámetros importantes de la fermentación vínica y compuestos volátiles derivados de las levaduras en el medio líquido y también las pérdidas correspondientes a través del medio gaseoso, en fermentaciones con mosto real. La levadura *S. cerevisiae* EC1118 fue elegida debido a su utilización en la industria de vino nacional, además de su habilidad para fermentar en un amplio rango de temperaturas (10°-30°C) (Lallemand).

7.1 Fermentación

Durante la fermentación vínica, se mantuvo una temperatura generalmente constante (datos no mostrados). La temperatura de la fermentación a pequeña escala, fue controlada mediante la circulación de vapor o agua fría en el reactor según fuera necesario ($18^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$). Al décimo día las fermentaciones alcanzaron sequedad⁸. La evolución de la densidad fue muy similar para la fermentación comercial y experimental (Figura 7-1).

Figura 7-1: Densidad de la fermentación vínica a escala laboratorio e industrial (Lara, 2006).

⁸ Sequedad: Concentración de azúcares menor a 2 gr/L



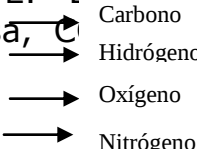
Al inicio de la fermentación se aprecia una mayor diferencia (Tabla 7-1), debido a que la fermentación industrial comenzó con una cantidad de azúcar mayor (232 gr/L) en comparación con la fermentación a escala de laboratorio ($174,9 \pm 2,8$ gr/L). Desde el 20% de progreso de la fermentación, la diferencia entre las curvas se vuelve ínfima, no sobrepasando el 1%.

Tabla 7-1: Evolución de la densidad durante la fermentación alcohólica de mosto S. blanc cosecha 2007

Progreso Fermentación (%)	Densidad Promedio (gr/L) Fermentación Laboratorio	Densidad (gr/L) Fermentación Industrial	Diferencia (%)
0	1080	1100	1,82
15	1071	1077	0,50
25	1060	1058	0,22
35	1044	1038	0,56
45	1029	1024	0,55
60	1012	1008	0,33
75	1003	998	0,52
100	991	990	0,09

7.2 Análisis de Consistencia

Los datos utilizados para el análisis de consistencia, fueron obtenidos de la fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. La fuente de carbono corresponde a glucosa-fructosa y la de nitrógeno a amonio. El modelo supone que no existen metabolitos extracelulares. De este modo, las tasas medidas son sustrato (glucosa y fructosa), biomasa, CO₂, acetato, glicerol, etanol, succinato y la tasa a calcular es NH₃ (amonio).

La matriz que contiene todos los compuestos de interés para el análisis, corresponde a la matriz E. El orden de las columnas es el siguiente: sustrato, NH₃, biomasa,  , glicerol, etanol y succinato.

 Carbono
 Hidrógeno
 Oxígeno
 Nitrógeno

$$E = \begin{pmatrix} 6 & 0 & 1 & 1 & 2 & 3 & 2 & 4 \\ 12 & 3 & 1,61 & 0 & 4 & 8 & 6 & 6 \\ 6 & 0 & 0,54 & 2 & 2 & 3 & 1 & 4 \\ 0 & 1 & 0,14 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{matrix} \longrightarrow \text{Carbono} \\ \longrightarrow \text{Hidrógeno} \\ \longrightarrow \text{Oxígeno} \\ \longrightarrow \text{Nitrógeno} \end{matrix}$$

$$r = \begin{pmatrix} r_s \\ r_n \\ r_x \\ r_c \\ r_a \\ r_g \\ r_e \\ r_{succ} \end{pmatrix}$$

En la matriz E no todos los coeficientes estequiométricos son medibles, por tanto, se deben eliminar las columnas correspondientes a los compuestos no medidos.

El consumo de Amonio no fue medido, por lo que r_n es eliminado de la matriz E

$$A = \begin{pmatrix} 6 & 1 & 1 & 2 & 3 & 2 & 4 \\ 12 & 1,19 & 0 & 4 & 8 & 6 & 6 \\ 6 & 0,54 & 2 & 2 & 3 & 1 & 4 \end{pmatrix} \quad r = \begin{pmatrix} r_s \\ r_x \\ r_c \\ r_a \\ r_g \\ r_e \\ r_{succ} \end{pmatrix}$$

Los grados de libertad del sistema son 4, debido a que existen 8 compuestos (7 medidos y 1 calculado) y 4 balances elementales (carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno), por tanto, el sistema está sobre-determinado. Al existir mayor cantidad de variables medidas que balances, se puede utilizar esta redundancia en el análisis de consistencia.

7.2.1 Cálculo de las tasas de reacción y sus coeficientes de variación

Para calcular las tasas de reacción química se utilizan los datos experimentales acumulados, junto con las ecuaciones 1.20, 1.21 y el programa Tablecurve 2D cuando se puede realizar ajuste de curvas, en caso contrario, se emplean aproximaciones de Taylor. En el caso estudiado, la tasa de formación de acetato es la única que se calcula empleando la aproximación de Taylor.

Se selecciona el programa Tablecurve2D para el cálculo de las tasas de reacción experimentales pues permite la obtención de derivadas numéricas más suavizadas, al no realizar aproximaciones lineales entre 2 puntos. Los residuos calculados a partir de la ecuación (1.31) utilizando las tasas específicas de reacción obtenidas mediante aproximaciones de Taylor, son superiores a los determinados por Tablecurve2D (Anexo D), reforzando la elección de este último programa para el cálculo de las tasas de reacción. Adicionalmente el valor del estadístico H es elevado, alcanzando valores irreales (Anexo E). Por estos motivos, se desarrolla en extenso el análisis de consistencia empleando el ajuste por Tablecurve2D para determinar las tasas de reacción experimentales.

Para obtener las tasas específicas a partir de las tasas de reacción calculadas por Tablecurve2D, se debe dividir por la concentración de biomasa en C-mol. Durante esta normalización, el error en la medición de biomasa es distribuido entre los otros compuestos, lo cual puede transformarse en una desventaja, porque errores en la medición de biomasa pueden no ser detectados o diagnosticados como errores en otros compuestos. Sin embargo, se asume que los errores en la medición de biomasa son aleatorios y por tanto, la normalización con respecto a la biomasa no afecta los resultados.

Cada fermentación se analizará por separado para poder determinar con mayor exactitud donde se localizan los errores en las mediciones.

Tabla 7-2: Resumen tasas de reacción específicas fermentación Batch 1, mosto S. blanc cosecha 2007 ($\text{mol (C-mol h)}^{-1}$), sólo la biomasa se expresa en C-mol/C-mol hr

Tiempo	Sustrato	Biomasa	CO2	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
Horas	mol compuesto/(C-mol biomasa hr)						
0	-0,107	-0,010	0,034	0,032	0,002	0,699	-0,00227
24	-0,137	0,042	0,239	0,026	0,018	0,069	-0,00234
32	-0,166	0,045	0,192	0,199	0,018	0,197	-0,00149
48	-0,088	0,024	0,110	-0,049	0,011	0,267	0,00059
57	-0,076	0,020	0,143	0,066	0,009	0,243	0,00068
106	-0,047	0,001	0,063	0,008	0,001	0,087	0,00027
130	-0,034	-0,004	0,050	0,042	0,002	0,052	0,00016
170	-0,023	-0,010	0,012	0,002	0,0001	0,016	-0,00022
198	-0,026	-0,009	0,013	0,001	0,002	0,228	-0,00130

Tabla 7-3: Resumen tasas de reacción específicas fermentación Batch 2, mosto S. blanc cosecha 2007 (mol (C-mol h)⁻¹), sólo la biomasa se expresa en C-mol/C-mol hr

Tiempo	Sustrato	Biomasa	CO2	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
Hora	mol compuesto/(C-mol biomasa hr)						
0	-0,839	0,042	0,022	0,000	0,001	0,000	-0,00378
24	-0,003	0,032	0,107	0,268	0,016	0,010	0,00228
49	-0,104	0,019	0,099	0,136	0,009	0,181	-0,00039
73	-0,096	0,013	0,154	0,040	0,005	0,163	0,00041
98	-0,056	0,005	0,121	-0,011	0,003	0,112	0,00017
122	-0,031	-0,0003	0,057	0,016	0,001	0,068	0,00009
168	-0,017	-0,001	0,021	0,006	0,001	0,041	0,00015
216	-0,008	-0,026	0,011	0,000	-0,001	0,028	0,00094

Tabla 7-4: Resumen tasas de reacción específicas fermentación Batch 3, mosto S. blanc cosecha 2007 (mol (C-mol h)⁻¹), sólo la biomasa se expresa en C-mol/C-mol hr

Tiempo	Sustrato	Biomasa	CO ₂	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
Hora	mol compuesto/(C-mol biomasa hr)						
0	0,000	0,040	0,025	0,000	0,007	0,059	-0,01118
26	-0,018	0,014	0,065	0,000	0,007	0,051	5,9e-04
49	-0,048	0,017	0,132	0,050	0,009	0,094	0,00104
73	-0,086	0,014	0,216	0,542	0,010	0,249	6,7e-04
97	-0,079	0,007	0,192	-0,052	0,003	0,129	1,4e-04
121	-0,053	0,003	0,115	-0,031	0,002	0,101	0,9e-04
145	-0,039	0,001	0,102	0,047	0,002	0,094	4,0e-04
169	-0,022	-0,002	0,062	-0,009	0,001	0,053	3,7e-04
220	-0,016	-0,015	0,024	0,004	0,001	0,011	7,8e-04

7.2.2 Coeficientes de variación

Los coeficientes de variación de las mediciones, basados en los equipos utilizados, se obtienen de la ecuación (1.27) para el CO₂ y de la ecuación (1.28) en el caso de la biomasa y los productos.

El coeficiente de variación de la medición en el flujómetro es de aproximadamente 10%; con este dato se calcula el CV para el CO₂ utilizando la ecuación (1.27). Para los datos obtenidos por HPLC, el CV para los datos es de 6,3% (debido a que sobre 200 inyecciones, en el equipo, la eficiencia disminuye desde 1,9 a 6,3%) (Tabla 7.5).

El CV del análisis de biomasa, depende de la cantidad de biomasa en la muestra, pues a menor concentración, existe más variación en la medición. Según datos obtenidos del manual del analizador de humedad (humidity analyser HA 300, Precisa), la reproducibilidad medida en porcentaje se indica en la Tabla 7-6.

Tabla 7-5: Expresión y rango para los coeficientes de variación de las medidas experimentales en mol/L, notar que para el CO₂ la letra “m” representa la cantidad de mediciones necesarias para obtener la concentración acumulada de CO₂.

Compuesto	Expresión analítica	Rango CV %
Biomasa	$CV_x = \frac{CV_{xm}}{\sqrt{1}}$	[0,13-1,4]
CO ₂	$CV_{CO_2} = \frac{10}{\sqrt{m}}$	[2,0-10]
Etanol, acetato, glicerol	$CV_i = \frac{6.3}{\sqrt{1}}$	6,3
Sustrato	$CV_s = \frac{\sqrt{6.3^2 + 6.3^2}}{\sqrt{1}}$	8,9

Tabla 7-6: CV de la biomasa en relación al analizador de humedad

Biomasa en la muestra (gr/L)	CV equipo %
0,1	2
1	0,2
10	0,02

Para cada instante de cultivo (tiempos de muestreo), se conoce la cantidad de biomasa presente, por tanto, es sencillo obtener el CV en función del tiempo de fermentación.

7.2.3 Estadístico H

El estadístico H permite determinar si los datos presentan errores; éste se calcula utilizando los datos experimentales aplicados a la ecuación 1.33.

El modelo corrige las tasas específicas de reacción química experimentales con valores del estadístico $H < \chi^2$ (presentan errores de medición consistentes con la matriz de varianza-covarianza) y con valores de $H > \chi^2$ (presentan errores de medición) mediante el empleo de las ecuaciones 1.18, 1.32 y 1.33. De este modo, las tasas de reacción obtenidas presentan formas más suavizadas, pero conservando la tendencia original.

Tabla 7-7: Estadístico H y tasas específicas reales, Fermentación Batch 1 con mosto Sauvignon blanc cosecha 2007, para datos seleccionados.

Tiempo	H	Sustrato	Biomasa	CO ₂	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
Horas		mol compuesto/(C-mol biomasa hr)						
24	0,835	-0,127	0,0408	0,2215	0,0258	0,026	0,2028	-0,0093
32	0,223	-0,162	0,0446	0,1948	0,1986	0,0197	0,1743	-0,0187
48	14,32							
57	0,377	-0,097	0,0200	0,1498	0,0662	0,0093	0,1406	-0,0080
106	0,959	-0,043	0,0010	0,0771	0,0075	0,0018	0,0767	0,0009
130	0,049	-0,035	-0,0040	0,0352	0,0424	0,001	0,0371	0,0045
170	0,980	-0,0225	-0,0092	0,0491	0,0016	0,0016	0,0533	0,0013
198	0,403	-0,0263	-0,0083	0,0608	0,0010	0,0010	0,0646	-0,0006

Tabla 7-8: Estadístico H y tasas específicas reales, Fermentación Batch 2 con mosto Sauvignon blanc cosecha 2007, para datos seleccionados.

Tiempo	H	Sustrato	Biomasa	CO ₂	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
Horas		mol compuesto/(C-mol biomasa hr)						
24	0,52	-0,149	0,030	0,104	0,268	0,022	0,090	-0,0039
49	1,35	-0,104	0,017	0,105	0,136	0,013	0,097	-0,0015
73	0,63	-0,096	0,012	0,156	0,040	0,010	0,150	-0,0002
98	0,023	-0,058	0,004	0,119	-0,011	0,004	0,117	0,0001
122	0,022	-0,032	0,0001	0,053	0,016	0,0003	0,053	0,0002
168	0,116	-0,017	-0,001	0,028	0,007	0,0002	0,028	0,0012
216	2,86	-0,008	-0,024	0,033	0,000	-0,019	0,044	0,0019

Tabla 7-9: Estadístico H y tasas específicas reales, Fermentación Batch 3 con mosto Sauvignon blanc cosecha 2007, para datos seleccionados.

Tiempo	H	Sustrato	Biomasa	CO ₂	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
Horas		mol compuesto/(C-mol biomasa hr)						
26	0,055	-0,035	0,013	0,065	0,000	0,008	0,059	-0,003
49	0,545	-0,086	0,016	0,129	0,050	0,013	0,121	-0,002
72	2,381	-0,288	0,014	0,202	0,542	0,012	0,196	0,0001
97	0,215	-0,077	0,006	0,184	-0,052	0,005	0,181	-0,0002
121	0,016	-0,051	0,003	0,119	-0,031	0,003	0,118	0,0000
145	0,195	-0,045	0,001	0,057	0,047	0,001	0,056	0,0004
169	0,097	-0,023	-0,001	0,051	-0,009	0,0003	0,052	0,0009
220	0,520	-0,016	-0,013	0,037	0,004	0,0100	0,043	0,0016

En la primera fermentación (a las 48 hr), con un 95% de confianza una de las mediciones presenta error grueso de medición mayor al esperado desde la matriz varianza-covarianza (Tabla 7-7). Las

fermentaciones 2 y 3 no presentan errores gruesos de medición, considerando todos los tiempos en que se realizan muestreos (Tabla 7-8 y 7-9).

Para determinar que medición presenta problemas en la fermentación 1, se utiliza el algoritmo de eliminación seriada, calculando nuevamente el valor del estadístico H (Tabla 7-10).

Tabla 7-10: Valor del estadístico H para la hora 48, en fermentación Batch 1 con mosto S. blanc cosecha 2007, aplicando el algoritmo de eliminación de compuestos.

Tiempo (hr)	Compuesto Eliminado						
	Sustrato	Biomasa	CO ₂	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
48	14	8,3	5,89	13,9	8,8	6,1	9,1

Al eliminar un compuesto, el estadístico H debe ser comparado con $\chi^2_{0,95}(2) = 5,99$. De la Tabla 7-10 se aprecia que la eliminación de sustrato, biomasa, acetato, glicerol, etanol y succinato mantiene el valor del estadístico por sobre el valor de la distribución χ^2 . Si se considera la eliminación de la medición de CO₂, H=5,89 valor menor que $\chi^2_{0,95}(2) = 5,99$, se puede decir entonces que con un 95% de confianza que la medición de CO₂ puede ser errónea a las 48 hrs (Tabla 7-10). Las tasas reales son corregidas para el tiempo que presenta el error (Tabla 7-11) y el valor de la tasa estimada correspondiente a la medida eliminada (CO₂) es 0,267

Tabla 7-11: Tasas específicas de los compuestos de interés al eliminar CO₂. Fermentación Batch 1 realizada con mosto S. blanc cosecha 2007

Tiempo	H	Sustrato	Biomasa	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
Horas		mol compuesto/(C-mol biomasa h)					
48	5,89	-0,121	0,023	-0,049	0,016	0,251	-0,004

Al observar la Tabla 7-10 el valor del estadístico H para la medición de etanol ($H=6,1$) es cercano al valor de $\chi^2_{0,95}(2) = 5,99$. Aproximaciones en los cálculos realizados pudo influir en el valor levemente mayor del estadístico H para el etanol, por tanto, se estudiará la eliminación de este compuesto.

Al considerar el etanol como compuesto no medido en lugar del CO_2 , las tasas de reacción cambian (Tabla 7-12) y la tasa específica de etanol calculada corresponde a 0,101. Para saber si la medición de etanol o la medición de CO_2 presenta el error de medición, se compara el valor de todas las tasas específicas de reacción obtenidas mediante el análisis de consistencia para la fermentación batch 1 (Tabla 7-7), con los datos obtenidos para la hora 48 (Tabla 7-11 y 7-12). Para las tasas específicas de biomasa, acetato, glicerol y succinato, no se aprecian diferencias. Sin embargo, las tasas específicas de reacción para etanol, CO_2 y sustrato, difieren dependiendo del compuesto eliminado.

Probablemente CO_2 es el compuesto que presenta el error de medición, pues al eliminarlo la tendencia de las tasas específicas de reacción se mantiene (Tabla 7-7), a diferencia de los valores obtenidos al eliminar el etanol, donde se aprecia que las tasas específicas de reacción a la hora 48 (Tabla 7-12) son menores que las presentadas a las horas 32 y 57 (Tabla 7-7).

Tabla 7-12: Tasas específicas de los compuestos de interés al eliminar etanol. Fermentación Batch 1 realizada con mosto S. blanc cosecha 2007

Tiempo	H	Sustrato	Biomasa	CO_2	Acetato	Glicerol	Succinato
Horas		mol compuesto/(C-mol biomasa h)					
48	6,1	-0,046	0,023	0,112	-0,049	0,016	-0,004

Al considerar la opción de eliminar las tasas específicas de CO_2 y etanol simultáneamente desde la matriz de tasas medidas, el valor del estadístico H es de 16,1. El valor de H es superior a la distribución $\chi^2_{0,95}(1) = 3,84$ por lo que eliminar etanol y CO_2 al mismo tiempo no permite detectar la fuente de error.

Mediante el uso de la matriz estequiométrica y las tasas medidas a partir de la eliminación de la tasa específica de producción de CO_2 , se calcula la tasa de consumo de amonio para cada fermentación (Tabla 7-13).

Tabla 7-13: Tasas específicas de consumo de NH_3 calculadas utilizando las tasas reales medidas después de eliminar el CO_2 , en fermentaciones batch realizadas con mosto S. blanc cosecha 2007

Fermentación 1		Fermentación 2		Fermentación 3	
Tiempo	NH_3	Tiempo	NH_3	Tiempo	NH_3
Horas	mol compuesto/(C-mol biomasa h)	Horas	mol compuesto/(C-mol biomasa h)	Horas	mol compuesto/(C-mol biomasa h)
24	-0,0058	24	-0,0042	26	-0,0015
32	-0,0061	32	-0,0038	32	-0,0023
48	-0,0030	49	-0,0022	49	-0,0025
57	-0,0026	57	-0,0026	55	-0,0032
79	-0,0012	98	-0,0006	97	-0,0008
106	-0,00014	122	-0,0001	121	-0,0005

Al finalizar la etapa exponencial (Tabla 7-13), el amonio se ha consumido completamente, ingresando el cultivo a fase estacionaria.

Con los datos corregidos, se comprueba que al realizar el análisis de consistencia, el balance de masa para el carbono, mejora notoriamente, pues la ecuación (1.10) entrega valores cercanos a 0 (Tabla 7-14, 7-15 y 7-16).

Tabla 7-14: Resultados del balance de masa para el carbono, en Fermentación Batch 1 con mosto Sauvignon blanc cosecha 2007, para tasas de reacción específicas

experimentales y tasas de reacción específicas entregadas por el programa de análisis de consistencia, para tiempos seleccionados.

Tiempo (hr)	Utilizando Datos Corregidos	no Datos corregidos
24	-0,306	-0,002
32	0,081	-0,003
57	0,355	-0,003
106	-0,024	-0,002
130	0,037	0,001
170	-0,165	0,025
198	0,307	0,027

Tabla 7-15: Resultados del balance de masa para el carbono, en Fermentación Batch 2 con mosto Sauvignon blanc cosecha 2007, para tasas de reacción específicas experimentales y tasas de reacción específicas entregadas por el programa de análisis de consistencia, para tiempos seleccionados.

Tiempo (Hr)	Utilizando Datos Corregidos	no Datos corregidos
24	0,7341	0,0064
49	0,1534	-0,003
73	0,0136	0,0012
98	0,0017	-0,0006
122	0,0421	0,0008
168	0,0156	0,0004
216	-0,0062	-0,0004

Tabla 7-16: Resultados del balance de masa para el carbono, en Fermentación Batch 3 con mosto Sauvignon blanc cosecha 2007, para tasas de reacción específicas

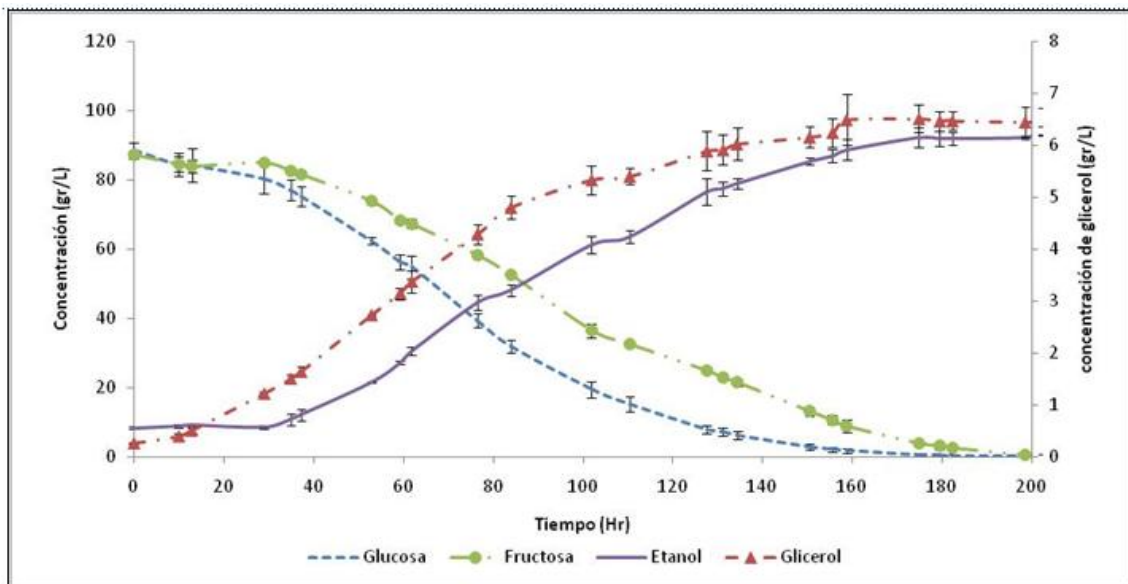
experimentales y tasas de reacción específicas entregadas por el programa de análisis de consistencia, para tiempos seleccionados

Tiempo (Hr)	Utilizando Datos corregidos	no Datos corregidos
26	9,64E-02	-2,00E-03
49	1,80E-01	2,00E-03
73	1,33E+00	4,00E-04
97	-1,11E-01	2,00E-04
121	-5,36E-02	-1,00E-03
145	1,59E-01	-1,40E-03
169	2,05E-02	7,00E-04
220	-5,09E-02	-1,60E-03

7.3 Parámetros fermentativos

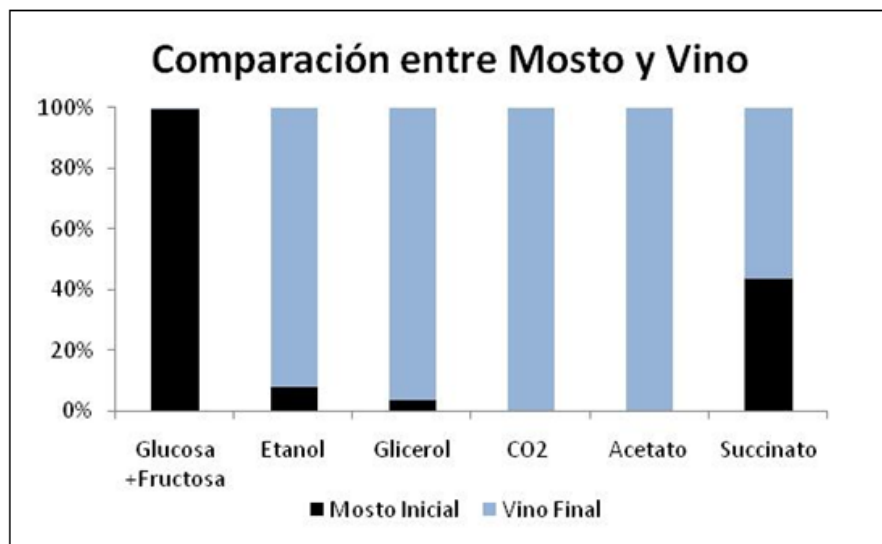
La fermentación se desarrollo con 30 litros de mosto S. blanc, con un tiempo total de fermentación de 211 ± 12 hr. Como las fermentaciones no se realizaron simultáneamente, la variabilidad fue ligeramente mayor, apreciándose una diferencia a la hora de alcanzar sequedad (concentración final de azúcares < 2 gr/L). El perfil de la fermentación se aprecia en la Figura 7-2. La fase lag tiene una duración de 13 horas aproximadamente, durante la cual se consume un 4% del sustrato. La fase exponencial se extiende por 71 horas, finalizando al consumirse el 47% del sustrato en dicha fase. La fase estacionaria, presenta una duración de 120 horas, durante la cual se consume un 49% de sustrato.

Figura 7-2: Perfil de las fermentaciones a escala de laboratorio a 18°C con mosto S. blanc cosecha 2007. Las fermentaciones se realizaron en triplicado.



Como era de esperar el sustrato inicial corresponde al 99,4% del total, mientras el etanol y glicerol en el mosto representan menos del 8 y 3,5% de su concentración final respectivamente. Al final de la fermentación se ha producido todo el CO₂ (Figura 7-3).

Figura 7-3: Comparación entre el mosto inicial y el vino final obtenido, para fermentación Batch a 18°C con la cepa *S. cerevisiae* EC1118.



El balance de los compuestos en C-mol se completa en un 98.8% (Tabla 7-17) pues se cuantificaron los compuestos más importantes,

no considerando por ejemplo el ácido cítrico o el málico. Parte del etanol producido se volatilizó (Tabla 7-19) durante las primeras etapas de la fermentación, subestimándose su producción.

Tabla 7-17: Rendimientos globales, C-mol compuestos en base a C-mol sustrato (glucosa y fructosa) en fermentaciones a 18°C con mosto S. blanc cosecha 2007

	Rendimientos	
Y_{sx}	0,0239 0,0014	±
Y_{sa}	0,0022 0,0004	±
Y_{sg}	0,0365 0,0010	±
Y_{se}	0,6589 0,0114	±
Y_{sc}	0,2658 0,0009	±
Y_{succ}	0,0009 0,0013	±
Total	0,9880 0,0120	±

Donde:

Y_{sx} : Rendimiento biomasa libre cenizas en sustrato

Y_{sa} : Rendimiento acetato en sustrato

Y_{sg} : Rendimiento glicerol en sustrato

Y_{se} : Rendimiento etanol en sustrato

Y_{sc} : Rendimiento CO₂ en sustrato

Y_{succ} : Rendimiento succinato en sustrato

Las fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae* EC1118, tuvieron una duración de 211 ± 12 hr. Después de este periodo, el azúcar

residual es menor a 2 gr/L y el etanol alcanza los 94 gr/L (Tabla 7-18).

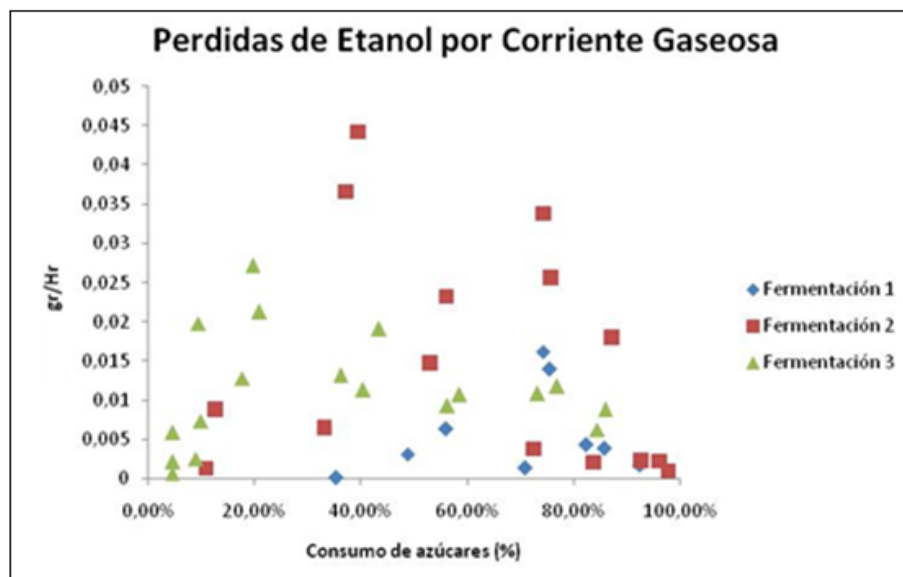
Tabla 7-18: Parámetros de las fermentaciones a 18°C con mosto S. blanc cosecha 2007, para el vino final.

Compuestos	Etanol		Sustrato		Glicerol		CO ₂
Concentración	94	±	1,07	±	6,4	±	76,5
Final (gr/L)	1,09		0,96		0,22		12,6

7.4 Pérdidas de Etanol por Corriente gaseosa

Las pérdidas de etanol por corriente gaseosa se concentran en la fase exponencial (principalmente entre las 40 y 110 hr), pues en dicha etapa se produce la mayor parte del CO₂, disminuyendo en la fase estacionaria (desde las 110 hrs) (Figura 7-18).

Figura 7-4: Perdidas de Etanol por corriente gaseosa durante fermentaciones batch de mosto S. blanc cosecha 2007 a 18°C, en el eje “y” se muestran los gramos perdidos por hora de etanol



Las pérdidas son mínimas (0,05%) (Tabla 7-19), demostrando que no existen fugas y que el reactor al funcionar bien y hermético, parte del gas se condensa en las paredes evitando que se arrastre etanol hacia el exterior.

Tabla 7-19: Porcentaje total de Etanol perdido en la corriente de CO₂, al final de fermentaciones batch con mosto S. blanc cosecha 2007 a 18°C

Fermentación	Porcentaje Total de Etanol Perdido por la Corriente de CO ₂ (%)
1	0,02
2	0,06
3	0,07
Promedio	0,05 ± 0,03

7.5 Comparación con Fermentación Industrial

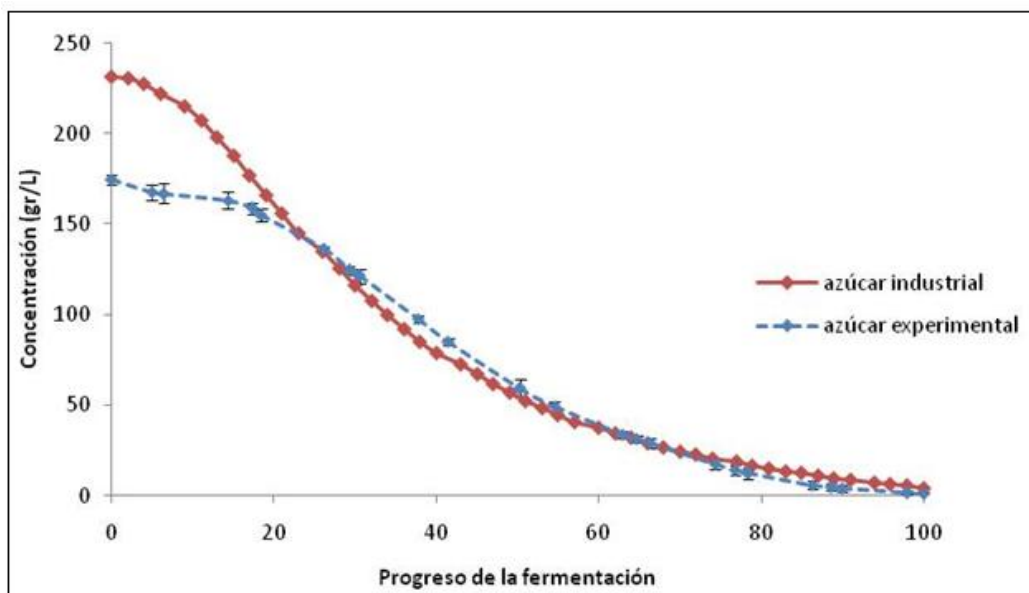
Para comparar los compuestos volátiles producto del metabolismo de las levaduras, en fermentaciones a escala de laboratorio y fermentaciones industriales, se emplea el trabajo realizado por Lara (2006). La fermentación industrial se realizó con 17.754 litros mosto Sauvignon blanc cosecha 2006 (viña Concha y Toro), empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. Las muestras de mosto y vino fueron recolectadas a densidades predefinidas (Lara, 2006). Para cuantificar los compuestos volátiles arrastrados por la corriente de CO₂, se desarrolló en el trabajo de Lara (2006) un sistema captador de compuestos volátiles (trampa de aromas), el cual se empleó como base para los estudios de fermentaciones a escala de laboratorio. Las características aromáticas de las muestras fueron analizadas utilizando técnicas basadas en cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) (Lara, 2006).

Para poder realizar una comparación de los compuestos volátiles producidos durante la fermentación alcohólica entre la fermentación industrial (Lara, 2006) y la fermentación realizada a escala de

laboratorio, se debe estudiar primero si los parámetros de la fermentación se comportan de modo similar.

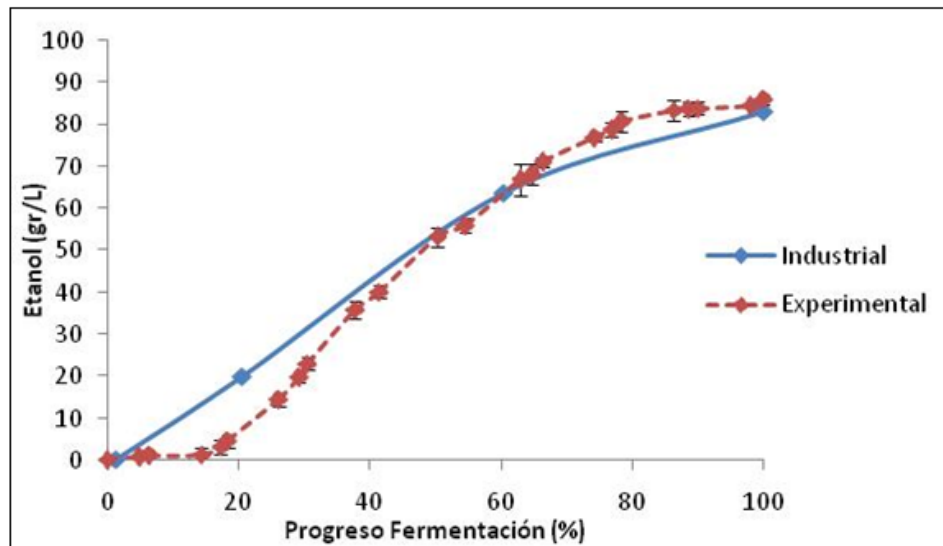
El consumo de azúcares presenta un comportamiento similar desde el 20% de progreso de la fermentación, punto desde el cual la diferencia entre las curvas no sobrepasa el 4%. La relación densidad-azúcares se mantiene lineal durante toda la fermentación (Anexo F).

Figura 7-5: Evolución de los azúcares durante la fermentación de Sauvignon blanc



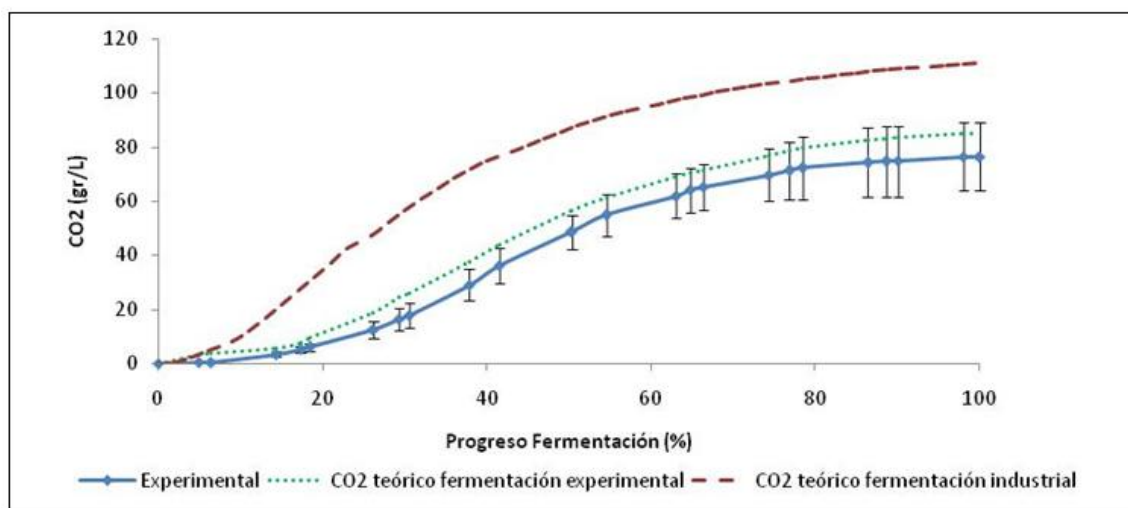
La concentración de etanol presenta un comportamiento similar durante el transcurso de las fermentaciones (Figura 7-6). Sin embargo, esta similitud se logra a partir del 26% de progreso de la fermentación, no sobrepasando el 9% de diferencia entre las curvas a partir de dicho punto. Esta mayor diferencia entre las curvas se puede deber al hecho de que se cuenta con una mínima cantidad de puntos de muestreo durante la fermentación industrial, lo que influencia la curva obtenida y por tanto, la comparación con la fermentación a escala de laboratorio. La diferencia entre las curvas de concentración de glicerol, no sobrepasa el 4%, a partir del 26% del progreso de la fermentación. Las curvas de evolución de acetato durante la fermentación no presentan diferencias significativas (Anexo F).

Figura 7-6: Evolución de la concentración de etanol durante la vinificación de Sauvignon blanc en fermentaciones de laboratorio y en escala industrial.



La concentración final de CO_2 en la fermentación industrial es 35 ± 13 gr/L mayor que la obtenida en la fermentación realizada en menor escala (Figura 7-7). Esta diferencia en la producción de CO_2 se debe a que la fermentación a escala de laboratorio comienza con una menor concentración de azúcares. Al graficar la producción de CO_2 teórico (un mol de azúcares produce 2 moles de CO_2) a partir de 175 gr/L de azúcares, las curvas para la fermentación a escala de laboratorio (experimental) y para CO_2 teórico, no muestran diferencias significativas (Figura 7-7).

Figura 7-7: Evolución del CO_2 producido durante la fermentación de Sauvignon blanc.



Al comprobar que los parámetros fermentativos se comportan de manera similar entre las vinificaciones estudiadas, se pueden escalar los resultados obtenidos en fermentaciones a menor escala, comparando los compuestos volátiles generados.

7.6 Compuestos volátiles producidos durante fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 a 18°C

Cuando se presentan mezclas de compuestos volátiles, como en el vino, se necesita saber cuáles son los compuestos aromáticos que influyen en el producto final. Esto depende de los umbrales de percepción (menor concentración capaz de producir sensación aromática detectable) y de la concentración. La contribución de cada compuesto volátil al aroma del vino puede ser evaluado cualitativamente a través de su descriptor asociado y cuantitativamente mediante las OAV. Así, un compuesto puede tener una alta concentración pero si su umbral de percepción es mayor, dicho compuesto no contribuirá significativamente al aroma. Se definen, por tanto, las OAV como un parámetro para determinar si un compuesto aporta realmente al aroma del vino.

Se reconocieron 51 compuestos volátiles en las fermentaciones de Sauvignon blanc (cosecha 2007), 5 ésteres de acetato, 11 ésteres etílicos, 9 alcoholes, 9 ácidos, 5 compuestos C6, 4 aldehídos y cetonas, 2 lactonas, 2 fenoles, 1 derivado azufrado y 3 compuestos que no se encuentran en ninguna de las categorías anteriores (Tabla 7-20).

Tabla 7-20: Descriptores, umbrales, concentraciones y OAV para compuestos encontrados en vino, al final de la fermentación alcohólica de mosto S. blanc cosecha 2007, para las 3 fermentaciones realizadas.

Compuestos	Umbral percepción (µg/L)	Descriptor	Concentración Final $\bar{x} \pm SD$ (µg/L)	OAV Final
Esteres				
Isobutil acetato	1600 ^{(1) (2) (3) (4) (5)}	anis, dulce, frutal, manzana, plátano	118,6 ± 3,5	0,074 ± 0,002
Etil butirato	20 ^{(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)}	Manzana, frutal, hazelnuts, piña, fresa	390,2 ± 25,4	19,5 ± 1,3
Isoamil acetato	30 ^{(2) (3) (5) (6) (8)}	frutal, plátano	4708,6 ± 170,1	156,9 ± 5,7
etil hexanoato	14 ^{(1) (2) (3) (5) (6) (7) (8)}	Anis, frutal, manzana, cascara de manzana	1490,3 ± 41,5	106,4 ± 2,9
hexil acetato	1500 ⁽²⁾	Pera, manzana	633,82 ± 7,5	0,42 ± 0,005
piruvato de etilo	sin referencia		40,0 ± 3,2	
Etil lactato	154636 ^{(1) (2) (3)}	Frutal, cremoso, mantequilla, dulce, coco	620,1 ± 18,8	0,004 ± 0,0001
Etil octanoato	580 ^{(2) (3) (7)}	Fruta, plátano, fruta, graso, piña, pera, floral, cerveza	2249,4 ± 110,7	3,9 ± 0,2
Etil 3 hidroxibutanoato	20000 ^{(1) (2)}	frutal	153,1 ± 3,0	0,008 ± 0,0002
Etil acetato	12264 ^{(1) (2)}	Dulce, frutal, manzana, plátano, piña	1466,5 ± 26,7	0,12 ± 0,002
Etil 4 hidroxibutanoato	sin referencia		1470,6 ± 28,2	
fenetil acetato	250 ^{(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)}	rosa, frutal, miel, floral, tabaco	766,3 ± 19,5	3,07 ± 0,08
3 metil butil acetamida	sin referencia		375,2 ± 21,4	
Etil laurato	sin referencia		121,2 ± 14,9	
Etil hexadecanoato	>2000 ^{(2) (3)}		35,5 ± 3,7	0,02 ± 0,002
Monoetil succinato	sin referencia		672,2 ± 24,3	
Alcoholes				
Propanol	306 ⁽⁷⁾	Fruta madura, alcohol	609,7 ± 14,8	2 ± 0,05
Isobutil alcohol	40000 ^{(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)}	alcohol, nail polish, vino, solvente, amargo	2177,9 ± 52,8	0,05 ± 0,001
1 butanol	150000 ^{(1) (2) (3) (7)}	medicinal, pasto	256,4 ± 10,03	0,002 ± 6,7e-5
Isoamil alcohol	30000 ^{(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)}	whisky, malta, cloro, frutal, alcohol, rancio, queso	46129 ± 1122,3	1,5 ± 0,04
1 propanol 3 etoxy	100 ⁽⁷⁾	frutal, especias	635,3 ± 12,9	6,35 ± 0,13
Isopropil alcohol	sin referencia		0	

benzil alcohol	200000 ^[1]	pasto	565,7 ± 15,9	0,003 ± 7,9e-5
2 fenil etanol	14000 ^[2]	rosa, miel, especias	14493,3 ± 274,6	1,04 ± 0,02
tirosol	sin referencia		1174,7 ± 22,7	
2,3 butanediol	150 ^[1]	frutal	3125,3 ± 120,2	20,8 ± 0,8
1,3 butanediol	sin referencia	floral	791,5 ± 33,01	
<i>Alcoholes C6</i>				
hexanal	4.5 ^[3]	lechuga, pasto cortado, zapallo	0	
hexanol	8000 ^[1-10-12-13]	resma, flores, pasto cortado, herbáceo, leñoso	860,2 ± 10,3	0,1 ± 0,001
cis 3 hexenol	400 ^[1-12-14-15-16-18]	Pasto cortado, verde, limón, licor, dulce	106,9 ± 2,5	0,27 ± 0,006
3 hexenol (trans)	sin referencia		125,1 ± 2,9	
trans 2 hexenol	sin referencia		0	
<i>Ácidos</i>				
Ácido acético	200000 ^[12-18]	vinagre, acético, picante	2714,8 ± 110,2	0,014 ± 0,0006
Ácido isobutírico	2300 ^[2-12-13]	rancio, mantequilla, queso	207,8 ± 6,7	0,09 ± 0,003
Ácido butírico	173 ^[1-12-13]	rancio, queso, sudor	316,2 ± 6,9	1,8 ± 0,04
Ácido isovalérico	33.4 ^[1-12-14]	Queso rancio, sudor, ácido	416,09 ± 7,3	12,5 ± 0,2
Ácido hexanoico	420 ^[1-12-13-14]	mantequilla, pasto, rancio, queso, sudor	3734,6 ± 123,4	8,9 ± 0,3
ácido trans 2 hexenoico	sin referencia		34,1 ± 0,9	
Ácido octanoico	500 ^[12-14]	sudor, queso rancio	8308 ± 118	16,6 ± 0,24
Ácido decanoico	1000 ^[1-12-13-14]	Rancio, graso	3525,1 ± 121,8	3,5 ± 0,12
Ácido hexadecanoico	10000 ^[2]		956,03 ± 55,7	0,1 ± 0,006
<i>Aldehídos y Cetonas</i>				
Acetoina	150000 ^[1-12-13-17-18]	Mantequilla, crema, floral	238,5 ± 12,2	0,0016 ± 8,1e-5
Acetol	sin referencia		0	
<i>Lactonas</i>				
γ butirrolactona	35000 ^[2]	manzana	622,8 ± 13,1	0,02 ± 0,0004
Pantolactona	2200 ^[1]	balsámico, humo, pan tostado	39,3 ± 1,2	0,02 ± 0,0005
<i>Fenoles</i>				
4 vinilguaiacol	1100 ^[1-13]	Curry, cuero, establo, madera quemada	167,8 ± 4,5	0,2 ± 0,004
4 vinilfenol	180 ^[1]	humo	1409 ± 26,2	7,8 ± 0,1
Azufrados				
metionol	1000 ^[8]	dulce, papa cocida	159,6 ± 4,7	0,2 ± 0,005
<i>Otros</i>				
cis 4hidroxymethyl 2 methyl 1,3 dioxolane	sin referencia		95,3 ± 5,2	
trans 4 hydroxymethyl 2 methyl 1,3dioxolane	sin referencia		148,2 ± 8,5	
diol 3,7	sin referencia		107,3 ± 2	

x ± SD: Concentración promedio final ± desviación estándar

[1] Gómez-Míguez et al. (2007)

[2] Francis y Newton (2005)

[3] www.leffingwell.com/odorthre.htm

[4] Guth (1997)

[5] Campo et al. (2006)

[6] Petka et al. (2006)

[7] Muñoz et al. (2007)

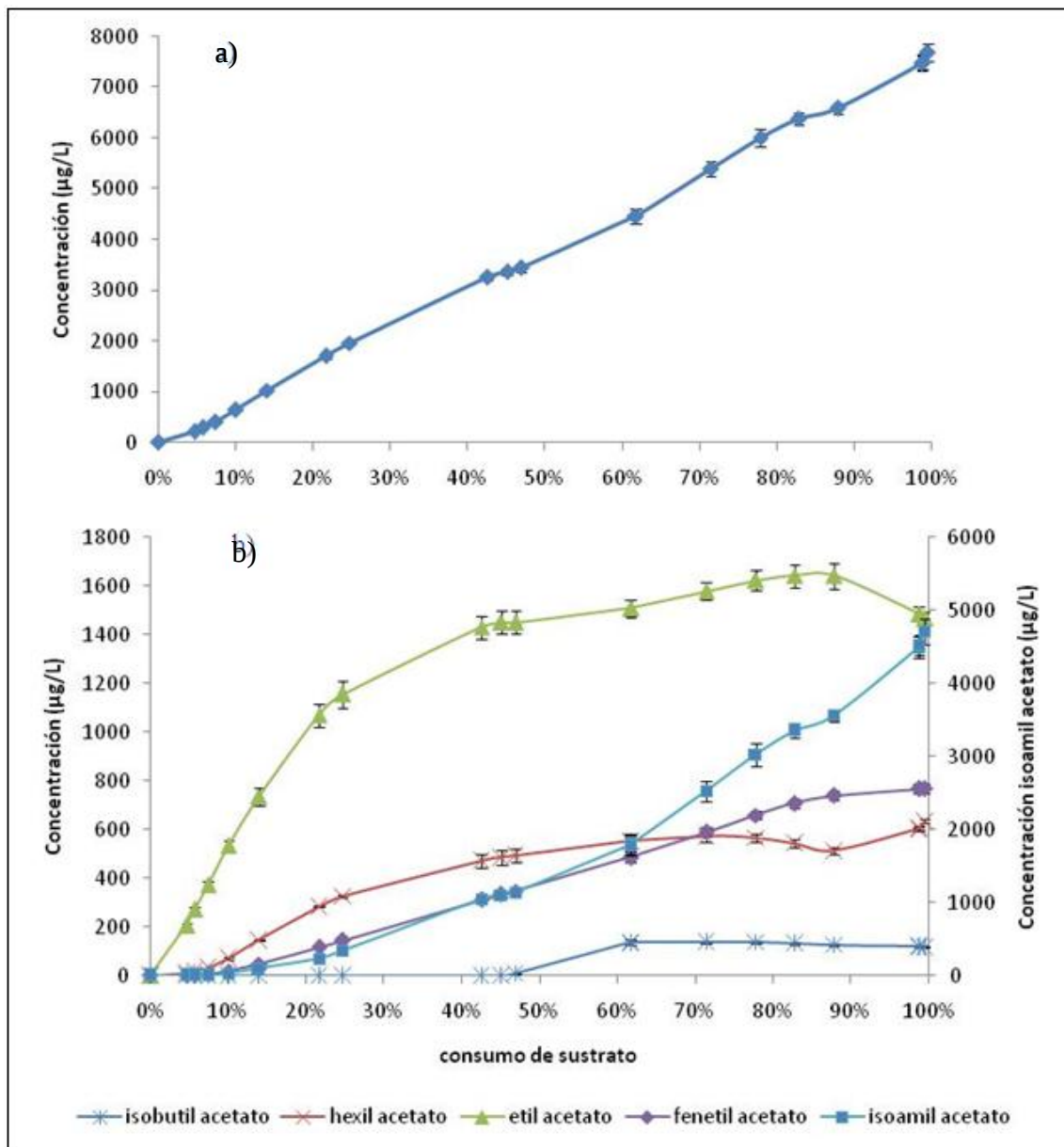
[8] Ferreira et al. (2000)

Ésteres

Ésteres de Acetato

El promedio de estos compuestos al final de la fermentación alcohólica es de $7,7 \pm 0,2$ mg/L. Junto con los esteres etílicos son los principales responsables de las características frutales y florales de los vinos. Dos de cinco esteres de acetato cuantificados, isoamil acetato y fenetil acetato, muestran importancia sensorial con OAV > 1. El OAV de isoamil acetato fue considerablemente alto, indicando la importante contribución al carácter frutal, especialmente "plátano" (Tabla 7-20).

Figura 7-8: Evolución promedio de los ésteres de acetato durante la fermentación alcohólica de mosto S. blanc (cosecha 2007) a 18°C. (a) Producción de ésteres de acetato totales, (b) isobutil acetato, hexil acetato, etil acetato, fenetil acetato e isoamil acetato durante la fermentación.



Se encontró que la correlación para las concentraciones de fenetil acetato y su correspondiente alcohol precursor (fenetil alcohol) indican relación lineal, con $r^2 \approx 0,994$, cuando se ha consumido más del 14% de sustrato (Anexo G). En el caso de isoamil acetato e isoamil alcohol se obtiene relación lineal entre el 14 y 88% de consumo de azúcares (datos no mostrados).

Los ésteres de acetato se producen y acumulan durante toda la fermentación (Tabla 7-21), con una evolución similar para cada compuesto de esta familia (Figura 7-8).

Tabla 7-21: Producción de ésteres de acetato en fermentación alcohólica de mosto S. blanc (cosecha 2007) a 18°C. En relación al consumo de sustrato (glucosa+fructosa)

Consumo de sustrato (%)	0	25	45	62	78	100
Concentración acumulada (µg/L)	0	1965±58	3369±67	4471±151	6014±164	7694±174
Formación (%)	0	26±1,0	44±1,3	58±2,4	78±3	100±3,2

Los ésteres son los compuestos que presentan mayores pérdidas por la corriente de CO₂ en una fermentación industrial, con un 26% (Lara, 2006). Las cubas industriales no se encuentran herméticas ni poseen condensadores, por lo que se libera gran cantidad de CO₂ el que arrastra estos compuestos, obteniéndose una menor concentración de ésteres comparado con una fermentación a pequeña escala. La concentración final de ésteres de acetato en el vino terminado, normalizado en base al consumo de azúcares, es 21% superior en las fermentaciones a escala de laboratorio (Figura 7-9). El comportamiento observado podría deberse al arrastre estos compuestos por la corriente de CO₂, el cual en una fermentación industrial es de 20% del total de ésteres de acetato (Lara, 2006), en cambio, en las fermentaciones a escala de laboratorio, sólo se detectó la pérdida de 275 ± 26 µg/L de isoamil acetato y 93 ± 23 µg/L hexil acetato por la corriente de CO₂, correspondiente a un 7% del total de ésteres de acetato (Figura 7-10a). Al comparar las pérdidas normalizadas por el consumo de azúcar, se mantiene la tendencia. Un 19% de los ésteres de acetato es perdido mediante la corriente gaseosa en la fermentación industrial, mientras que en las fermentaciones a escala de laboratorio se pierde aproximadamente un 4%.

Figura 7-9: Evolución de los ésteres de acetato durante la vinificación de Sauvignon blanc

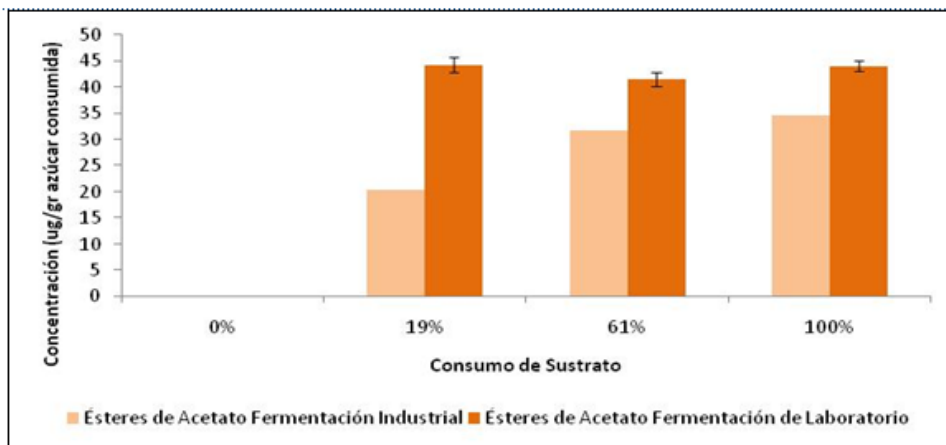
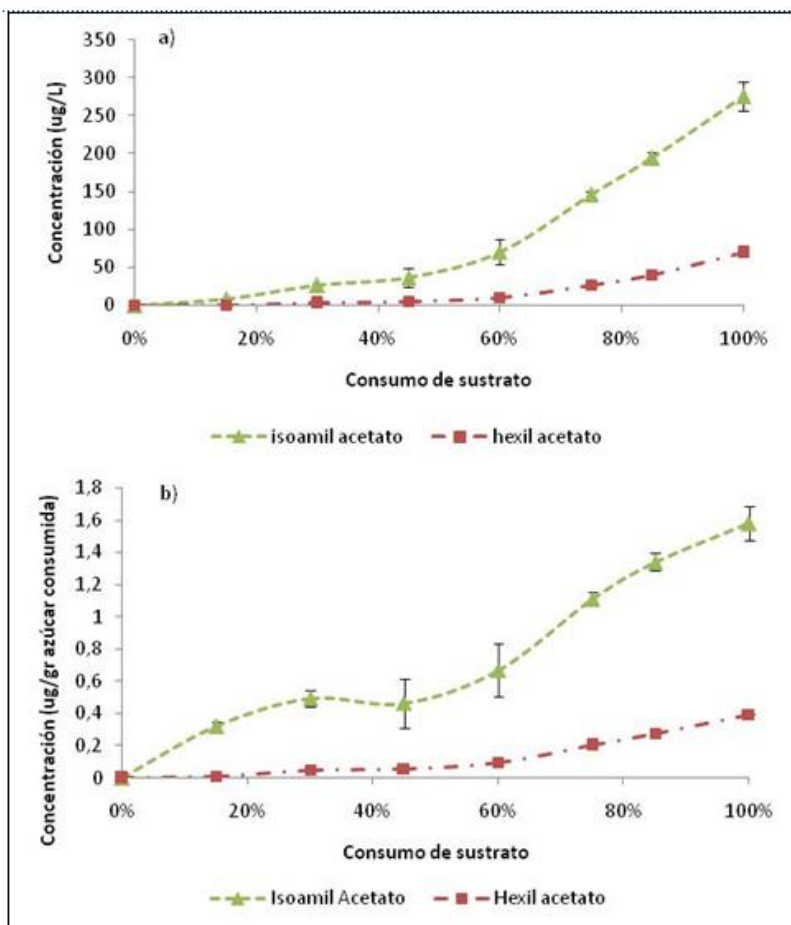


Figura 7-10: Pérdida acumulada de a) isoamil acetato y hexil acetato en µg/L; b) pérdidas de isoamil acetato y hexil acetato normalizadas con respecto al consumo de azúcares (µg/gr), durante la fermentación de mosto Sauvignon blanc (cosecha 2007) a escala de laboratorio.



Ésteres Etílicos

Estos compuestos presentan un importante aumento durante la fermentación, desde $98 \pm 1 \mu\text{g/L}$ a $7618 \pm 131 \mu\text{g/L}$. Los ésteres etílicos que presentan altas concentraciones son etil octanoato, etil hexanoato y etil butirato con OAV elevados (Tabla 7-20) determinando su importancia en el aroma frutal y floral del vino final. Etil hexanoato fue el ester etílico más importante, con un OAV de 106 ± 3 a la temperatura de fermentación, siguiéndole en importancia etil octanoato con un OAV de $3,9 \pm 0,2$.

A diferencia de lo que sucede con los esteres de acetato, este tipo de ésteres se acumula principalmente en las últimas etapas, produciéndose cerca del 50% antes de finalizar la fase exponencial (Tabla 7-22). La tasa de síntesis de etil hexanoato, etil octanoato y etil 4 hidroxí butanoato fue mayor en las últimas etapas de la fermentación, a diferencia de lo que sucede con etil butirato, donde la

máxima producción se logra en la fase exponencial, posteriormente su concentración varía levemente (Figura 7-11 b).

Figura 7-11: Producción promedio de ésteres etílicos durante la fermentación alcohólica de S. blanc (cosecha 2007) a 18°C en escala de laboratorio. (a) Ésteres totales cuantificados, (b) etil hexanoato, etil octanoato, etil 4 hidroxibutanoato, etil butirato, otros (piruvato de etilo, etil lactato, etil 3 hidroxibutanoato, 3 metilbutil acetamida, etil laurato, etil palmitato y monoetil succinato), sintetizados durante la fermentación alcohólica.

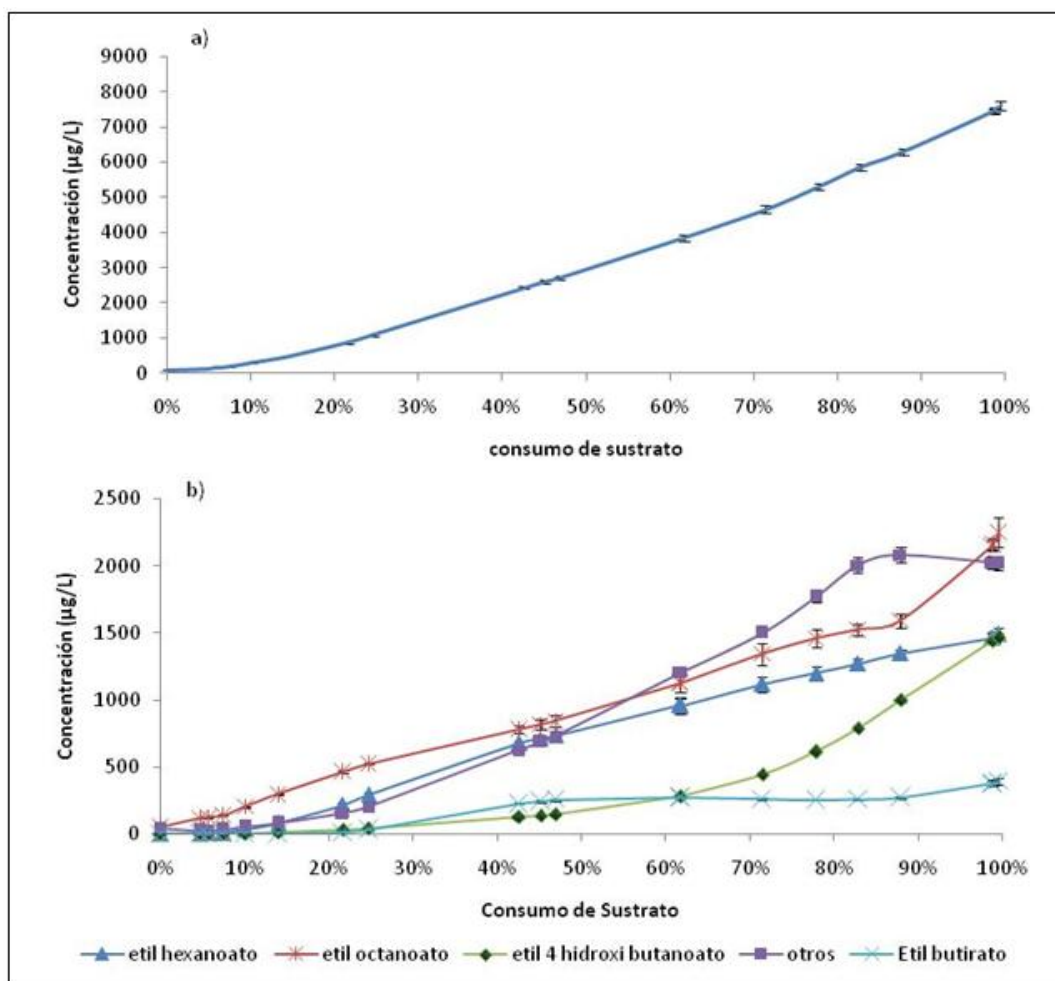


Tabla 7-22: Producción de ésteres etílicos en fermentación alcohólica de mosto S. blanc (cosecha 2007) a 18°C. En relación al consumo de sustrato (glucosa+fructosa)

Consumo de sustrato (%)	0	25	45	62	78	100
Concentración acumulada ($\mu\text{g/L}$)	98,4 $\pm$ 1,0	1091 $\pm$ 27	2592 $\pm$ 51	3841 $\pm$ 96	5291 $\pm$ 96	7617 $\pm$ 131
Formación (%)	1,3 $\pm$ 0,03	14 $\pm$ 0,4	34 $\pm$ 0,9	50 $\pm$ 1,5	70 $\pm$ 1,7	100 $\pm$ 2,4

Los ésteres etílicos muestran una gran diferencia en relación a la concentración final obtenida en fermentaciones industriales y de laboratorio, quintuplicando la concentración ($\mu\text{g/gr}$ consumo de azúcar) encontrada en el vino final obtenido industrialmente (Figura 7-12), a pesar de que las pérdidas de estos compuestos por la corriente gaseosa en la fermentación industrial ($\sim 20\%$), son similares a los que presentan los ésteres de acetato.

La concentración de los ésteres etílicos durante la fermentación de laboratorio, se ve favorecida debido a que las pérdidas son menores (3% de la concentración total de estos compuestos) y se registran sólo 2 compuestos en la corriente de CO_2 : etil butanoato y etil hexanoato (Tabla 7-23), presentando un comportamiento similar (Figura 7-13a y 7-13b).

Figura 7-12: Evolución de los ésteres etílicos durante la vinificación de Sauvignon blanc, normalizados con respecto al consumo de azúcar

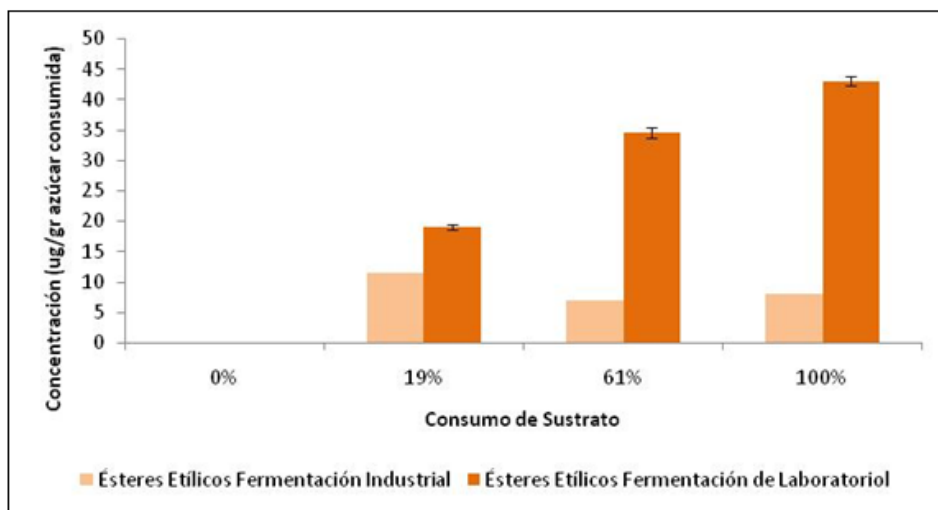
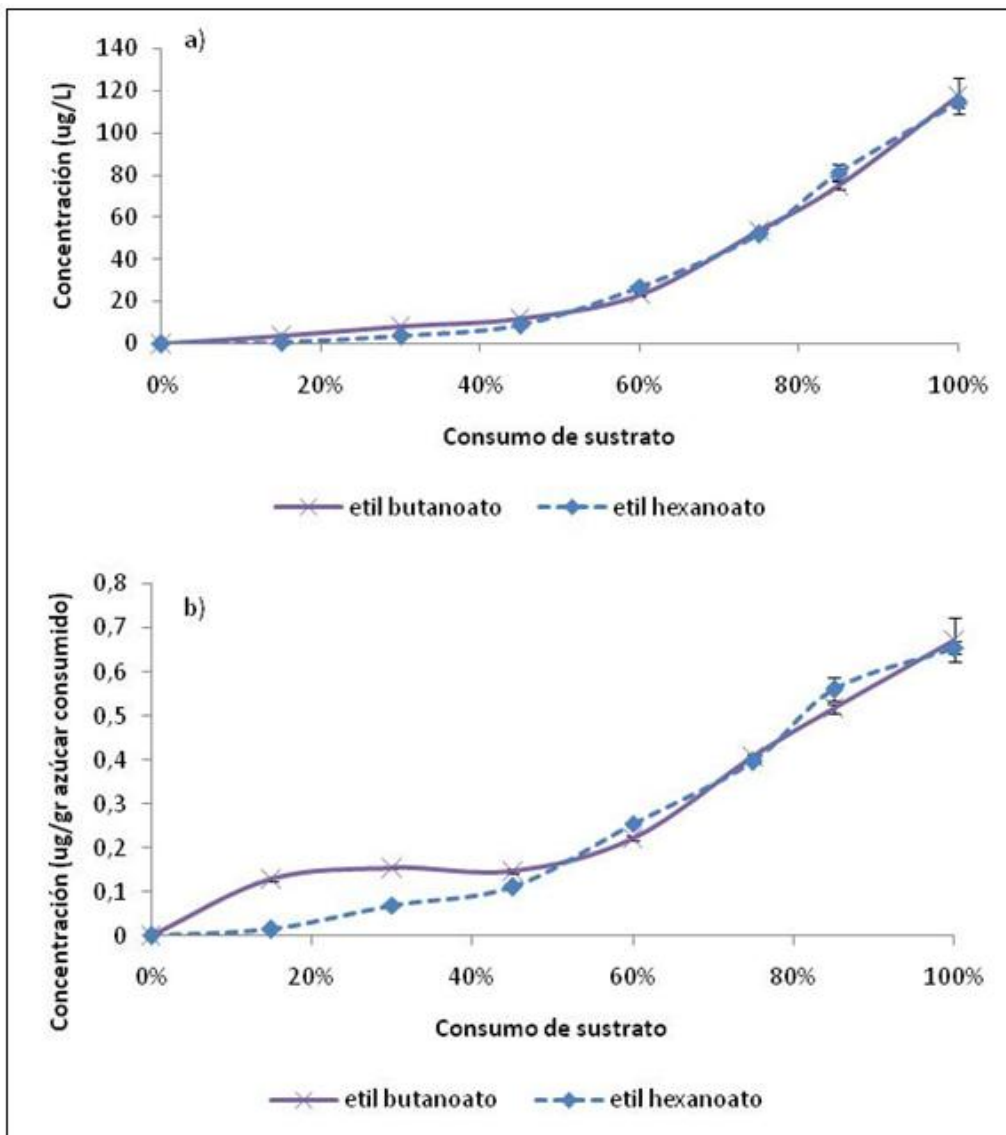


Tabla 7-23: Distribución de dos ésteres etílicos encontrados en la corriente de CO₂ en fermentaciones de laboratorio. Estas pérdidas equivalen a un 4% de los ésteres etílicos totales.

Compuesto	% en vino	% en el CO ₂
etil butirato	69	31
etil hexanoato	93	7

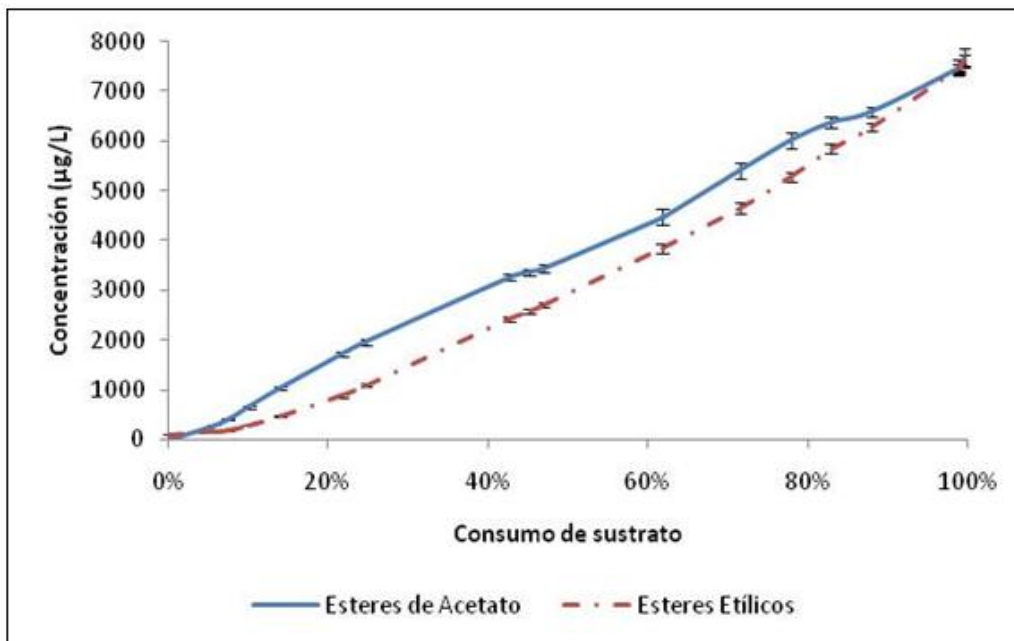
Figura 7-13: Pérdida acumulada de los 2 ésteres etílicos encontrados en la corriente gaseosa durante la fermentación de mosto Sauvignon blanc (cosecha 2007) a escala de laboratorio. a) Valores en µg/L y b) valores normalizados con respecto al consumo de azúcares (µg/gr).



Comparación entre ésteres etílicos y ésteres de acetato

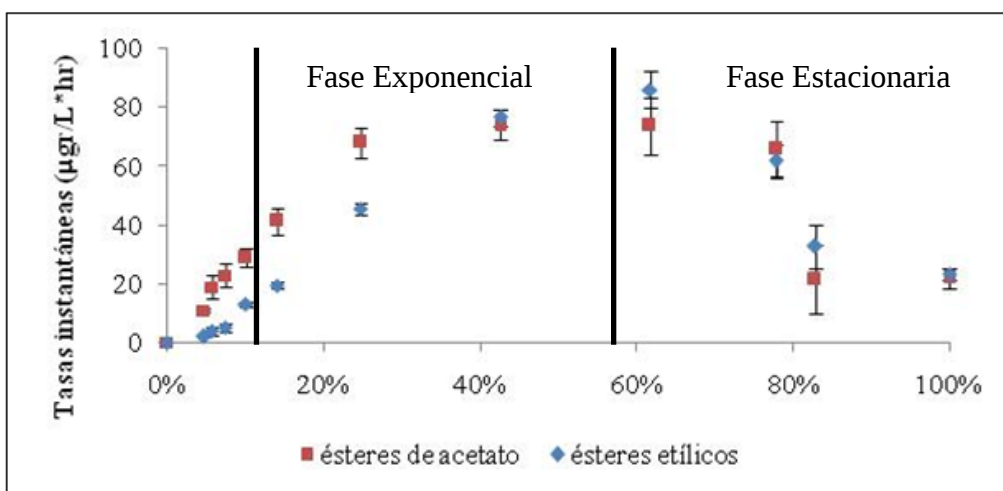
Al comparar las 2 clases de ésteres, se aprecia que los ésteres de acetato dominan durante toda la fermentación. Sin embargo, hacia el término del proceso, las curvas se solapan (Figura 7-14).

Figura 7-14: Comparación entre la producción de ester de acetato y ester etílicos durante la fermentación alcohólica de S. blanc (cosecha 2007) a 18°C



Los ésteres de acetato y etílicos presentan tasas de síntesis similares durante la fermentación, apreciándose una mayor síntesis durante el final de la fase exponencial y el principio de la fase estacionaria (Figura 7-15).

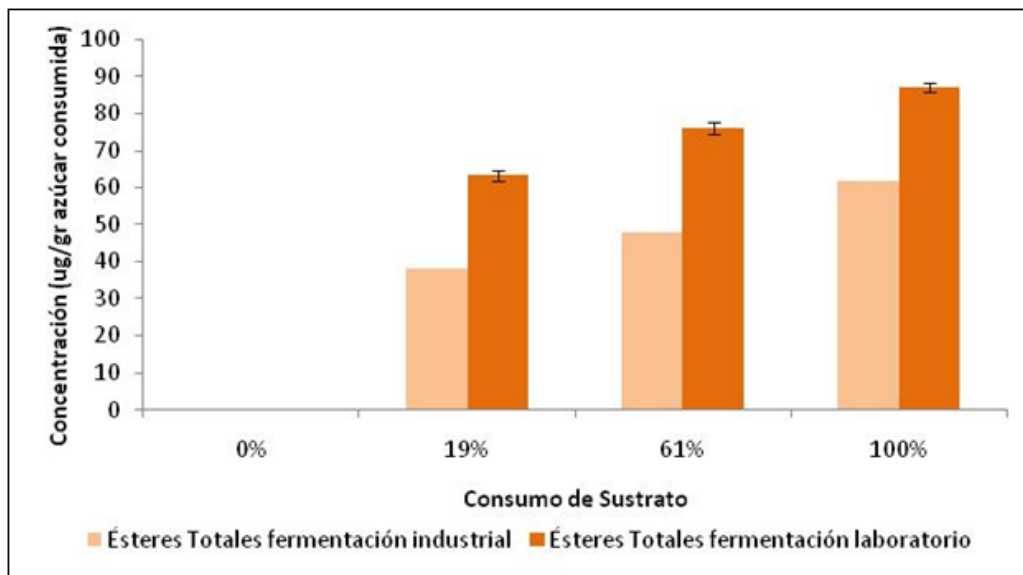
Figura 7-15: Tasas instantáneas de producción de ésteres de acetato y etílicos, durante la fermentación alcohólica de *S. blanc* (cosecha 2007) a 18°C



Al agrupar las 2 clases de ésteres, las diferencias entre las concentraciones finales obtenidas en la fermentación de laboratorio y

la industrial disminuyen (Figura 7-16). Sin embargo se continúa apreciando el efecto de una mayor pérdida de ésteres en la fermentación industrial (Figura 7-16).

Figura 7-16: Evolución de ésteres totales durante la vinificación de Sauvignon blanc. Datos normalizados con respecto al consumo de azúcares.



Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores son los compuestos aromáticos más abundantes en los vinos estudiados. Estos compuestos también presentan un amplio rango de concentraciones, el cual va desde 0,3 a 71 mg/L (Figura 7-17). Son formados principalmente en las primeras etapas de la fermentación alcohólica (Figura 7-18) alcanzando un $56 \pm 2\%$ del total producido al final de la fermentación, cuando se ha consumido un 45% de los azúcares (Tabla 7-24).

Tabla 7-24: Producción de alcoholes superiores en fermentación alcohólica de mosto S. blanc (cosecha 2007) a 18°C. En relación al consumo de sustrato (glucosa+fructosa)

Consumo de sustrato (%)	0	25	45	62	78	100
Concentración acumulada (µg/L)	322±18	23176±747	39682±1122	52510±1144	64810±1442	71145±1172
% Formación	0,5±0,03	33±1,2	56±2	74±2	91±3	100±2,3

2,3 Butanodiol, presenta el mayor OAV (20,8), excediendo su umbral de percepción desde etapas tempranas de fermentación. Alcohol isoamílico, lo sigue en importancia, presentando un OAV en el rango de percepción olfativa: 1.5 (Tabla 7-20), contribuyendo a la calidad sensorial del vino, con su aroma frutal. 2 fenil alcohol, el tercer compuesto más importante (Tabla 7-20), posee un OAV levemente superior a 1 (1,04), el cual puede contribuir con un delicado aroma a rosas. Isoamil alcohol excede su umbral de percepción hacia el final de la fase exponencial, mientras el 2 fenil alcohol excede su umbral de percepción hacia el final de la fase estacionaria.

Figura 7-17: Producción promedio de alcoholes superiores durante la fermentación alcohólica de S. blanc (cosecha 2007) a 18°C. Producción de alcoholes totales (a) cuantificados, (b) isobutil alcohol, 2,3 butanodiol, 1,3 butanodiol, isoamil alcohol, fenetil alcohol y otros (butanol, isopropyl alcohol, benzyl alcohol, propanol, tirosol, 1 propanol 3 ethoxy, glicerol) sintetizados durante la fermentación.

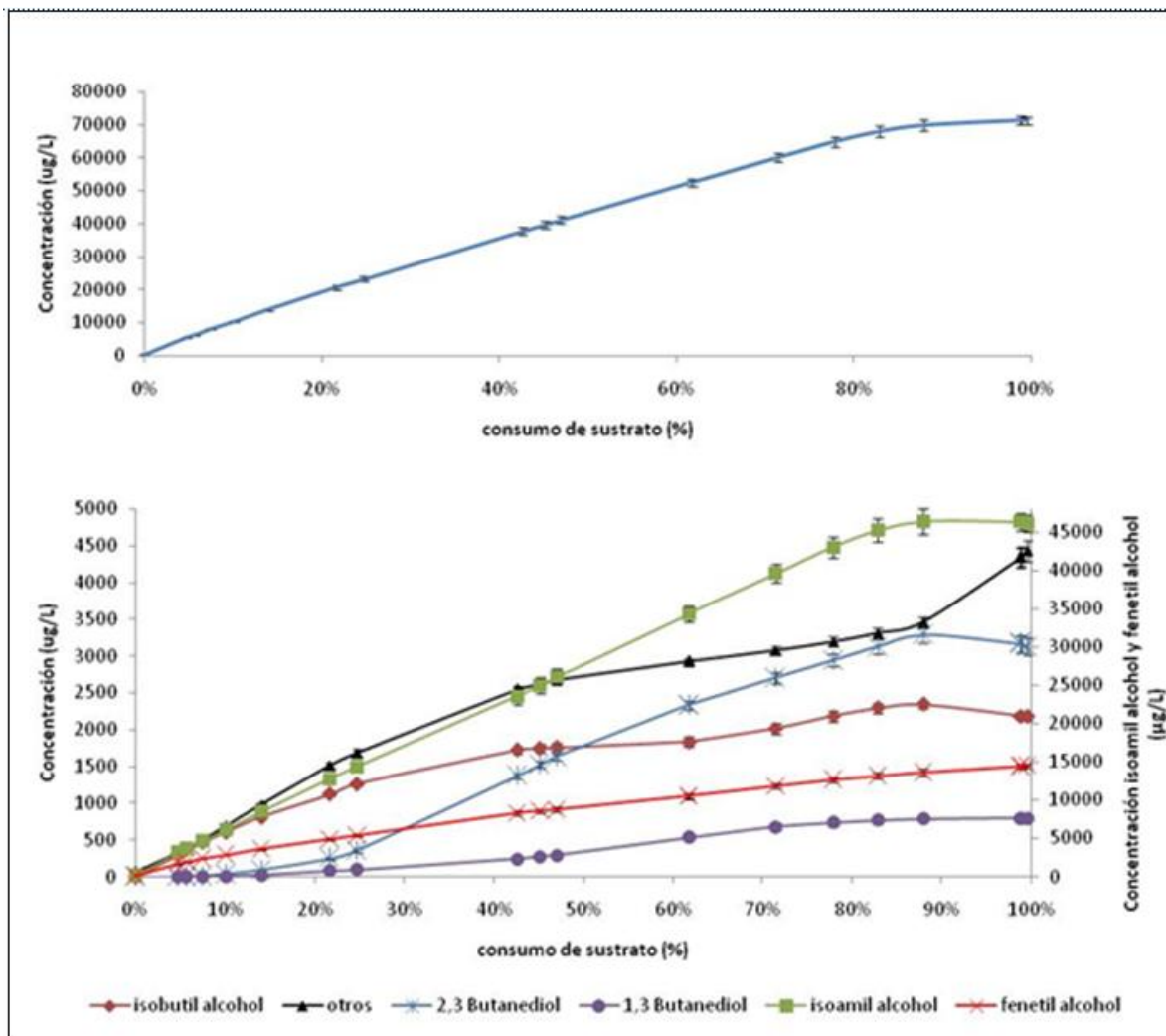
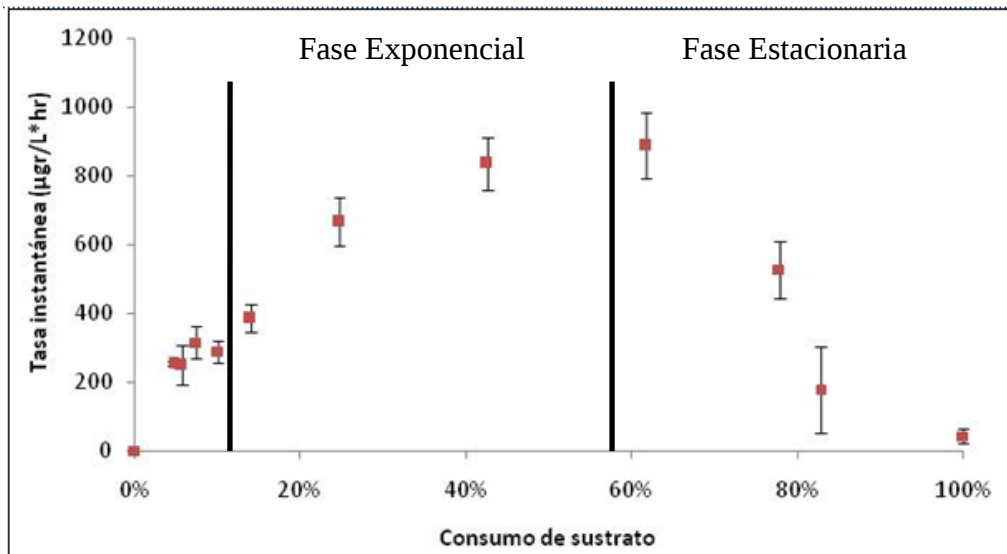
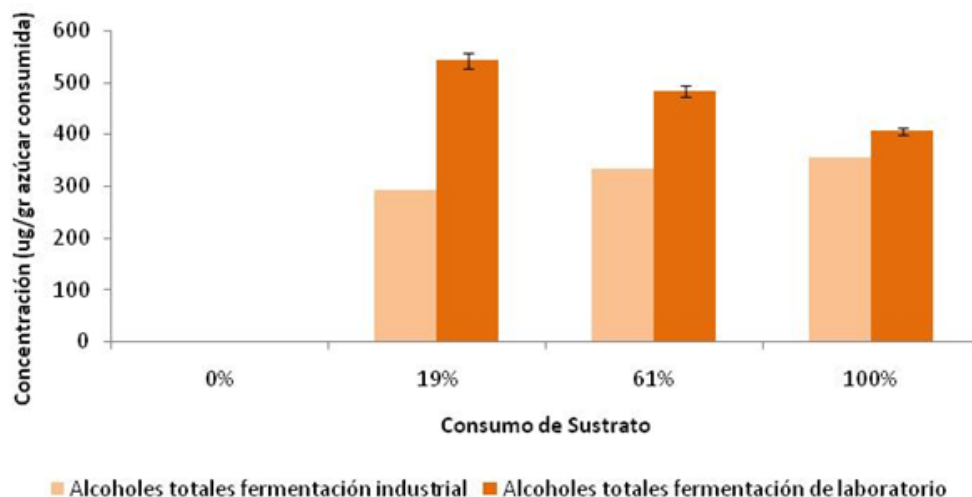


Figura 7-18: Tasas instantáneas de producción de alcoholes, durante la fermentación alcohólica de *S. blanc* (cosecha 2007) a 18°C



Los alcoholes superiores aumentaron con el transcurso de la fermentación, alcanzando una mayor concentración en la fermentación industrial (Figura 7-19). Esto se puede deber a una deficiencia de amonio o aminoácidos libres en la fermentación industrial lo que provocará un aumento en la concentración de alcoholes superiores, pues las levaduras realizarán transaminación para obtener nitrógeno (Boulton, et al., 2002).

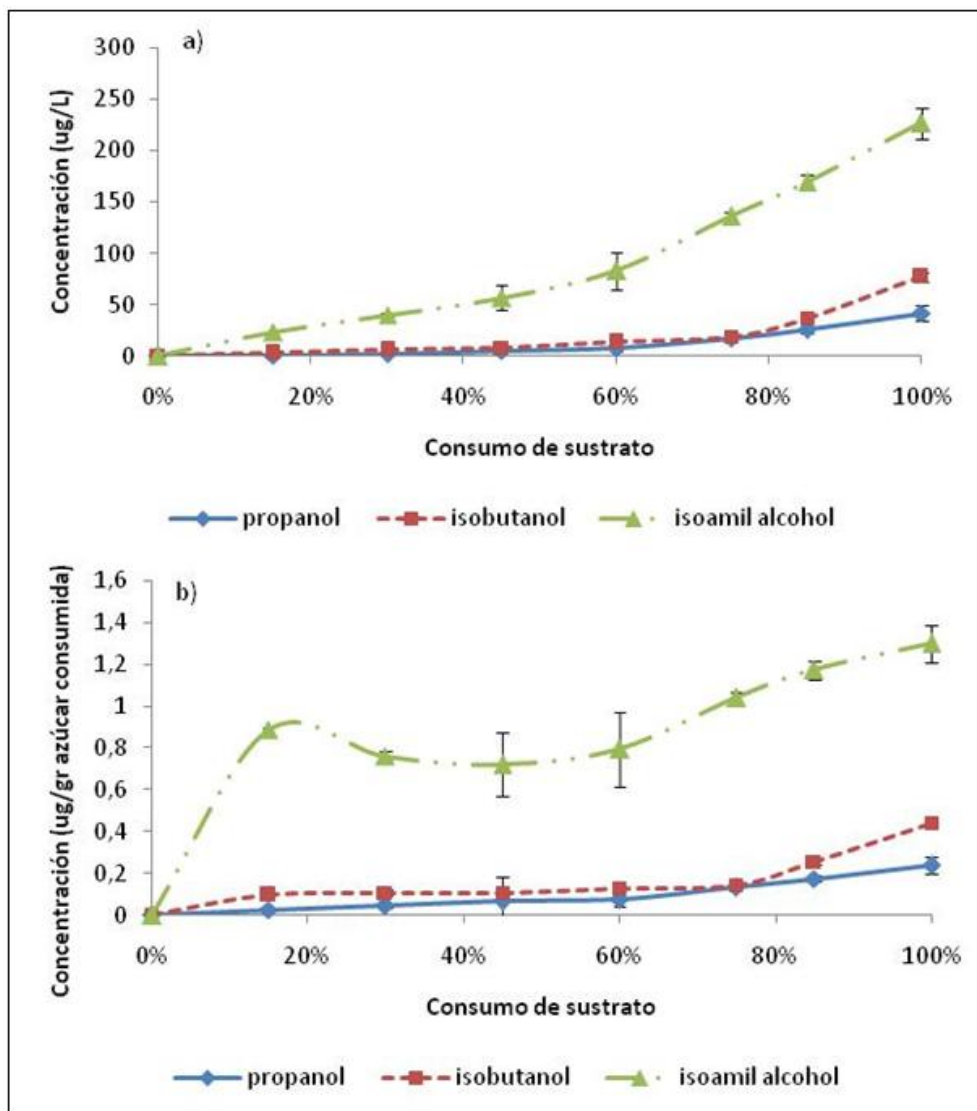
Figura 7-19: Evolución de los alcoholes superiores totales durante la vinificación de Sauvignon blanc. Datos normalizados con respecto al consumo de azúcares.



Las pérdidas de estos compuestos a través de la corriente gaseosa son ínfimas, sólo un 0.3% en fermentaciones industriales y 0.5% en fermentaciones de laboratorio.

Los alcoholes superiores detectados en la corriente gaseosa corresponden a propanol, isobutanol e isoamil alcohol; siendo el comportamiento de los 2 primeros compuestos muy similares (Figura 7-20a y 7-20b).

Figura 7-20: Pérdida acumulada de alcoholes superiores encontrados en la corriente gaseosa durante la fermentación de mosto Sauvignon blanc (cosecha 2007) a escala de laboratorio. a) Valores en $\mu\text{g/L}$ y b) valores normalizados con respecto al consumo de azúcares ($\mu\text{g/gr}$).



Ácidos

Los ácidos son sintetizados principalmente en las primeras etapas, fase exponencial, presentando leves cambios después de dicha etapa (Tabla 7-25; Figura 7-21; Figura 7-22). Ácido butírico presenta una concentración superior a su umbral de percepción en el vino final ($316 \pm 7 \mu\text{g/L}$) con un OAV de 1,8 (Tabla 7-20). Mientras ácido isovalérico presenta una concentración levemente menor, pero un OAV de 12,5, debido a que su umbral de percepción es mucho menor que para ácido butírico. Ácido octanóico, hexanóico y decanóico también pueden contribuir al aroma final del vino, al presentar OAV > 1.

Tabla 7-25: Producción de ácidos en fermentación alcohólica de mosto S. blanc (cosecha 2007) a 18°C. En relación al consumo de sustrato (glucosa+fructosa)

Consumo de sustrato (%)	0	25	45	62	78	100
Concentración acumulada (µg/L)	1307±159	9883±251	14831±246	16625±167	18917±281	20212±244
% Formación	6,5±0,8	49±1,4	73,4±1,5	82,2±1,3	94±1,8	100±1,7

Figura 7-21: Tasas instantáneas de producción de ácidos, durante la fermentación alcohólica de S. blanc (cosecha 2007) a 18°C, en fermentaciones a escala de laboratorio.

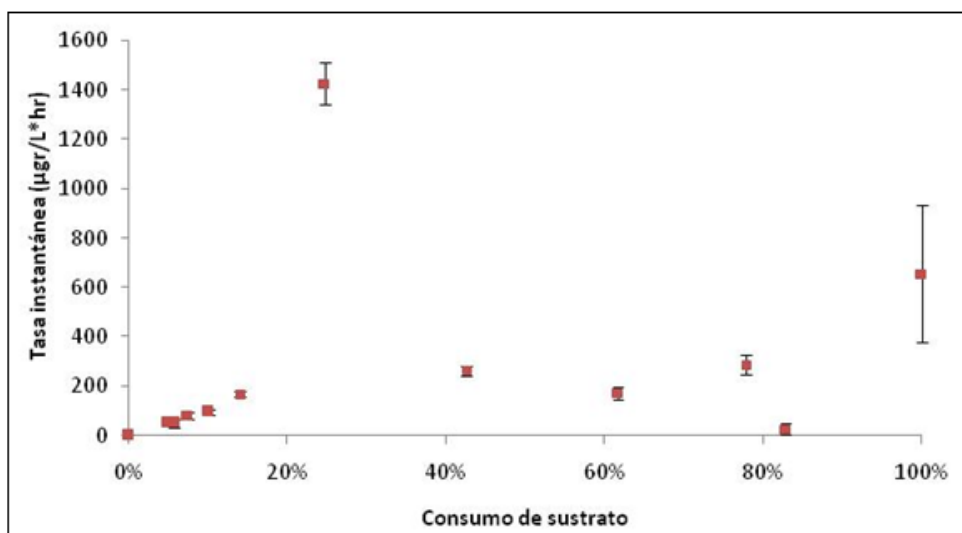
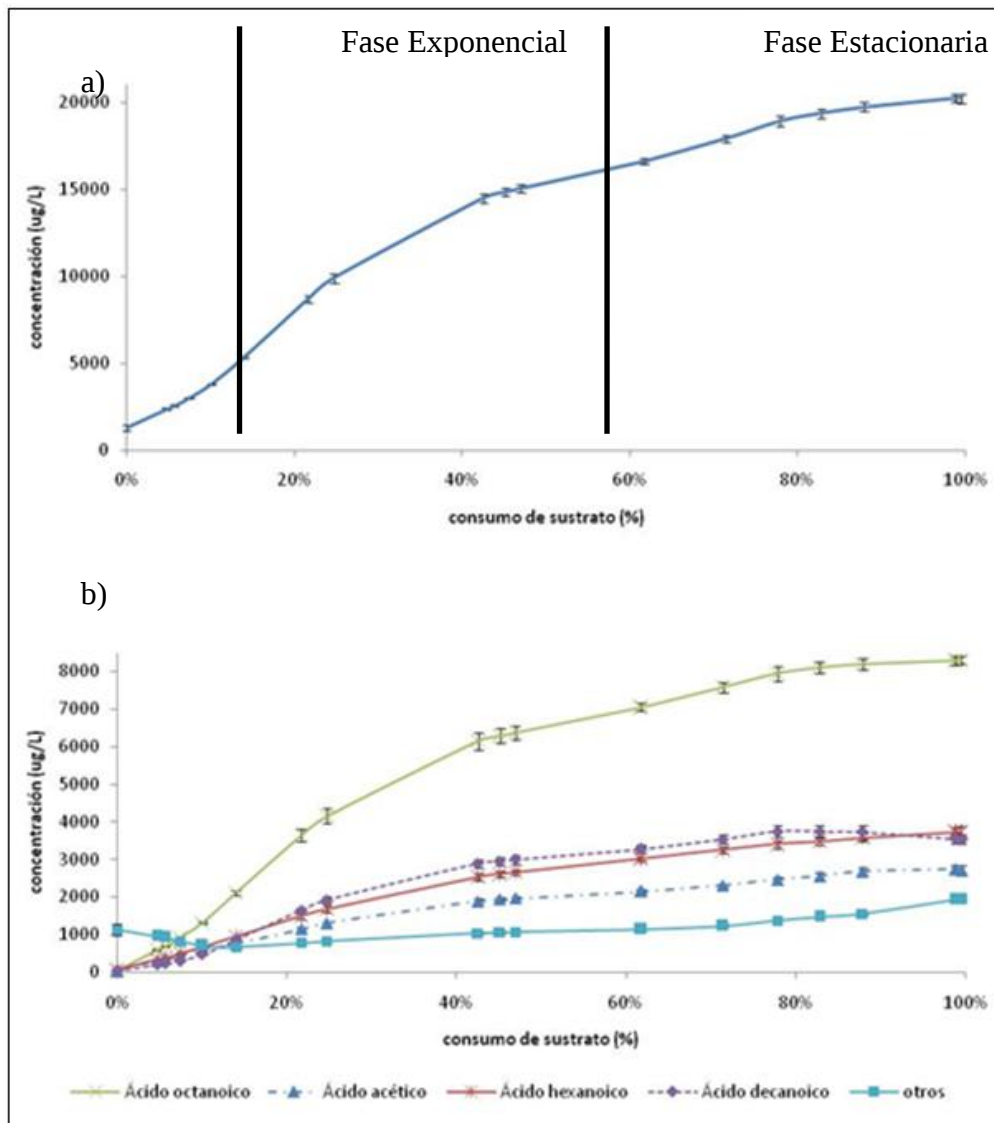


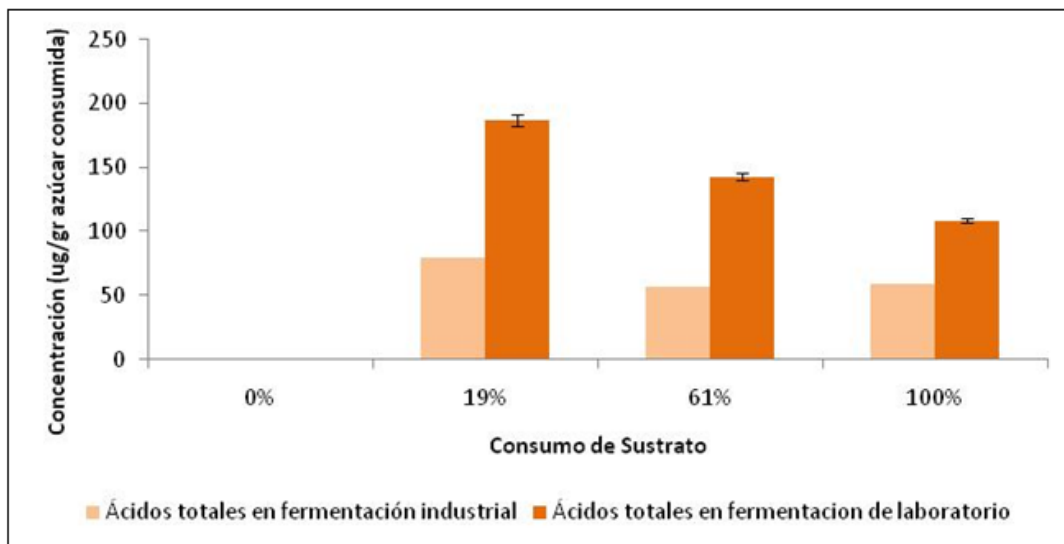
Figura 7-22: Producción promedio de ácidos durante la fermentación alcohólica de S. blanc (cosecha 2007) a 18°C. Síntesis total de ácidos (a) cuantificados, (b) ácido octanoico, acético, hexanoico, decanoico y otros (ácido hexadecanoico, trans 2 hexenoico, isovalerico, butírico e isobutírico), producidos durante la fermentación.



Los ácidos aumentan durante la fermentación, principalmente en las vinificaciones a pequeña escala (Figura 7-23). Debido posiblemente, a la influencia positiva de una anaerobiosis más estricta (Dekker, 1991), lograda en un reactor de laboratorio completamente cerrado. Al normalizar los datos se aprecia una mayor relación μg de compuesto/ gr de azúcar consumida en las primeras etapas de la fermentación (Figura 7-23), debido a que el consumo de azúcares en dicho tiempo es menor relacionado con la alta concentración de ácidos producida (Tabla 7-25)

En la fermentación industrial se pierde un 2% de estos compuestos (Lara, 2006), mientras que en la fermentación a escala de laboratorio, no son detectados en la corriente de CO₂.

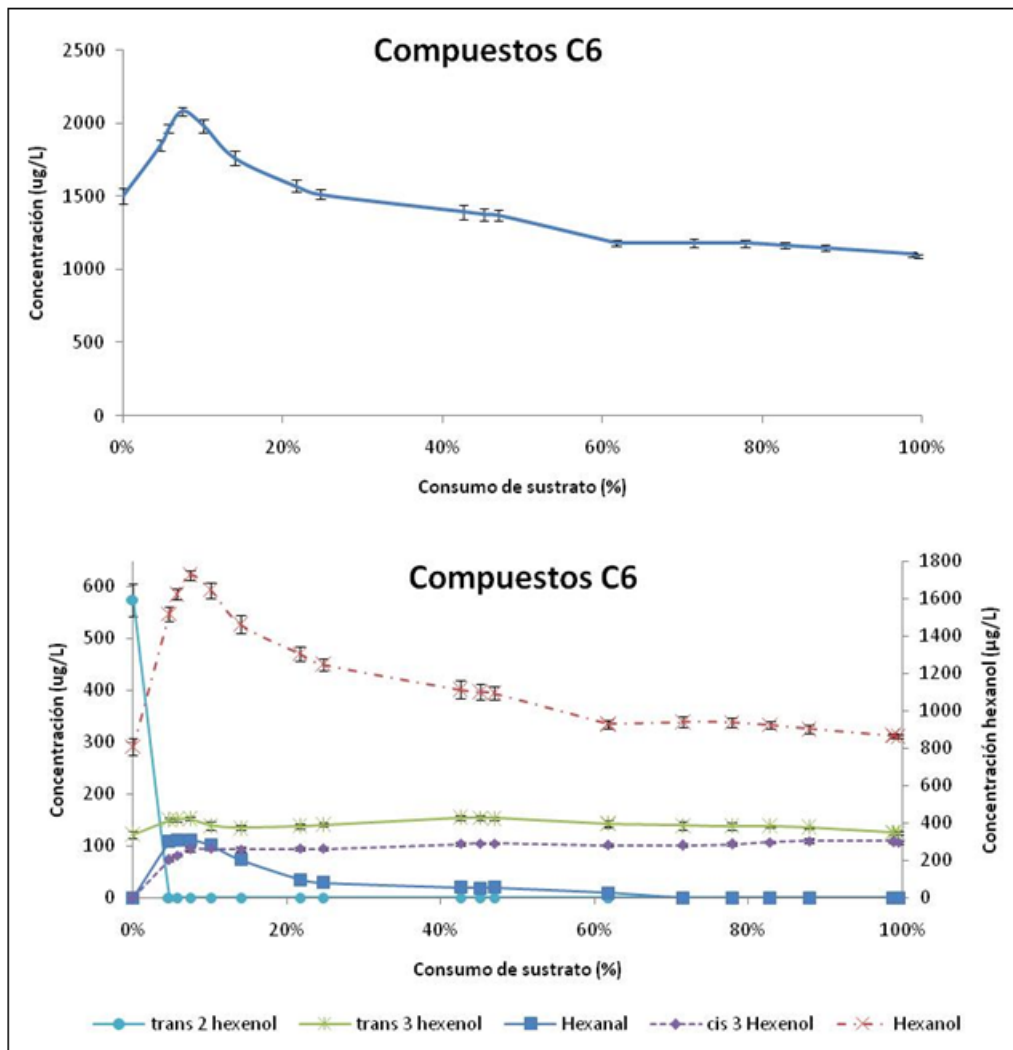
Figura 7-23: Evolución de los ácidos durante la vinificación de Sauvignon blanc. Datos normalizados por el consumo de azúcares.



Compuestos C6

Estos compuestos presentan diferentes comportamientos (Figura 7-24b), hexanal y hexanol presentan un peak de concentración en etapas tempranas de la fase exponencial para luego disminuir considerablemente. Hexanol fue detectado en el vino a concentraciones superiores que otros compuestos C6, determinando el comportamiento de la Figura 7-24a, pero su contribución es insignificante al aroma total, pues presenta un OAV<1 (Tabla 7-20). Esto es considerado positivo, porque la presencia de altas concentraciones de este compuesto puede dar connotaciones herbáceas, no deseables en el vino final.

Figura 7-24: Producción promedio de Compuestos C6 durante la fermentación alcohólica de S. blanc (cosecha 2007) a 18°C. Síntesis total de compuestos C6 (a) cuantificados, (b) trans 2 hexenol, trans 3 hexenol, hexanal, cis 3 hexenol, hexanol sintetizados durante la fermentación.



Los compuestos C6 presentan un comportamiento distinto en relación a compuestos estuc durante la fermentación, mostrándose como valores negativos, esto se debe a que en fermentaciones de laboratorio se tiene inicialmente una concentración de $\sim 1504 \mu\text{g/L}$ de compuestos C6, mientras en el vino terminado sólo existe una concentración de $\sim 1092 \mu\text{g/L}$ (Figura 7-25). En el caso de la fermentación industrial se comienza con una concentración de $\sim 3250 \mu\text{g/L}$ de compuestos C6, para finalizar con $\sim 1960 \mu\text{g/L}$. Una menor concentración de estos compuestos, al inicio de la fermentación a pequeña escala, podría haber influido en la cantidad encontrada en el vino terminado.

b)

En fermentaciones industriales se pierde un 12% a través de la corriente gaseosa que sale del reactor (Lara, 2006), en las fermentaciones a escala de laboratorio el único compuesto C6 detectado en la corriente de CO₂ es hexanol (Figura 7-26), equivalente a una pérdida del 2% con respecto al total.

Figura 7-25: Evolución de los compuestos C6 durante la vinificación de Sauvignon blanc. Datos normalizados por el consumo de azúcares

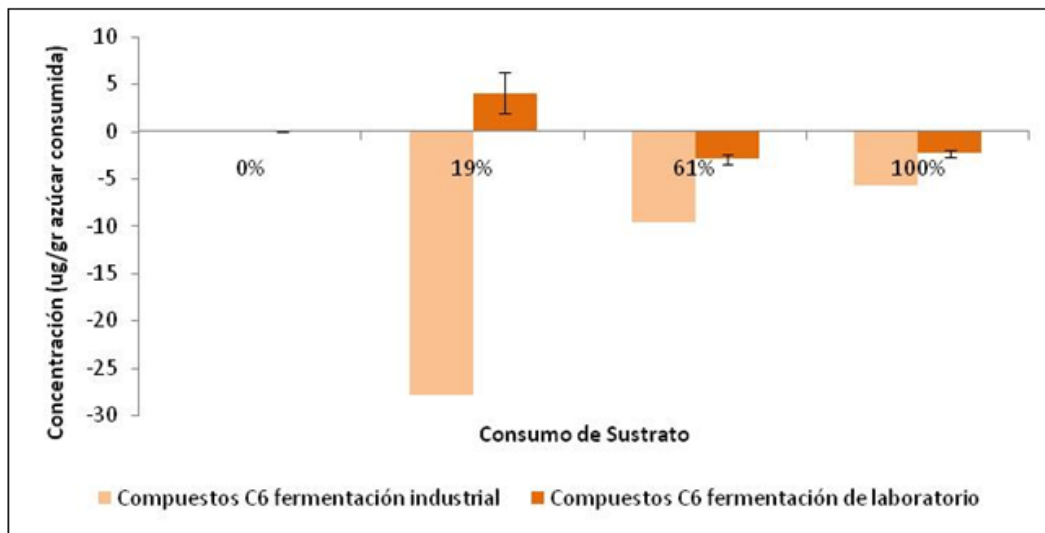
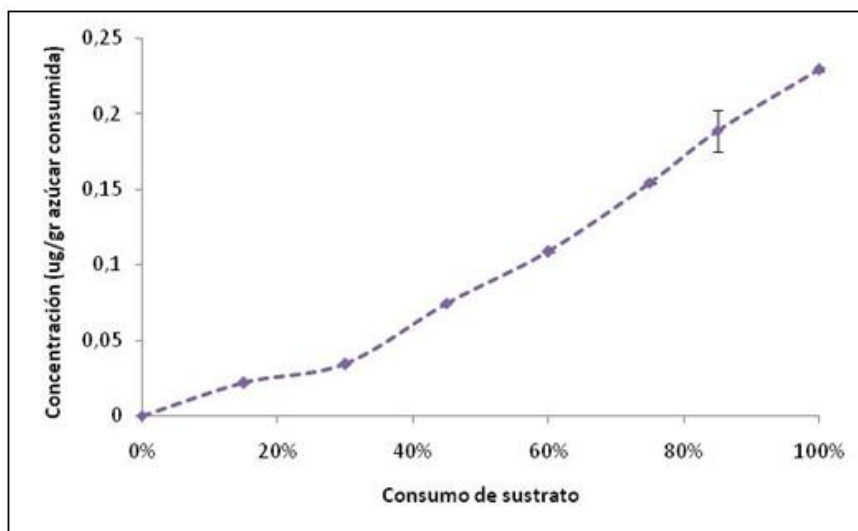


Figura 7-26: Pérdida acumulada normalizada de hexanol en la corriente gaseosa durante la fermentación de mosto Sauvignon blanc (cosecha 2007) a escala de laboratorio.



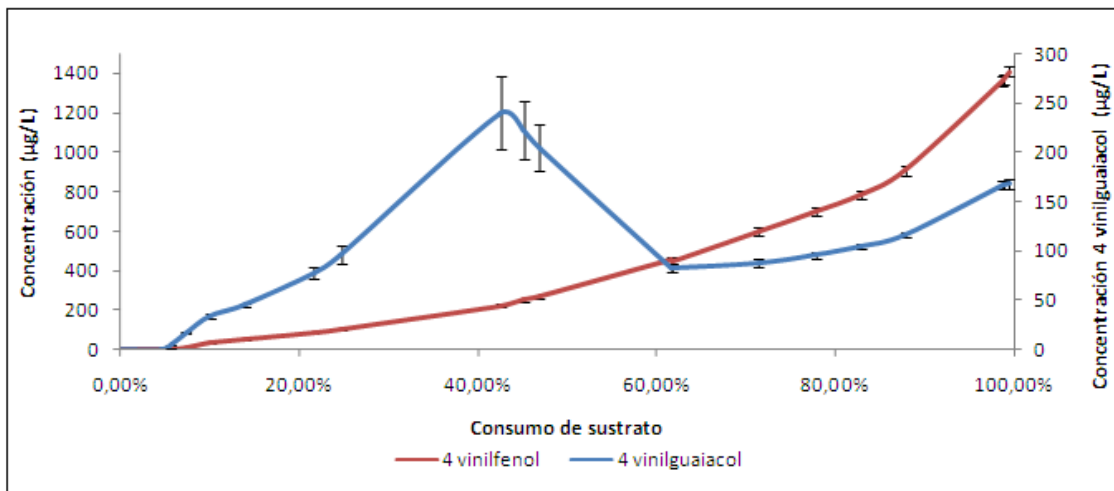
Fenoles

Durante la fermentación se cuantificó la concentración de 4 vinilfenol y 4 vinilguaiacol, los que presentan un comportamiento muy distinto. 4 vinilfenol se sintetiza principalmente durante la fase estacionaria y 4 vinilguaiacol disminuye su concentración en dicha etapa, después de haber alcanzado su peak máximo en la primera mitad de la fase exponencial, obteniendo un OAV<1 al finalizar la fermentación (Figura 7-27).

A altas concentraciones, los vinilfenoles pueden ser responsables de un fuerte aroma "farmacéutico", pero a concentraciones bajas o moderadas pueden ser relacionados a aromas especiados o aromáticos, como en el caso estudiado, donde su concentración es de $1409 \pm 26 \mu\text{g/L}$ con $\text{OAV} > 1$ (Tabla 7-20).

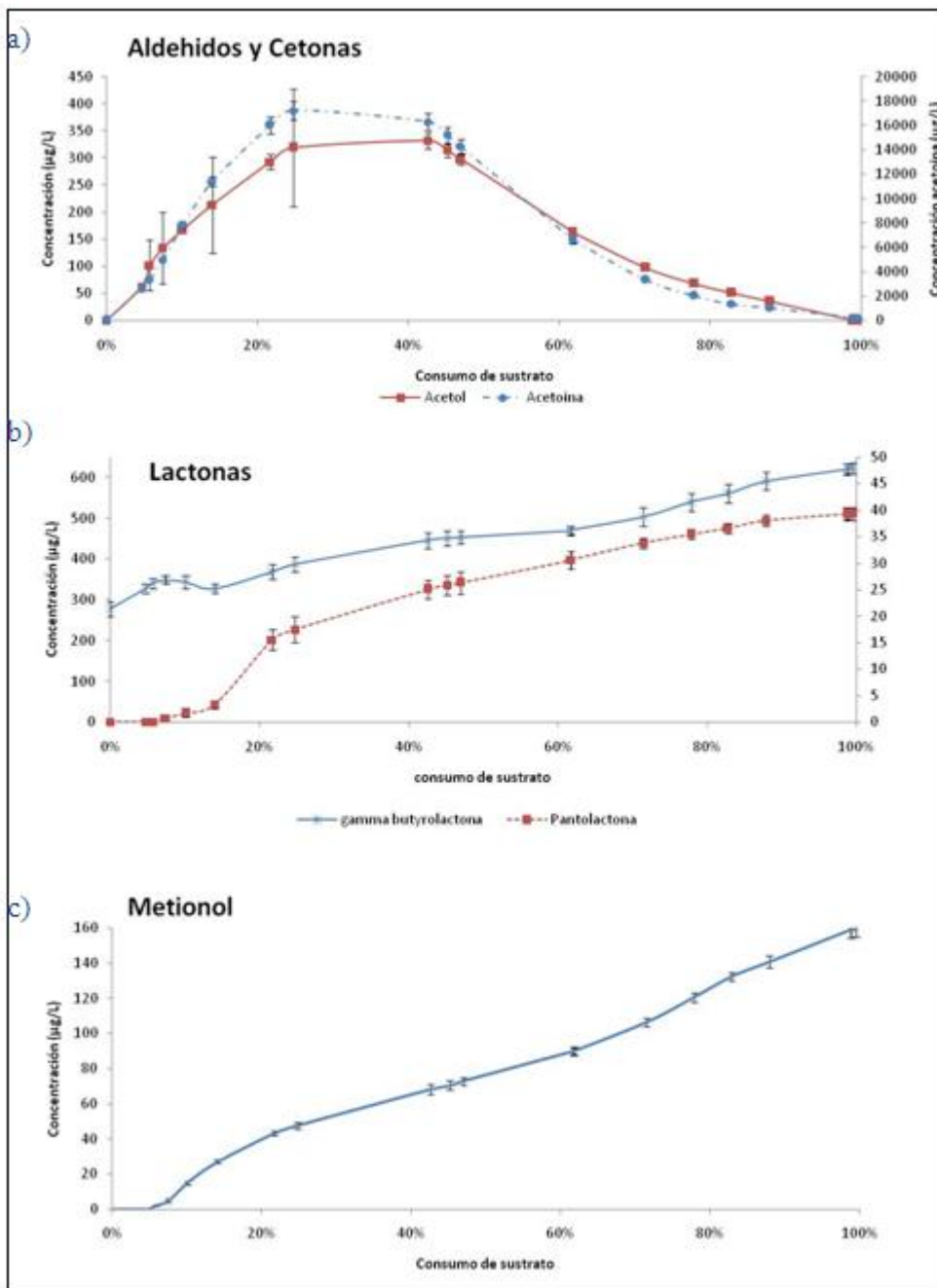
Estos compuestos no son detectados en la corriente gaseosa de fermentaciones industriales ni en fermentaciones a escala de laboratorio.

Figura 7-27: Evolución de las principales fenoles durante la fermentación alcohólica de S. blanc (cosecha 2007) a 18°C, nivel de laboratorio



Otros compuestos volátiles son producidos durante la fermentación, pero al poseer $\text{OAV} < 1$, no contribuyen activamente al aroma de los vino.

Figura 7-28: Evolución de los compuestos en la clasificación de aldehídos y cetonas (a), lactonas (b) y metionol (c) durante la fermentación alcohólica de *S. blanc* (cosecha 2007) a 18°C, nivel de laboratorio.



En la clasificación de aldehídos y cetonas se encuentran acetol y acetoina, con una marcada síntesis durante la fase exponencial, pero

son perdidos casi totalmente en la fase estacionaria (Figura 7-28). Sólo se encontró acetoína en la corriente de CO₂ del fermentador a escala de laboratorio, con pérdidas que no sobrepasan el 5% del total de aldehídos y cetonas producidas durante la fermentación, indicando que deben existir otros medios por los cuales estos compuestos disminuyen durante la fermentación.

Las lactonas cuantificadas corresponden a gamma butirolactona y pantolactona, las que no aportan al carácter aromático del vino pues su OAV es mucho menor que 1. Metionol pertenece a la clasificación de compuestos azufrados y al igual que las lactonas su concentración no supera el umbral de percepción (Tabla 7-20).

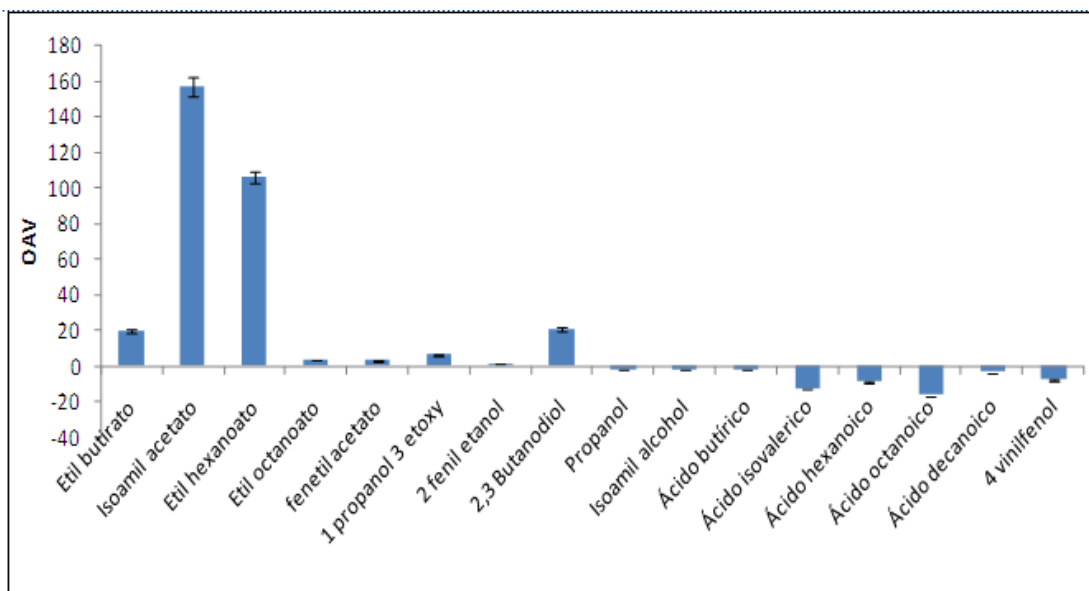
En resumen, la esencia del vino se revela durante la fermentación alcohólica. Etanol es el alcohol más abundante (Tabla 7-4), seguido por los alcoholes superiores, los ácidos y los ésteres (Tabla 7-20), cuya combinación otorga un importante aporte al carácter aromático del vino Sauvignon blanc.

7.6.1 Caracterización compuestos volátiles

Evolución OAV

Los compuestos más importantes desde un punto de vista olfativo – medido como OAV- que influyen positivamente en el aroma del vino S. blanc (Tabla 7-20) se deben a isoamil acetato y etil hexanoato a niveles entre $157 \pm 5,8$ y 107 ± 3 , respectivamente. Continuando en nivel de significancia se encuentran etil butirato y 2,3 butanediol (Figura 7-29). Los ácidos isovalerico, octanoico, hexanoico y 4 vinilfenol son los principales compuestos ubicados en la parte negativa de la Figura 7-29, debido a que pueden aportar negativamente al aroma, con descriptores como queso, mantequilla, sudor, humo etc.

Figura 7-29: OAV promedio en el vino final (cosecha 2007), valores negativos indican compuestos que pueden contribuir negativamente al aroma



El vino Sauvignon blanc como otros vinos, presenta compuestos provenientes de la acción de la levadura sobre el mosto. Dentro de estos compuestos, destaca la influencia de aromas que contribuyen positivamente en su percepción, como isoamil acetato, etil hexanoato, etil butirato y 2,3 butanodiol, los que superan su umbral de percepción desde etapas iniciales de la fermentación, cuando se ha consumido un 25% del sustrato, superando en el vino final los OAV de los compuestos que influyen negativamente (Tabla 7-26).

Tabla 7-26: Evolución de OAV de compuestos que superan su umbral en el vino final, durante la fermentación de mosto S. blanc (cosecha 2007) a 18°C, nivel de laboratorio.

Compuestos con umbral de percepción conocido	Consumo de sustrato						
	0%	14%	25%	45%	62%	78%	100%
Etil butirato	0,0±0	0,0±0	1,6±0,72	12,2±0,4	13,7±0,7	12,7±0,3	19,5±1,3
Isoamil acetato	0,0±0	3,4±0,4	11,3±0,63	36,7±1,1	59,6±4,7	101±5,2	157±5,8
Etil hexanoato	0,0±0	5,7±0,2	21±1,4	50,8±2	68,2±4,1	85,5±3,6	107±3,0
Etil octanoato	0,09±2e-3	0,51±0,01	0,9±0,01	1,4±0,07	1,9±0,1	2,5±0,1	3,9±0,2
fenetil acetato	0,0±0	0,19±0,02	0,58±0,03	1,3±0,05	2,0±0,09	2,6±0,07	3,1±0,08
1 propanol 3 etoxy	0,0±0	1,6±0,04	3,3±0,3	5,7±0,2	6,5±0,1	7,0±0,2	6,4±0,1
2 fenil etanol	0,01±1e-3	0,26±0,01	0,4±0,01	0,6±0,02	0,8±0,03	0,9±0,02	1,0±0,02
2,3 Butanodiol	0,0±0	0,61±0,06	2,4±0,2	10,2±0,3	15,6±0,4	19,6±0,6	20,8±0,8
Propanol	0,0±0	0,56±0,02	1,0±0,08	1,6±0,04	1,9±0,01	2,2±0,06	2,0±0,05
Isoamil alcohol	0,00±3e-4	0,28±0,01	0,5±0,02	0,8±0,04	1,1±0,04	1,4±0,05	1,5±0,04
Ácido butírico	0,0±0	0,49±0,03	0,8±0,05	1,1±0,03	1,4±0,05	1,7±0,07	1,8±0,04
Ácido isovalérico	0,0±0	1,29±0,06	1,9±0,2	3,0±0,2	3,1±0,2	3,6±0,2	12,5±0,2
Ácido hexanoico	0,13±6e-3	2,25±0,04	4,0±0,2	6,2±0,2	7,2±0,1	8,1±0,2	8,9±0,3
Ácido octanoico	0,07±5e-3	4,21±0,11	8,3±0,4	12,6±0,4	14,1±0,2	15,9±0,4	16,6±0,2
Ácido decanoico	0,05±1,4e-2	0,86±0,04	1,9±0,09	3,0±0,1	3,3±0,1	3,8±0,1	3,5±0,1
4 vinilfenol	0,0±0	0,28±0,01	0,6±0,02	1,4±0,04	2,5±0,1	3,9±0,1	7,8±0,1

OAV en x ± SD: Concentración promedio final ± desviación estándar

7.6.2 Análisis Componentes Principales

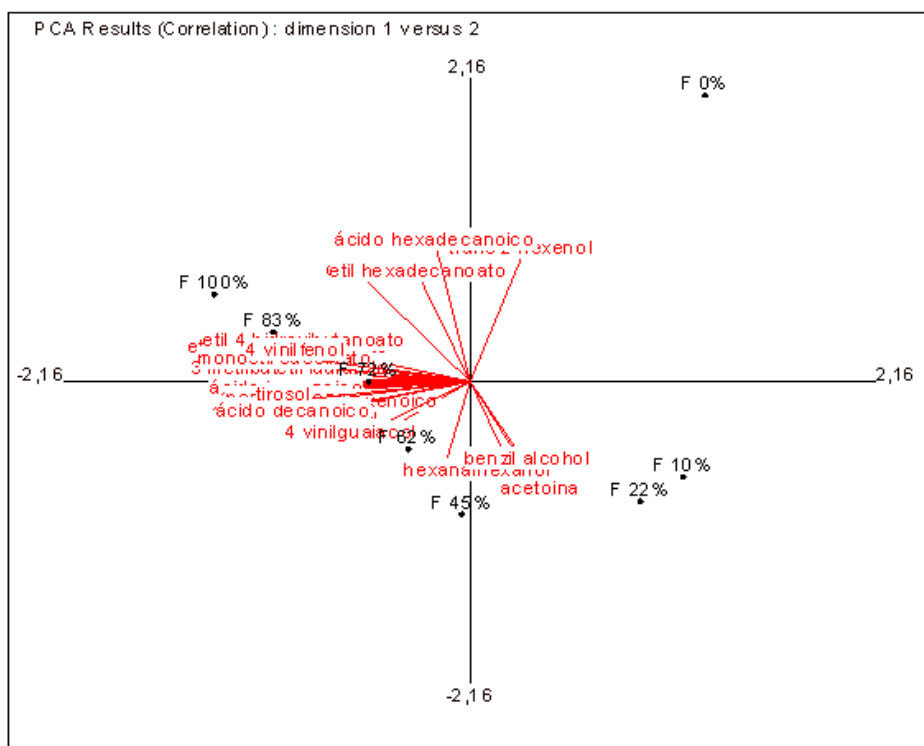
Para observar los patrones que existen entre las etapas de fermentación y los compuestos volátiles sintetizados por las levaduras, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando el software SensTools®.

Cuando se analizan los compuestos volátiles producidos por *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 a 18°C (49 compuestos), 2 componentes principales explican el 86% de la varianza (74% componente 1 y 12% componente 2) (Figura 7-30). El transcurso de la fermentación fue agrupada en 5 clusters: mosto inicial; cuando se ha consumido 22% de azúcares; 45% de azúcares; 62% de azúcares y final de la fermentación.

El mosto inicial se caracteriza por un número limitado de compuestos volátiles en particular trans 2 hexenol. Cuando se ha consumido el 22% de los azúcares, dominan los compuestos hexanol, benzil alcohol y acetoina. Hexanal determina las últimas etapas de la fase exponencial. Con un 62% de consumo de azúcares acetol y 4 vinilguaiacol representan dicha etapa. Desde el 62% de consumo de azúcares hasta que finaliza la fermentación no existe un compuesto

dominante. Los atributos con mayor peso (valor en paréntesis) que caracterizan el componente 1 son etil hexanoato e isoamil alcohol (-1) con peso negativo. Para el componente 2, el principal atributo es ácido hexadecanoico (0.96) con peso positivo. Lo anterior señala que los compuestos volátiles permitieron determinar efectivamente las diferencias entre etapas de la fermentación.

Figura 7-30: Análisis de componentes principales con las concentraciones de compuestos volátiles producidos durante la fermentación.

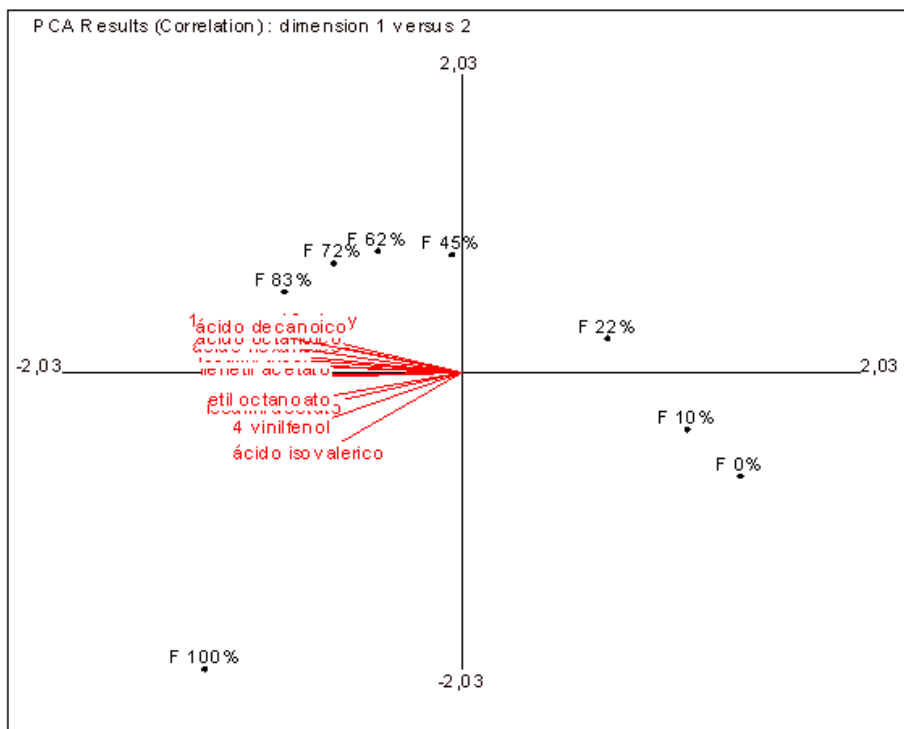


El análisis anterior, entrega información de los compuestos volátiles que determinan cada etapa de la fermentación, basados en su concentración, sin embargo, compuestos de elevada concentración no necesariamente tienen influencia en el aroma desarrollado durante la fermentación.

Cuando se analizan compuestos que desarrollan concentraciones que superan su umbral de percepción en el vino final (16 compuestos), el 98% de la varianza es explicada por 2 componentes principales (92% componente 1 y 6% componente 2) (Figura 7-31). Los atributos que caracterizan el vino final son etil octanoato, isoamil acetato, 4 vinil fenol y ácido isovalérico. El carácter frutal del vino final,

particularmente plátano, se debe a que isoamil acetato determina la fase terminal de la fermentación. En etapas iniciales de la fermentación (fase lag y exponencial) no se detectan compuestos que la caractericen.

Figura 7-31: Análisis de componentes principales para los compuestos con OAV>1 al final de la fermentación.



8 CONCLUSIONES

Durante la vinificación se estudia una gran cantidad de parámetros, los cuales deben ser estudiados antes de inferir conocimiento a partir de ellos. En este estudio, siete parámetros se emplearon para determinar la consistencia de los datos (biomasa, glucosa + fructosa, succinato, acetato, CO₂, etanol y glicerol) utilizando un programa computacional desarrollado con esta finalidad.

En cada instante de tiempo, el balance de carbono no cierra completamente, motivo por el cual se desarrolla el análisis de consistencia de datos. Sólo la fermentación denominada Batch 1 realizada a escala de laboratorio, presentó un error de medición en el CO₂ a las 48 hrs el cual fue corregido con el programa computacional desarrollado en Matlab. La experiencia indica que etanol podría presentar errores en su medición, sin embargo como la pérdida de este compuesto por stripping fue ínfima en fermentaciones de laboratorio, no se presentaron problemas con este parámetro. Para emplear derivadas suavizadas en el análisis de consistencia, se recomienda el empleo del programa Tablecurve2D.

Con respecto al programa desarrollado en Matlab, éste se enfoca en sistemas sobre-determinados, donde los datos se deben ingresar de manera directa: matriz elemental y tasas específicas de consumo/formación de sustratos/productos. Los coeficientes de variación dependen del equipo utilizado en las mediciones y eventualmente podrían cambiar, modificaciones en el programa computacional solucionan inmediatamente este problema. En la interpretación de los resultados se debe emplear la experiencia, para tener resultados reales evitando situaciones de comportamiento irreal.

Los resultados muestran que realizar un análisis de consistencia de datos previo a la interpretación de los resultados, optimiza el tiempo empleado en los estudios, al enfocarse en datos que no presentan errores de medición.

En las fermentaciones de vino blanco, son sintetizados por *S. cerevisiae* una gran cantidad de compuestos volátiles. Mejorar el conocimiento de las variables que afectan estos compuestos es

fundamental para aumentar la calidad del vino final. En este estudio, se analiza la evolución 51 compuestos volátiles en el transcurso de la fermentación de Sauvignon blanc y luego se realiza la comparación de las principales familias de compuestos volátiles (ésteres, alcoholes, ácidos y compuestos C6) producidos en fermentaciones batch a escala de laboratorio (30 L) y una fermentación industrial.

Dentro de los compuestos estudiados, isoamil acetato y etil hexanoato son los más significativos a nivel aromático, con OAVs de 157 y 107 respectivamente, contribuyendo positivamente al aroma. Estos compuestos presentes en fermentaciones industriales también se encuentran en concentraciones superiores a sus umbrales olfativos (Lara, 2006).

La revisión de los parámetros fermentativos mostró que a 18°C no existen diferencias significativas entre las fermentaciones de laboratorio y la desarrollada industrialmente, lo que permitió su comparación. Es interesante observar que los compuestos aromáticos más importantes son los mismos para cada fermentación, a pesar de que si fue posible apreciar diferencias de concentración en las familias de compuestos estudiados.

Ésteres, alcoholes superiores y ácidos son los compuestos volátiles estudiados más representativos, debido a su concentración y OAV desarrollado durante la vinificación.

Los ésteres de acetato y etílicos presentan su mayor tasa de síntesis durante la fase exponencial, estrategias enfocadas en mantener estos compuestos volátiles en el vino final, repercutirán en un producto de mayor calidad. En las fermentaciones a pequeña escala estos compuestos presentan una mayor concentración en el vino final, debido a que el fermentador se encuentra cerrado, con una única salida de la corriente gaseosa, favoreciendo la condensación del gas y evitando las elevadas pérdidas desarrolladas en fermentaciones industriales, las que son de aproximadamente 20% para ésteres etílicos y de acetato. Se recomienda, por tanto, el empleo de un condensador, el cual al permitir una recuperación de compuestos volátiles desde la corriente gaseosa, posibilitaría la obtención de vinos de mayor valor comercial a los logrados actualmente.

Los alcoholes superiores que desarrollaron una concentración mayor a su umbral de percepción contribuyen al aroma frutal (2,3 Butanodiol,

alcohol isoamílico) y floral (2 fenil alcohol) del vino. En la fermentación industrial se muestra una mayor concentración de estos compuestos en relación con fermentaciones a escala de laboratorio, existiendo una variable (concentración de nitrógeno) que influencia dicho comportamiento. Se propone que la modulación en la producción de estos compuestos se puede lograr mediante el control de la cantidad de nitrógeno en el mosto inicial o suministrándolo durante la fermentación.

Los ácidos con $OAV > 1$ presentes en el vino final, aportan negativamente al aroma (descriptores de queso, humo, etc.), sin embargo, su acción es contrarrestada por la presencia de ésteres y alcoholes superiores con $OVA > 1$, los que se perciben por sobre los descriptores negativos en el vino terminado.

Los compuestos volátiles que permitieron determinar efectivamente las diferencias entre las etapas de la fermentación, varían de acuerdo al consumo de sustrato, desde un compuesto en el mosto inicial (trans 2 hexenol) hasta múltiples compuestos en el vino final. Por otra parte, compuestos de elevada concentración no necesariamente indican un aporte al aroma final, basados en esta información se desarrolló una evaluación de componentes principales empleando los compuestos con $OAV > 1$. Con este análisis se obtiene información relevante, que permite relacionar las etapas de la fermentación con los aromas producidos por la levadura. A pesar de que compuestos volátiles son producidos en etapas tempranas de la fermentación, con tasas de producción máxima a finales de la fase exponencial e inicios de la fase estacionaria, sólo en las etapas finales se aprecia su contribución al aroma del vino al superarse los umbrales de percepción.

Un tema de vital importancia en trabajos de investigación futuros, enfocados en mejorar la calidad del vino final, es el estudio de la evolución de tioles durante la vinificación. El vino Sauvignon blanc posee un aroma característico, otorgado por los tioles. En el estudio realizado no se pudo trabajar con estos compuestos, pero se considera importante estudiar la evolución de su concentración durante la fermentación y las posibles pérdidas en la corriente gaseosa.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, C. A. (2006). Production of Antioxidants, Aromas, Colours, Flavours, and Vitamins by Yeasts. In A. Querol & G. H. Fleet (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*: Springer.
- Augustin, C., Bonhomme, S., Murat, M.-L., & Masneuf, I. (2006). Nuevo proceso de selección de levaduras para la liberación del aroma varietal de S. Blanc. *Journal Enology and viticulture*(8).
- Axel, R., & Buck, L. (2004). Odorant receptors and the organization of the olfactory system. The nobel prize in Physiology or Medicine.
- Belancic, A., & Agosin, E. (2002). AROMAS VARIETALES: Influencia de ciertas prácticas vitícolas y enológicas. Paper presented at the Tópicos de Actualización en Viticultura y Enología, Santiago, Chile.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (2002). *Teoría y Práctica de la Elaboración del Vino*.
- Brethauer, E. (2006). *Vino y Frutas: ¿Pura Química?* [Electronic Version]. Retrieved www.brethauer.cl.
- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Marqués, J., & Cacho, J. (2006). Quantitative gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines: *Analytica Chimica Acta*, 563, 180-187.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., et al. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality.
- Dekker, M. (1991). *Volatile Compounds in Foods and Beverages*.
- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(11), 4501-4510.
- Falqué, E., Fernández, E., & Dubourdieu, D. (2001). Differentiation of White wines by their aromatic index. *Talanta*, 54, 271-281.

- Ferreira, V., López, R., & Cacho, J. (2000). Quantitative determination of the odorants of Young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1659-1667.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1), 11-22.
- Francis, I. L., & Newton, J. L. (2005). Determining Wine Aroma from Compositional Data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 114-126.
- Gil, M., Cabellos, J. M., Arroyo, T., & Prodanov, M. (2006). Characterization of the volatile fraction of Young wines from the Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (Spain). *Analytica Chimica Acta*, 563, 145-153.
- Gómez-Miguel, M. J., Cacho, J. F., Ferreira, V., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Volatile components of Zalema white wines. *Journal Food Chemistry*, 100, 1464-1473.
- Guth, H. (1997). Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 45, 3027-3032
- Howell, K. S., Swiegers, J. H., Elsey, G. M., Siebert, T. E., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H., et al. (2004). Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiology Letters*, 240, 125-129.
- Lallemand. www.lalvinyeast.com/strains.asp.2008
- Lara, M. I. (2006). Implementación y Análisis de un balance de aromas en la cadena de elaboración de vino Sauvignon blanc_ Parte II. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.
- Mestres, M., Busto, O., & Guasch, J. (2000). Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography*, 881, 569-581.
- Molina, A. M. (2008). Yeast Derived Volatile Compounds in Wines: Influence of the Yeast Strain and the Temperature of Fermentation. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile.

- Muñoz, D., Peinado, R., Medina, M., & Moreno, J. (2007). Biological aging of sherry wines under periodic and controlled microaerations with *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis*: Effect on odorant series. *Food Chemistry*, 100, 1188-1195.
- Noorman, H. J., Heijnen, J. J., & Luyben, K. (1991). Linear Relations in Microbial Reaction Systems: A General Overview of their Origin, Form, and Use. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 603-618.
- Noorman, H. J., Romein, B., Luyben, K. C. A., & Heijnen, J. J. (1996). Classification, error detection, and reconciliation of process information in complex biochemical systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(4), 364-376.
- Petka, J., Ferreira, V., González-Viñas, M. A., & Cacho, J. (2006). Sensory and Chemical Characterization of the Aroma of a White Wine Made with Devi'n Grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 909-915.
- Rapp, A. (1998). Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung*, 42(6), 351-363.
- Rosenblitt, A. (1999). Análisis del Crecimiento y Producción de pigmentos de *Monascus Purpureus* en Fermentación sobre Sustrato Sólido. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.
- Servicio-Agrícola-Ganadero. (2008). Informe Ejecutivo: Producción de Vinos 2008.
- Stephanopoulos, G., Aristidou, A., & Nielsen, J. (1998). *Metabolic Engineering*: Academic Press.
- Swiegers, J., Bartowsky, E., Henschke, P., & Pretorius, I. (2005). Yeast and Bacterial Modulation of Wine Aroma and Flavour. *The Australian Journal of Grape and wine Research*(11), 139-173.
- Swiegers, J., Francis, I., Herderich, M., & Pretorius, I. (2006). Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery the choice of yeast for fermentation offers great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Journal Wine Industry*, 21(1), 34-42.
- van der Heijden, R., Romein, B., Heijnen, J. J., Hellinga, C., & Luyben, K. (1994a). Linear Constraint Relations in Biochemical Reaction Systems: I. Classification of the

Calculability and the Balanceability of Conversion Rates. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 3-10.

van der Heijden, R., Romein, B., Heijnen, J. J., Hellinga, C., & Luyben, K. (1994b). Linear Constraint Relations in Biochemical Reaction Systems: II. Diagnosis and Estimation of Gross Errors. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(1), 11-20.

Wang, N., & Stephanopoulos, G. (1983). Application of microscopic balances to the identification of gross measurement errors. *Biotechnology and bioengineering*, 25(9), 2177-2208.

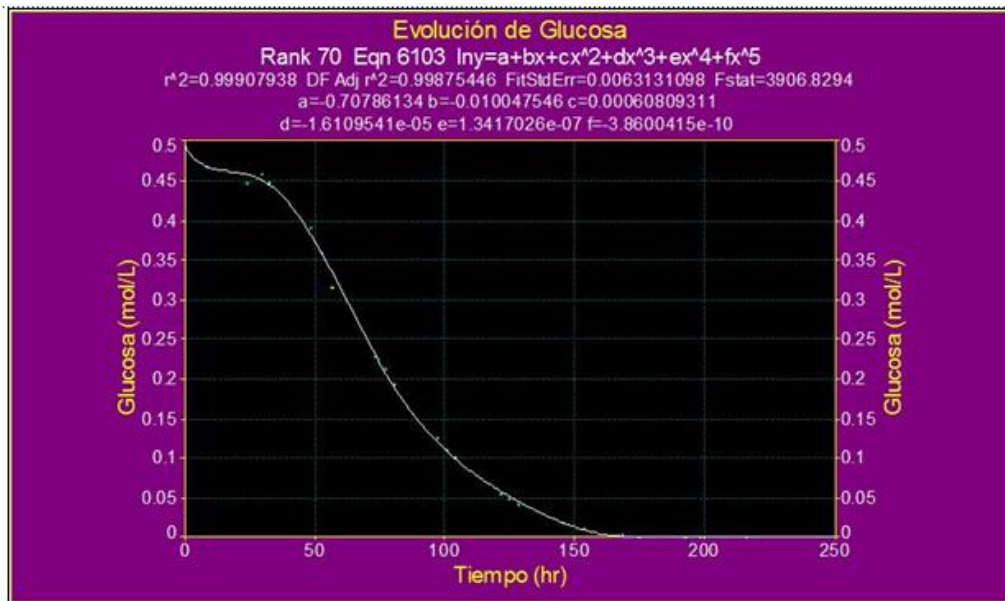
Wilker, K. L., Dharmadhikari, M. R., & Goin, J. C. (2004). Effect of Sweetening Treatments on White Wine Aroma and Composition. *Journal Enology and viticulture*, 55(2), 168-173.

ANEXOS

Anexo A: Ajuste de Parámetros

Para calcular las tasas de reacción tanto de los sustratos como de los productos, a partir de los datos obtenidos en la fermentación batch, se utiliza el software TableCurve 2D® (SYSTAT Software Inc., Chicago, USA). El software permite ajustar curvas modelando los datos de manera rápida, además de poder seleccionar entre las opciones de ajuste que se entregan. La mayor parte de los datos presenta valores de r^2 cercanos a 1 (Figura 10-1). El programa calcula también las derivadas en cada punto de la curva, lo que es útil cuando se necesita calcular las tasas de reacción a ingresar en el análisis de consistencia de datos. En la Tabla 10-1 se muestran los datos obtenidos al utilizar el programa TableCurve 2D.

Figura 10-1: Ejemplo de ajuste para la glucosa utilizando el software TableCurve 2D, para uno de los triplicados de fermentaciones batch (Fermentación 2). La ecuación 6103 fue la escogida con un valor de r^2 de 0.999



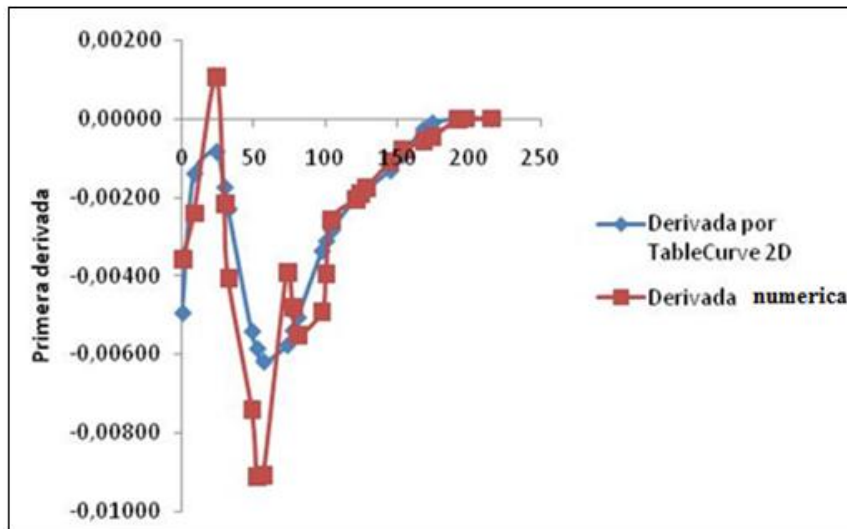
Este análisis se realiza para las 3 fermentaciones por separado, debido a que el tiempo de medición de las muestras en dichas fermentaciones no es el mismo, se prefiere este método.

Tabla 10-1: Ejemplo de Datos obtenidos mediante el ajuste de la mejor curva con TableCurve 2D para la glucosa en una de las fermentaciones batch (Fermentación 2) realizadas con mosto S. blanc cosecha 2007

$\ln y = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4 + fx^5$							
Parámetros	Error estándar	X observado	Y observado	Predicción Y	Y Residual	Primera Derivada	Segunda Derivada
-0,70786134	0,0123	0	0,493	0,493	0,001	-0,00495	0,00065
-0,01004755	0,0026	8	0,469	0,469	0,000	-0,00139	0,00025
0,00060809	0,00015	24	0,448	0,459	-0,011	-0,00083	-0,00012
-1,611E-05	3,25E-06	29	0,459	0,451	0,008	-0,00175	-0,00019
1,3417E-07	2,90E-08	32	0,448	0,446	0,002	-0,00230	-0,00020
-3,86E-10	9,08E-11	49	0,391	0,381	0,010	-0,00542	-0,00014
		52	0,361	0,360	0,001	-0,00586	-0,00010
		57	0,316	0,333	-0,017	-0,00619	-0,00005
		73	0,228	0,232	-0,005	-0,00577	0,00008
		77	0,213	0,209	0,004	-0,00540	0,00010
		81	0,194	0,192	0,002	-0,00507	0,00010
		97	0,127	0,121	0,006	-0,00337	0,00009
		100	0,111	0,111	0,000	-0,00312	0,00008
		104	0,102	0,100	0,002	-0,00284	0,00007
		122	0,056	0,059	-0,004	-0,00199	0,00003
		125	0,050	0,053	-0,004	-0,00190	0,00003
		128	0,043	0,046	-0,004	-0,00181	0,00003
		145	0,020	0,019	0,001	-0,00131	0,00004
		154	0,012	0,010	0,002	-0,00093	0,00005
		168	0,005	0,002	0,003	-0,00026	0,00003
		175	0,001	0,000	0,000	-0,00010	0,00002
		192	0,000	0,000	0,000	-0,0000011	0,0000004
		198	0,000	0,000	0,000	-0,0000001	0,0000001
		216	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Dentro de los compuestos estudiados, la producción de acetato no pudo ser ajustada, pues las curvas obtenidas muestran un r^2 muy bajo, indicando un mal ajuste. En este caso se empleo el método de cálculo de derivadas en tres puntos. Este método no se utilizó para todos los compuestos debido a que las derivadas no son tan suavizadas y se presentan mayores pendientes dependiendo de la cantidad de datos experimentales (Figura 10-2).

Figura 10-2: Comparación entre la primera derivada obtenida mediante la utilización del programa TableCurve 2D y el cálculo mediante el desarrollo de Taylor, para la glucosa en fermentación batch 2 con mosto S. blanc cosecha 2007.

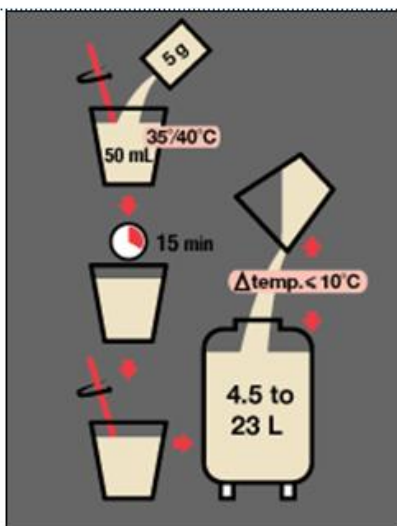


Anexo B: Hidratación de Levaduras

En la fermentación se agregó un activador de fermentación (Superstart, Laffort), para asegurar su término.

En un recipiente con agua a 40°C, agregar 30 gr de Superstart por hL de mosto a fermentar, luego incorporar la levadura seca seleccionada (30 gr de levadura por hL de mosto a fermentar). Agitar para homogeneizar la mezcla. Cronometrar 15 minutos sin agitación, luego agitar para suspender las levaduras y agregar mosto, de modo que la temperatura disminuya 5°C. Repetir el proceso hasta alcanzar la temperatura de fermentación. Inocular el mosto (Figura 10-3).

Figura 10-3: Protocolo de Rehidratación de levaduras secas (Lallemand).



Anexo C: Trampa de Aromas

IMPORTANTE: En este procedimiento se utilizan químicos peligrosos, es necesario informarse al respecto leyendo las MSDS (hoja de seguridad) de los químicos que correspondan. Utilice siempre guantes de látex para manejar los elementos de la trampa y delantal de laboratorio.

Comprar hielo seco y comprobar si existe diclorometano.

Comprobar nivel del baño termostático y hacer funcionar bomba al menos media hora antes de la primera medición, para circular agua por los condensadores y colocar hielo seco en recipiente final.

Conectar la salida de gases del fermentador con la entrada al primer condensador. Conectar el condensador a la trampa final de aromas (ver figura adjunta). Medir el flujo de CO_2 producido por el reactor hasta que se retire la muestra.

Al finalizar, desconectar la salida del fermentador al sistema.

Sacar la trampa final del recipiente con hielo seco y abrir, dejar a un lado la parte superior de la trampa, tomar firmemente el frasco de diclorometano, abrir y colocar (usar embudo) 20 ml de diclorometano en la trampa final, cerrar el frasco con diclorometano y dejar fuera del alcance, cerrar la trampa y mover en círculos pequeños y suaves para disolver los aromas congelados en el fondo de la trampa durante 30 segundos. Verter el contenido de la trampa en una botella oscura

utilizando un embudo, sellar y almacenar a -80°C . Utilizar para esto guantes de nitrilo, lentes de seguridad, mascarilla de gases y delantal de laboratorio.

Si cae en algún sector diclorometano, utilice un material absorbente inerte (tierra, arena, etc.) y después limpiar con agua.

Figura 10-4: Visión del sistema para capturar aromas durante la fermentación, se aprecia claramente la trampa final. Dicha trampa se coloca dentro de una caja de plumavit, en la cual además se localiza otro aislante, para evitar que el frío escape al ambiente.



Anexo D: Tasas específicas de reacción obtenidas mediante aproximaciones de Taylor

Tabla 10-2: Resumen tasas de reacción específicas fermentación Batch 1, mosto S. blanc cosecha 2007 ($\text{mol (C-mol h)}^{-1}$) calculadas por aproximaciones de Taylor

Tiempo	Sustrato	Biomasa	CO ₂	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
Horas	mol compuesto/(C-mol biomasa hr)						
24	-4.869	2.046	-0.300	-0.027	-0.064	-0.996	-0.054
32	1.176	-2.548	0.376	0.013	0.042	0.623	0.013
48	-0.509	0.600	0.051	-0.004	0.002	0.101	-0.005
57	-0.418	0.871	0.025	0.001	0.002	0.140	-0.004
106	-0.077	-0.042	0.097	0.000	0.001	0.074	0.0001
130	-0.030	-0.009	0.047	0.001	0.003	0.043	0.001
170	-0.042	0.063	-0.036	0.000	-0.004	-0.076	-0.002
198	-0.013	-0.026	0.459	0.003	0.020	0.836	0.005

Tabla 10-3: Resumen tasas de reacción específicas fermentación Batch 2, mosto S. blanc cosecha 2007 (mol (C-mol h)⁻¹) calculadas por aproximaciones de Taylor

Tiempo	Sustrato	Biomasa	CO ₂	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
Hora	mol compuesto/(C-mol biomasa hr)						
24	0.569	0.622	0.161	0.016	0.027	-0.200	0.021
49	-0.145	-0.179	0.179	0.005	0.011	0.110	-0.003
73	-0.184	0.762	0.101	0.000	-0.002	-0.060	-0.002
98	-0.153	0.922	0.019	-0.001	-0.014	-0.244	-0.003
122	0.032	-1.386	0.505	0.002	0.020	0.630	0.005
168	-0.019	-0.077	0.048	0.000	0.003	0.082	0.001
216	-0.001	0.032	-0.257	-0.001	-0.006	-0.271	-0.001

Tabla 10-4: Resumen tasas de reacción específicas fermentación Batch 3, mosto S. blanc cosecha 2007 (mol (C-mol h)⁻¹) calculadas por aproximaciones de Taylor

Tiempo	Sustrato	Biomasa	CO ₂	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
Hora	mol compuesto/(C-mol biomasa hr)						
26	0.1505	0.0705	0.1029	0.0000	0.0075	0.3080	-0.0090
49	1.0354	-2.2633	0.4001	0.0024	0.0371	0.5850	0.0270
73	-0.4609	1.4240	0.0443	0.0140	0.0039	-0.1228	-0.0020
97	-0.1106	0.2582	0.1630	-0.0021	-0.0016	0.0900	-0.0005
121	-0.1173	0.0404	0.2103	-0.0010	-0.0034	-0.0239	-0.0015
145	-0.0612	0.9706	-0.2740	0.0000	-0.0006	-0.2655	0.0013
169	-0.0227	-0.2619	0.2597	0.0001	0.0038	0.2360	0.0003
220	0.0070	-0.0217	0.4094	0.0046	0.0300	0.3302	0.0086

Figura 10-5: Tasas específicas de consumo de sustrato obtenidas a partir de aproximaciones de Taylor y ajustes por Tablecurve2D para fermentación a) Batch 1, b) Batch 2 y c) Batch 3 de mosto Sauvignon blanc cosecha 2007

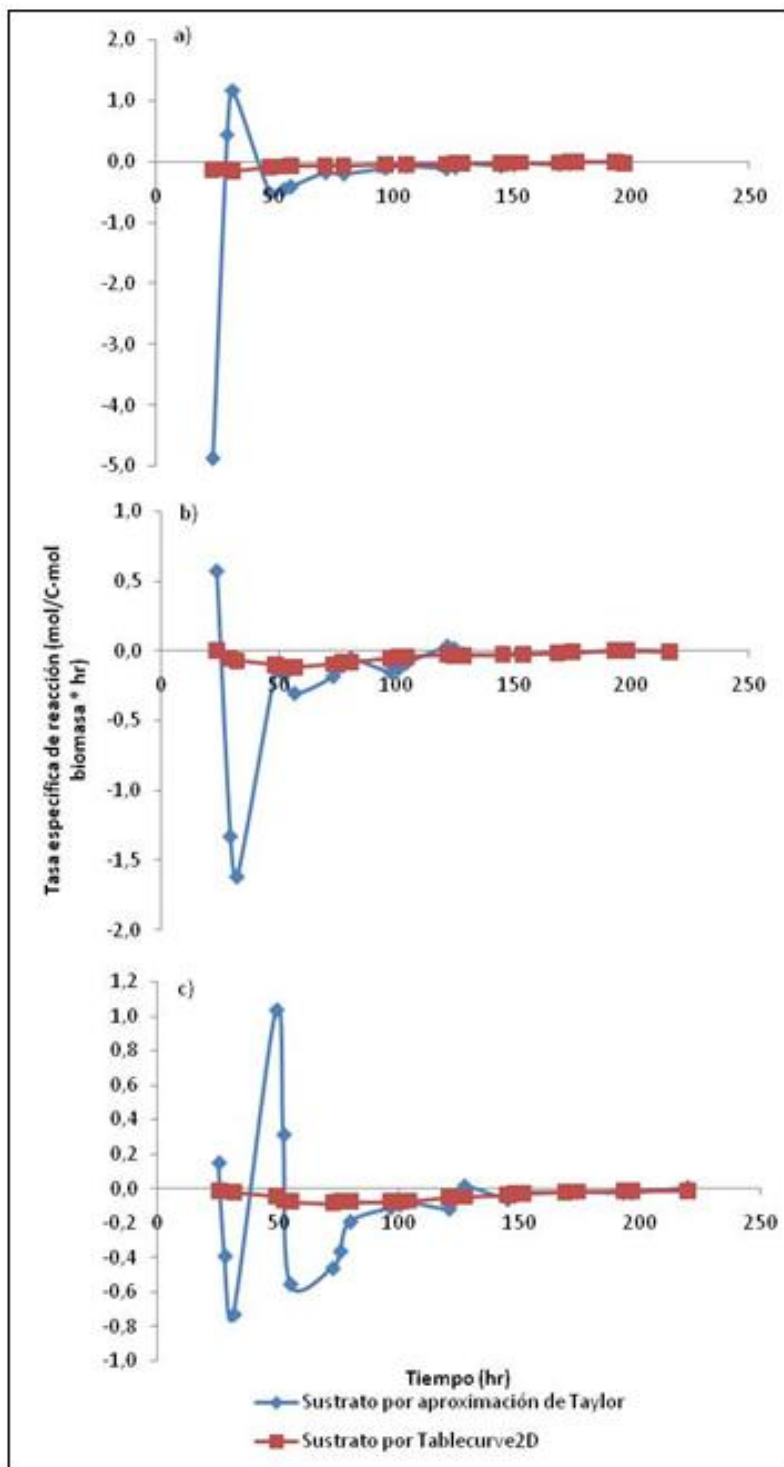
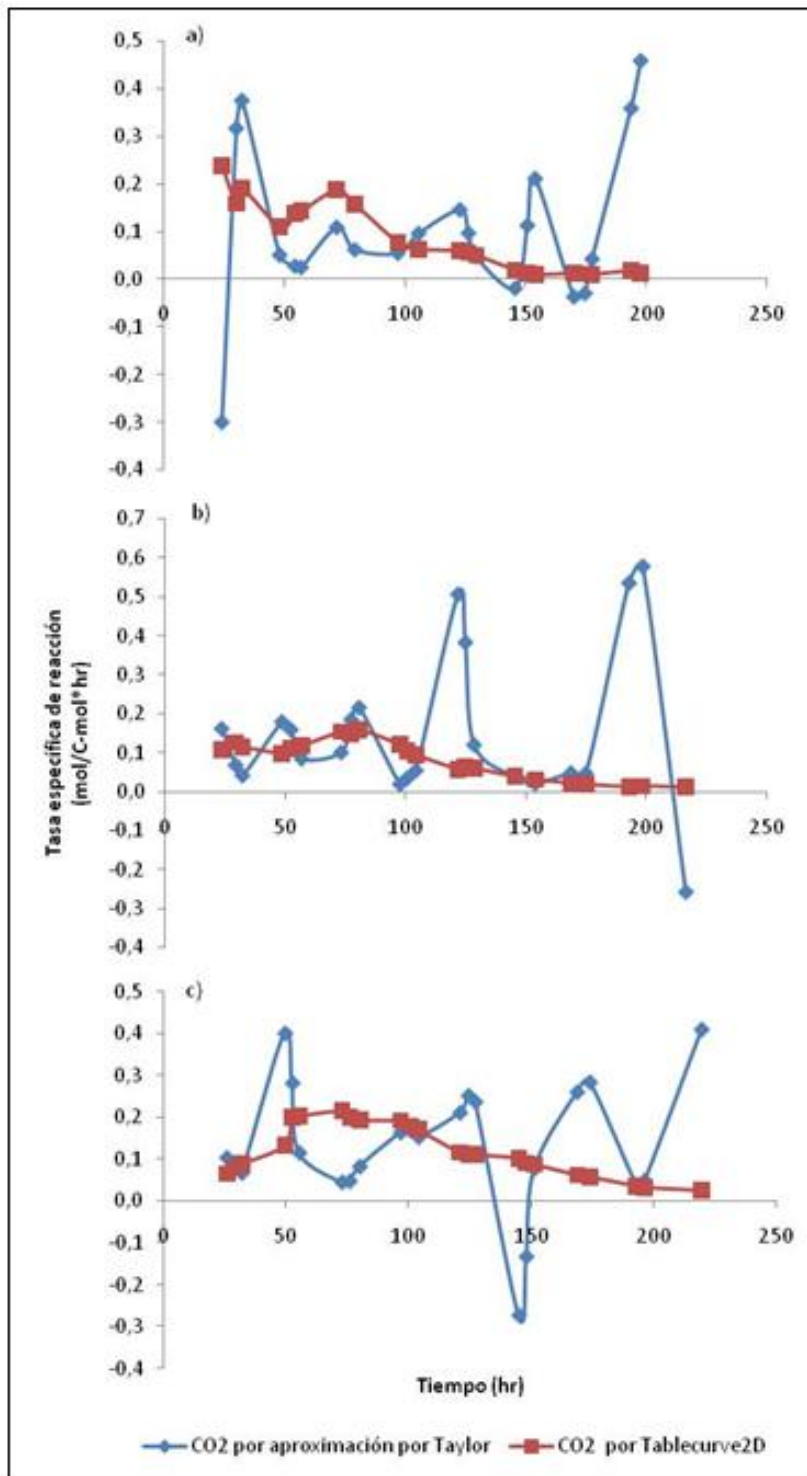


Figura 10-6: Tasas específicas de producción de CO₂ obtenidas a partir de aproximaciones de Taylor y ajustes por Tablecurve2D para fermentación a) Batch 1, b) Batch 2 y c) Batch 3 de mosto Sauvignon blanc cosecha 2007



Los residuos se calculan de acuerdo a la ecuación (1.31), obteniéndose resultados para cada tiempo. Sin embargo, al emplear

la aproximación de Taylor para calcular las tasas específicas de reacción experimentales, los errores de medición involucran más de un compuesto, dificultando el cálculo de los residuos. Para ejemplificar, se utilizan los tiempos que no presentan errores de medición.

Tabla 10-5: Residuos para la fermentación Batch 1, mosto S. blanc cosecha 2007

Tiempo (hr)	Residuos Método empleado: Tablecurve2D	Residuos Método empleado: Aproximación de Taylor
126	0.020	0.427
	0.028	1.043
	0.021	0.332
130	-0.038	0.041
	-0.085	0.079
	-0.038	0.033
174	0.203	0.036
	0.550	0.897
	0.122	0.316

Tabla 10-6: Residuos para la fermentación Batch 2, mosto S. blanc cosecha 2007

Tiempo (hr)	Residuos Método empleado: Tablecurve2D	Residuos Método empleado: Aproximación de Taylor
145	0.012	0.069
	-0.021	0.141
	0.032	0.068
154	0.021	0.111
	-0.003	0.270
	0.042	0.106

Tabla 10-7: Residuos para la fermentación Batch 3, mosto S. blanc cosecha 2007

Tiempo (hr)	Residuos Método empleado: Tablecurve2D	Residuos Método empleado: Aproximación de Taylor
101	0.041	0.068
	0.200	0.279
	-0.015	0.059
104	-0.004	-0.024
	0.100	0.006
	-0.055	-0.016
151	-0.005	-0.587
	0.005	-1.658
	-0.014	-0.337
196	0.292	-0.007
	0.590	-0.149
	0.283	0.028

Anexo E: Estadístico H para datos iniciales obtenidos por aproximaciones de Taylor

Tabla 10-8: Estadístico H, Fermentación Batch 1 con mosto Sauvignon blanc cosecha 2007, para datos seleccionados.

Tiempo	H	Valor de H cuando se elimina un compuesto						
Horas		Sustrato	Biomasa	CO ₂	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
24	5483	5483	55	5527	5483	32	5529	70
32	2799	2774	10	2767	2774	25	2776	55
48	12158	12089	76	12090	12089	45	12135	239
57	362	331	8	336	331	7	356	42
106	8	8	4	8	8	7	7	1
130	0	No existe error de medición para este tiempo						
170	30	28	3	28	28	1	29	8
198	12	3	11	4	3	9	10	12

Tabla 10-9: Estadístico H, Fermentación Batch 2 con mosto Sauvignon blanc cosecha 2007, para datos seleccionados.

Tiempo	H	Valor de H cuando se elimina un compuesto						
Horas		Sustrato	Biomasa	CO ₂	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
24	558	557	3	557	557	2	558	0
49	417	417	0	417	417	3	416	2
73	6801	6800	6	6801	6800	12	6801	76
98	4453	4450	9	4451	4450	21	4453	120
122	10243	10239	43	10242	10239	61	10240	495
168	91	90	0	90	90	2	91	8
216	15	7	10	7	7	8	15	13

Tabla 10-10: Estadístico H, Fermentación Batch 3 con mosto Sauvignon blanc cosecha 2007, para datos seleccionados.

Tiempo	H	Valor de H cuando se elimina un compuesto						
Horas		Sustrato	Biomasa	CO2	Acetato	Glicerol	Etanol	Succinato
26	4	No existe error de medición para este tiempo						
49	35322	35302	26	35279	35302	43	35290	132
72	12534	12534	11	12530	12534	10	12530	80
97	577	577	0	577	577	2	577	6
121	12	12	1	12	12	1	11	2
145	3903	3901	9	3902	3901	18	3900	117
169	790	785	11	785	785	1	790	59
220	12	5	8	5	5	7	12	10

Anexo F: Comportamiento de parámetros fermentativos

Figura 10-7: Relación entre la densidad y la concentración de azúcares, durante la vinificación de Sauvignon blanc.

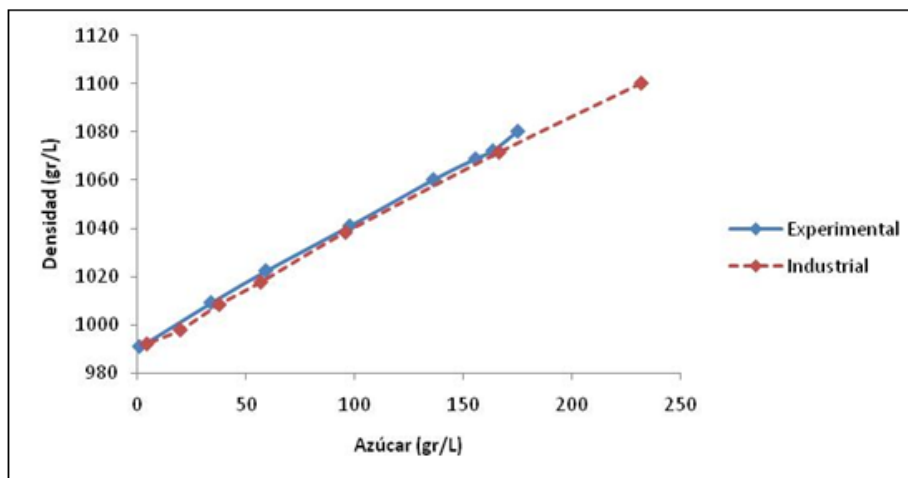


Figura 10-8: Evolución de la concentración de glicerol durante la vinificación de Sauvignon blanc en fermentaciones de laboratorio y en escala industrial.

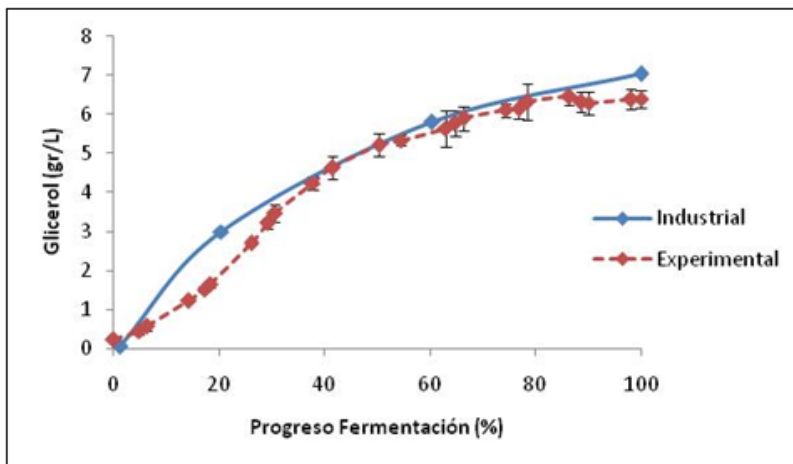
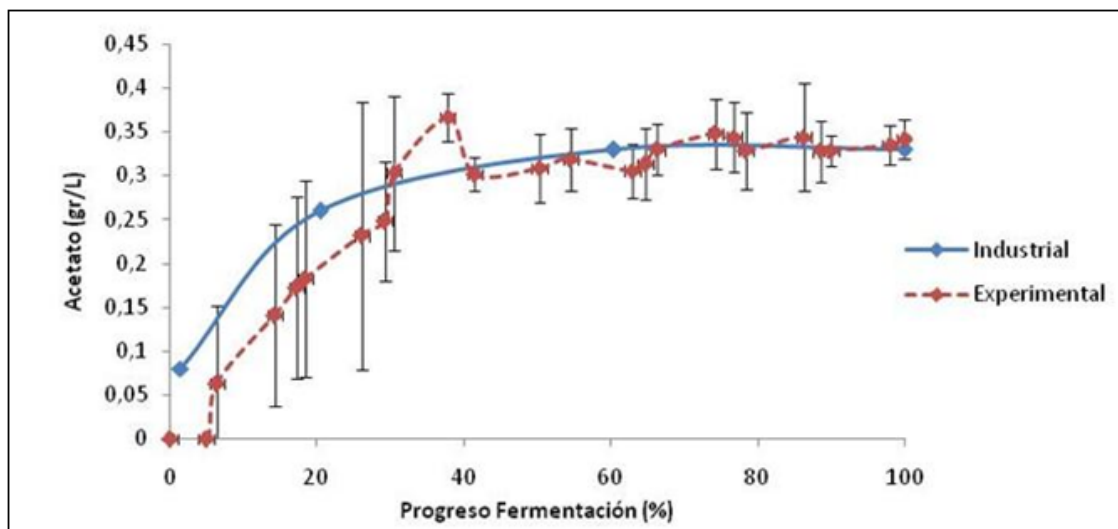


Figura 10-9: Evolución de la concentración de acetato durante la vinificación de Sauvignon blanc en fermentaciones de laboratorio y en escala industrial.



Anexo G: Correlación de fenetil acetato y su alcohol precursor

Figura 10-10: Correlación entre fenetil acetato y su precursor fenetil alcohol durante la fermentación vínica de S. blanc a 18°C

