

EFFECTO DE PASTEURIZACIÓN Y ADICIÓN DE SULFITOS EN LA FERMENTACIÓN DE VINO DE PIÑA

por

Juan Manuel Pérez Gómez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

en

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO

RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ

2006

Aprobado por:

Mildred Chaparro, PhD
Miembro de Comité Graduado

Fecha

Javier Huertas Miranda, M.S.Ch.E.
Miembro de Comité Graduado

Fecha

Carol Harper, PhD.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Luis A. Rivera, PhD
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón, PhD.
Coordinadora del Programa Ciencia
y Tecnología de Alimentos

Fecha

ABSTRACT

Fermentation experiments have been conducted with pineapple juice using pineapple (*Ananas comosus*) Red Spanish variety. The experiments were conducted to evaluate the effect of five types of yeast strains in the sensory characteristics of pineapple wines and to evaluate the effect of pasteurization and addition of sulfites in the overall ethanol productivity (Q_p), maximum sugar consumption rate (r_s) and maximum ethanol production rate (r_{pm}). The effect of yeast strains was evaluated using the 20 point system of UC Davis. Twenty sensory panelists were selected and trained. The data was performed with a Balance Incomplete Block Design (BIB). The effects of pasteurization and addition of sulfites were evaluated with a factorial design 2x2 with 3 repetitions. The wine with the best evaluation in the UC Davis system was IVC-GRE with 14.36 average score. The pasteurization had no significant effect in the fermentation but the addition of sulfites delayed the onset fermentation for 24 to 36 hours, increased the maximum sugar consumption rate, decreased the overall ethanol productivity and had no effect in the maximum ethanol production rate.

RESUMEN

Se realizaron fermentaciones experimentales, utilizando jugo de piña (*Ananas comosus*) de la variedad Española roja. Los experimentos tenían como objetivo evaluar el efecto de las cepas de levadura en la elaboración de un vino de piña y evaluar el efecto de la adición de sulfitos y pasteurización en los parámetros de productividad global de etanol (Q_p), velocidad máxima de consumo de azúcares (r_s) y velocidad máxima de producción de etanol (r_{pm}). El efecto de las cepas de levadura fue evaluado utilizando el sistema de 20 puntos de la UC Davis. Veinte panelistas fueron seleccionados y entrenados y los datos arrojados por los mismos fueron analizados utilizando un Diseño de Bloque Incompleto Balanceado. Los efectos de pasteurización y adición de sulfitos fueron evaluados mediante un diseño factorial 2x2 con tres repeticiones utilizando la levadura “Montrachet Red Star”. El vino que resultó ser mejor evaluado fue IVC-GRE con una evaluación promedio en la escala Davis de 14.36. El efecto de la pasteurización no es significativo, sin embargo el efecto de adición de sulfitos retrasó el inicio de la fermentación de 24 a 36 horas, incrementó la razón máxima de consumo de azúcares, disminuyó la productividad global de etanol y no tuvo efecto en la razón máxima de producción de etanol.

A mi familia que me ha apoyado siempre..., a mis amigos..., a los que siempre han creído en mi..., a ti que lees estas páginas... y especialmente a mi esposa a quien dedico todo este esfuerzo.

AGRADECIMIENTOS

En esta sección quiero reconocer el apoyo de personas e instituciones sin las cuales esta investigación no se hubiese finalizado. Quiero Agradecer:

- A mi tutor el Profesor Javier Huertas por su apoyo en el desarrollo de esta investigación.
- Al Doctor Carlos Muñoz y a José Almodóvar por su apoyo en el trabajo de microscopia.
- A las personas que me ayudaron a procesar las piñas por su ardua labor gracias Verónica, Nayka, Jomar, Miguel Ángel, Javier y Liliana.
- A Ileana, Sandrita y Anita por ayudarme en los experimentos microbiológicos.
- Al Doctor Dumas y Sheila Soler del laboratorio de análisis químico de la Estación Experimental Agrícola en Río Piedras, por ayudarme con el Análisis químico de HPLC.
- Al Doctor Raúl Macchiavelli por su apoyo con el análisis estadístico muchísimas gracias profesor.
- A la profesora Amanda Díaz de Hoyos por ayudarme a conocer del mundo de los vinos y ayudarme con el análisis sensorial de los mismos.
- Agradecer a todos los panelistas que desinteresadamente brindaron de su tiempo para poder llevar a cabo el análisis sensorial, muchísimas gracias sin ustedes nada de esto se hubiese realizado.

- Gracias al Señor Nieves Morales de la Empresa Agrocampo inc. por proporcionarme la piña para estos experimentos.
- Gracias a Lucy y a Virginia, por ayudarnos a tener local para los catados muchísimas gracias.
- Finalmente Agradezco al USDA y a su Proyecto TSTAR 101 quien patrocina esta investigación.

ÍNDICE

ABSTRACT	II
RESUMEN	III
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE	VII
LISTADO DE TABLAS	VIII
LISTADO DE FIGURAS	IX
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 OBJETIVOS.....	5
1.2 REVISION LITERARIA.....	6
1.3 MARCO TEÓRICO	9
2 MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 EFECTO DE LEVADURAS	17
2.2 EFECTO DE PASTEURIZACIÓN Y ADICIÓN DE SULFITOS	35
2.3 PROCEDIMIENTOS.....	37
3 RESULTADOS	42
3.1 EFECTO DE LEVADURAS.....	42
3.2 EFECTO DE PASTEURIZACIÓN Y ADICIÓN DE SULFITOS	53
4 CONCLUSIONES	69
5 REFERENCIAS	73
APENDICES	76

Lista De Tablas

Tablas	Páginas
Tabla 2.1 Diseño experimental utilizado	36
Tabla 3.1 Resultados globales de la evaluación de vinos utilizando la escala UCD	42
Tabla 3.2 Resultados de ANOVA y Test Fisher para atributos evaluados	43
Tabla 3.3 Resumen de resultados de análisis sensorial	52
Tabla 3.4 Resultados ANOVA Razón de consumo de Sacarosa	58
Tabla 3.5 Resultados ANOVA Razón de consumo de Glucosa	59
Tabla 3.6 Resultados ANOVA Razón de consumo de Fructosa	60
Tabla 3.7 Resultados ANOVA Razón de consumo de Azúcares totales	61
Tabla 3.8 Efectos principales de Razón de consumo de Azúcares	64
Tabla 3.9 Resultados ANOVA Productividad global de etanol	67
Tabla 3.10 Resultados ANOVA Razón máxima de producción de etanol	68
Tabla 3.11 Resultados promedio de parámetros que miden producción de etanol	69

Listado de Figuras

Figuras	Pags
Figura 1.1 Producción de piña en Puerto Rico 1990 a 2004	3
Figura 1.2 Piña variedad “Española Roja”	12
Figura 1.3 Clarificación Prensando	16
Figura 1.4 Clarificación con Bentonita	16
Figura 3.1 Puntuación promedio global de cada vino, según criterio de los panelista	51
Figura 3.2 Puntuación promedio para calidad general, según criterio panelistas	51
Figura 3.3 Consumo de azúcares y producción de etanol Jugo pasteurizado con sulfitos	54
Figura 3.4 Consumo de azúcares y producción de etanol Jugo no pasteurizado con sulfitos	55
Figura 3.5 Consumo de azúcares y producción de etanol Jugo pasteurizado sin sulfitos	56
Figura 3.6 Consumo de azúcares y producción de etanol Jugo no pasteurizado sin sulfitos	57
Figura 3.7 Fermentaciones experimentales	66

Listado De Símbolos

E:	Cantidad de Etanol total producida
C_s :	Concentración de Azúcar
F:	Masa de Fructosa a adicionar
J:	Masa de Jugo
M:	Masa de Mezcla Final
P_E :	Concentración de Etanol
Q'_p :	Productividad Global de Etanol
r_p :	Razón de Producción de Etanol.
r_{pm} :	Razón Máxima de Producción de Etanol
r_s :	Razón de Consumo de Azúcares
r_{sm} :	Razón Máxima de Consumo de Azúcares
S:	Masa Total de Azúcares en el Mosto
T_f :	Tiempo
X_m :	Fracción Másica de Sólidos en la Mezcla
X_j :	Fracción Másica de Sólidos en el Jugo

1 INTRODUCCIÓN

En Puerto Rico la producción agrícola se ha convertido en un reto para los agricultores. Los altos costos de producción, las pequeñas extensiones a cultivar y los altos salarios comparados a otras partes del mundo han influido en la disminución de la producción. Hacer grandes inversiones en maquinaria no resulta rentable ya que las tierras, al no ser de gran extensión se convierten en zonas de baja productibilidad.

Una de las mayores fortalezas de la agricultura Puertorriqueña es la peculiaridad y gran gusto que poseen sus frutas tropicales; piñas, parchas y mangos son considerados como frutas exóticas en Europa y Estados Unidos. Estas frutas son apreciadas también por su alto valor nutricional además de que éstas y otras frutas tropicales tienen un alto potencial de negocio en el mercado internacional.

Sin embargo la producción de piña en Puerto Rico en 1993 era 58,674 toneladas y en 1998 decreció a 15,664 toneladas y se ha mantenido en estos márgenes ya que en 2003-2004 la producción fue de 19,097 toneladas(DAPR, 2004); esto demuestra el claro descenso en la producción en los últimos años(Figura 1.1). Este descenso puede deberse a que la producción de piña local se ha orientado exclusivamente al consumo local, pues los costos de producción altos impiden la comercialización hacia otros mercados.

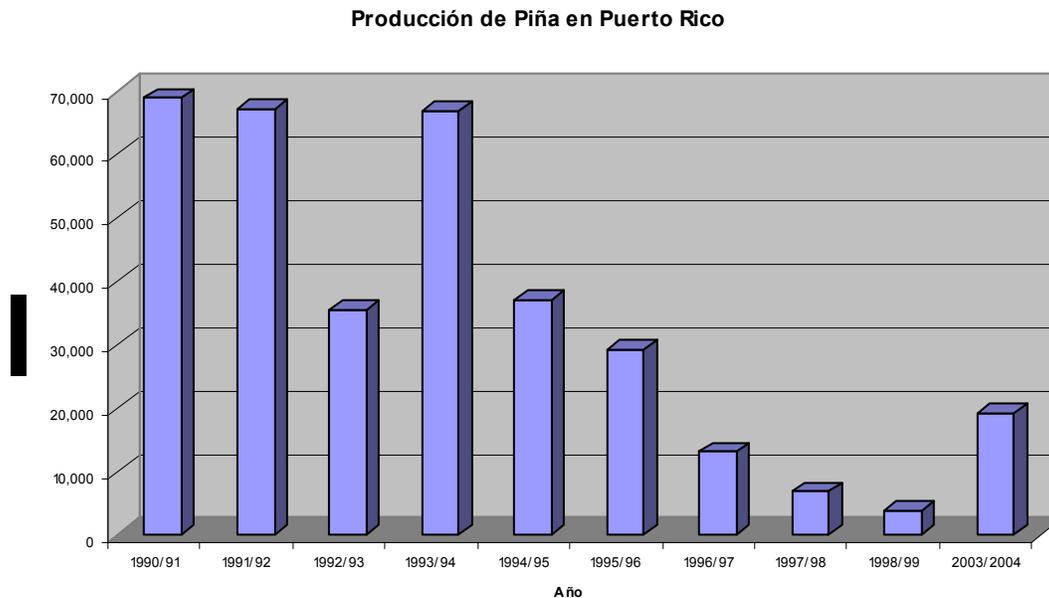


Figura 1.1. Producción de piña en Puerto Rico 1990 a 2004.

Una manera de resolver este problema es brindando valor agregado (Ostergat 2002) a los productos agrícolas. Productos enlatados como el tutti-fruti, frutas deshidratadas, conservas y jugos empacados son algunos ejemplos de valor agregado a los mismos. En adición al valor agregado, el largo de vida útil de estos productos es mayor por los procesos ulteriores recibidos.

Dentro de todos los tipos de productos con valor agregado que pueden fabricarse a partir de cultivos agrícolas, los más rentables son las bebidas alcohólicas. Este tipo de producto representa ganancias substanciales para el gobierno, pues los impuestos a los mismos son utilizados directamente en los rubros de salud y educación poblacional.

Los vinos tienen una ventaja adicional y es que los mismos son asociados a la región geográfica de donde se obtiene la materia prima. En Europa, como en otras partes del mundo, los vinos de frutas, que son elaborados utilizando otras frutas distintas de la uva, se están volviendo cada día productos más populares. Esta nueva tendencia emergente puede ser considerada como una herramienta importante para mercadeo de nuevos productos.

Los vinos de piña pueden ser una alternativa prometedora ya que es una fruta exótica en estos países, sin embargo, para poder competir en estos países es necesario desarrollar productos de la más alta calidad. Este trabajo pretende a través de la investigación en vino de piña de la variedad “Española Roja”, obtener resultados importantes que conduzcan al desarrollo de un producto de la más alta calidad.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

Generar información importante relacionada a la selección de cepas de levaduras y otros parámetros de producción que permitan elaborar vinos de piña de la más alta calidad.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto del uso de cinco cepas diferentes de levaduras comerciales en la elaboración de vino en las características de apariencia, aroma, sabor y aceptación general, para vinos de piña frescos y secos.

Estudiar el efecto que tiene la pasteurización y la adición de sulfitos al mosto, en el consumo de azúcares y producción de etanol durante la fermentación del jugo de piña.

1.2 REVISION LITERARIA

Es importante responder a una polémica que existe en el uso del término “vinos de frutas” pues, según el diccionario de la Real Academia de la Lengua Española (RAE, 2006) vino es un “licor alcohólico que se hace del zumo de las uvas exprimido, y cocido naturalmente por la fermentación.” Pero también el mismo diccionario presenta la acepción de vino como: “zumo de otras plantas o frutos que se cuece y fermenta al modo del de las uvas”. A medida que esta tendencia de realizar fermentaciones apegadas a la metodología del tradicional vino de uvas aumenta, el uso de la palabra vino de frutas ha tenido un aumento sustancial. (Wang, 2004)

La gran mayoría de las investigaciones en el área de vinos son de carácter multidisciplinario. Se ha estudiado mucho de vinos en las distintas áreas de la ciencia como son: agricultura (Aradhya, 2003; Arozarena, 2000), química (Frías, 2001; Netzel, 2002; Stecher, 2001; Varea, 2001), ingeniería (Lopes, 2002; Cramer, 2002; Luedeking, 2000), microbiología (Esteve, 2001; Nissen, 2004; Mills 2002, Naumov 2002, Trabalzini, 2003) y análisis sensorial (Pet’ka, 2001; Vlassides, 2003). Dentro de los muchos estudios realizados, los estudios sensoriales de los atributos presentes en un vino son de mucha importancia para esta investigación ya que la correlación de la respuesta de panelistas puede explicar cómo se diferencian dos vinos entre si.

Carlucci y colaboradores, propusieron una validación estadística apropiada de datos sensoriales obtenida para un vino tinto joven (Aglianico), utilizando ocho panelistas que calificaron nueve atributos en 16 productos distintos. Ellos obtuvieron diferencias significativas para los atributos analizados en los distintos productos, excepto para los atributos de aroma a

cereza y la agudeza en boca. La evaluación estadística se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). (Carlucci, 2001)

Gallart y colaboradores, evaluaron vinos espumosos por una metodología conocida como Método de Mosalux, que consiste en evaluar ciertos parámetros de la espuma y burbujas que se forman y así predecir las características del vino espumoso. Los autores evaluaron 18 vinos, utilizando los parámetros requeridos por el método que son: habilidad de generar espuma (HM), coeficiente de Bikerman (Σ) y tiempo de estabilidad de la espuma (TS). Una vez obtenidos, éstos datos fueron correlacionados con un análisis sensorial realizado por cinco catadores profesionales. Concluyen finalmente que el Método Mosalux fue efectivo para medir las características sensoriales de los vinos espumosos ya que posee una fuerte correlación con los datos obtenidos mediante el análisis sensorial. (Gallart, 2004)

Vidal y colaboradores, realizaron un estudio sensorial, aislando pro-antocianinas de uva y manzanas en cantidades suficientes para llevar a cabo un análisis sensorial, que fue realizado por un panel de 16 voluntarios adiestrados. Los resultados obtenidos demuestran que un aumento en la fracción de pro-antocianinas es responsable de la sensación áspera encontrada en esas muestras que contribuyen con la percepción de astringencia en el vino. (Vidal, 2003)

Nurgel y colaboradores, realizaron un estudio en 20 vinos canadienses de las distintas regiones, encontrando diferencias en los vinos de las regiones de Columbia Británica y Ontario. Por medio de análisis químico encontraron dos diferencias principales: la primera fue la alta acidez titulable y glucosa en los vinos de Columbia al compararlos con los de Ontario; la segunda diferencia fue el bajo contenido de color y acetato de etilo en los vinos de Columbia respecto a los de Ontario. Posteriormente, seleccionaron un panel sensorial de 9 jueces

adiestrados quienes encontraron alta intensidad de aromas a albaricoque, pasas, miel y roble en los vinos de Ontario, mientras que los vinos de Columbia mostraron olores a piña y ciertos aromas oxidados. (Nurgel, 2004)

El efecto del procesamiento del sustrato en las características organolépticas del vino, fue estudiado por Netzel y colaboradores, quienes probaron el efecto del procesamiento de la uva en las características sensoriales del vino tinto. Además encontraron que tres diferentes técnicas de procesamiento influyen la cantidad final de compuestos fenólicos. Estos compuestos fenólicos ayudan positivamente a la salud y nutrición pero causan problemas de opacidad en los vinos y ciertos sabores desagradables. Ellos estudiaron tres técnicas de fermentación: primero la fermentación de uva con cáscara, luego la fermentación macerando y calentando y por último una combinación de los dos. Ellos encontraron que la mayor cantidad de compuestos fenólicos estaba en el tratamiento combinado. (Netzel, 2002) En la misma línea Shimoda y colaboradores, investigaron el efecto que tiene el tratamiento térmico en el aroma de jugo de manzana. Utilizando evaluaciones sensoriales demostraron que existe una marcada diferencia entre el aroma según los distintos tratamientos térmicos aplicados. Ellos obtuvieron valores óptimos de temperatura-tiempo para retener la frescura y el olor frutal, y observaron que el olor dulce aumentaba mientras los olores verdes disminuían. Los valores de tiempo-temperatura fueron 65 s para 80°C, 25 s para 90°C y 15 s para 100°C. (Shimoda, 2003)

Usualmente los enólogos más tradicionalistas no recomiendan pasteurizar los mostos (Callec, 2004; Eisenman, 1998), previo a las fermentaciones, sin embargo Vogt propone un tratamiento térmico previo que no sea severo, con el objeto de homogeneizar el producto que se obtiene, es decir que los vinos posean una calidad reproducible. (Vogt, 1984) Surge entonces la

necesidad de conocer qué cambios puede tener en la calidad del vino el hecho de pasteurizar el mosto. Esta investigación buscó responder el efecto de pasteurización del sustrato en los parámetros que modelan la fermentación. Dentro de los parámetros que modelan la fermentación están los estudiados por Cramer y colaboradores. Ellos desarrollaron un modelo físico-matemático que explica la cinética de la fermentación de un vino. Realizaron fermentaciones con la levadura Premier Cuveè Red Star y evaluaron el crecimiento celular, utilizando la razón específica de crecimiento (μ). Además evaluaron la razón de consumo de azúcares (r_s), el rendimiento de etanol basado en el consumo de azúcares ($Y_{E/S}$) y producción de etanol, como parámetros explicatorios de la fermentación. Concluyen que el modelo desarrollado aplica tanto a las fermentaciones normales, como a las fermentaciones que se transforman en lentas o muertas. (Cramer, 2002)

Nobile y colaboradores, modelaron el crecimiento celular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*; la masa celular, la concentración de etanol y azúcares fue monitoreada durante 200 horas y se obtuvo un modelo determinístico que predice el comportamiento de las levaduras desde la inoculación hasta la muerte de las mismas. (Nobile, 2003)

1.3 MARCO TEÓRICO

El estudio de la fermentación en vinos comprende muchas variables que es necesario conocer y controlar para llevar a cabo una elaboración de alta calidad. Esta sección pretende delimitar la investigación fijando ciertos parámetros de la elaboración y contextualizar dentro de las distintas maneras de elaborar vino cual es la que peculiarmente se siguió.

Un vino es producto de un esfuerzo agrícola de alta calidad para producir la materia prima de mayor excelencia, así como un proceso de producción con mucho control de las variables que intervienen en el mismo. En la producción agrícola de los vinos, es importante obtener frutos con la mayor cantidad de azúcares disponibles y con una considerable acidez, ya que estos dos parámetros ayudarán mucho en la calidad final del producto. Los azúcares son la fuente de la que se obtendrá el alcohol así que es importante tener la mayor disponibilidad de los mismos. Los ácidos ayudarán con los sabores durante el proceso de añejamiento por lo que también es importante disponer de ellos. En la elaboración de vinos de gusto frutal es muy importante la acidez como parámetro de equilibrio.

En la elaboración, el enólogo deberá seleccionar el tipo de vino a realizar ya sea dulce (45 g/L o más de azúcar residual), semi dulce [demisec] (18-45 g/L azúcar residual), semi seco (9-18 g/L de azúcar residual), extra seco [dry] (4-9 g/L de azúcar residual) o brut (<4g/L de azúcar).(Callec, 2004) Para ello deberá conocer el momento adecuado de detener la fermentación o dejar que la misma llegue al consumo máximo por las levaduras.

Debe conocer además del tipo de levadura que posee, si es buena para potenciar los aromas, cómo interactúa con el sustrato, si el pH al que se encuentra es más favorable, si requiere nutrientes para iniciar la fermentación o no, si es más adecuada para vinos espumosos, blancos, tintos o rosados, si soporta altos niveles de alcohol y si es buena como re-iniciadora para tanques muertos o fermentaciones lentas. En fin, debe conocer todos los aspectos en que la levadura puede ayudarle en la fermentación. Luego de decidir acerca de la levadura, debe decidir si el jugo o mosto será pasteurizado y si la adición de sulfitos tendrá alguna repercusión en el rendimiento de su fermentación. Debe saber sobre las condiciones óptimas de la fermentación,

es decir, definir la temperatura, agitación si es necesaria; pH, selección del inóculo si la fermentación es realizada con un inóculo controlado o decidir si será una de forma espontánea.

Debe establecer si es necesario pre-clarificar el mosto y cual es el mejor método, entre ellos el uso de enzimas pectinolíticas, uso de agentes floculantes, membranas o filtros. El enólogo debe tomar en consideración si es necesario el añejamiento y cuanto es el tiempo adecuado para el mismo sin que se oxide el vino o tenga problemas de descomposición. Para el trasiego y clarificación del vino debe tener en cuenta el tipo de barriles a usar y el método de clarificación. Finalmente el enólogo debe evaluar la posible pasteurización final y el envasado, el tipo de corcho y color de botella a utilizar.

Esta cantidad de parámetros a controlar, hacen necesario fijar ciertas variables en la elaboración del vino, por lo tanto, previo a la realización de los objetivos de este trabajo se realizaron pruebas preliminares que buscaban contestar todas las posibles maneras de elaborar los vinos.

1.3.1 VARIEDAD DE PIÑA

Primero se comenzó por la selección de la variedad de piña para la elaboración del vino. Se seleccionó la variedad Española Roja por ser una de las variedades más aromáticas y por poseer en su estado de madurez óptimo una cantidad considerable de sólidos disueltos mayor a 14 °Brix. Existe otra variedad de piña que posee mayor cantidad de grados Brix que es un híbrido de la variedad Española Roja y la variedad Cayena Lisa pero su disponibilidad es muy poca, ya que en comparación a las otras variedades se cultiva en menor proporción. La Española Roja se cultiva en la zona norte de Puerto Rico, por la empresa Agrocamos Inc., principalmente en el

municipio de Manatí. El costo de producción de esta variedad es mayor que el de otras variedades por la peculiaridad de la planta de generar muchas espinas que dificultan su recolección durante la cosecha.



Figura 1.2 Piña variedad Española Roja

1.3.2 SELECCIÓN DE LEVADURAS

Una vez seleccionada la variedad de piña se procedió a la selección de las cepas de levadura más adecuadas para la elaboración. Los criterios que se evaluaron para la selección de levaduras son los siguientes:

- la capacidad de realzar los sabores y aromas del sustrato
- resistencia a altas concentraciones de alcohol
- buena capacidad para elaboración de vinos espumosos, tintos y blancos
- resistencia a concentraciones de sulfitos

- amplio rango de temperaturas de trabajo
- baja necesidad de nutrientes.

A continuación se describen las características principales de las levaduras escogidas para la realización de los vinos de piña según el fabricante:

Montrachet Red Star©: Levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* que es vigorosa a altas concentraciones de SO₂ y con muy buena tolerancia en altas concentraciones de alcohol. Buena para propósitos generales de fermentación tanto para vinos tintos como blancos. Ocasionalmente presenta problemas en presencia de H₂S. Tiende a formar mayor cantidad de espuma comparada con otras levaduras.

K1-V1116 Lalvin©: Levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* que es conocida también como “Montpellier”, posee un factor de inhibición para otras levaduras silvestres “Killer factor”, su poder espumante es bajo y tolera altas temperaturas. Excelente para propósitos generales tanto para vinos tintos como blancos. Es capaz de fermentar a concentraciones de alcohol de hasta 18% en volumen.

71B-1122 Lalvin©: Levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* que es conocida también como “Narbonne”, produce vinos de aromas y sabores frutales. Puede metabolizar entre el 15 y 20% de ácido málico durante la fermentación. Debe ser considerada para vinos de alta acidez.

EC-1118 Lalvin®: Levadura de la especie *Saccharomyces bayanus* que es formalmente conocida como “Prise de Mousse”. Posee un poder espumante bajo, buena para propósitos generales es decir, para vinos tintos y blancos. Es también muy buena para vinos espumosos. Posee la peculiaridad de ser un buen cultivo re-iniciador para tanques muertos o fermentaciones de lento perfil. Usualmente imparte aromas y sabores cítricos a los vinos.

IVC-GRE Lalvin®: Levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura es de la región de Cornas perteneciente al Valle de Rhône, es muy buena para vinos al estilo “easy to drink”. Bajo ciertas condiciones controladas puede evitar olores azufrados no deseados que se producen durante la fermentación. En vinos blancos contribuye con aromas y sabores a sandía y albaricoque, que es deseable en los vinos frutales. Su rango de temperatura óptima está entre los 64 y 96 °F. Tolera alcohol hasta 15% en volumen, pero requiere cierta cantidad inicial de nutrientes.

1.3.3 METODOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN

Para el diseño de la metodología de fermentación se fijaron los siguientes parámetros: fermentadores sin agitación, el pH no fue modificado así que el mismo no es auto regulado con ningún agente externo, la temperatura del medio circundante se fijó a 21°C, pero no se colocó a los fermentadores ningún sistema de auto regulación interna de la temperatura. La fermentación se realizó con las cepas de levaduras seleccionadas y no fue una fermentación de levaduras silvestres. El inóculo de las mismas se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante dejando hidratar las mismas en agua esterilizada a una razón de 0.1g/mL por 30 minutos y se inoculó en una proporción de 0.25g/L respecto al sustrato.

Luego de fijar los anteriores parámetros se realizó experimentos preliminares cuyo objetivo fue definir para la piña cual es la manera más conveniente de obtener un producto de alta calidad.

El primer experimento se realizó para evaluar la metodología de extracción del jugo de piña más adecuado. Esta extracción puede realizarse por prensado o licuado, se optó por el método de prensado pues se encontró que existe un particulado muy fino que se genera en el método de licuado y que es bien difícil de retirar por los ulteriores procesos de clarificación. La figura 1.3 presenta los resultados de ese experimento.

El segundo experimento tenía por objetivo comprobar si es preferible pre-clarificar o solo se clarifica el vino al finalizar la fermentación. Se utilizó agentes floculantes (bentonita, gelatina y enzimas pectinolíticas) en las dosis recomendadas por el fabricante y se encontró que utilizar bentonita, en una relación mayor a la propuesta por el fabricante de 1gr/L, al finalizar la fermentación brinda resultados de clarificación aceptables en cuanto a la apariencia final del vino. La figura 1.4 presenta los resultados de ese experimento.

Debido a que para ciertas levaduras el proceso de fermentación puede alargarse mucho se decidió, en base a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, que en el día 10 de fermentación se agregara sorbato de potasio en las proporciones recomendadas por el fabricante para detener los procesos a un mismo tiempo. Para ese día los grados Brix observados están en el orden de 7, la fermentación se vuelve mucho mas lenta pues la cantidad de alcohol presente es alta y los cambios en la producción de alcohol son mínimos.

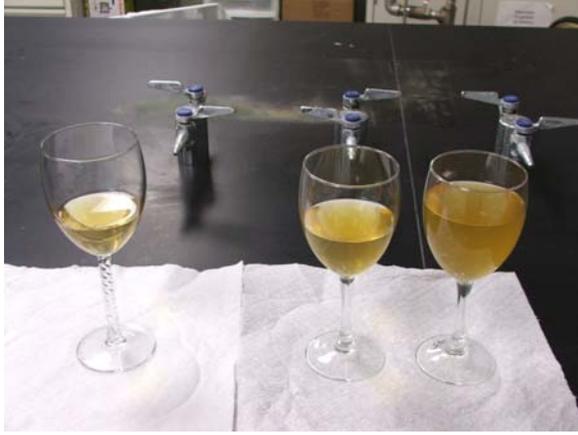


Figura 1.3 Clarificación Prensando

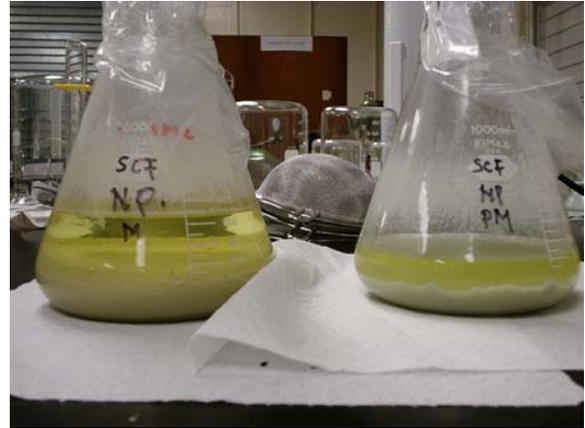


Figura 1.4 Clarificación con Bentonita

Una vez se definió la metodología completa de la realización de la fermentación y clarificación de los vinos, se procedió a trabajar en los dos objetivos principales de esta tesis, que son evaluar el efecto de las levaduras en las características sensoriales de los vinos y evaluar el efecto de pasteurizar y adicionar sulfitos en el jugo de piña. En el siguiente capítulo se presenta la metodología específica de los experimentos realizados para responder a los objetivos planteados

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para los experimentos que se describirán a continuación se utilizó piña de la variedad Española Roja. La piña utilizada fue provista por Agrocambios Inc. y se cultiva en Manatí Puerto Rico.

2.1 EFECTO DE LEVADURAS

2.1.1 ELABORACIÓN DE LOS VINOS

Cinco fermentadores tipo “glass carboy” se utilizaron, cada fermentador con su respectiva válvula de agua para el escape de CO₂ “air lock”. Las piñas utilizadas fueron peladas y picadas con las técnicas asépticas correspondientes. Se prepararon para cada fermentación 14 litros de jugo. Los Brix iniciales del jugo fueron medidos como se explica en el procedimiento 1 y se ajustaron a 24 Brix agregando la cantidad correspondiente de fructosa comercial, para conocer la cantidad a adicionar se realizaron los respectivos balances de masa. (Ver procedimiento 2 como ejemplo de cálculo). Se adicionó al sustrato 75ppm de metabisulfito de potasio, previo a la inoculación de las levaduras liofilizadas. Las levaduras utilizadas fueron Montrachet Red Star (ATCC 36026), Montpellier (K1-V1116), I.N.R.A. Narbonne (71B-1122), Rhône (IVC-GRE), Prise de Mousse (EC-1118). Siguiendo las recomendaciones del fabricante las levaduras se hidrataron en agua estéril a razón de 0.1g/mL a 30 °C por 30 minutos. Luego se inoculó asépticamente la cantidad correspondiente para los 14 litros de jugo preparado. La relación de inóculo recomendada por el fabricante es de 0.25g/L.

El período de fermentación fue de 10 días. Luego de ese período de tiempo se agregó sorbato de potasio en una proporción de 200 ppm para inactivar las levaduras remanentes y se dejó reposar el proceso por un día y se agregó una segunda dosis de 75ppm de metabisulfito de potasio. Posteriormente se procedió al proceso de clarificación. Para la clarificación se utilizó bentonita comercial, previamente hidratada al 5 % en agua estéril. La hidratación se llevó a cabo utilizando la bentonita (en polvo). La relación utilizada de bentonita fue de 5 g de bentonita en polvo por litro de producto final. Se dejó reposar por 3 días para alcanzar la mayor separación por el agente floculante. Finalmente se procedió a envasar el vino agregando la última dosis de metabisulfito de potasio a razón de 50 ppm. El vino fue envasado en envases de cristal color verde oscuro de 375ml. marca vino canario moscatel. Los vinos fueron almacenados en un cuarto frío a temperatura de 5 °C durante 3 meses antes del análisis sensorial.

2.1.2 ANÁLISIS SENSORIAL

Para determinar el efecto de las levaduras en las propiedades sensoriales de los vinos y su calidad en general se realizó un análisis sensorial. El análisis sensorial constó de 3 etapas, primero se desarrolló una metodología de selección, adiestramiento y desarrollo de un panel sensorial. Segundo, se realizaron las pruebas finales de catado en las que el panelista utilizando la escala de 20 puntos de la Universidad de California en Davis (UCD), evaluó los vinos en los atributos de apariencia, color, aroma, sabor, calidad en general. Finalmente este catado fue estadísticamente realizado utilizando el Análisis de Varianza ANOVA para un diseño experimental de Bloque Incompleto Balanceado. A continuación se detallan las etapas del análisis sensorial.

2.1.2.1 SELECCIÓN, ADIESTRAMIENTO Y DESARROLLO DE UN PANEL SENSORIAL DESCRIPTIVO PARA CATADO DE VINO.

Para el correcto desarrollo de un panel sensorial para tipos de Análisis Descriptivo se siguió con lo propuesto por Meilgaard y colaboradores. Estos a su vez están basados en parte de las normas ASTM “Guía para la selección y entrenamiento de los miembros de un panel sensorial” y en las normas ISO “Guías para la Selección y Entrenamiento de Asesores”. (Meilgaard, 1999)

2.1.2.1.1 Selección de los miembros del panel

Debido a la poca cantidad de candidatos para preselección y falta de constancia de los mismos, así como a la dificultad de horarios, se tomó la opción de no rechazar panelistas bajo los criterios que exigen algunas de las pruebas, según lo descrito por Meilgaard y colaboradores. Para compensar esta deficiencia se optó por adiestrar a reconocer cual era el atributo en el que fallaban para que aprendieran a reconocer las diferencias que se evaluaban en los mismos, a aquellos panelistas que lo requirieron. En el Apéndice 1 se presentan los modelos de las pruebas realizadas a los panelistas que se describen a continuación (Meilgaard, 1999):

Cuestionario a candidatos

El cuestionario a candidatos de preguntas generales acerca del panelista, en las cuales se incluyen preguntas particulares sobre enfermedades o preferencias que pueden afectar los sentidos a ser utilizados en las pruebas descriptivas, también se pregunta en general sobre conocimiento de alimentos y asociación de ciertos sabores y olores a tipos de alimentos. Se rechazó candidatos que no cumplan con requisitos de horario, o que poseían enfermedades o problemas con los sentidos de vista, olfato y gusto. (Meilgaard, 1999)

Prueba Pareo

Esta prueba fue utilizada luego de clasificar al personal de la encuesta y se realizó a un número más reducido de personas. Para este panel descriptivo, en que se necesita tener destrezas con los sentidos de la vista, el olfato y el gusto, se realizaron las pruebas de pareo para evaluar la

habilidad inicial de los panelistas de encontrar y ubicar correctamente olores, sabores y apariencia. Para realizarla se utilizaron las siguientes frutas: piña, uva, naranja, toronja, limón y mandarina, se les extrajo el jugo a estos y se coloreó para que los panelistas no se preenjuiciaran con el sentido de la vista, ya que el objetivo fue detectar en un pareo cual es la fruta, únicamente utilizando el sentido del olfato. En la segunda parte de la misma prueba el panelista tuvo que detectar cuál muestra poseía mayor turbidez. Se utilizó agua coloreada y a una de las muestras se le agregó una pizca de maicena para generar turbidez. En la tercera parte el panelista pareó 5 muestras que contenían principalmente agua y un sabor característico, dulce, salado, ácido y amargo. Además la última muestra poseía la sensación de astringencia. Para realizarla se utilizó azúcar, sal, ácido cítrico, cafeína y alumbre, en las cantidades recomendadas por Meilgaard y colaboradores. Aquellos candidatos que obtuvieron menos de 75% de las respuestas correctas, fueron readiestrados hasta obtener resultados satisfactorios. (Meilgaard, 1999)

Prueba de Detección

Esta prueba es utilizada para determinar si el panelista puede identificar muestras diferentes en cuanto a concentración de un atributo. Se realizó una prueba triángulo que evaluó un atributo en específico, con un umbral de detección amplio. El atributo a evaluar fue dulzura. Para ello se preparó una solución azucarada de 20g/L y otra sin el atributo y se realizó la prueba triángulo siguiendo las recomendaciones para la misma explicadas por Meilgaard y colaboradores (Meilgaard, 1999).

Prueba de Discriminación

Esta prueba es utilizada para determinar si el panelista puede identificar muestras diferentes en cuanto a concentración de un atributo. Se realizó una prueba triángulo, que evaluó un atributo en específico, con un umbral de detección reducido. El atributo a evaluar fue dulzura, para ello se preparó una solución azucarada de 20g/L y otra de 5g/L atributo y se realizó la prueba triangulo siguiendo las recomendaciones para la misma explicadas por Meilgaard y colaboradores (Meilgaard, 1999).

Prueba de Ordenamiento

Esta prueba es utilizada para determinar si el panelista tiene la capacidad de ordenar las muestras en cuanto a la intensidad de un atributo. Se realizó la prueba de ordenamiento para 4 categorías. Aquellos panelistas que no tuvieron correctas todas sus respuestas, recibieron adiestramiento para reconocer el atributo evaluado. Se evaluó el atributo de dulzura, para ello se preparó 4 soluciones azucaradas de 20g/L 10g/L 5 g/L y 1g/L y se realizó la prueba de ordenamiento siguiendo las recomendaciones para la misma explicadas por Meilgaard y colaboradores (Meilgaard, 1999).

Prueba de uso de Escalas

Esta prueba es utilizada para evaluar la capacidad del panelista en traducir a escalas una percepción. Se utilizó la prueba de evaluación de escalas con figuras. El rechazo en esta prueba está sugerido para panelistas que obtuvieron 20% o menos de los aciertos.

Una vez concluida la etapa de pruebas y adiestramientos básicos sobre el análisis sensorial, los panelistas fueron adiestrados en el uso correcto de la escala de 20 puntos de la Universidad de California en Davis para la evaluación de vinos blancos y en las técnicas a utilizar para la realización adecuada de un catado de vino (Meilgaard, 1999).

2.1.2.2 Entrenamiento de un panel Sensorial Descriptivo para Vinos utilizando el Sistema de 20 Puntos de la Universidad de California en Davis (UCD)

Los vinos utilizados para los distintos adiestramientos fueron: Cuvée de los altos, Jacob Greek Chardonnay de 2003, Durius Viura Sauvignon blanc 2004, Condes de Albare, Gato Blanco Chardonnay de 2003, Jacob's Creek, Andes, Albariño, Ernest Julio Gallo, Pinot Grigio.

Primera Sesión:

Objetivos:

- Desarrollar en el Panel conciencia sobre la importancia de la actitud en un panel sensorial.
- Que el Panel se comience a familiarizar con la Escala UCD.
- Reconocer atributos de apariencia y color de vinos y cómo medirlos

Desarrollo: Mediante una charla se explicó a los panelistas:

1. La importancia de los sentidos de la vista, olfato y gusto dentro del análisis a realizar
2. La relación de las percepciones fisiológicas con las respuestas psicofísicas del panelista
3. Los factores que influyen en el panel sensorial
4. La escala UCD, qué atributos mide y cuáles son los puntajes que otorga por atributo en el vino
5. Cómo se evalúa el color en un vino y en qué puntaje se traduce en escala UCD
6. Cómo se evalúa la apariencia del vino y se traduce esto en puntaje según la escala UCD
7. Además se realizó una prueba sensorial de cata en color y apariencia en vino como parte del adiestramiento.

Segunda Sesión:

Objetivo: Desarrollar en el Panel conocimientos y destrezas en el reconocimiento del atributo aroma en vino y cómo medirlo.

Desarrollo: Mediante una charla a los panelistas se explicó la forma en que se evalúan los siguientes aspectos:

1. El aroma en vinos.

2. Las percepciones positivas y negativas en aroma y su puntuación en la Escala UCD
3. Cómo se hace una cata orto-nasal y retro-olfativa de un vino (Callec, 2004)
4. Cómo utilizar la rueda de aromas para vinos
5. Realización de prueba sensorial de cata de Aroma en Vino

Además se repasó los conocimientos aprendidos en la sesión anterior y se realizó una prueba sensorial de cata de color, apariencia y aroma de vinos comerciales blancos.

Tercera Sesión:

Objetivos: Desarrollar en el Panel conocimientos y destrezas asociados al reconocimiento del atributo de sabor en vino y como medirlo. Desarrollar en el Panel conocimientos y destrezas en el reconocimiento de la complejidad de caracteres de un vino en general y cómo medirlo.

Desarrollo: Mediante una charla a los panelistas se explicó:

1. Cómo se evalúa el sabor y sensaciones orales en vinos.
2. Cómo se diferencian los sabores en las zonas de la lengua y cuáles son las sensaciones más importantes en un vino.
3. Cómo estas percepciones positivas y negativas en sabor se traducen en puntuación en la Escala UCD.
4. Qué parámetros se debe tener en cuenta en un criterio de evaluación de calidad general del vino

Además se repasó el conocimiento aprendido en la sesión anterior y se realizó una prueba sensorial de cata de sabor y calidad general del vino, utilizando vinos comerciales blancos.

Una vez realizadas estas pruebas se pasó al catado de los vinos. Éstos, como se dijo, fueron evaluados utilizando el sistema de 20 puntos de la UCD. A continuación se explica los criterios utilizados por la escala UCD para evaluar a un vino y cuáles son los atributos y cómo deben ser medidos por los panelistas.

2.1.2.3 SISTEMA DE 20 PUNTOS PARA EVALUACION DE VINOS DESARROLLADO POR LA UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA EN DAVIS

El sistema de 20 puntos para la evaluación de vinos consiste en ciertos criterios de evaluación para los atributos de apariencia, color, aroma, sabor y calidad general. La evaluación global del aroma está compuesta por dos criterios: aroma y olor vinagre; de la misma manera la evaluación del sabor se divide en cinco criterios: ácido total, azúcar, cuerpo, aroma en boca “flavor” y astringencia

APARIENCIA: La apariencia del vino evaluó qué tan atractivo el vino es al consumo. Este atributo se midió sensorialmente con el sentido de la vista. La puntuación brinda un máximo de 2.0 y un mínimo de 0.0 utilizando los criterios:

<i>Puntuación Otorgada</i>	<i>Criterio de Evaluación</i>
2.0	Brillante, transparente, atractivo, pulido
1.5	Transparente pero no tan brillante, limpio como cristal
1.0	Apagado y posibles rastros de turbidez
0.0	Opaco y con turbidez evidente

COLOR: En el atributo de color se evaluó si el color del vino corresponde al de un vino fresco o si existen rastros de oxidación en el vino. La puntuación brinda un máximo de 2.0 y un mínimo de 0.0 utilizando los criterios:

<i>Puntuación Otorgada</i>	<i>Criterio de Evaluación</i>
2.0	Color paja claro, con destellos verdes y atractivo.
1.0	Duda si esta oxidado o no.
0.0	Evidentemente oxidado

AROMA: El aroma y la complejidad en nariz de los vinos se midió utilizando tanto la nariz como la boca, mediante un catado orto-nasal y un catado retro-olfativo (Callec, 2004), para poder encontrar mejor percepción de los aromas. Este atributo en la escala Davis se divide en dos

partes: la primera evalúa Aroma y Bouquet del vino con un máximo de 4.0 y un mínimo de 0.0. En vinos frescos, como los evaluados, no existe bouquet desarrollado; por tanto la puntuación se realizó básicamente en el aroma. En la segunda parte se evaluó el olor avinagrado del vino, conocido como “Asecent” con un máximo de 2.0 y un mínimo de 0.0. Así el aroma recibe un puntaje total de 6.0. Debe tenerse en cuenta que se utilizó la rueda de aromas para facilitar al panelista la identificación de los aromas positivos y negativos de los vinos. Los criterios usados para esa puntuación son los siguientes:

AROMA

Puntuación Otorgada ***Criterio de Evaluación***

4.0	Aroma fácilmente identificable a fruta, indicios de la fruta que se hizo y otros aromas agradables (florales especies)
3.0	Aromas identificables a frutas sin ningún otro aroma agradable.
2.0	Aromas agradables no identificables y sin aromas desagradables
1.0	No tiene aroma, con la posible excepción del alcohol
0.0	Tiene aromas desagradables (químicos, oxidado, terroso, microbiológico)

VINAGRE (ASCESENT)

<i>Puntuación Otorgada</i>	<i>Criterio de Evaluación</i>
2.0	No tiene olor a vinagre
1.0	Un poco, o dudo si tiene o no tiene olor a vinagre
0.0	Evidentemente tiene olor a vinagre

SABOR: La evaluación del sabor y las sensaciones en la boca según la escala Davis se divide en: ácido total 2.0, Azúcar 1.0, Cuerpo 1.0, Sabor 2.0, Astringencia o post-gusto 2.0. Así se distribuyen los 8.0 puntos de sabor en la escala. Los panelistas fueron adiestrados en reconocer en qué zonas de la lengua se perciben con mayor intensidad los distintos sabores, así como también fueron adiestrados para reconocer en qué zonas de la boca se encuentran las principales sensaciones a evaluar en un vino. Los criterios utilizados para evaluar cada uno de ellos fueron los siguientes:

ÁCIDO TOTAL

<i>Puntuación Otorgada</i>	<i>Criterio de Evaluación</i>
2.0	Apropiado balance de ácido respecto a otros sabores
1.0	Ligeramente ácido
0.0	Ácido predomina evidentemente sobre los demás sabores

AZÚCAR

<i>Puntuación Otorgada</i>	<i>Criterio de Evaluación</i>
1.0	Apropiada y balanceada (vino seco apenas sensible, vino dulce sensible)
0.0	Inapropiada (vino seco dulce o vino dulce apenas sensible)

CUERPO

<i>Puntuación Otorgada</i>	<i>Criterio de Evaluación</i>
1.0	Apropiado y balanceado (vino blanco más ligero que vino tinto)
0.0	Inapropiado (vino blanco pesado, o vino tinto muy ligero)

AROMA EN BOCA

<i>Puntuación Otorgada</i>	<i>Criterio de Evaluación</i>
2.0	Sabor complejo y acorde al aroma (tan complejo que cada vez encuentro una nueva sensación)
1.5	Sabor frutal acorde al aroma
1.0	Sabor agradable
0.0	Casi sin sabor parecido al agua o con sabor desagradable

ASTRINGENCIA

<i>Puntuación Otorgada</i>	<i>Criterio de Evaluación</i>
2.0	El post-gusto es largo y agradable; dá la sensación de querer ingerir más
1.5	El post-gusto es corto y agradable
1.0	El post-gusto es corto pero es muy fuerte; reseca
0.0	El post-gusto es largo y muy fuerte, reseca, desagradable

CALIDAD GENERAL: Este criterio es muy individual de cada panelista se evaluó con un máximo de 2.0 y un mínimo de 0.0, pero se utilizó las siguientes preguntas guías para facilitar la respuesta del panelista:

<i>Puntuación Otorgada</i>	<i>Criterio de Evaluación</i>
2.0	Le agrada tanto que lo regalaría como un regalo especial.
1.5	Le agrada lo suficiente para comprarlo
1.0	Le agrada pero no lo compraría
0.0	No le agrada en absoluto

La suma total de los criterios es 20 puntos, esta escala se utilizó como la variable respuesta para el análisis estadístico de un Diseño de Bloque Incompleto Balanceado (DBIB). La puntuación de la escala se traduce de la siguiente manera: vinos con puntaje entre 20 y 17 son vinos con excelentes características y sin ningún defecto notable. Vinos evaluados entre 13 y 16 tienen excelente carácter pero defectos poco notables. Vinos evaluados entre 9 y 12 son de aceptabilidad comercial pero con defectos notables. Vinos evaluados entre 5 y 8 son vinos por debajo de la aceptabilidad comercial. Vinos entre 1 y 4 son vinos totalmente arruinados.

2.1.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los vinos fueron evaluados estadísticamente utilizando un Análisis de Varianza ANOVA para un Diseño de Bloque Incompleto Balanceado. La restricción de que un panelista no puede evaluar más de 4 vinos a la vez y poseer un número de tratamientos de 5 hace idóneo este tipo de diseño. Esta restricción esta basada en la disminución de las capacidades sensoriales del panelista al ingerir bebidas alcohólicas (Meilgaard, 1999)

El diseño de Bloque Incompleto Balanceado es en un diseño experimental estadístico que permite evaluar un número de tratamientos (t) en (b) bloques homogéneos y aleatorizados, con la restricción de que no pueden evaluarse los (t) tratamientos en cada bloque escogido, sino sólo un número inferior al número de tratamientos. Este número inferior lo llamaremos sub-bloque (k). Este diseño exige que para poder realizarse las comparaciones correctamente de los (t) tratamientos, éstos se encuentren balanceados a través de los (b) bloques del diseño. El Balanceo implica que un tratamiento (t) debe ser evaluado el mismo número de veces (r) en el total de

bloques, así como las comparaciones de a pares (λ) deben ser las mismas a través de todo los bloques.

Chocran y Cox en el plan 11.1a, proponen un diseño de bloques incompletos balanceados donde $t=5$, $k=3$, $r=6$, $b=10$ y $\lambda=3$. (Chocran y Cox, 1957) Lo anterior sugeriría el uso de 10 panelistas, pero se realizó con 20 para duplicar la precisión en la medición y siguiendo con la recomendación de Meilgaard y colaboradores de poseer un número de panelistas superior a 16 (Meilgaard, 1999). Entonces el plan real utilizado fue $t=5$, $k=3$, $r=12$, $b=20$ y $\lambda=6$. Los 5 tratamientos, los 20 panelistas y el ordenamiento de las 3 posiciones en las que el panelista debía analizar los vinos fueron debidamente aleatorizados, para luego ubicarlos en el diseño seleccionado. Se codificó las muestras de tal manera para evitar que el panelista asociara algún tipo de orden a las muestras que pudiese causar sesgos en las mediciones. En el Apéndice 2 se muestran las distintas aleatorizaciones y los códigos finalmente usados para los panelistas.

2.2 EFECTO DE PASTEURIZACIÓN Y ADICIÓN DE SULFITOS

Para evaluar el efecto de la pasteurización y la adición de sulfitos en la fermentación de vinos se realizaron fermentaciones de prueba, las cuales fueron preparadas como se explica en el procedimiento 2.3.3. Estas fueron monitoreadas para evaluar las curvas de producción de etanol y consumo de azúcares. En la curva de producción de etanol se evaluó los parámetros de razón máxima de producción de etanol (r_{pm}) y productividad global de etanol (Q_p). En la curva de consumo de azúcares totales se evaluó la razón máxima de consumo de azúcares total, utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (r_{sm}). La metodología para calcular cada una de estas variables, así como la definición matemática de las mismas, se explica en el procedimiento 2.3.4. Las variables anteriores sirven como variables respuestas de un diseño experimental.

El diseño experimental utilizado fue un diseño factorial de dos factores con dos niveles de evaluación y tres repeticiones. En este diseño se prueban las siguientes hipótesis:

1. Existe un efecto de la pasteurización del sustrato afectando las variables respuesta de la fermentación
2. Existe un efecto de la adición de sulfitos afectando las variables respuesta de la fermentación
3. Existe un efecto combinado de la pasteurización y adición de sulfitos en las variables respuesta de la fermentación

Un esquema del diseño experimental se presenta en la Tabla 2.1. En este esquema se muestra la codificación utilizada durante la experimentación, las muestras fueron evaluadas

durante las 200 horas siguientes a la inoculación cada 12 horas, como se explica en el procedimiento 2.3.4 y fueron almacenadas en un ultra-congelador “ultrafreezer” modelo “isotemp Basic” para su posterior análisis mediante cromatografía. Este análisis se realizó como se describe en el procedimiento 2.3.5. Con los datos obtenidos se realizó Análisis de varianza para evaluar las variables respuesta descritas anteriormente.

Tabla 2.1 Diseño experimental utilizado

DISEÑO FACTORIAL 2X2 CON 3 REPETICIONES		
Condiciones Experimentales	Pasteurizado	No Pasteurizado
Con Sulfitos	Repetición (A1, A2, A3)	Repetición (B1, B2, B3)
Sin Sulfitos	Repetición (C1, C2, C3)	Repetición (D1, D2, D3)

Todos los análisis estadísticos descritos en este capítulo fueron realizados mediante el programa estadístico INFOSTAT® Estudiantil Versión 2.0 de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

2.3 PROCEDIMIENTOS

2.3.1 PROCEDIMIENTO 1: FERMENTACIONES DE PRUEBA

El inóculo de levadura se preparó pesando levadura liofilizada de forma aséptica y se diluyó con agua estéril a razón de 0.33g/L para cada condición experimental. Se dejó hidratar 30 min a 30°C en una incubadora. Para cada conjunto de experimentos se extrajo el jugo de tres piñas. El jugo se obtuvo mediante un procesador de jugos (Hamilton Beach) Luego fue filtrado en una malla de tela comercial. Se ajustó a 24 °Brix el contenido de sólidos mediante la adición de fructosa comercial (Abel Sales Inc.). Para ello se midió el grado Brix original del jugo con un refractómetro de mano (Reichtec modelo 10431) y se hizo el balance de masa correspondiente para determinar la fructosa añadida (ver apéndice 9 para ejemplo de cálculo). El jugo con los grados Brix ajustados se repartió en 4 alícuotas de 125 mL para cada condición experimental. Se aplicó entonces los tratamientos de pasteurización y adición de sulfitos según se describe en la Tabla 2.1.

La pasteurización se llevó a cabo a 76 °C por 15 segundos; para calentar el jugo, éste se sumergió en aceite vegetal a una temperatura de 320 °F. Para las condiciones experimentales que así lo requirieron se añadió metabisulfito de potasio a razón de 75ppm. Posteriormente se llevó a 30°C las muestras para las cuatro condiciones experimentales y se inocularon las mismas con el inóculo de levadura. El inóculo de levadura se añadió a razón de 330 µL utilizando una micropipeta marca Fisher Brand modelo “Finnpipette” de 100-1000 µl , para cada uno de 4 matraces.

Utilizando un agitador magnético previamente esterilizado, se agitó el contenido de cada matraz con una manta eléctrica “hot plate” (marca Fisher Scientific modelo “310T”). Manteniendo la agitación se repartió el contenido del matraz en 20 tubos de ensayo previamente esterilizados utilizando pipetas estériles de 10 mL, colocando en cada tubo de ensayo 5mL. Se utilizó un succionador eléctrico para pipetas marca “Drumond” modelo “Hood Mate” para realizar estas transferencias. Finalmente los tubos fueron colocados en gradillas y sumergidos en el baño de agua a ($30 \pm 5^{\circ}\text{C}$.) Estos se mantuvieron así durante el proceso de fermentación. Se realizaron muestreos a las siguientes horas 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192 y 204 siguiendo el procedimiento 2.3.2 para cada muestra.

2.3.2 PROCEDIMIENTO 2: TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Para la condición a muestrear, se tomó uno de los tubos de ensayo inoculados y se agitó vigorosamente utilizando un Vortex© durante 10 segundos para asegurar su homogeneidad. Se tomó una alícuota de 1 ml del tubo correspondiente y se diluyó hasta completar 10 mL en un matraz volumétrico. Se tomó entonces dos alícuotas de esta dilución y se filtraron con una membrana de nylon marca “Fisher Brand” de $0.45 \mu\text{m}$ y colocadas en viales para su posterior análisis por HPLC

2.3.3 PROCEDIMIENTO 3: ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE MUESTRAS

El análisis cromatográfico para el análisis del contenido de azúcares se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC por sus siglas en inglés “High Performance Liquid Chromatography”. Marca Waters®. Las azúcares analizadas fueron sacarosa, glucosa y fructosa. El instrumento utilizado poseía un inyector automático de muestras, modelo 770 plus. La fase móvil utilizada fue agua desionizada con 0.05g de Ca EDTA por litro de solución. Esta fue bombeada a una razón de flujo de 0.5mL/min, con una bomba Millipore® modelo M45. La columna utilizada fue una Sugar Pak® operada entre 0.5-1 Kpsi de presión y a 90°C. El detector utilizado fue un Refractómetro modelo 410 cuya celda se mantuvo a 35 °C.

Con los datos obtenidos, se prepararon curvas de consumo de azúcares y producción de etanol. Estas curvas se realizaron utilizando el programa estadístico INFOSTAT® teniendo como variables en el eje de las ordenadas la concentración (g/100 mL) y en el eje de las abscisas el tiempo (h) .

2.3.4 DEFINICIÓN DE VARIABLES RESPUESTA

2.3.4.1 PRODUCTIVIDAD GLOBAL DE ETANOL

Este parámetro representa la cantidad total de etanol producido dividido entre el tiempo que tardó en llevarse a cabo la fermentación. Es una cantidad que no tiene significado físico, pero que da una idea general del comportamiento de la fermentación y es un buen parámetro de

comparación entre las condiciones experimentales evaluadas. La siguiente expresión la define numéricamente:

$$Q' p = \frac{E}{t_F} \quad (2.1)$$

2.3.4.2 RAZÓN MÁXIMA DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Este parámetro representa la velocidad máxima que alcanza la razón de producción de etanol a lo largo de la curva de generación del alcohol. La siguiente expresión define matemáticamente la razón de producción de etanol:

$$r_P = \frac{dP_E}{dt} \quad (2.2)$$

El valor de la razón máxima se encontró para cada condición experimental haciendo una regresión sobre la curva de etanol obtenida. Luego se derivó esta función y se encontró el punto en que se volvió cero la ecuación derivada, es decir, un máximo. Este parámetro puede ser calculado también con una regresión lineal en puntos seleccionados en las cercanías de la pendiente máxima en la curva de producción de etanol. La pendiente de la regresión lineal es la razón máxima de producción de etanol (r_{pm}).

2.3.4.3 RAZÓN MÁXIMA DE CONSUMO DE AZÚCARES

Este parámetro representa la velocidad máxima que alcanza la razón de consumo del azúcar total presente a lo largo de la curva de consumo de azúcares totales. La siguiente expresión define matemáticamente la razón de consumo de azúcares totales:

$$r_s = \frac{dC_s}{dt} \quad (2.3)$$

El valor de la razón máxima se encontró para cada condición experimental haciendo una regresión sobre la curva de azúcares totales obtenida. Luego se derivó esta función y se encontró el punto en que se volvió cero, es decir, un máximo. Este parámetro puede ser calculado también con una regresión lineal en puntos seleccionados en las cercanías de la pendiente máxima en la curva de consumo de azúcares totales. La pendiente de la regresión lineal es la razón máxima de consumo de azúcares totales (r_{sm}).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EFECTO DE LEVADURAS

3.1.1 RESULTADOS ANALISIS SENSORIAL

Los resultados que se muestran en la Tabla 3.1, corresponden a las evaluaciones globales en la escala UCD recibida por los panelistas para cada uno de los vinos. En esta misma tabla se muestra también la distribución real de los vinos en el diseño de bloques incompletos balanceados.

Tabla 3.1 Resultados globales de la evaluación de vinos utilizando la escala UCD

RESULTADOS					
panelista/vino	Montrachet Vino 1	K1-V1116 Vino 2	EC-1118 Vino 3	71B-1122 vino 4	IVC-GRE Vino 5
1		12	19		16.5
2	12.5			17	16.5
3	17.5	16.5	16		
4	19.5		19		18.5
5	9.5	4.5			14
6	10	9	13.5		
7		7	15.5	15.5	
8	8			16.5	14
9		10		9.5	5.5
10			11	13.5	17
11	14	15		14.5	
12	9		17.5	10.5	
13	12		14.5	15	
14		15.5	6		17.5
15	4.5		8.5		4.5
16		11		13.5	14.5
17	12.5	11		16.5	
18		11	14.5	8	
19			13.5	4	10.5
20	18	13.5			18

Utilizando estos datos se hizo un análisis de varianza (ANOVA) sobre todas las variables medidas por la escala Davis. Estos ANOVA se realizaron utilizando el programa (INFOSTAT®). Los resultados finales ANOVA se presentan en la Tabla 3.2. En el Apéndice 3 se pueden encontrar los resultados de las pruebas de ANOVA y Fisher para todos los atributos

Tabla 3.2 .Resultados de ANOVA y Test Fisher para los atributos evaluados

Atributo	Valor p	Vinos significativamente diferentes (Prueba Fisher)	Levaduras Mejor Puntuadas**
UCD	Panelistas 0.0021* Vinos 0.0593	3 y 5	EC-1118 IVC-GRE
Apariencia	Panelistas 0.0070* Vinos 0.2232	1 y 5	Montrachet IVC-GRE
Color	Panelistas 0.0114* Vinos 0.0655	1, 3 y 5	Montrachet EC-1118 IVC-GRE
Aroma	Panelistas 0.0097* Vinos 0.4334	No diferentes	EC-1118 IVC-GRE
Olor a Vinagre	Panelistas 0.0110* Vinos 0.3281	No diferentes	EC-1118 K1-V1116
Ácido Total	Panelistas 0.0375* Vinos 0.7194	No diferentes	EC-1118 IVC-GRE
Azúcar	Panelistas 0.0008* Vinos 0.0829	4 3 y 5	71B-1122 EC-1118 IVC-GRE
Sabor	Panelistas 0.0150* Vinos 0.2235	3	EC-1118
Astringencia	Panelistas 0.0496 Vinos 0.1907	4 5 y 3	71B-1122 IVC-GRE EC-1118
Calidad General	Panelistas 0.1216 Vinos 0.0293*	3 y 5	EC-1118 IVC-GRE

*Valores ($p \leq 0.05$) significativamente diferentes

** Resultados independientemente si son significativos o no

UCD

Para el análisis global (UCD) de la Tabla 3.2 se infiere que entre los cinco vinos no existen diferencias significativas ya que el valor p es mayor que 0.05. La diferencia que se obtuvo es apenas mínima y por ello la prueba Fisher de comparación si encuentra diferencias entre los vinos 3 y 5 en comparación con los vinos 1, 2 y 4. Esta variabilidad está afectada por la diferencia que presentan los panelistas. Las diferencias de los panelistas son significativas, ya que obtuvo un p menor de 0.05. La variabilidad de los panelistas confirma la no existencia de diferencias significativas en los vinos. Sin embargo la puntuación otorgada por los panelistas califica a los vinos fermentados con las levaduras EC-1118 e IVC-GRE, (vinos 3 y 5 respectivamente), en vinos estándares con excelente carácter y muy pocos defectos, según los criterios de la escala UCD.

Los vinos realizados con las levaduras Montrachet, 71B-1122 y K1-V1116 fueron evaluados como vinos de calidad aceptable comercialmente, pero con defectos notables. Esta clasificación de la escala concuerda con las diferencias que encuentra el método comparativo de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD, por sus siglas en inglés). El método de Fisher da una idea de esas diferencias pero no puede ser concluyente en este caso, pues no se rechazó el ANOVA, lo que implica como se dijo al inicio que no existen diferencias significativas entre los vinos con una confianza del 95%.

APARIENCIA

Para la Apariencia en la Tabla 3.2, se puede observar que no existen diferencias significativas entre los 5 vinos evaluados, la prueba de Fisher propone una ligera diferencia del vino IVC-GRE respecto a los otros obteniendo en promedio un mejor valor en apariencia. En general el atributo de apariencia fue evaluado positivamente ya que en términos de la escala UCD, los vinos, según el criterio global de los panelistas, son transparentes, no tan brillantes pero limpios como cristal. Se observa también que los vinos realizados con las levaduras IVC-GRE y Montrachet son los mejor puntuados en éste atributo

COLOR

Para el Color en la Tabla 3.2, se puede observar que no existen diferencias significativas entre los 5 vinos evaluados, aunque el criterio está en el cercano al límite con un p de 0.0655 apenas mayor a 0.05. La prueba de Fisher propone una diferencia del vino IVC-GRE , EC-1118 y Montrachet, respecto a los otros obteniendo en promedio un mejor valor en color. En general el atributo de Color fue evaluado positivamente, pues la prueba de Fisher presenta a los vinos realizados con las levaduras IVC-GRE, EC-1118, Montrachet y 71B-1122 con un puntaje mayor a 1.5. Este valor, en términos de la escala UCD, significa que los vinos tienen a no presentar oxidación sino más bien concuerdan con el color paja verdoso que se espera que tengan. Esto no puede decirse del vino fermentado con la levadura K1-V1116 ya que los panelistas en promedio presentan dudas si este vino está oxidado o no.

AROMA

Para el Aroma en la Tabla 3.2, se puede observar que no existen diferencias significativas entre los cinco vinos evaluados, ya que el p observado es de 0.4334 y la prueba de Fisher lo corrobora ya que no encuentra diferencias entre las medias. Este resultado en términos de la escala UCD significa, que el aroma de los vinos posee muy pocos aromas agradables identificables fácilmente. Se observa también que los vinos realizados con las levaduras IVC-GRE y EC-1118 son los mejor puntuados en éste atributo

OLOR A VINAGRE

Para el olor a vinagre “Acescent”, en la Tabla 3.2, se puede observar que no existen diferencias significativas entre los 5 vinos evaluados, ya que el p observado es de 0.3281 y la prueba de Fisher lo corrobora ya que no encuentra diferencias entre las medias. Éste resultado en términos de la escala UCD significa, que en el olor vinagre “Acescent” de los vinos, los panelistas dudan si lo posee o no, es decir, que hay panelistas que lo detectaron, otros que no y otros que dudan del mismo. Se observa también que los vinos realizados con las levaduras K1-V1116 y EC-1118 son los mejor puntuados en éste atributo.

ÁCIDO TOTAL

Para el sabor ácido total en la Tabla 3.2, se puede observar que no existen diferencias significativas entre los 5 vinos evaluados, ya que el p observado es de 0.7194 y la prueba de Fisher lo corrobora ya que no encuentra diferencias entre las medias. Este resultado en términos

de la escala UCD significa, que el sabor ácido total de los vinos, es ligeramente ácido. Se observa también que los vinos realizados con las levaduras IVC-GRE y EC-1118 son los mejor puntuados en éste atributo.

AZÚCAR

Para el sabor Azúcar en la Tabla 3.2, se puede observar que no existen diferencias significativas entre los 5 vinos evaluados, ya que el p observado es de 0.0829, pero la diferencia se detecta como mínima ya que es un valor muy cercano a $p = 0.05$ de rechazo. La prueba de Fisher sí detecta diferencias significativas en el atributo y presenta a los vinos realizados con las levaduras IVC-GRE, EC-1118 y 71B-1122 como los mejor evaluados. La puntuación obtenida por estos tres vinos se interpreta como que la cantidad de azúcar es apropiada y balanceada para el tipo de vino que es. Los resultados obtenidos por los vinos realizados con las levaduras Montrachet y K1-V1116 se interpretan como que estos vinos tienen a no poseer el azúcar apropiado.

CUERPO

Para la sensación de cuerpo en la Tabla 3.2, se puede observar que no existen diferencias significativas entre los 5 vinos evaluados, ya que el p observado es de 0.2235. La prueba de Fisher sí detecta diferencias significativas en el atributo y presenta al vino realizado con la levadura EC-1118 como el mejor evaluado. La puntuación obtenida por este vino se interpreta como un vino con un cuerpo balanceado y apropiado, para ser fresco, blanco y seco. La

puntuación obtenida por este vino fue la máxima que otorga la escala para cuerpo. Los resultados obtenidos por el resto de los vinos se interpretan como que estos vinos tienden a no poseer el cuerpo balanceado del todo y existe algunos defectos en el mismo.

AROMA EN BOCA

Para la sensación de aromas en boca o gusto del vino, en la Tabla 3.2, se puede observar que no existen diferencias significativas entre los cinco vinos evaluados, ya que el p observado es de 0.2142. La prueba de Fisher si detecta diferencias significativas en el atributo y presenta al vino realizado con la levadura IVC-GRE como el mejor evaluado. La puntuación obtenida por este vino se interpreta como un vino con un aroma en boca frutal, acorde con la fruta de la cual se realiza el vino, balanceado y apropiado, más no demuestra ningún rasgo de complejidad. Los resultados obtenidos por el resto de los vinos se interpretan como que estos vinos poseen un aroma en boca agradable, más no presentan rasgos florales o complejos fácilmente detectables. Inclusive el vino realizado con la levadura K1-V1116, se puede interpretar que tiende a no tener aroma en boca, o es muy poco perceptible, según el criterio de los panelistas.

ASTRINGENCIA

Para la sensación de Astringencia y post-gusto, en la Tabla 3.2 se puede observar que no existen diferencias significativas entre los cinco vinos evaluados, ya que el p observado es de 0.1907. La prueba de Fisher sí detecta diferencias significativas en el atributo y presenta a los vinos realizados con las levaduras: IVC-GRE, EC-1118 y 71B-1122 como los mejor evaluados.

La puntuación obtenida por estos vinos se interpreta como que los vinos posean un post-gusto corto pero agradable. Los resultados obtenidos por el resto de los vinos se interpretan como que estos vinos poseen un post-gusto corto pero fuerte, que reseca demasiado que no provoca la sensación de desear más del mismo.

CALIDAD GENERAL

Para calidad en general, es decir, la opinión del panelista como atributo de evaluación de la calidad del vino. En esta se puede observar que sí existen diferencias significativas entre los 5 vinos evaluados, ya que el p observado es de 0.0293. La prueba de Fisher detecta diferencias significativas en el atributo y presenta a los vinos realizados con las levaduras: IVC-GRE y EC-1118 como los mejor evaluados. En este caso en particular la prueba Fisher es una prueba concluyente ya que el ANOVA muestra diferencias significativas. Este criterio se ve reforzado con el análisis que reporta la prueba sobre los panelistas, en el cual no existe diferencia entre las respuestas que brindan los mismos. Por tanto en base a la preferencia personal, los panelistas están de acuerdo con una confiabilidad de 95% de que los vinos realizados con las levaduras IVC-GRE y EC-1118 son los mejores.

3.1.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS DEL EFECTO DE LAS LEVADURAS

Las levaduras tienen una gran responsabilidad en la formación de aromas y sabores en los vinos. Ferreira y colaboradores presentan en su estudio realizado en sustancias que brindan aromas y sabores en los vinos, que de los 14 componentes estudiados 12 son aportados por las

levaduras en el proceso de la fermentación, mientras que solo dos son propios de la fruta. Por tanto la influencia de las levaduras en la conformación final del vino es primordial (Ferreira, 2000). En nuestro caso se encontró que las levaduras influyeron de la misma manera que en el estudio citado, en las evaluaciones sensoriales. En cuanto a estos análisis sensoriales, puede decirse con certeza, que los panelistas que recibieron el adiestramiento detectaron las diferentes variables que afectan la calidad sensorial del vino. Las variables que detectaron estaban enmarcadas dentro de los criterios de calidad que brinda la escala UCD.

Los resultados mostrados en la Tabla 3.2 indican que los vinos no son significativamente diferentes, es decir que el criterio global con el que midió la escala UCD no encontró diferencias estadísticamente hablando, pero sí detectó diferencias significativas en la respuesta de los panelistas. Por tanto el panel sensorial como un todo de medición, no detecta diferencias en los atributos de apariencia, color, aroma y sabor; pero sí reconocen un vino de otro en cuanto a la calidad general. En este atributo de calidad general, si existe un acuerdo común de los panelistas de que los vinos IVC-GRE y EC-1118 son los de mejor calidad. Esto puede observarse en los resultados del ANOVA en la Tabla 3.2 y en la Figura 3.2

La Figura 3.1 presenta la puntuación global recibida por los vinos según el criterio de lo panelistas. Aunque el ANOVA para estas medias no fue significativo, la puntuación de calidad general coincidió perfectamente con la preferencia de los panelistas cuyo ANOVA demostró ser significativo. Estos resultados colocan los vinos preparados con EC-118 y IVC-GRE como los de mejor puntaje.

Figura 3.1 Puntuación promedio global de cada vino, según criterio de los panelistas

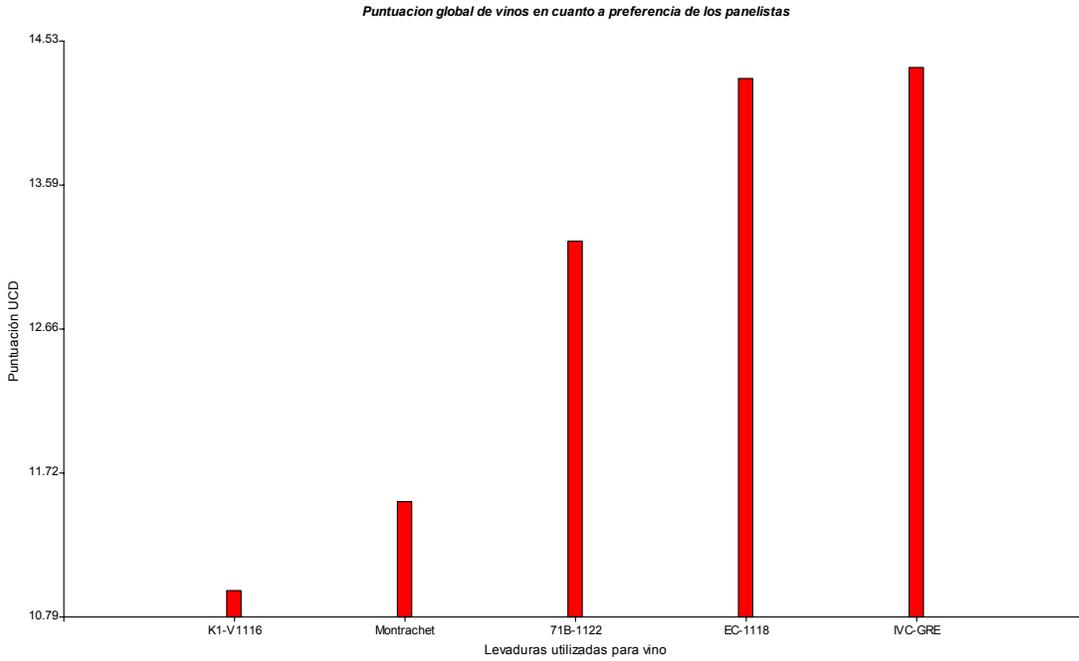
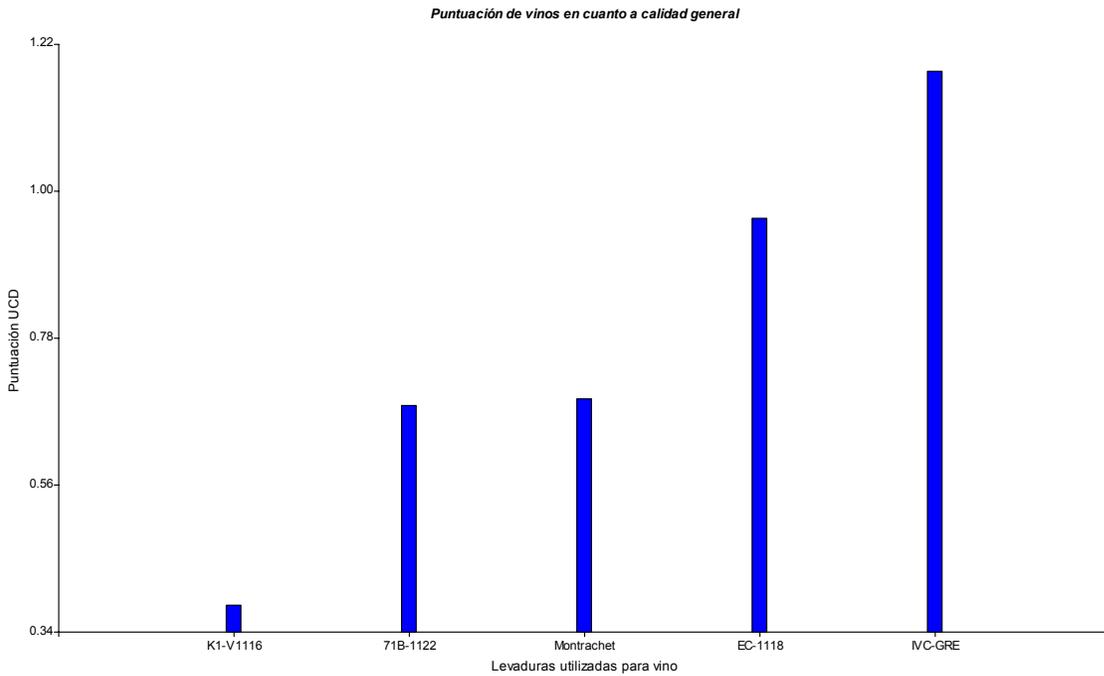


Figura 3.2 Puntuación promedio para calidad general, según criterio de los panelistas



En la Tabla 3.3 se muestra en resumen la puntuación máxima obtenida, las levaduras mejor calificadas y si la diferencia que se establece es significativa o no estadísticamente

Tabla 3.3 Resumen de resultados de análisis sensorial.

ATRIBUTO	LEVADURAS MEJOR CALIFICADAS	CALIFICACION PROMEDIO	ANOVA SIGNIFICATIVO
UCD -20.0	IVC-GRE – EC-1118	14.36 14.20	NO
APARIENCIA- 2.0	IVC-GRE - MONT	1.82 -1.63	NO
COLOR- 2.0	IVC-GRE – MONT- EC-1118	1.83 – 1.83 – 1.77	NO
AROMA- 4.0	IVC-GRE	2.98	NO
OLOR VINAGRE- 2.0	EC-1118	1.73	NO
ACIDO TOTAL- 2.0	EC-1118	1.38	NO
AZÚCAR- 1.0	71B-1122	0.85	NO
CUERPO-1.0	EC-1118	1.0	NO
FLAVOR-2.0	IVC-GRE	1.31	NO
ASTRINGENCIA-2.0	71B-1122- IVE-GRE – EC-1118	1.28 – 1.26 – 1.26	NO
CALIDAD GENERAL-2.0	IVC-GRE – EC-1118	1.18 – 0.96	SI

3.2 EFECTO DE PASTEURIZACIÓN Y ADICIÓN DE SULFITOS

3.2.1 PERFILES GENERALES

En las Figuras 3.3, a 3.6 se presenta el perfil general de las fermentaciones en las cuatro condiciones experimentales estudiadas. El perfil incluye el comportamiento del consumo de azúcares totales, el consumo de sacarosa, el consumo de glucosa, el consumo de fructosa y el perfil de la producción de etanol.

Las Figuras 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6 presentan el perfil de consumo de azúcares y producción de etanol, en función del tiempo, para las condiciones de: jugo pasteurizado con adición de sulfitos, jugo no pasteurizado con adición de sulfitos, jugo pasteurizado sin adición de sulfitos y jugo no pasteurizado sin adición de sulfitos, respectivamente.

Todos estos resultados se obtuvieron después de tabular los datos obtenidos del análisis de HPLC, el Apéndice 16 muestra la tabulación de la data obtenida del análisis.

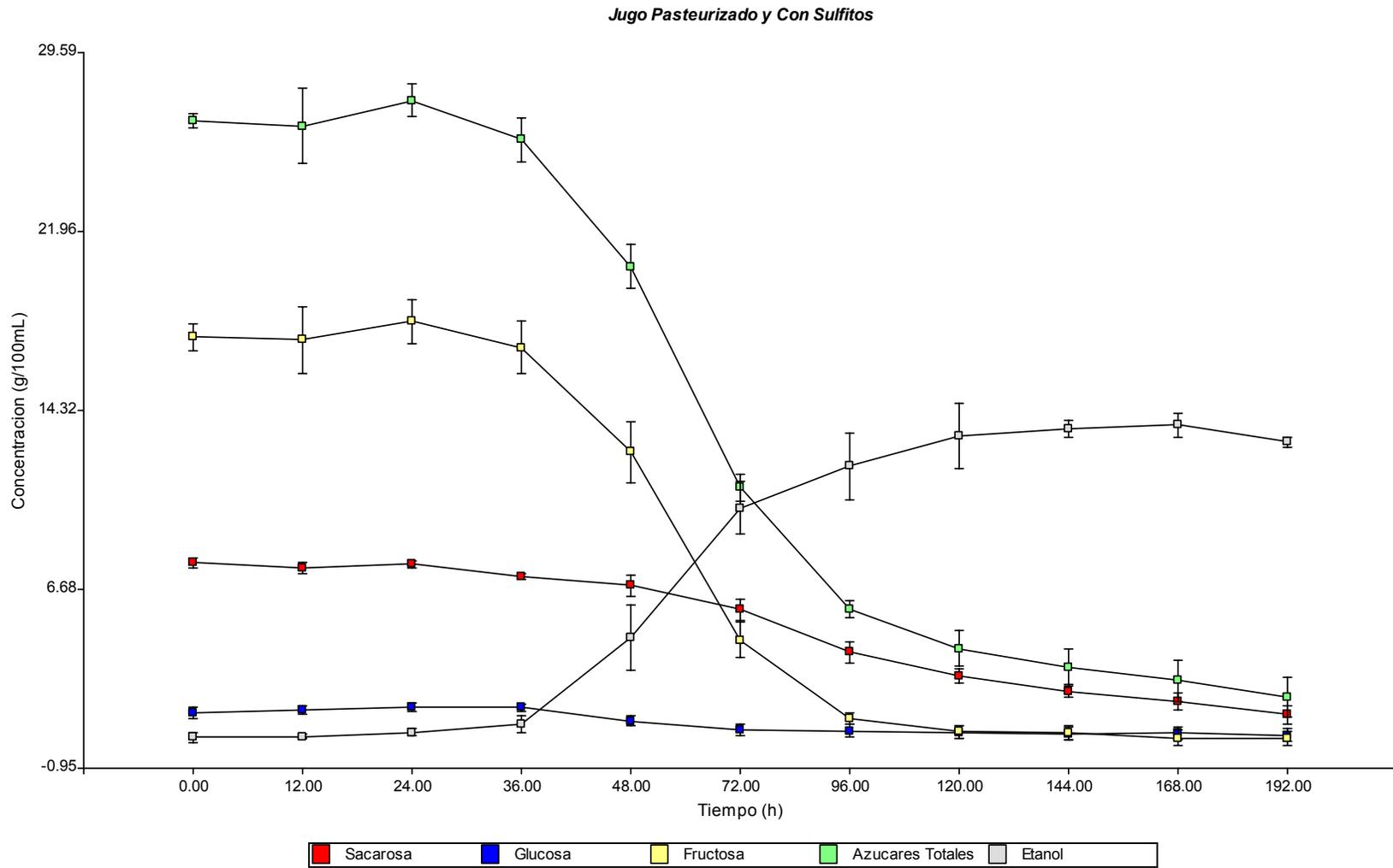


Figura 3.3 Curvas de Consumo de Azúcares y Producción de Etanol jugo pasteurizado con sulfito

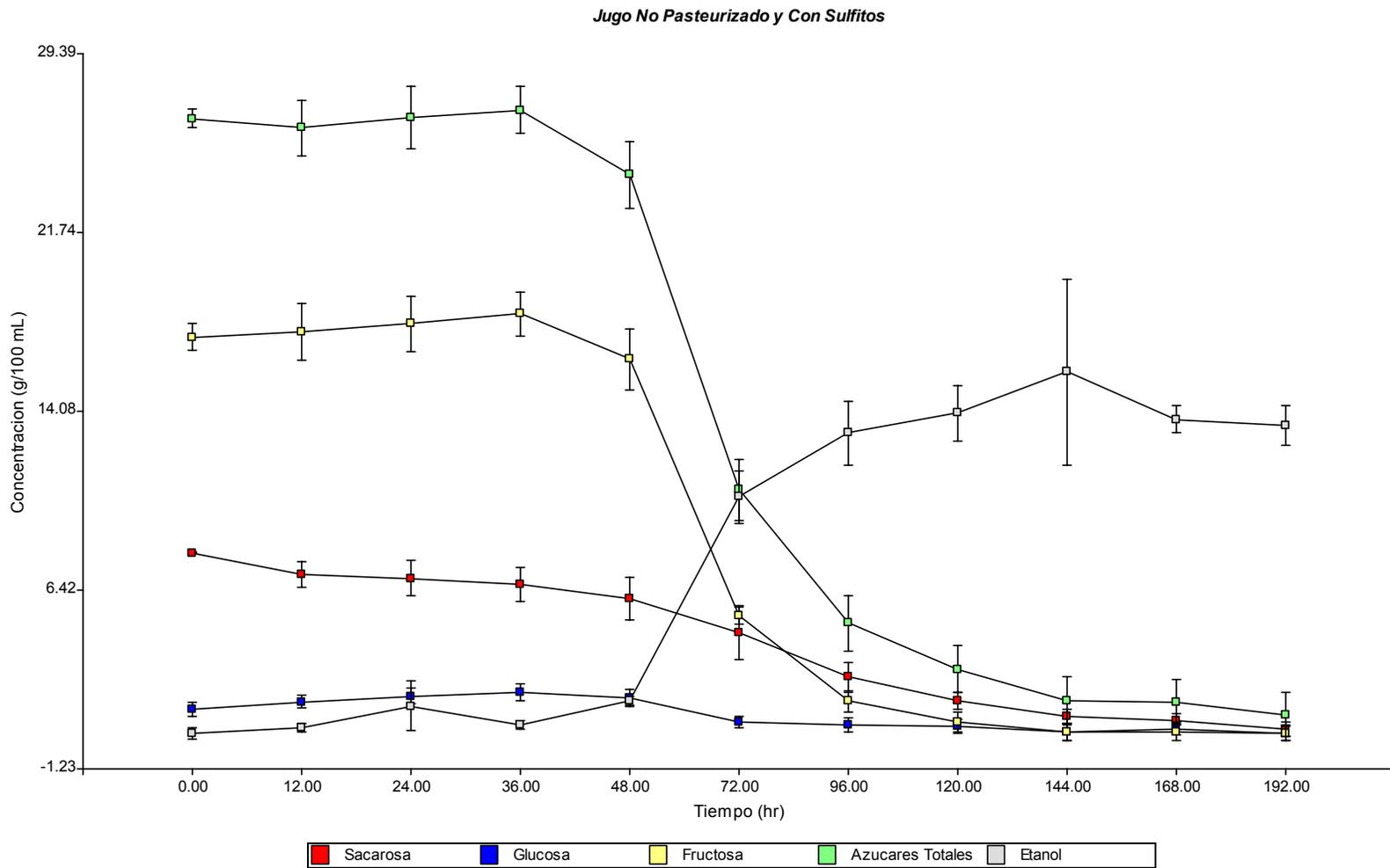


Figura 3.4 Consumo de Azúcares y Producción de Etanol jugo no pasteurizado y sin sulfitos

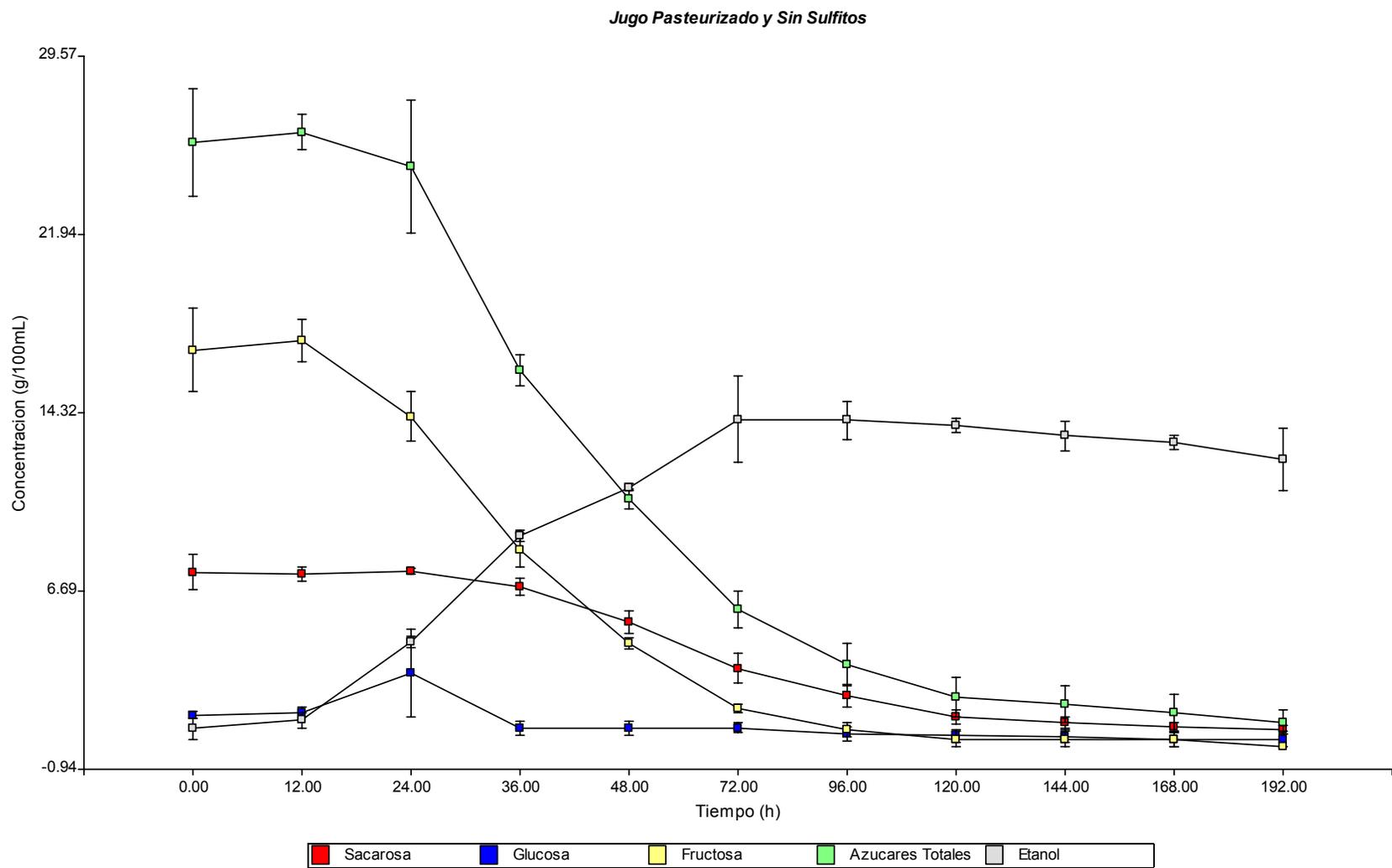


Figura 3.5 Consumo de Azúcares y Producción de Etanol jugo pasteurizado sin sulfitos

Jugo No Pasteurizado y Sin Sulfitos

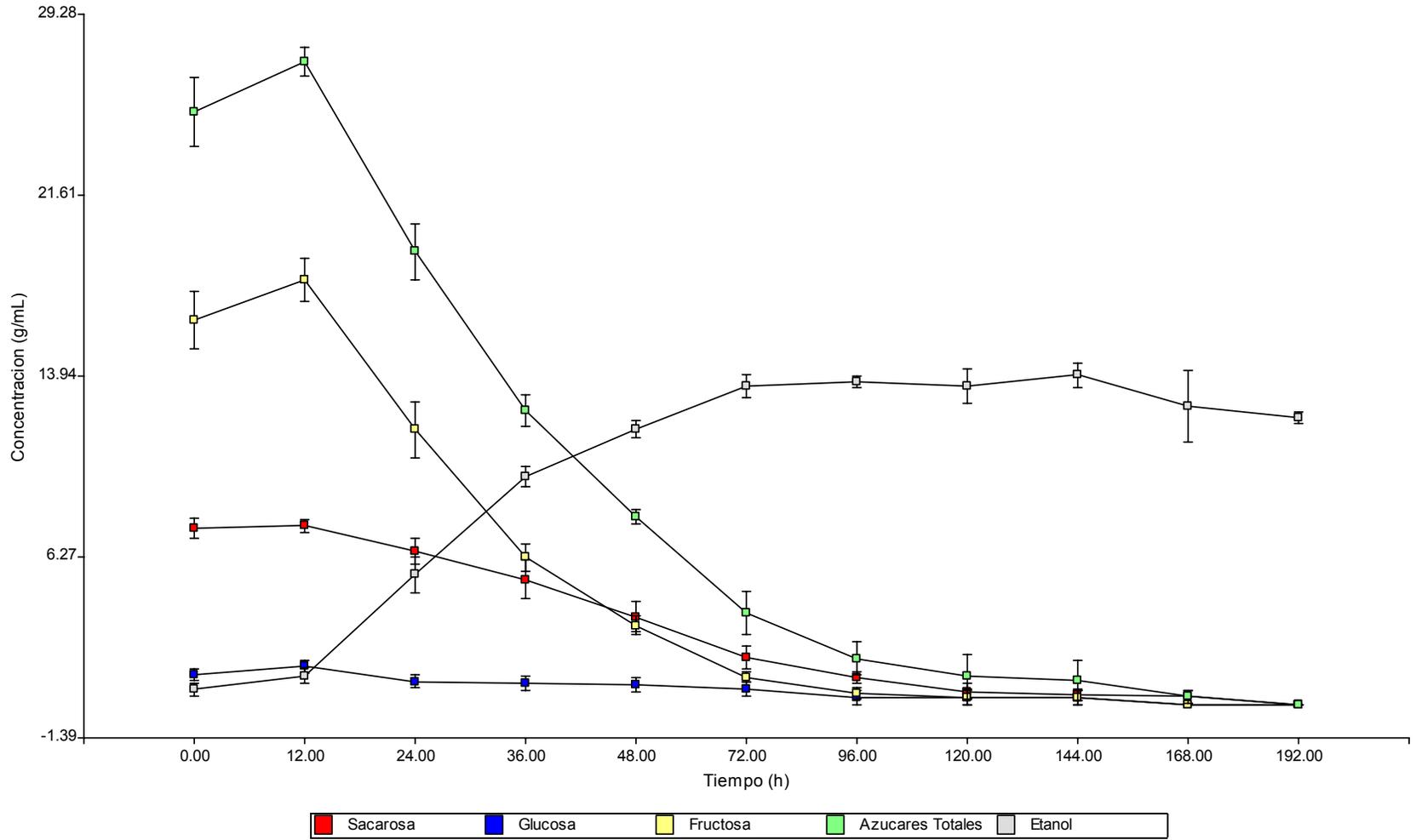


Figura 3.6 Consumo de Azúcares y Producción de Etanol jugo no pasteurizado sin sulfitos

3.2.2 RAZÓN DE CONSUMO DE AZÚCARES

Con los datos obtenidos para sacarosa, fructosa, glucosa y azúcares totales por el análisis de HPLC se evaluó la razón de consumo de azúcares (r_{pm}). Estos cálculos se realizaron utilizando las formulas que se encuentran en el procedimiento 2.3.4. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 3.4, 3.5, 3.6 y 3.7. Las regresiones realizadas para obtener estos resultados pueden verse en los Apéndices: 5, 6, 7 y 8. A estos resultados se les realizó análisis de varianza que se muestra un ejemplo de cálculo en lo Apéndices: 10, 11, 12 y 13.

Tabla 3.4 Valores p para Análisis de Varianza ANOVA

ANOVA RAZÓN DE CONSUMO MÁXIMA	VALOR p
SACAROSA	
PASTEURIZADO	0.33
ADICIÓN DE SULFITOS	0.0068*
EFEECTO COMBINADO	0.6195

*Existe diferencia significativa $p < 0.05$

El ANOVA realizado para estudiar el efecto de la adición de sulfitos y pasteurización muestra que, con un nivel de confianza de 95%, no existe efecto combinado que sea significativo en la razón máxima de consumo de sacarosa, ya que el p de la interacción fue 0.6195. Al no existir interacción los efectos principales son los que poseen prioridad. El efecto principal de pasteurización no es significativo con un 95% de confianza ya que el valor p observado fue de

0.3319. Finalmente el efecto principal de adición de sulfitos si fue significativo con un 95% de confianza ya que el valor p observado fue de 0.0068.

Tabla 3.5 Valores p para Análisis de Varianza ANOVA

ANOVA RAZÓN DE CONSUMO MÁXIMA	VALOR p
GLUCOSA	
PASTEURIZADO	0.8718
ADICIÓN DE SULFITOS	0.6305
EFFECTO COMBINADO	0.2769

*Existe diferencia significativa $p < 0.05$

El ANOVA realizado para estudiar el efecto de la adición de sulfitos y pasteurización muestra que, con un nivel de confianza de 95%, no existe efecto combinado que sea significativo en la razón máxima de consumo de glucosa. No existe efecto principal de pasteurización, y tampoco existe efecto principal de adición de sulfitos. Los valores de p observados son todos mayores que 0.05

Tabla 3.6 Valores p para Análisis de Varianza ANOVA

ANOVA RAZÓN DE CONSUMO MÁXIMA	VALOR p
FRUCTOSA	
PASTEURIZADO	0.2106
ADICIÓN DE SULFITOS	0.0185
EFFECTO COMBINADO	0.8263

*Existe diferencia significativa $p < 0.05$

El ANOVA realizado para estudiar el efecto de la adición de sulfitos y pasteurización muestra que, con un nivel de confianza de 95%, no existe efecto combinado que sea significativo en la razón máxima de consumo de fructosa, ya que el p de la interacción fue 0.8263. Al no existir interacción los efectos principales son los que poseen prioridad. El efecto principal de pasteurización no es significativo con un 95% de confianza ya que el valor p observado fue de 0.2106. Finalmente el efecto principal de adición de sulfitos si fue significativo con un 95% de confianza ya que el valor p observado fue de 0.0185.

Tabla 3.7 Valores p para Análisis de Varianza ANOVA

ANOVA RAZÓN DE CONSUMO MÁXIMA	VALOR p
AZÚCARES TOTALES	
PASTEURIZADO	0.2772
ADICIÓN DE SULFITOS	0.0345
EFECTO COMBINADO	0.5425

*Existe diferencia significativa $p < 0.05$

El ANOVA realizado para estudiar el efecto de la adición de sulfitos y pasteurización muestra que, con un nivel de confianza de 95%, no existe efecto combinado que sea significativo en la razón máxima de consumo de azúcares totales, ya que el valor p de la interacción fue 0.5425. Al no existir interacción los efectos principales son los que poseen prioridad. El efecto principal de pasteurización no es significativo con un 95% de confianza ya que el valor p observado fue de 0.2772. Finalmente el efecto principal de adición de sulfitos sí fue significativo con un 95% de confianza ya que el valor p observado fue de 0.0345.

3.2.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS RAZÓN DE CONSUMO DE AZÚCARES

Cramer y colaboradores, estudiaron la razón de consumo de azúcares como parámetro explicatorio de un modelo cinético de la fermentación de un vino realizado con uvas Chardonnay usando la levadura Premier Cuveè. Este parámetro en el estudio realizado por Cramer⁶, fue utilizado para determinar la razón específica de producción de etanol (β) y el rendimiento de etanol basado en el consumo de azúcares ($Y_{E/S}$) (Cramer, 2002).

En el presente estudio, utilicé la razón de consumo máxima de sustrato, para evaluar como el efecto de la pasteurización y adición de sulfito; afecta el consumo de sacarosa, glucosa, fructosa y los azúcares totales en la fermentación. La adición de sulfitos es un factor que tiene un efecto significativo, tanto retrasando el inicio de la fermentación como aumentando la razón de consumo de azúcares. El inicio se ve retrasado probablemente porque las levaduras son sometidas a estrés con el sulfito, del cual se recuperan posteriormente.

Los sulfitos son aditivos químicos ampliamente utilizados en la industria de alimentos, tanto como antioxidantes y como antimicrobianos. Como antioxidantes, su mecanismo sigue la interrupción de la oxidación interactuando con los radicales libres que se forman y que son los principales precursores de la reacción de oxidación (Bakalinsky, 2004). Inhiben también a la polifenol oxidasa y su principal función en vinos es que protege a los polifenoles. Los polifenoles, tienen un gran valor nutricional y nutracéutico y son responsables del post-gusto y el grado de astringencia del vino (Bakalinsky, 2004).

Como agentes antimicrobianos, los sulfitos tienen el efecto de inhibir enzimas como gliceraldehido-3-fosfato-dehidrogenasa y alcohol-dehidrogenasa, afectando a los

microorganismos directamente en el ciclo de Embden-Meyerhoff-Parnas que es la ruta alternativa de los microorganismos cuando se encuentran en condiciones fermentativas para obtener ATP. Al no poder obtener el ATP se ven inhibidos de crecimiento. Pero microorganismos del genero *Saccharomyces*, *Candida* y *Zygosaccharomyces*, no se ven inhibidos por que poseen la enzima SSU1 que degrada el sulfito y hace que este no interfiera con la ruta metabólica antes descrita (Bakalinsky, 2004). Este mecanismo que se ha descrito de la enzima SSU1 puede ser el que haga que la fermentación comience más tarde alrededor de las 36 horas y eso explicaría por que las fermentaciones que poseen sulfito inician después.

Un hallazgo importante observado, es que las curvas que muestran el efecto de adición de sulfitos, poseen una razón de consumo mayor, que las que no poseen sulfito. La Tabla 3.8 muestra como a excepción del consumo de glucosa, la diferencia entre adición y no adición de sulfitos es significativa aumentando la razón máxima de consumo cuando se tiene sulfitos.

Tabla 3.8 Efectos principales de razones de consumo de azúcares

Promedio por experimento (g/100mL-h)	Con Sulfitos	Sin Sulfitos	Pasteurizado	No Pasteurizado
Razón Máxima de Consumo de Azúcares Totales (g/100mL)	0.36*	0.28*	0.30	0.34
Razón Máxima de Consumo de Sacarosa (g/100mL)	0.08*	0.06*	0.07	0.07
Razón Máxima de Consumo de Glucosa (g/100mL)	0.02	0.02	0.02	0.02
Razón Máxima de Consumo de Fructosa (g/100mL)	0.28*	0.20*	0.22	0.26

* Razones de consumo significativamente diferentes con un 95% de confianza

A partir de lo observado en la Tabla 3.8 surge una contradicción. Podría suponerse que las levaduras, al estar sometidas al estrés de sulfitos, se vuelvan más lentas que las que no estuvieron sometidas al efecto, pero los números anteriores demuestran lo contrario. Existe un efecto positivo de la adición de sulfitos, en cuanto que acelera la razón de consumo de azúcares. Esto se explica mediante el mecanismo de acción de los sulfitos. Allan Bakalinky, explica basado en otros estudios que los sulfitos, al encontrarse en forma intracelular en las levaduras,

acidifican el interior de la célula estimulando específicamente la enzima F1-ATP-asa, la cual promueve un agotamiento interno de ATP (Bakalinsky, 2004). Por tanto, esto me hace suponer que la levadura al verse disminuida en ATP, debe aumentar el consumo de azúcares para poder suplir sus necesidades mediante la utilización de la vía metabólica Embden Meyerhoff (Glicólisis) lo que redundaría en un consumo mayor de azúcares para obtener la energía necesaria brindada por el ATP.

Sobre el efecto de pasteurización se puede comentar que visualmente la pasteurización parecía que había afectado la fermentación, pues las fermentaciones pasteurizadas siguieron un patrón muy distinto que, no pasteurizadas. En la Figura 3.7 se puede observar estos comportamientos. Pero los resultados obtenidos del experimento factorial demuestran que la pasteurización no tiene un efecto significativo sobre la fermentación en cuanto a la variable respuesta de razón de consumo. Este comportamiento diferente en apariencia puede estar más relacionado a la desnaturalización térmica de proteínas y pectinas que mantienen la homogeneidad del jugo, logrando que éste se pueda separar en dos fases. Estas fases pueden ser claramente observadas en la Figura 3.6, pero como se dijo la influencia en cuanto al comportamiento de la fermentación no es significativo.

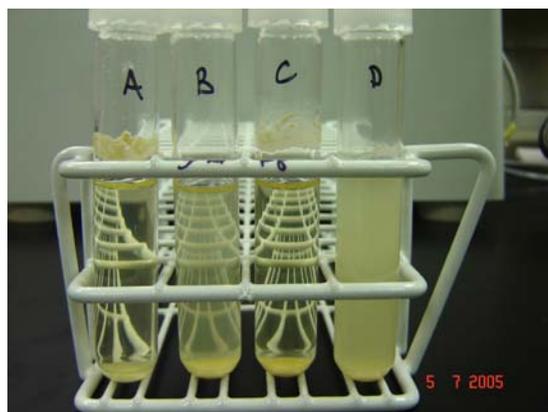


Figura 3.7 Fermentaciones experimentales

Se observa que las condiciones de jugo pasteurizado (tubos A y C de la Figura 3.7) tienen una separación de fases dando la impresión de clarificación del jugo. Las condiciones de jugo no pasteurizado (tubos B y D de la Figura 3.7) presentan la turbidez normal encontrada al extraer el jugo de la piña.

3.2.4 RAZÓN DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Para cuantificar el efecto de la pasteurización y adición de sulfitos sobre la producción de etanol se evaluó tres variables respuesta que fueron la productividad global de etanol (Q'_p), la razón máxima de producción de etanol (r_{pm}). El cálculo se realizó como se explica en el procedimiento 2.3.4, las Tablas 3.9, 3.10 y 3.11 presentan los efectos principales de la adición de sulfitos y pasteurización. Los valores obtenidos de las regresiones lineales, así como los análisis de varianza realizados a estos resultados se muestran en los Apéndices 4, 14 y 15.

Tabla 3.9 Valores p para Análisis de Varianza ANOVA

ANOVA PRODUCTIVIDAD GLOBAL DE	VALOR p
ETANOL	
PASTEURIZADO	0.9147
ADICIÓN DE SULFITOS	0.0079*
EFECTO COMBINADO	0.5091

*Existe diferencia significativa $p < 0.05$

El ANOVA realizado para la adición de sulfitos y pasteurización, muestra que, con un nivel de confianza de 95%, no existe efecto combinado, que sea significativo en la productividad global de etanol, ya que el valor p de la interacción fue 0.5091. Al no existir interacción los efectos principales son los que poseen prioridad. El efecto principal de pasteurización no es significativo con un 95% de confianza ya que el valor p observado fue de 0.9147. Finalmente el efecto principal de adición de sulfitos sí fue significativo con un 95% de confianza ya que el valor p observado fue de 0.0079.

Tabla 3.10 Valores p para Análisis de Varianza ANOVA

ANOVA RAZON DE PRODUCCION MAXIMA	VALOR p
ETANOL TOTALES	
PASTEURIZADO	0.9363
ADICION DE SULFITOS	0.3908
EFECTO COMBINADO	0.4791

*Existe diferencia significativa $p < 0.05$

El ANOVA realizado para las condiciones adición de sulfitos y pasteurización muestra que, con un nivel de confianza de 95%, no existe efecto combinado que sea significativo en la razón máxima de producción de etanol. No existe efecto principal de pasteurización, y tampoco existe efecto principal de adición de sulfitos. Los valores de p observados son todos mayores que 0.05

3.2.5 DISCUSIÓN SOBRE RAZÓN DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

En los resultados observados anteriormente, se tuvo diferencias significativas únicamente en el parámetro de productividad global de etanol. Este parámetro es muy útil, pues nos ayuda a explicar cómo se comportará la cantidad de etanol producida para un proceso en lotes. En este caso la adición de sulfitos estaría afectando el tiempo necesario para el proceso en lote haciéndolo más grande. El resultado que se muestra en la tabla 3.11, comprueba que la razón de producción de etanol con sulfitos es menor que cuando no son adicionados. Para el otro parámetro de razón máxima de producción de etanol no se encontró diferencias significativas.

La razón máxima de consumo (r_m) es una variable que sirve para predecir la alimentación de una fermentación incremental. En este caso (r_m), no se vería afectado con la adición de sulfitos.

Tabla 3.11 Promedio por experimento de parámetros que miden producción de etanol

	Con Sulfitos	Sin Sulfitos
Productividad global de etanol (g/100mL-h)	0.15	0.21
Razón máxima de producción de etanol (g/100mL-h)	0.18	0.19

4 CONCLUSIONES

Respecto al objetivo de evaluar el efecto de las levaduras en la elaboración de vino se encontró que los panelistas difieren significativamente en opinión en el análisis sensorial. Por lo que las conclusiones sobre este análisis son limitadas.

- Se puede concluir basado en los resultados de la Tabla 3.2 que las dos levaduras mejor evaluadas son IVC-GRE y EC-1118. Es concluyente esta aseveración únicamente para el criterio de calidad general de los vinos, debido a que los panelistas estuvieron en acuerdo (no hay diferencias significativas en ANOVA) y las medias obtenidas para estos vinos si son estadísticamente diferentes.
- Los otros criterios, incluyendo el puntaje total de la escala no muestran diferencias significativas entre los vinos, aun así, los puntajes de los vinos están en un rango por encima del criterio comercialmente aceptable. Esto último implica que los resultados obtenidos pueden ser utilizados como guías para decidir cual es la mejor levadura para realizar el vino, más no es un criterio absoluto, pues no es estadísticamente significativo.

Respecto al objetivo de evaluar el efecto de pasteurización y adición de sulfitos se tienen las siguientes conclusiones:

- No existe un efecto combinado de pasteurización y adición de sulfitos en el parámetro razón de consumo de azúcares.
- No existe un efecto principal de pasteurización en la razón de consumo, por tanto, no afecta la fermentación en términos de rendimiento la pasteurización.
- Los patrones diferentes observados en pasteurización no influyen en la fermentación aunque si en su apariencia.
- Existe un efecto principal de adición de sulfitos, retardando el inicio de la fermentación y aumentando la razón de consumo. Estos dos efectos se explican así: el inicio de la fermentación es retardado. Esto puede deberse al trabajo que requiere para la enzima SSU1 degradar el sulfito evitando el ataque a la levadura. La razón de consumo se ve incrementada. Esto puede deberse a que la presencia de sulfito acidifica en interior celular de la levadura y promueve la activación de la enzima F1-ATP-asa que agota la reserva interna de ATP en la levadura. Para contrarrestar ese efecto la levadura consume más azúcares para producir más ATP.
- No existe un efecto combinado de pasteurización y adición de sulfitos en los parámetros razón de producción máxima de etanol, productividad global de etanol y rendimiento de etanol basado en consumo de azúcares.

- No existe un efecto principal de pasteurización en los parámetros de razón de producción máxima de etanol y productividad global de etanol.
- No existe un efecto principal de adición de sulfito en los parámetros razón de producción máxima de etanol. Esto significa que una fermentación incremental no se vería afectada ni con la pasteurización del jugo ni con la adición de sulfitos al mismo.
- Si existe un efecto principal de adición de sulfito en la productividad global de etanol. Esto significa que una fermentación por lotes si se verá afectada retrasándose el tiempo promedio en que tarda en llevarse a cabo.

REFERENCIAS

1. Aradhya M., Danghl G, 2003. Genetic structure and differentiation in cultivated grape *Vitis vinifera* L. Genet. Res. Camb. 81:179-192.
2. Arozarena I., Casp A., 2000. Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety. J. Sci. F. and Agric. 80:1909-1917.
3. Bakalinsky, Allan. Why are wine yeast resistant to sulfite?. <http://www.u-bourgogne.fr/IUVV/Bakalinsky/Bakalinsky.pdf>.
4. Callec Christian, 2004. "Enciclopedia del vino". Rebo Internacional Holanda. 470 p.
5. Carlucci A., Monteleone E., 2001. Statistical validation of sensory data: a study on wine. J. Sci. F. and Agric 81:751-758.
6. Cramer Amanda, Vlassides S., 2002. Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. Biotech Bioeng, 77 (1):49-60.
7. Cochran W., Cox G., "Experimental Design".1957. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. 611 p.
8. Departamento de Agricultura de Puerto Rico. 2004. Estimado de consumo de productos agrícolas seleccionados. "External Trade Statistic Center". Junta de Planificación de Puerto Rico.
9. Eisenman, Lum. 1998. The home winemaking manual. Copyright 1999 <http://www.geocities.com/lumeisenman/contents.html>
10. Esteve-Zarzoso, B., Peris T, 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. App. Env. Micro. 67(5):2056-2061.
11. Frías S., Pérez J., 2001. Classification and differentiation of bottled sweet wines of Canary Islands (Spain) by their metallic content. Eur. Food Res. Technol. 213:145-149.
12. Ferreira V., López R, 2002. Quantitative determination of the odorants of young red wines of different varieties. J. Sci. F. and Agric. 80:1659-1667.
13. Gallart M., Tomas X., 2004. Relationship between foam parameters obtained by the gas-sparging method and sensory evaluation of sparkling wines. J. Sci. F. Agric. 84:127-133.
14. Keller, Jack. "The Winemaking Home Page" Yeast Red Star®, Yeast Lalvin® <http://winemaking.jackkeller.net/strains.asp>

15. Lopes C., Brook M., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. J. App. Micro. 93:608-615.
16. Luedeking R, Piret L, 2000. a kinetic study of lactic acid fermentation batch process, controlled pH. J. Bioch. Micro. Tech. and Eng. 4(1):636-644 (Reprinted Article)
17. Meilgaard, M; Civille, 1999. Sensory Evaluation Techniques (3rd edition) CRC Press LLC, Florida. 400 p.
18. Mills, D, Johannsen, E., 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. App. Env. Micro. 68(10): 4884-4893.
19. Naumov G., Naumova E., 2002. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* Tokaj winemaking of Slovakia and Hungary. App. Micro. Biotech. 59:727-730
20. Netzel, M.; Strass, G.; 2002. Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wines. J. F. Eng. 56:223-228.
21. Nissen P, Nissen D, 2004. The relative glucose uptake abilities of non-*Saccharomyces* yeast play a role in their coexistence with *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures. App. Micro. Biotech. 64:543-550.
22. Nobile M., D'amato, A 2003. Modeling the yeast-growth cycle in a model wine system. J. F. Sci. 68(6):2080-2084.
23. Nurgel C., Pickering G., 2004. Sensory and chemical characteristics of Canadian ice wines. J. Sci. F. and Agric. 84:1675-1684.
24. Ostergat C., Rizo J., 2002. Proyecto de desarrollo Agro-empresarial Rural. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
25. Pet'ka J., Mocák J, 2001. Classification of Slovak varietal white wines by volatile compounds. J. Sci. F. and Agric. 81:1533-1539.
26. Real Academia de la Lengua Española, Diccionario del estudiante 1537 p. Madrid, 2005. <http://www.rae.es/>
27. Shimoda, M., Katoh, T., 2003. Changes in the odors of reconstituted apple juice during thermal processing. F. Res. Inter. 36:439-445.

28. Stecher, G., Huck C., Popp M., 2001. Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS. *J. Anal. Chem.* 371:73-80.
29. Trabalzini L., Paffeti A., 2003. Proteomic response to physiological fermentation stresses in wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* *J. Biochem.* 370:35-46.
30. Varea S., Garcia C., 2001. Polyphenols susceptible to migrate from cork stoppers to wine. *Eur. F. Res. Tech.* 213:56-61.
31. Vidal, S.; Francis, L.; 2003. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. F. and Agric.* 83:564-573.
32. Vlassides, S. Ferrier, J. 2001. Using historical data for bioprocess optimization: modeling wine characteristics using artificial neural networks and archived process information. *Biotech. Bioeng.* 73(1):56-68.
33. Vogt, E., Jacob, L., 1984. "El vino: obtención elaboración y análisis" Editorial Acribia. 200 p.
34. Wang, Z., Xu, Y., 2004. "Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Inst. Brew.* 110(4):340-346.

APÉNDICE 1 PRUEBAS REALIZADAS AL PANEL SENSORIAL

1. Cuestionario a candidatos
2. Prueba de Pareo
3. Prueba de Detección
4. Prueba de Discriminación
5. Prueba de Ordenamiento
6. Prueba de Escalas

Cuestionario Panel Sensorial de Vino

Nombre: _____

Dirección postal: _____

Teléfono (ext): _____, Teléfono celular: _____

E mail: _____

Conteste por favor las siguientes preguntas:

1. Estaría usted disponible los martes y jueves durante la hora universal para recibir adiestramientos sensoriales (S/N): _____ de no ser así que horario le parece más adecuado: _____
2. Padece alguna de las siguientes condiciones: (S/N)
 - Diabetes _____
 - Hipoglicemia _____
 - Alergia a alimentos _____ (si su respuesta es si diga cuales) _____
 - Algún tipo de enfermedad Bucal: _____
 - Toma algún tipo de medicamentos que afecten sus sentidos de gusto y olfato _____
 - Es alérgico o hipersensible a la piña _____
 - Es alérgico o hipersensible al vino _____
 - Fuma: Frecuentemente ____, Ocasionalmente ____, Nunca _____
3. Sobre hábitos alimenticios:
 - Se encuentra en algún tipo de dieta rigurosa (si su respuesta es Si explique) _____
 - ¿Con qué frecuencia come en Fast Foods?
 - Menos de 2 vez por semana _____
 - 2 veces por semana _____
 - Más de 2 veces por semana _____
 - ¿Cuál es (son) su (s) comida(s) favorita(s)? _____
 - ¿Qué comida no le gusta? _____

○ Le gusta el vino (S/N)____; cerveza(S/N)____; brandy(S/N)____; otras bebidas alcohólicas_____

○ ¿Cómo considera su habilidad en detectar olores y sabores

Olores

Sabores

- Mejor que El promedio ____ Mejor que El promedio ____
- Promedio _____ Promedio _____
- Mas bajo que el promedio __ Mas bajo que el promedio __

○ Diga algunas comidas que tengan sabor similar al yogurt:

○ ¿Cuál cree usted que es la diferencia entre sabor y aroma?

○ ¿Cuál cree usted que es la diferencia entre sabor y textura?

○ Describa los sabores mas notables de un refresco de cola

○ Describa los sabores mas notables de la mayonesa

○ Describa los sabores mas notables de una Salchicha

○ Describa los sabores mas notables de una galleta Ritz

Test 1 Pareo

PRIMER ENTRENAMIENTO

No. de panelista: _____ Nombre: _____ Fecha: _____

I. Parte

Instrucciones:

Luego de analizar con su sentido del olfato las siguientes muestras; coloque el número de la muestra en el espacio que corresponde a la fruta indicada.

China: _____

Piña: _____

Uva: _____

Mango: _____

Toronja: _____

Limón: _____

Parcha: _____

Guayaba: _____

II. Parte

Instrucciones:

Luego de analizar con su sentido de la vista las siguientes muestras; coloque el número de la muestra en el espacio que corresponde.

Turbia: _____

Transparente: _____

III. Parte

Instrucciones:

Luego de analizar con su sentido del gusto las siguientes muestras; coloque el número de la muestra en el espacio que corresponde.

Dulce: _____

Amarga: _____

Acida: _____

Salada: _____

Astringente: _____

Test 2
Detección / Discriminación

No. de panelista: _____

Fecha: _____

Nombre: _____

Atributo: Dulzura

Instrucciones: Se le presentan a continuación 3 muestras de Agua azucarada, analícelas de izquierda a derecha únicamente con el atributo de Dulzura, favor no oler las muestras. Existen dos muestras iguales y una diferente. En espacio que se le proporciona a continuación escriba el número de la muestra diferente.

Muestra diferente _____

Test 3
Detección / Discriminación

No. de panelista: _____

Fecha: _____

Nombre: _____

Atributo: Dulzura

Instrucciones: Se le presentan a continuación 3 muestras de Agua azucarada, analícelas de izquierda a derecha únicamente con el atributo de Dulzura, favor no oler las muestras. Existen dos muestras iguales y una diferente. En espacio que se le proporciona a continuación escriba el número de la muestra diferente.

Muestra diferente _____

Test 4

Ordenamiento

CUARTO ENTRENAMIENTO

No. de panelista: _____

Fecha: _____

Nombre: _____

Atributo: Dulzura

Instrucciones: Se le presentan a continuación 4 muestras de Agua azucarada, analícelas de izquierda a derecha únicamente con el atributo de Dulzura, favor no oler las muestras. Ordénelas de la más dulce a la menos dulce. En los espacios que se le proporciona a continuación escriba el número de las muestras ordenadas.

Muestra más Dulce _____

Muestra menos Dulce _____

Test 5

Ejercicios de Escalas

QUINTO ENTRENAMIENTO

No. de panelista: _____

Fecha: _____

Nombre: _____

Instrucciones: Marque en la línea de la derecha la proporción del área sombreada.

Ejemplos:

APÉNDICE 2 ALEATORIZACIÓN PANEL SENSORIAL

Aleatorizaciones de vinos por panelista*.

Panelista	vino			Panelista	vino		
3	1	2	3	6	1	2	3
5	1	2	5	20	1	2	5
8	1	4	5	2	1	4	5
7	2	3	4	18	2	3	4
19	3	4	5	10	3	4	5
11	1	2	4	17	1	2	4
13	1	3	4	12	1	3	4
15	1	3	5	4	1	3	5
1	2	3	5	14	2	3	5
9	2	4	5	16	2	4	5

Aleatorización de Levaduras.

Levadura	Vino
Montrachet	1
K1-V1116	2
EC-1118	3
71B-1122	4
IVC-GRE	5

*Según el plan 11.1a Cochran Cox

Codificación entregada a los panelistas

Panelista / vino	1	2	3	4	5
1		412	334		740
2	816			968	637
3	628	212	130		
4	324		265		432
5	369	943			255
6	834	356	213		
7		269	755	935	
8	513			349	222
9		554		125	865
10			247	863	611
11	131	345		166	
12	256		812	844	
13	827		261	912	
14		367	119		151
15	343		751		236
16		425		837	144
17	232	328		854	
18		955	241	329	
19			154	225	713
20	928	447			567

APÉNDICE 3 EJEMPLO DE COMPUTO PARA ANOVA Y PRUEBA FISHER EN ESCALA UCD Y ATRIBUTOS, UTILIZANDO PROGRAMA INFOSTAT®

Resultados de ANOVA y Test Fisher para puntuación global UCD

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	659.62	23	28.68	2.94	0.0019
Panelista	561.81	19	29.57	3.03	0.0021
vino	97.81	4	24.45	2.50	0.0593
Error	351.69	36	9.77		
Total	1011.31	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 2.58786

Error: 9.7691 gl: 36

vino	Medias	n		
2.00	10.96	12	A	
1.00	11.54	12	A	
4.00	13.23	12	A	B
3.00	14.29	12		B
5.00	14.36	12		B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Resultados ANOVA y Prueba Fisher para Calidad General

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	12.75	23	0.55	1.82	0.0521
Panelista	9.05	19	0.48	1.56	0.1216
vino	3.71	4	0.93	3.04	0.0293
Error	10.96	36	0.30		
Total	23.71	59			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.45687

Error: 0.3045 gl: 36

vino	Medias	n		
2.00	0.38	12	A	
4.00	0.68	12	A	B
1.00	0.69	12	A	B
3.00	0.96	12		B C
5.00	1.18	12		C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

APÉNDICE 4 REGRESIÓN LINEAL PARA CÁLCULO DE RAZÓN MÁXIMA DE PRODUCCIÓN DE ETANOL (EJEMPLO DE COMPUTO UTILIZANDO PROGRAMA INFOSTAT®)

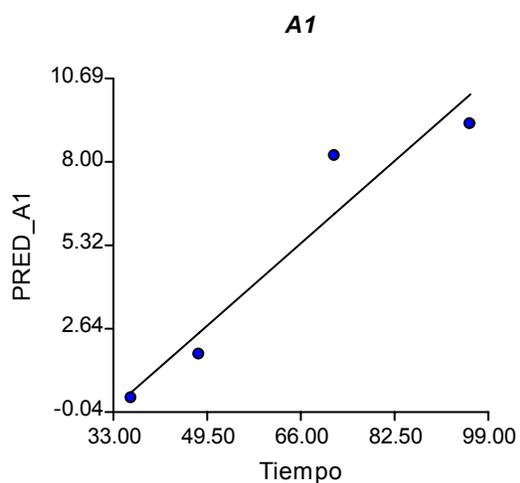
Variable	N	R ²	R ² Aj
A1	4	0.92	0.88

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef.	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	Valor p	CpMallows
const	-5.18	2.24	-14.83	4.47	-2.31	0.1471	
Tiempo	0.16	0.03	0.02	0.30	4.79	0.0409	16.65

Tabla de análisis de la varianza SC Tipo III

FV	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	54.58	1	54.58	22.98	0.0409
Tiempo	54.58	1	54.58	22.98	0.0409
Error	4.75	2	2.38		
Total	59.33	3			



APÉNDICE 5 REGRESIÓN LINEAL PARA CÁLCULO DE RAZÓN MÁXIMA DE CONSUMO DE SACAROSA (EJEMPLO DE COMPUTO UTILIZANDO PROGRAMA INFOSTAT®)

Análisis de regresión lineal

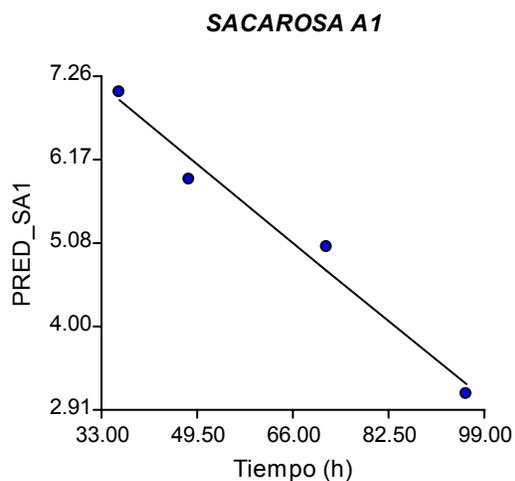
Variable	N	R ²	R ² Aj
SA1	4	0.97	0.96

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef.	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	Valor p	CpMallows
const	9.17	0.47	7.14	11.21	19.39	0.0027	
Tiempo (h)	-0.06	0.01	-0.09	-0.03	-8.77	0.0128	52.58

Tabla de análisis de la varianza SC Tipo III

FV	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	8.13	1	8.13	76.87	0.0128
Tiempo (h)	8.13	1	8.13	76.87	0.0128
Error	0.21	2	0.11		
Total	8.34	3			



APÉNDICE 6 REGRESIONES LINEALES PARA CÁLCULO DE RAZÓN MÁXIMA DE CONSUMO DE GLUCOSA (EJEMPLO DE COMPUTO UTILIZANDO PROGRAMA INFOSTAT®)

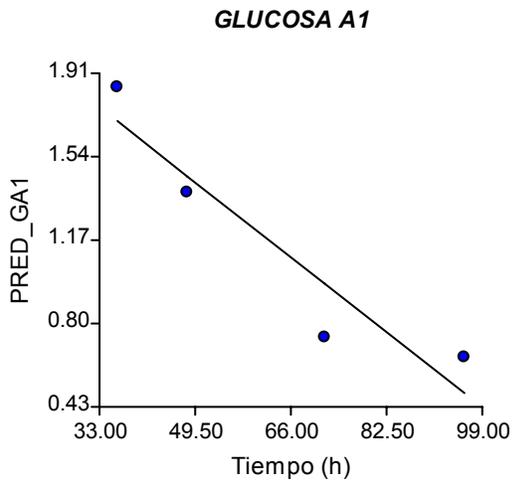
Variable	N	R ²	R ² Aj
GA1	4	0.89	0.83

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef.	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	Valor p	CpMallows
const	2.42	0.34	0.96	3.88	7.12	0.0192	
Tiempo (h)	-0.02	0.01	-0.04	0.00	-3.96	0.0584	11.77

Tabla de análisis de la varianza SC Tipo III

FV	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.85	1	0.85	15.65	0.0584
Tiempo (h)	0.85	1	0.85	15.65	0.0584
Error	0.11	2	0.05		
Total	0.96	3			



Apéndice 7 Regresiones lineales para cálculo de razón máxima de consumo de fructosa (ejemplo de computo utilizando programa infostat®)

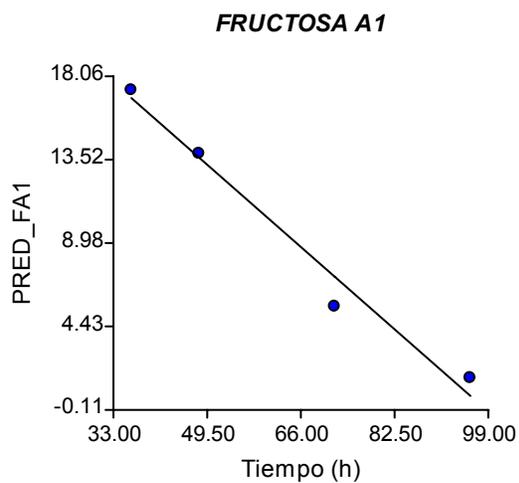
Variable	N	R ²	R ² Aj
FA1	4	0.98	0.97

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef.	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	Valor p	CpMallows
const	26.50	1.97	18.04	34.96	13.48	0.0055	
Tiempo (h)	-0.27	0.03	-0.39	-0.14	-9.17	0.0117	57.42

Tabla de análisis de la varianza SC Tipo III

FV	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	153.47	1	153.47	84.14	0.0117
Tiempo (h)	153.47	1	153.47	84.14	0.0117
Error	3.65	2	1.82		
Total	157.11	3			



APÉNDICE 8 REGRESIONES LINEALES PARA CÁLCULO DE RAZÓN MÁXIMA DE CONSUMO DE AZÚCARES TOTALES (EJEMPLO DE COMPUTO UTILIZANDO PROGRAMA INFOSTAT®)

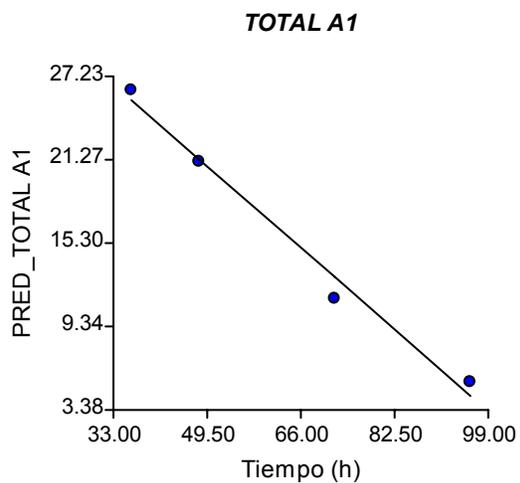
Variable	N	R ²	R ² Aj
TOTAL A1	4	0.99	0.98

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef.	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	Valor p
const	38.09	1.99	29.52	46.67	19.11	0.0027
Tiempo (h)	-0.35	0.03	-0.48	-0.22	-11.80	0.0071

Tabla de análisis de la varianza SC Tipo III

FV	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	261.20	1	261.20	139.28	0.0071
Tiempo (h)	261.20	1	261.20	139.28	0.0071
Error	3.75	2	1.88		
Total	264.95	3			



APÉNDICE 9 BALANCES DE MATERIA PARA AJUSTE DE BRIX

El cálculo de la cantidad de fructosa comercial necesaria para alcanzar 24° Brix se realizó de la siguiente manera:

Se realizó un balance global de materia así:

$$\{acumulación\} = \{entrada\} + \{salida\} + \{producción\} + \{consumo\} \quad (2.1)$$

Debido a que este es un proceso sin reacción química la producción y el consumo son cero y como es un proceso de lote la salida es cero también. La ecuación 2.1 se convierte entonces en la siguiente:

$$\{acumulación\} = \{entrada\} \quad (2.2)$$

Se utilizó la siguiente simbología J para la masa de jugo, F para la masa de fructosa, M para la masa de la mezcla final, Xj para la fracción másica de sólidos en el jugo, Xf para la fracción másica de sólidos en el azúcar y Xm para la fracción másica de sólidos en la mezcla final. Sustituyendo el término acumulación y entrada en la ecuación 2.2 se tiene:

$$\{M\} = \{J + F\} \quad (2.3)$$

Luego se planteó un balance de masa para los sólidos solubles así:

$$\{MX_m\} = \{JX_j + FX_f\} \quad (2.4)$$

Sabiendo que $X_f=1$, despejando para M en 2.4 y sustituyendo en 2.3 se tiene:

$$F = J \left(\frac{X_m - X_j}{1 - X_m} \right) \quad (2.5)$$

Así la ecuación 2.5 se utilizó para calcular la cantidad de fructosa necesaria para alcanzar 24° Brix. Se asume que la densidad del jugo es aproximadamente la del agua, es decir 1g/L para facilitar el cálculo de la masa de F.

APÉNDICE 10 RESULTADOS DE RAZÓN MÁXIMA DE CONSUMO DE SACAROSA, ANOVA Y PRUEBA FISHER

Razón máxima de consumo de sacarosa por condición experimental

VALORES DE (r_{ms}) EN CONDICIONES ESTUDIADAS (g/100mL-h)		
Condiciones Experimentales	Pasteurizado	No Pasteurizado
Con Sulfitos	-0.06	-0.06
	-0.06	-0.05
	-0.04	-0.08
Sin Sulfitos	-0.09	-0.09
	-0.07	-0.08
	-0.08	-0.08

ANOVA y Prueba Fisher en condiciones: adición de sulfitos y pasteurización

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
rmS	12	0.64	0.51	15.97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.00	3	0.00	4.80	0.0338
pasteurizado	0.00	1	0.00	1.07	0.3319
sulfito	0.00	1	0.00	13.07	0.0068
pasteurizado*sulfito	0.00	1	0.00	0.27	0.6195
Error	0.00	8	0.00		
Total	0.00	11			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.01489

Error: 0.0001 gl: 8

pasteurizado	Medias	n	
2.00	-0.07	6	A
1.00	-0.07	6	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.01489

Error: 0.0001 gl: 8

sulfito	Medias	n	
2.00	-0.08	6	A
1.00	-0.06	6	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.02105

Error: 0.0001 gl: 8

pasteurizado	sulfito	Medias	n		
2.00	2.00	-0.08	3	A	
1.00	2.00	-0.08	3	A	
2.00	1.00	-0.06	3	A	B
1.00	1.00	-0.05	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

APÉNDICE 11 RESULTADOS DE RAZÓN MÁXIMA DE CONSUMO DE GLUCOSA, ANOVA Y PRUEBA FISHER

Razón máxima de consumo de glucosa por condición experimental

VALORES DE (r_{mg}) EN CONDICIONES ESTUDIADAS (g/100mL-h)		
Condiciones Experimentales	Pasteurizado	No Pasteurizado
Con Sulfitos	-0.02	-0.04
	-0.01	-0.02
	-0.02	-0.02
Sin Sulfitos	-0.01	-0.01
	0.00	-0.01
	-0.06	-0.01

ANOVA y Prueba Fisher en condiciones: adición de sulfitos y pasteurización

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
rmG	12	0.17	0.00	90.37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.00	3	0.00	0.55	0.6644
pasteurizado	0.00	1	0.00	0.03	0.8718
sulfito	0.00	1	0.00	0.25	0.6305
pasteurizado*sulfito	0.00	1	0.00	1.36	0.2769
Error	0.00	8	0.00		
Total	0.00	11			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.02306

Error: 0.0003 gl: 8

pasteurizado	Medias	n	
1.00	-0.02	6	A
2.00	-0.02	6	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.02306

Error: 0.0003 gl: 8

sulfito	Medias	n	
1.00	-0.02	6	A
2.00	-0.02	6	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.03261

Error: 0.0003 gl: 8

pasteurizado	sulfito	Medias	n	
2.00	1.00	-0.03	3	A
1.00	2.00	-0.02	3	A
1.00	1.00	-0.02	3	A
2.00	2.00	-0.01	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

APÉNDICE 12 RESULTADOS DE RAZÓN MÁXIMA DE CONSUMO DE FRUCTOSA, ANOVA Y PRUEBA FISHER

Razón máxima de consumo de fructosa por condición experimental

VALORES DE (r_{mf}) EN CONDICIONES ESTUDIADAS (g/100mL-h)		
Condiciones Experimentales	Pasteurizado	No Pasteurizado
Con Sulfitos	-0.27	-0.30
	-0.23	-0.25
	-0.30	-0.35
Sin Sulfitos	-0.18	-0.14
	0.14	-0.23
	-0.20	-0.29

ANOVA y Prueba Fisher en condiciones: adición de sulfitos y pasteurización

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
rmF	12	0.57	0.41	21.21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.03	3	0.01	3.53	0.0681
pasteurizado	0.00	1	0.00	1.85	0.2106
sulfito	0.02	1	0.02	8.69	0.0185
pasteurizado*sulfito	0.00	1	0.00	0.05	0.8263
Error	0.02	8	0.00		
Total	0.05	11			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.06778

Error: 0.0026 gl: 8

pasteurizado	Medias	n	
2.00	-0.26	6	A
1.00	-0.22	6	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.06778

Error: 0.0026 gl: 8

sulfito	Medias	n	
1.00	-0.28	6	A
2.00	-0.20	6	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.09585

Error: 0.0026 gl: 8

pasteurizado	sulfito	Medias	n		
2.00	1.00	-0.30	3	A	
1.00	1.00	-0.27	3	A	B
2.00	2.00	-0.22	3	A	B
1.00	2.00	-0.17	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

APÉNDICE 13 RESULTADOS DE RAZÓN MÁXIMA DE CONSUMO DE AZÚCARES TOTALES, ANOVA Y PRUEBA FISHER

Razón máxima de consumo de azúcares por condición experimental

VALORES DE (r_{mt}) EN CONDICIONES ESTUDIADAS (g/100mL-h)		
Condiciones Experimentales	Pasteurizado	No Pasteurizado
Con Sulfitos	-0.35	-0.40
	-0.29	-0.32
	-0.36	-0.45
Sin Sulfitos	-0.27	-0.24
	0.21	-0.32
	-0.34	-0.31

ANOVA y Prueba Fisher en condiciones: adición de sulfitos y pasteurización

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
rmTOTAL	12	0.51	0.32	16.93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.02	3	0.01	2.75	0.1127
pasteurizado	0.00	1	0.00	1.36	0.2772
sulfito	0.02	1	0.02	6.47	0.0345
pasteurizado*sulfito	0.00	1	0.00	0.40	0.5425
Error	0.02	8	0.00		
Total	0.05	11			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.07252

Error: 0.0030 gl: 8

pasteurizado	Medias	n	
2.00	-0.34	6	A
1.00	-0.30	6	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.07252

Error: 0.0030 gl: 8

sulfito	Medias	n	
1.00	-0.36	6	A
2.00	-0.28	6	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.10255

Error: 0.0030 gl: 8

pasteurizado	sulfito	Medias	n		
2.00	1.00	-0.39	3	A	
1.00	1.00	-0.33	3	A	B
2.00	2.00	-0.29	3	A	B
1.00	2.00	-0.27	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

APÉNDICE 14 RESULTADOS DE PRODUCTIVIDAD GLOBAL DE ETANOL, ANOVA Y PRUEBA FISHER

Productividad global de etanol

VALORES DE (Q_p) EN CONDICIONES ESTUDIADAS (g/100mL-h)		
Condiciones Experimentales	Pasteurizado	No Pasteurizado
Con Sulfitos	0.09	0.12
	0.12	0.12
	0.14	0.16
Sin Sulfitos	0.16	0.17
	0.17	0.18
	0.22	0.18

ANOVA y Prueba Fisher en condiciones: adición de sulfitos y pasteurización

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Q_p	12	0.63	0.49	16.75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.01	3	0.00	4.50	0.0395
pasteurizado	0.00	1	0.00	0.08	0.7810
sulfito	0.01	1	0.01	13.02	0.0069
pasteurizado*sulfito	0.00	1	0.00	0.40	0.5472
Error	0.01	8	0.00		
Total	0.01	11			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.03439

Error: 0.0007 gl: 8

pasteurizado	Medias	n	
1.00	0.15	6	A
2.00	0.16	6	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.03439

Error: 0.0007 gl: 8

sulfito	Medias	n	
1.00	0.13	6	A
2.00	0.18	6	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.04863

Error: 0.0007 gl: 8

pasteurizado	sulfito	Medias	n			
1.00	1.00	0.12	3	A		
2.00	1.00	0.13	3	A	B	
2.00	2.00	0.18	3		B	C
1.00	2.00	0.18	3			C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

**APÉNDICE 15 RESULTADOS DE RAZÓN MÁXIMA DE PRODUCCIÓN DE ETANOL,
ANOVA Y PRUEBA FISHER**

Razón máxima de producción de etanol

VALORES DE (r_{mp}) EN CONDICIONES ESTUDIADAS (g/100mL-h)		
Condiciones Experimentales	Pasteurizado	No Pasteurizado
Con Sulfitos	0.16	0.14
	0.17	0.17
	0.22	0.19
Sin Sulfitos	0.14	0.20
	0.17	0.20
	0.25	0.20

ANOVA y Prueba Fisher en condiciones: adición de sulfitos y pasteurización

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
r_{pm}	12	0.15	0.00	19.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.00	3	0.00	0.46	0.7176
pasteurizado	0.00	1	0.00	0.01	0.9363
sulfito	0.00	1	0.00	0.82	0.3908
pasteurizado*sulfito	0.00	1	0.00	0.55	0.4791
Error	0.01	8	0.00		
Total	0.01	11			

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.04660

Error: 0.0012 gl: 8

pasteurizado	Medias	n	
2.00	0.18	6	A
1.00	0.19	6	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.04660

Error: 0.0012 gl: 8

sulfito	Medias	n	
1.00	0.18	6	A
2.00	0.19	6	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

Test : LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.06590

Error: 0.0012 gl: 8

pasteurizado	sulfito	Medias	n	
2.00	1.00	0.17	3	A
1.00	1.00	0.18	3	A
1.00	2.00	0.19	3	A
2.00	2.00	0.20	3	A

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)

APÉNDICE 16 RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS EXPERIMENTOS POR HPLC Y VARIABLES RESPUESTA UTILIZADAS EN ANOVA

VARIABLES RESPUESTA

	Qp' (g/100mL-h)	rp	S rs	G rs	F rs	total rs
Pasteurizado Con Sulfitos	0.09	0.16	-0.06	-0.02	-0.27	-0.35
	0.12	0.17	-0.06	-0.01	-0.23	-0.29
	0.15	0.22	-0.04	-0.02	-0.3	-0.36
No Pasteurizado Con Sulfitos	0.12	0.14	-0.06	-0.04	-0.3	-0.4
	0.12	0.17	-0.05	-0.02	-0.25	-0.32
	0.17	0.19	-0.08	-0.02	-0.35	-0.45
Pasteurizado Sin Sulfitos	0.16	0.14	-0.09	-0.01	-0.18	-0.27
	0.17	0.17	-0.07	0	-0.14	-0.21
	0.22	0.25	-0.08	-0.06	-0.2	-0.34
No Pasteurizado Sin Sulfitos	0.17	0.2	-0.09	-0.01	-0.14	-0.24
	0.18	0.2	-0.08	-0.01	-0.23	-0.32
	0.18	0.2	-0.08	-0.01	-0.29	-0.31

RESULTADOS HPLC

tiempo (h)	A					B					C					D				
	S	G	F	Total	Etanol	S	G	F	Total	Etanol	S	G	F	Total	Etanol	S	G	F	Total	Etanol
0	7.38	1.55	17.8	26.73	0.354	7.94	1.55	17.8	27.29	0.08	6.22	1.45	15.97	23.64	0.339	6.65	1.31	14.42	22.38	0.128
0	8.09	1.76	16.32	26.17	0.73	8.07	1.74	16.07	25.88	0.74	7.4	1.62	14.52	23.54	0.376	7.92	1.71	15.97	25.6	0.85
0	7.99	0.95	18.24	27.18	0	8.06	0.69	17.91	26.66	0	8.89	1.1	20.5	30.49	1.693	7.94	0.86	18.59	27.39	1.016
12	7.94	1.77	18.61	28.32	0.399	6.01	2	17.9	25.91	0.23	6.81	1.63	17.41	25.85	0.557	7.07	1.92	18.5	27.59	0.617
12	7.12	1.69	14.46	23.27	0.549	7.33	1.81	15.17	24.31	0.86	7.74	1.79	15.81	25.34	1.256	7.93	1.88	16.3	26.11	1.324
12	7.71	1.18	18.9	27.79	0.218	7.92	1.11	19.39	28.42	0.54	7.66	1.1	19.02	27.78	1.693	7.8	1.1	19.29	28.19	1.745
24	7.53	1.75	18.03	27.31	0.399	5.46	2.43	16.95	24.84	3.57	7.24	1.22	14.2	22.66	4.333	5.56	1.23	11.84	18.63	4.115
24	8.01	1.93	16.55	26.49	0.91	7.57	1.96	16.37	25.9	0.74	7.7	1.43	12.31	21.44	4.183	6.59	1.35	9.55	17.49	6.771
24	7.72	1.34	19.79	28.85	0.429	7.79	1.28	20.19	29.26	0.1	7.65	6.9	15.96	30.51	5.025	7.47	0.43	13.61	21.51	5.695
36	7.06	1.85	17.28	26.19	0.399	5.17	2.65	17.86	25.68	0.32	6.2	0.98	8.44	15.62	8.983	3.83	1.1	6.72	11.65	9.118
36	7.47	1.73	14.95	24.15	1.587	7.37	2.16	16.85	26.38	0.61	6.91	1.28	7.18	15.37	8.629	5.47	1.35	5.13	11.95	9.404
36	7.18	1.31	18.77	27.26	0.805	7.44	1.41	20.05	28.9	0.96	7.52	0.24	9.71	17.47	9.479	6.66	0.28	6.9	13.84	10.49
48	5.91	1.38	13.83	21.12	1.836	4.46	2.45	17.16	24.07	1.69	4.41	0.85	4.56	9.82	11.17	2.45	0.91	4.18	7.54	11.04
48	7.39	1.22	9.96	18.57	6.011	6.19	1.86	13.76	21.81	1.38	5.62	1.34	4	10.96	10.86	4.22	1.35	3.05	8.62	11.68
48	7.23	0.61	13.85	21.69	6.064	7.58	1.13	18.04	26.75	2	6.01	0.29	4.79	11.09	11.36	4.53	0.35	2.89	7.77	12.37
72	5.03	0.74	5.55	11.32	8.185	2.38	0.81	5.66	8.85	8.79	2.11	0.74	1.74	4.59	11.54	1.07	0.58	0.79	2.44	12.52
72	5.83	1.1	3.02	9.95	10.18	6.14	1.2	5.88	13.22	9.93	4.14	1.28	1.92	7.34	12.94	2.72	1.27	1.56	5.55	14.08
72	6.62	0.2	4.98	11.8	12.13	5.25	0.32	4.53	10.1	12.5	3.91	0.51	1.32	5.74	17.6	2.28	0.2	1.19	3.67	13.98
96	3.11	0.65	1.61	5.37	9.246	1.58	0.52	1.69	3.79	11.8	1.21	0.46	0.48	2.15	13.16	0.7	0	0.58	1.28	13.26
96	4.29	1.1	1.17	6.56	12.32	3.79	1.21	2.41	7.41	11.8	2.74	1.16	1.31	5.21	13.22	1.51	0.94	0.91	3.36	13.82
96	4.58	0.18	0.78	5.54	14.22	2.72	0.2	0.87	3.79	15.9	2.61	0.16	0.46	3.23	15.57	1.26	0.01	0	1.27	14.07
120	2.48	0.56	0.87	3.91	10.61	1.08	0.58	0	1.66	12	0.77	0.53	0	1.3	13.59	0	0	0	0	13.28
120	3.58	1.06	0.91	5.55	13.6	2.3	1.1	1.58	4.98	14	1.85	0.96	1	3.81	13.33	1.14	0.95	0.98	3.07	12.43
120	2.93	0.11	0	3.04	15.43	1.63	0.15	0.73	2.51	16.1	1.32	0.02	0	1.34	14.41	0.54	0	0	0.54	14.91
144	2.1	0.52	0.63	3.25	12.9	0.66	0	0	0.66	11.1	0.73	0.52	0	1.25	13.09	0	0	0	0	13.11
144	2.77	0.98	1	4.75	13.64	1.61	1.01	1.06	3.68	12.4	1.5	0.92	1	3.42	12.39	0.9	0.92	0.92	2.74	14.92
144	2.02	0.07	0	2.09	14.08	0.76	0	0	0.76	23.7	0.91	0	0	0.91	14.48	0.37	0	0	0.37	13.93
168	1.29	0.61	0	1.9	13.46	0.67	0.47	0	1.14	12.6	0.65	0	0	0.65	12.88	0	0	0	0	9.682
168	2.6	0.98	1	4.58	12.94	1.45	1	1.01	3.46	14	1.2	0.91	0.92	3.03	12.62	0.86	0	0	0.86	13.56
168	1.79	0.07	0	1.86	14.69	0.31	0	0	0.31	14.5	0.75	0	0	0.75	13.62	0.19	0	0	0.19	14.75
192	0.67	0.49	0	1.16	13.41	0	0	0	0	12	0.68	0	0	0.68	10.06	0	0	0	0	11.72
192	1.95	0.9	0.91	3.76	12.7	1.1	0.94	0.92	2.96	14.9	1.1	1	0	2.1	12.22	0	0	0	0	12.5
192	1.34	0	0	1.34	12.83	0.33	0	0	0.33	13.6	0.46	0	0	0.46	14.67	0.05	0	0	0.05	12.35