

**CARACTERIZACIÓN DE VINOS DE PIÑA (VARIEDADA ESPAÑOLA ROJA)
PASTEURIZADOS Y SIN PASTEURIZAR ELABORADOS CON DIFERENTES CEPAS
DE *Saccharomyces cerevisiae*.**

Por

Miguel Ángel Ramírez Niño

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:

Edna Negrón, Ph.D.
Presidenta, Comité Graduado

Fecha

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

Fecha

Lynette E. Orellana, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Luis Rivera, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón Ph.D.
Coordinadora del Programa Ciencia
y Tecnología de Alimentos

Fecha

ABSTRACT

An important characteristic of wines is their acidity, as it could influence the final properties of the product. Some of these characteristics are: conservation, stability, influence on organoleptic properties and foam production. The objective of this study was to accomplish a chemical characterization on pasteurized and non pasteurized pineapple wines made with different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. The evaluated parameters were: pH, titratable acidity and the composition of organic acids. The organic acids were evaluated by high performance liquid chromatography using a Supelcogel C-610H ionic exchange column. The pH of the wines varied between 3.99 and 4.50 and the titratable acidity between 0.336 and 0.491 g citric acid / 100 mL. The main acids identified were: citric, malic, succinic, acetic, formic and butyric acids. It could be concluded that these wine samples are stable. The wine samples did present high concentrations of volatile acids, which influence the organoleptic of the final product and its chemical stability.

RESUMEN

Una característica importante en los vinos es la acidez, ya que ésta puede influenciar en las propiedades finales del producto. Algunas de estas características son conservación, estabilidad, influencia en las propiedades organolépticas y formación de espuma. El objetivo de este estudio fue realizar una caracterización química en vinos de piña sin pasteurizar y pasteurizados elaborados con diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Los parámetros evaluados en este estudio fueron el pH, la acidez titulable y la composición de ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos se evaluaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución utilizando la columna de intercambio iónico supelcogel C-610H. El pH de los vinos y la acidez titulable variaron entre 3.99 y 4.50 y 0.336 y 0.491 (g ácido cítrico/100 mL) respectivamente. Los principales ácidos identificados fueron cítrico, málico, succínico, acético, fórmico y butírico. Se puede concluir que estas muestras de vinos son estables. Estas muestras de vinos presentaron altas concentraciones de ácidos volátiles lo cual influye en las propiedades organolépticas del producto final y su estabilidad química.

Derechos de Autor Reservados ©

Miguel Ángel Ramírez Niño

2006

DEDICATORIA

A Dios por su amor y compañía, a mi familia, mi esposa Liliana por su espera, a mis dos hermosos angelitos Angie y Nicole, a mi madre, mis hermanos y por último a mi padre Ángel Miguel que descansa en el cielo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Edna Negrón de Bravo coordinadora del Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos por permitir desarrollar mis estudios de maestría en su programa.

Al profesor Javier Huertas por permitir trabajar en un área de su proyecto de vinos y por la colaboración con parte de los materiales para el desarrollo de éste.

A la Dra. Lynette E. Orellana miembro del comité por sus sugerencias en la escritura del documento final.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
AGRADECIMIENTO	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Obtención de las muestras de vinos de piña (<i>Ananas sativus</i>)	18
3.2 Determinación del pH	18
3.3 Determinación del contenido total de acidez	19
3.4 Determinación de grados Brix	19
3.5 Determinación de ácidos orgánicos en los vinos por HPLC	20
3.5.1 Extracción de los ácidos orgánicos	20
3.5.2 Análisis cromatografico de las muestras de vino	20
3.5.3 Identificación de los ácidos orgánicos por medio de soluciones estándar	21
3.5.4 Cuantificación de los ácidos orgánicos por medio de soluciones estándar	22
3.5.5 Determinación del límite de cuantificación	23
3.5.6 Determinación del porcentaje de recuperación	23
3.6 Pasteurización de los vinos	24
3.7 Análisis estadístico	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1 Resultados de pH en las muestras de vinos de piña	25
4.2 Resultados de acidez titulable en las muestras de vinos de piña	27
4.3 Resultados de grados Brix en las muestras de vinos de piña	29
4.4 Resultados de los ácidos orgánicos por HPLC para las muestras de vinos de piña	30
4.5 Análisis estadístico de los ácidos orgánicos	38
4.6 Resultados del límite de cuantificación	39
4.7 Resultados del porcentaje de recuperación	40

5. CONCLUSIONES	42
6. RECOMENDACIONES	44
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8. APÉNDICE	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores de pH en las muestras de vinos de piña	25
Tabla 2. Valores de acidez titulable de las muestras de vino de piña	28
Tabla 3. Valores de grados Brix de las muestras de vino de piña	29
Tabla 4. Composición de ácidos orgánicos en las muestras de vinos de piña sin pasteurizar	31
Tabla 5. Composición de ácidos orgánicos en las muestras de vinos de piña pasteurizados	34
Tabla 6. Resultados del ANOVA para las muestras de vinos de piña sin pasteurizar y pasteurizados	38
Tabla 7. Resultados del límite de cuantificación de los ácidos orgánicos identificados en las muestras de vinos de piña	40
Tabla 8. Resultados del porcentaje de recuperación de los ácidos orgánicos identificados en las muestras de vinos de piña	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma de HPLC de la muestra de vino de pina sin pasteurizar elaborado con la levadura EC-1118	36
Figura 2. Cromatograma de HPLC de la muestra de vino de pina pasteurizado elaborado con la levadura EC-1118	37

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: grados centígrados

% vol: porcentaje en volumen

g/L: gramos/litro

N: normalidad

mL: mililitro

rpm: revoluciones por minuto

μm: micrómetros

μL: microlitos

ppm: partes por millón

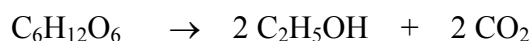
°F: grados Fahrenheit

s: segundos

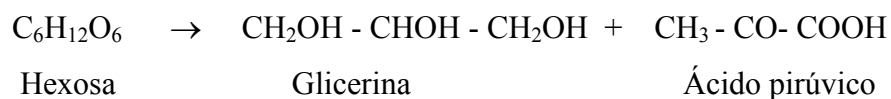
min: minutos

1. INTRODUCCIÓN

El vino es una bebida que se produce a partir de la fermentación alcohólica del mosto de la uva, en donde los azúcares reductores como glucosa y fructosa son convertidos a etanol y CO₂, debido a la acción de las enzimas presentes en las levaduras (1). En el caso de la molécula de la glucosa, se producen dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono, tal como se ilustra en la ecuación de Gay –Lusac y que se expresa de la siguiente manera:



Además durante la fermentación alcohólica de vinos se producen otros compuestos asociados a una fermentación gliceropirúvica, la cual se conoce como la ecuación de Neuberg (2):



Uno de los mecanismos por el cual se lleva a cabo la fermentación alcohólica se conoce como glicólisis, el cual se realiza en el citoplasma de las levaduras, generando energía para mantener el crecimiento y el metabolismo de éstas (3). La glicólisis se lleva a cabo por medio de 10 reacciones intermedias en las que el producto final es el ácido pirúvico, posteriormente este es descarboxilado a acetaldehído y finalmente es reducido a etanol. Durante el inicio de fermentación las levaduras mantienen un crecimiento exponencial logarítmico. La presencia del alcohol inhibe el crecimiento de otros microorganismos en el mosto (mohos, bacterias y levaduras silvestres). Esto también influye en el crecimiento de las levaduras genuinas cuando la cantidad de alcohol presente en el medio es de 15 -17.5 % vol.

Existen otras frutas que pueden ser usadas para producir este tipo de bebidas alcohólicas. Según la ley de bebidas de Puerto Rico define como vino de frutas tropicales, el producto de la fermentación alcohólica normal del jugo de las frutas como: piña, acerola, tomate, parcha y de la maceración de guayaba, mango, guineo, papaya, guanábana y de otras frutas de las que comúnmente se producen en la zona tropical y cuyo contenido alcohólico no exceda de veinticuatro por ciento (24%) de alcohol por volumen (4). En el presente trabajo se analizarán vinos que fueron elaborados de piña de la variedad *Española Roja*. Este tipo de vino de frutas se encuentra dentro de la clasificación de los vinos blancos debido al color del producto final.

La piña es una fruta que posee un contenido de sólidos solubles de 10.33°Brix a 20°C, un pH de 3.49 y una acidez titulable (g ácido cítrico/100 g) de 1.17 (5). Estas características junto al aroma que es bien definido, son muy importantes para la producción de un buen vino. Puerto Rico es un lugar ideal para la producción de vinos de excelente calidad de piña. Esto debido a que posee las condiciones en cuanto al suelo y al clima, lo cual es indispensable para la producción a gran escala de este fruto. Además, la elaboración de estas bebidas alcohólicas tendría un impacto muy positivo en la demanda de este cultivo. Según el censo de agricultura del 2002, la producción de piña en Puerto Rico fue de 18,908 toneladas, lo que representa un aumento con respecto a las 15,644 toneladas que se cultivaron en el 1998. El número de fincas dedicadas a la producción pasó de 57 a 59 (6). La producción de piña es prácticamente para satisfacer el consumo local. No obstante esta actividad se puede convertir en una más atractiva, debido al potencial del mercado de las frutas tropicales a nivel mundial y en particular en los países desarrollados que cobijan ampliamente a la piña. El cultivo de piña se convierte en una actividad promisorio para los países con condiciones agroecológicas óptimas y de visión de

desarrollo agroindustrial con orientación exportadora, tanto para la producción fresca como para los productos procesados. La isla de Puerto Rico posee las condiciones para el cultivo, en especial para la variedad *Española roja*. La elaboración de bebidas alcohólicas son productos que ayudan a incrementar el valor de algunos cultivos, ejemplo de esto son los vinos con las uvas, la cerveza y el vodka con la cebada, el whiskey con el maíz y el ron que se produce con las mieles de la caña.

La calidad de un vino está altamente relacionada con el sabor y aroma. Existen algunos factores que influyen marcadamente en las características sensoriales de un vino como lo son: la variedad de la fruta, los microorganismos usados para la fermentación, y el tiempo de añejamiento. También la pasteurización del producto final puede tener un impacto en las características sensoriales, pues a diferencia de las uvas, la piña tiene aromas bien definidos que podrían conservarse después de la fermentación. Una característica muy importante en los vinos es la acidez, la cual influye en las propiedades finales del producto. Algunas de estas características son conservación, estabilidad y propiedades organolépticas. La acidez de los vinos está determinada por la composición de los ácidos presentes en el vino. Dentro de los ácidos encontrados en los vinos se encuentran: los originarios de la fruta, los procedentes de la fermentación y los ácidos inorgánicos.

Este trabajo es parte del proyecto TSTAR 101 “Elaboración de vinos de frutas y brandys de alta calidad” y tiene como propósito evaluar el efecto de diferentes cepas de levaduras y la pasteurización en el producto final en cuanto al contenido de ácidos orgánicos, pH y acidez titulable, con el fin de determinar si existen diferencias significativas y además, realizar una

correlación con los resultados obtenidos por medio del análisis sensorial al que fueron sometidos estos vinos.

OBJETIVO

Realizar una caracterización química en vinos de piña sin pasteurizar y pasteurizados elaborados con diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta caracterización estará basada en parámetros tales como pH, acidez titulable y composición de ácidos orgánicos y además, determinar si existen diferencias significativas entre cada una de las muestras de los vinos de piña en cuanto a los parámetros antes mencionados.

2. REVISION DE LITERATURA

Durante la fermentación alcohólica en vinos, en adición al etanol y CO₂ se genera una serie de compuestos como son: alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, cetonas, compuestos azufrados y ácidos orgánicos. Estos compuestos son conocidos como metabolitos secundarios en el vino, su presencia influye en las propiedades organolépticas del producto final. Cada uno de estos compuestos tienen umbrales de percepción diferentes y por lo tanto su concentración influye en la percepción. Un compuesto con un umbral de percepción bajo puede desempeñar un papel importante en el aroma, incluso en concentraciones pequeñas. Los alcoholes superiores representan los componentes de influencia más abundantes en las características organolépticas, pero sus umbrales de percepción son 10 veces más altos que los de los ésteres y mil veces mayores que la de los diacetilos (2).

La mayoría de los alcoholes superiores provienen del metabolismo de los aminoácidos, entre los encontrados en los vinos se encuentran el 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, isobutanol, feniletanol y n-propanol. Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la fermentación, el aumento de la temperatura de la fermentación y la oxigenación del mosto aumentan la síntesis de estos compuestos. Las cepas de levaduras utilizadas en la fermentación también influyen en la producción de estos compuestos. Es por eso que en la industria vinícola es muy importante la selección de las cepas de levaduras a utilizar para evitar la formación de compuestos que sean desfavorables sobre la calidad del producto final. Se tiene conocimiento que muchos de los compuestos aromáticos presentes en el vino son procedentes del mosto pero otros se forman por diversas rutas metabólicas durante la fermentación (7 y 8). Algunos estudios

demuestran cómo las levaduras influyen en la formación de ciertos compuestos volátiles en el vino. Mateo y colaboradores (1991) realizaron estudios para determinar la variación en los compuestos volátiles producidos en el mosto de la uva fermentada, utilizando levaduras tales como *Hansenula*, *Kloeckera* y *Saccharomyces cerevisiae*. En estos estudios se encontraron que la producción de estos compuestos depende de la cepa de levadura utilizada. Algunos de estos compuestos son: 1-propanol, alcohol isobutírico, 1-butanol, ácido isobutírico, ácido isovalérico, isobutirato de etilo, butirato de etilo entre otros (9). Además, en otros estudios realizados por Gil y colaboradores (1996) se encontraron diferencias en las cantidades de los volátiles producidos por diferentes especies de *Kloeckera apiculata* y *Saccharomyces cerevisiae*. *Kloeckera apiculata* produce grandes cantidades de 1-propanol e isobutanol y pequeñas cantidades de ácido acético al ser comparada con *Saccharomyces cerevisiae* (10). Estas diferencias se reflejan en las características del vino.

Pérez y colaboradores (1999) realizaron un estudio en donde prepararon 15 vinos con levaduras comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un mismo mosto de la región de la Mancha (Airen) y elaborado bajo condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos fue la diferencia en la composición química de los compuestos volátiles, dentro de los que se encuentran acetaldehído, metanol, 1-propanol, acetato de etilo, isobutanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol entre otros (11). El aroma de un vino está influenciado por la presencia de una mezcla compleja de cientos de compuestos que pueden ser evaluados por métodos químicos (12) o por medio del análisis sensorial (13 y 14).

El pH, la acidez total y la composición de los ácidos orgánicos son los parámetros que conforman la acidez global de un vino. El pH puede influenciar de cierta manera en aspectos como: crecimiento de levaduras, solubilidad de las sales de tartrato, efectividad del dióxido de sulfuro, solubilidad de proteínas, efectividad de la bentonita, polimerización de los pigmentos del color, reacciones de oxidación y pardeamiento (15). En el vino la mayoría de los ácidos presentes son ácidos orgánicos débiles, los cuales se disocian parcialmente. Debido a esto la acidez se encuentra en dos formas una no disociada, y la otra la disociada cuando el ión hidrógeno se separa del ácido y puede ser medido por separado. Por lo tanto, la medición del pH es un indicador de la presencia de los iones de hidrógeno en la solución, es por esto que la acidez total no está relacionada directamente con el valor del pH. Lo que si se puede relacionar es que entre mayor valor de acidez total, el valor del pH será más bajo y por lo tanto el vino tendrá una mayor acidez. Generalmente el pH de los vinos ya sea blanco o tinto se encuentra en un rango de 3.5 – 4.0 (15).

La acidez total o acidez titulable se define como la suma de todos los ácidos encontrados en el vino que pueden ser valorados mediante una titulación con una base fuerte, generalmente con hidróxido de sodio. El resultado se expresa en el ácido que se encuentre en mayor proporción, para el caso de los vinos de uva se expresa en términos del ácido tartárico. Los valores de acidez total varían dependiendo del tipo de la uva, pero según la literatura existe un rango entre 6 – 12 g/L (15). Dentro de la acidez total se encuentra la acidez fija que es la que se debe a la presencia de los ácidos orgánicos no volátiles y la acidez volátil también conocida como acidez negativa que se debe a la presencia del ácido acético (volátil), por lo tanto se espera que su presencia sea mínima en el vino. Por general la acidez volátil en un vino de buena calidad

varía de 0.2 – 1 g/L. Para determinar la acidez total se puede realizar una titulación por medio de un potenciómetro y llevando el pH hasta 8.1-8.2 y otra titulando en presencia de fenolftaleína hasta cambio de color.

Los ácidos orgánicos son compuestos de interés en el vino (16). Algunos de ellos son originarios de la uva o del fruto utilizado y otros se producen durante la fermentación alcohólica o cualquier otro tipo de fermentación que se lleve a cabo durante el procesamiento como pueden ser la acética, propiónica, maloláctica o butírica entre otras. Los ácidos son importantes ya que imparten estabilidad, además actúan como preservantes, influyen en el color, las propiedades organolépticas (17) y en el sabor del producto final. El sabor ácido que se percibe en el vino proviene directamente de la abundancia de los protones, es decir por la acidez real o pH. Los ácidos que se encuentran en estado libre son los que generan el sabor ácido, el cual es uno de los cuatro sabores que se pueden percibir en un vino. Cuando el vino presenta excesiva acidez, tiene una agresividad molesta, por el contrario, si el vino es insuficientemente ácido, el vino se presenta frágil y con sabor pastoso. Para que el vino tenga buen sabor, debe presentar una acidez adecuada, con una gama muy amplia que permita graduar y matizar su percepción (18). A continuación se presentan algunas de las características de los ácidos más importantes encontrados en el vino.

Ácido Tartárico: Es un compuesto muy extendido en el reino vegetal, ya sea libre o en forma de sales. Se encuentra en numerosas frutas, principalmente en la uva. Existen cuatro estereoisómeros de la cual el ácido tartárico L (+) es la única forma natural. Es el ácido más abundante en el vino de uva. Una de sus características más importantes es la de añadir sabores

de fruta madura, sabores frescos y agradables. El ácido tartárico precipita de manera natural en forma de sales (tartrato cálcico o bitartrato potásico) formando cristales, debido a la presencia del alcohol y a las bajas temperaturas. Su presencia en el vino se encuentra en rango entre 5 – 10 g/L. Con el tiempo el ácido tartárico disminuye en el vino debido a que sufre un proceso de esterificación por la presencia del etanol formando bitartrato de etilo (15).

Ácido Málico: El ácido málico es un ácido de origen natural presente en la mayoría de frutas y muchos vegetales, siendo el ácido predominante de la manzana. El isómero del ácido málico encontrado en las uvas es el L(+) ácido málico el cual es sintetizado de la glucosa por la vía del ácido pirúvico (15). En los vinos la presencia del ácido málico se identifica por un peculiar olor característico de las manzanas verdes. La presencia de este ácido en los vinos provoca una tonalidad verdosa que es indeseable en los vinos tintos pero que en los blancos es aceptable. Se encuentra en las uvas verdes y en vinos que no han realizado totalmente la fermentación maloláctica. El ácido málico juega un papel importante en la tecnología de vinos debido, a que por su presencia se lleva a cabo una segunda fermentación llamada maloláctica. Ésta se lleva a cabo gracias a la presencia de las bacterias ácido lácticas presentes en el vino tales como, *Oenococcus oeni spp*, *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp* (19).

La fermentación maloláctica es conocida como un proceso de desacidificación en la que el ácido L- málico es convertido a ácido L- láctico y dióxido de carbono. El resultado de esta fermentación es una disminución en la acidez titulable, un pequeño aumento en el pH, además influye en la estabilidad microbiológica y en la calidad organoléptica del vino (20), ya que aumenta la complejidad aromática. Además aparecen algunos compuestos nuevos, mientras que

otros se atenúan o incluso desaparecen, como los procedentes de la variedad de uva o de la fermentación alcohólica. La fermentación maloláctica ha sido objeto de estudios debido a la complejidad metabólica y diversidad de las bacterias ácido lácticas, lo cual sugiere que este tipo de fermentación pueda afectar la calidad de los vinos ya sea en una forma positiva o negativa (19). Se ha encontrado que la especie *Oenococcus oeni* es una de las mejores bacterias para llevar a cabo la fermentación maloláctica, debido a su resistencia a concentraciones altas de alcohol y a pH bajo.

En la industria del vino se utilizan formas para poder llevar a cabo un procedimiento que se conoce como corrección de la acidez los cuales pueden ser por medios químicos o biológicos. La utilización de bacterias como *Oenococcus oeni* es una de las alternativas para poder llevar a cabo este procedimiento en la industria vinícola.

Ácido Cítrico: Es un ácido tricarboxílico que se encuentran en la mayoría de las frutas y vegetales, especialmente en el genero *Citrus*. Este ácido presenta una marcada acidez debido a la presencia de los tres grupos ácidos en su estructura. Se encuentra en las uvas en concentraciones bajas. En el vino se encuentra en concentraciones de 100-300 mg/L y le imparte al vino sensaciones frutales y aromáticas. Al igual que el ácido málico, el ácido cítrico es fácilmente metabolizable por las bacterias, por lo que en vinos en donde se lleva a cabo la fermentación maloláctica este tiende a desaparecer. El metabolismo de este ácido durante esta fermentación tiene como consecuencias la producción de nuevos aromas. Los productos que se obtienen son ácido acético, diacetilacetona y 2,3-butanodiol (18).

Ácido Succínico: Es un ácido formado durante la fermentación alcohólica por las levaduras presentes en el mosto. Se encuentra en cantidades entre 0,6 y 2g/L (3). El ácido succínico es estable frente a las fermentaciones lácticas, por lo que su contenido no cambia durante todo el tiempo de almacenamiento del vino. Su sabor es una mezcla de gustos ácidos, salados y amargos. Esta mezcla de sabores es lo que proporciona el sabor característico del vino.

Ácido Acético: Es conocido como el ácido del vinagre, por lo que la presencia en concentraciones altas en el vino es negativo y en términos enológicos se conoce como un sabor “picado acético”. La concentración normal en un vino es de 0.15 a 0.6 g/L. El ácido acético se produce por la oxidación del etanol presente en el vino, debido a la presencia de las bacterias acéticas. Este proceso se realiza en dos etapas, la primera el etanol se oxida a acetaldehído y en la segunda el acetaldehído se oxida a ácido acético (5). El ácido acético también puede aparecer por la degradación de ácido cítrico combinado con la presencia de las bacterias ácido lácticas en el vino.

Ácido Láctico: Este ácido no es característico de la uva, por lo que su presencia se debe a que se forma durante la fermentación alcohólica o más comúnmente durante la fermentación maloláctica, en donde el ácido L-málico se transforma a ácido L-láctico debido a la presencia de las bacterias ácido lácticas. Su presencia en el vino aporta una acidez más suave con un sabor parecido al de los lácteos, la concentración normal en el vino es de 0 – 2.5 g/L (15).

Ácido Butírico: Este ácido no es muy común encontrarlo en los vinos. Sin embargo se puede producir si hay presencia de bacterias anaeróbicas del género *Clostridium*, específicamente *Clostridium butyricum*, mediante una fermentación butírica (5). Esta fermentación es una de las tantas que pueden surgir durante la fermentación alcohólica. La ruta que puede seguir este tipo de fermentación es a partir del ácido pirúvico que actúa como sustrato o de la misma glucosa hasta la formación de ácido butírico. La presencia de este ácido en los vinos provoca un sabor a rancio por lo que su presencia es indeseable, un buen catador puede fácilmente detectarlo.

Determinar la naturaleza y la concentración de los ácidos orgánicos en las frutas utilizadas para la producción de vinos es muy importante debido a su composición propia y única lo cual influye en las propiedades organolépticas (21). En el vino la composición y la concentración de los ácidos orgánicos es un parámetro importante de estudio. El conocimiento de éstos en el vino puede ser utilizado para evaluar como avanza la fermentación alcohólica (17), como el sustrato está siendo transformado por las diferentes rutas metabólicas. Además para determinar si hay presencia de otro tipo de fermentaciones como puede ser la maloláctica o al contrario otro tipo de fermentación no deseable como el caso de la acética o butírica. En el producto final el conocimiento de la composición de los ácidos orgánicos está relacionado con la estabilidad y las propiedades organolépticas (22).

Los ácidos orgánicos han sido determinados mediante varios métodos entre los que se encuentran: procedimientos enzimáticos (23,24), cromatografía de papel, cromatografía de gas y cromatografía líquida. El método con el uso de enzimas es el método estándar para la

determinación de ácidos orgánicos en vinos, el cual es el reconocido y recomendado por la Oficina Internacional de vinos en París y por la Asociación Americana de Químicos Analíticos (25). Tiene la ventaja de ser selectivo pero a la vez es un método muy tedioso y los reactivos utilizados son muy costosos (26). Un método rápido y sencillo ampliamente utilizado por muchos investigadores en este campo es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por sus siglas en inglés (27).

La cromatografía líquida de alta resolución es considerada como una técnica de separación, en la cual se puede identificar y cuantificar un analito en una muestra determinada. En esta técnica la fase móvil es un líquido, el cual se hace correr a través de una columna que contiene la fase estacionaria. La muestra es inyectada en la columna en donde se lleva a cabo el proceso de separación. La resolución de esta separación depende de la interacción entre la fase estacionaria y la fase móvil, pudiendo ser manipulada a través de la elección de diferentes mezclas de solventes. Como resultado final la mezcla de componentes son detectados electrónicamente en el tiempo en que ellos eluyen de la columna llamados tiempos de retención; dando como resultado lo que se conoce como cromatograma a través del cual se puede realizar la identificación cualitativa y cuantitativa de las especies separadas. La cromatografía líquida de alta resolución es además una de las técnicas más ampliamente utilizada. Esto debido a su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria y en la ciencia. Algunas de estas sustancias son aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, ácidos orgánicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, plaguicidas, antibióticos entre otros (28).

Dentro de la cromatografía líquida de alta resolución se encuentran dos tipos de separaciones muy usadas para la determinación de ácidos orgánicos en vinos que son la utilización de cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía en fase reversa. La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) por sus siglas en inglés, utiliza un soporte en la columna de carácter no polar. Por lo general el material de relleno es de octilsilano (C_8) y octadecilsilano (C_{18}). Además el sistema de elusión es usualmente binario, aunque se encuentran terciarios y cuaternarios (29). En la literatura se encuentran muchos estudios de análisis de ácidos orgánicos en vino (22, 23, 29, 30) y en jugos de frutas (21, 31) los cuales han sido realizados por RP-HPLC utilizando un detector de ultravioleta. Los resultados en cada uno de estos estudios son una buena separación de cada uno de los ácidos presentes en la muestra. Los ácidos comúnmente encontrados por medio de esta técnica son: tartárico, cítrico, málico, láctico, acético, fórmico, shikímico, fumárico y succínico. La mayor complejidad con esta metodología se debe a que debe existir un pretratamiento de la muestra, con el fin de eliminar toda aquella sustancia que pueda interferir durante el análisis (30). Esto se debe a que el vino es una matriz muy compleja formada de muchas sustancias. Dentro de los compuestos que pueden causar estas interferencias se encuentran las antocianinas y los polifenoles; estos últimos en el caso de vinos tintos.

La cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico es una técnica muy utilizada en la determinación de ácidos orgánicos en diferentes tipos de muestras (jugos de frutas, vinagre y vinos). Esta técnica es muy eficaz para la separación de compuestos neutros y de carácter ácido de compuestos básicos mediante el principio de exclusión iónica. La fase estacionaria es una resina de intercambio iónico (catiónica o aniónica) que actúa como una

membrana semipermeable, la cual actúa con las especies iónicas presentes en la muestra. La cromatografía de intercambio iónico es muy utilizada para la separación de ácidos orgánicos debido a las diferencias en los valores de los pKa de los ácidos orgánicos. Por lo general se utiliza una resina de gran carácter ácido como fase estacionaria. El principio de este tipo de separación se basa que en las especies no electrolíticas o sustancias de carácter básico son altamente retenidas en la resina y las sustancias de carácter ácido son los primeros compuestos que eluyen. El pH de la fase móvil es un factor muy importante para lograr una buena separación de los ácidos y por lo general la forma de elusión es isocrática.

En la actualidad existen en el mercado una gran variedad de columnas de intercambio iónico, algunas compañías manufactureras se encargan en desarrollar columnas para la separación de ciertos tipos de compuestos específicos como ácidos orgánicos, aminoácidos y proteínas entre otros. Ashoor y colaboradores (1984) determinaron ácido acético en diferentes muestras de alimentos utilizando una columna de intercambio iónico Aminex HPX87-H, un sistema de elusión isocrática y como fase móvil solución acuosa de ácido sulfúrico de concentración 0.0045 M. La detección se realizó por medio de un detector de ultravioleta a 210 nm (32). Los resultados demostraron que el método es bastante específico para la determinación de dicho ácido en las muestras analizadas. Además la metodología utilizada fue bastante precisa y exacta, esto lo comprobaron por medio de los coeficientes de variación y con el porcentaje de recuperación.

Morales y colaboradores (1998) lograron identificar y cuantificar ácido cítrico, málico, tartárico, láctico y acético en muestras de vinagres balsámicos, de sherry y de cidra utilizando

una columna de cromatografía de intercambio iónico Aminex HPX87-H. La elusión fue isocrática utilizando una solución de ácido sulfúrico de pH 1. La detección se realizó por medio de un detector de ultravioleta a 214 nm (16). Los resultados obtenidos demostraron que la metodología utilizada tiene una buena precisión y exactitud, así como buena linealidad.

Picha (1985) logró identificar y cuantificar ácido málico, cítrico y succínico en muestras de patatas dulces como los ácidos presentes en mayor proporción. Además encontraron trazas de ácido oxálico y oxaloacético. La identificación se llevó a cabo utilizando una columna de cromatografía de intercambio iónico Aminex HPX87-H, la elusión fue isocrática utilizando una solución de ácido sulfúrico 0.0008 N, la detección se realizó por medio de un detector de ultravioleta a 214 nm (33).

Walter y colaboradores (2003) realizaron un estudio en vinos de uva syrah y cynthiana con el fin de comparar el análisis de ácidos orgánicos por medio de métodos enzimáticos y por cromatografía de intercambio iónico. Éstos utilizaron una columna Aminex HPX87-H y la elusión fue isocrática utilizando una solución de ácido sulfúrico de pH 2.28. La detección se realizó por medio de un detector de arreglo de diodo y una longitud de onda de 210 nm (25). Los ácidos orgánicos que lograron identificar y cuantificar fueron los siguientes: cítrico, málico, succínico, tartárico, láctico y acético. Los resultados en este estudio determinaron que el análisis por medio de la cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico es más precisa, más fácil y se tienen resultados más rápidos comparados con el método enzimático (25).

La compañía Supelco ha desarrollado una columna de intercambio iónico denominada Supelcogel C-610H, la cual es específica para la separación de ácidos orgánicos, carbohidratos y alcoholes en productos como jugos de frutas, vinos, productos de fermentación y muestras biológicas (34). Esta columna tiene la capacidad de lograr una separación de alrededor de 20 ácidos orgánicos según lo especifica la casa matriz. Debido a su especificidad y a la experiencia con el uso de esta columna fue por lo que se decidió a usarla en el presente trabajo.

En la literatura no se encontraron muchos estudios acerca de análisis de ácidos orgánicos en vinos de frutas, específicamente elaborados de piña. Tampoco se encontraron estudios del efecto de la pasteurización en el producto final (vino) en cuanto al pH, la acidez titulable y en la composición de ácidos orgánicos. Okoh y colaboradores (1997) realizaron un trabajo en el cual fabricaron un vino de piña utilizando una especie de levadura aislada de la ceta de la palmenta (*Elaeisguineensis*). El producto final tuvo las siguientes características, 15 % de alcohol, un pH de 3.2 y una acidez titulable de 1.52 %. Además realizaron un análisis sensorial en donde lo compararon con un vino de piña comercial, los resultados del panel sensorial demostraron que el vino era en términos generales aceptables (35).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de las muestras de vino de piña (*Ananas sativus*)

Estos vinos se elaboraron con anterioridad como parte del proyecto “Elaboración de vinos y brandys de alta calidad a partir de frutas tropicales” (TSTAR 101). Los vinos de piña fueron preparados a partir de la especie Española Roja utilizando las siguientes cepas: Montrachet Red Star (ATCC 36026), Montpellier (K1-V1116), I.N.R.A. Narbonne (71B-1122), Rhône (IVC-GRE), Prise de Mouse (EC-1118). Las muestras de vino de piña se tomaron al azar de muestras almacenadas en el cuarto frío del edificio de Piñero. Estas muestras de vinos tenían un periodo de 6 meses de almacenamiento. Una parte de las muestras de los vinos se sometió al proceso de pasteurización, el cual se explica en el numeral 3.5.

3.2 Determinación del pH

El pH de las muestras de vino se determinó utilizando un metro de pH Accumet Research modelo AR 15 (Fisher Scientific), previamente calibrado con soluciones buffer de 4.00 y 7.00 (Fisher Scientific). Se tomaron 10 mL de cada muestra y se transfirieron en un vaso de 50 mL. Se tomaron lecturas por triplicado.

3.3 Determinación del Contenido Total de Acidez

El contenido total de acidez en las muestras de vino se realizó según la metodología de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC – 962-12) y la Sociedad Americana de Enología. Se tomó un volumen de 50 mL del vino a analizar, se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se le removió el CO₂ por medio de vacío. Se tomó una alícuota de 25 mL del vino desgasificado, se pesó y se añadió 25 mL de agua destilada. Seguidamente se procedió a titular con solución de hidróxido de sodio estandarizado hasta obtener un pH entre 8.1 y 8.2, el cual se midió utilizando un metro de pH.

La fórmula utilizada para la determinación de la acidez titulable (g/100 mL) fue la siguiente:

$$\% \text{ Acidez titulable} = \frac{(V \text{ NaOH} \times N \text{ NaOH}) \times 64.04}{V \text{ muestra (mL)}} \times 100$$

Expresada en base a ácido cítrico

3.4 Determinación de Grados Brix

Los grados Brix (°B) de las muestras de vino se determinó utilizando un refractómetro (Bausch & Lomb), previamente calibrado. La muestra se tomó con una pipeta pasteur y se tomaron lecturas por triplicado.

3.5 Análisis de Ácidos Orgánicos en los vinos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

3.5.1 Extracción de los ácidos orgánicos

El proceso de extracción de los ácidos de las muestras de vino se realizó de la siguiente manera. Se midieron 4.00 mL de muestra de vino y se pesaron en una balanza analítica AG204 (Mettler Toledo). La muestra se transfirió a un tubo de centrifuga y se le añadieron 8.0 mL de agua grado HPLC (Fisher Scientific) y se centrifugó a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. Se tomó 1.0 mL del líquido sobrenadante, se inyectó en la columna de Extracción en Fase Sólida de intercambio iónico SCX (Propilsulfonilbenceno) (500mg/3mL) (Varian). Esta columna fue previamente activada con 1.0 mL de Metanol grado HPLC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y 10.0 mL de agua grado HPLC (Fisher Scientific). La columna de SCX se lavó con 2.0 mL de agua grado HPLC y el líquido se recogió en un matraz volumétrico de 10 mL y se completó a volumen con fase móvil de ácido fosfórico (H_3PO_4) al 0.1 %. De la solución anterior se tomaron 3.0 mL y se pasaron a través de un filtro de 0.20 μm de Nylon (Fisherbrand, Fisher Scientific). La muestra filtrada se guardó en un tubo de plástico para su análisis inmediato por HPLC.

3.5.2 Análisis cromatográfico de las muestras de vino de piña

Para el análisis de las muestras de vino se tomaron 25 μL y se inyectaron manualmente en un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución HP series 1100 (Hewlett Packard, U.S.A). El

instrumento tiene una columna guarda supelguard C610H de 5 cm x 4.6 mm ID (Supelco, Bellefonte, PA) y una columna de intercambio iónico supelcogel C-610H de 30 cm x 7.8 mm ID (Supelco, Bellefonte, PA). La fase móvil utilizada fue H_3PO_4 al 0.1% de pH: 2.2. Las condiciones del equipo fueron las siguientes, flujo de la fase móvil 0.5 mL/min, presión 43 bar y temperatura de 20°C. La identificación de los ácidos se realizó a 210 nm por medio de un detector de longitud de onda variable. La integración de los picos se realizó por medio de un integrador acoplado HP3396 Series III (Hewlett Packard, U.S.A). Cada muestra se inyectó por triplicado y se identificaron los tiempos de retención de cada ácido orgánico encontrado.

3.5.3 Identificación de los Ácidos Orgánicos por medio de Soluciones Estándar

La identificación de cada uno de los picos obtenidos en los cromatogramas de las muestras analizadas se realizó por medio de estándares de ácidos orgánicos. Se prepararon soluciones estándar de 10 ppm de grado analítico de alta pureza a partir de los siguientes ácidos: oxálico, maleíco, cítrico, tártrico, málico, ascórbico, quínico, malónico, shikimico, succínico, fórmico, acético, fumárico, propiónico, butírico y láctico. Las soluciones estándar se inyectaron por triplicado manualmente en el HPLC HP series 1100 (Hewlett Packard, U.S.A). Además se determinaron los tiempos de retención a tres temperaturas diferentes 20 °C, 25 °C y 30 °C, con el fin de observar la variación en los tiempos de retención y así tener una mayor confiabilidad a la hora de la identificación.

3.5.4 Cuantificación de los Ácidos Orgánicos por medio de Soluciones Estándar

Para la cuantificación de los ácidos orgánicos, se prepararon soluciones *stock* de 10,000 ppm con cada uno de los estándares de los posibles ácidos identificados con anterioridad. A partir de esta solución se prepararon las soluciones trabajo de 1,000 ppm y por último se prepararon las soluciones estándar en concentraciones que variaron desde 5 ppm hasta 120 ppm, según fuera el caso. Se utilizó H₃PO₄ como solvente diluido al 0.1% con un pH de 2.2 en la preparación de las soluciones. Las soluciones estándar de cada ácido se filtraron con una membrana de 0.20 μm de Nylon. Las mismas se inyectaron por triplicado.

Para cada ácido se hizo una curva de calibración “área vs concentración (ppm)” con el promedio de las áreas de las tres inyecciones. Además se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación, esto con el fin de evaluar la precisión de la metodología utilizada. Obtenida la curva de calibración se determinó el coeficiente de regresión lineal y la ecuación de la recta con la cual se estimó la concentración de cada ácido identificado en la muestra de vino.

La fórmula utilizada para la determinación de la concentración de cada ácido presente en el vino fue la siguiente:

$$Y = mX + b, \text{ donde}$$

$$Y = \text{Área promedio bajo la curva}$$

$$m = \text{Pendiente de la recta}$$

$$X = \text{Concentración (ppm)}$$

$$b = \text{Intercepto}$$

$$X = \frac{Y - b}{m}$$

$$\text{Concentración del ácido (g/L)} = X * (\text{F.D}) * 1 \times 10^{-3}$$

F.D = Son los factores de dilución

3.5.5 Determinación del Límite de Cuantificación

Se determinó el límite de cuantificación para cada uno de los ácidos orgánicos identificados y cuantificados en cada una de las muestras de vino. El límite de cuantificación es un parámetro que indica la mínima cantidad que puede ser medida con una exactitud y precisión aceptable. Se prepararon soluciones diluidas de concentración (ppm) conocida de los ácidos identificados. Se inyectaron por triplicado manualmente en el HPLC HP series 1100 (Hewlett Packard, U.S.A) a las condiciones de análisis anteriormente mencionadas. Este procedimiento se realizó hasta obtener una señal que fuera reproducible y que los valores del área bajo la curva presentaran un coeficiente de variación menor del 5%.

3.5.6 Determinación del Porcentaje de Recuperación

Para calcular el rendimiento del proceso de extracción y de la limpieza de la muestra se determinó el porcentaje de recuperación. Este paso consistió en añadir una cantidad conocida de cada estándar de los ácidos identificados a una muestra de vino y realizar todo el procedimiento tanto de extracción como el de identificación. Finalmente se determinó la concentración de los estándares de ácido añadidos a la muestra por medio de las curvas de calibración.

La fórmula utilizada para la determinación del porcentaje de recuperación fue la siguiente:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración del ácido añadido obtenida de la curva (mg/L)} \times 100}{\text{Concentración real del ácido añadido (mg/L)}}$$

3.6 Pasteurización de las muestras de vinos de piña

Las muestras de los cinco vinos fermentados con diferentes levaduras se sometieron a un proceso de pasteurización para su análisis posterior. El proceso de pasteurización consistió en introducir la botella de vino en un baño de aceite vegetal el cual se encontraba a 320 °F. La botella de vino permaneció sumergida hasta que la temperatura interna de la botella alcanzara los 76 °C durante 15 s. La temperatura se midió por medio de un termómetro digital (Fisher Scientific).

3.7 Análisis Estadístico

Los resultados de pH, acidez titulable y concentración de ácidos orgánicos fueron evaluados estadísticamente mediante un análisis de varianza ANOVA utilizando el programa Infostat 2002. Este análisis se hizo con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre cada uno de las muestras de vinos fermentados con diferentes levaduras. El análisis estadístico se realizó tanto para las muestras de vino sin pasteurizar y pasteurizado.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Resultados de pH en las muestras de vinos de piña

Los resultados de pH en las muestras de vino sin pasteurizar y pasteurizados se muestran en la Tabla 1. Éstos se presentan como el promedio de las tres mediciones con su correspondiente desviación estándar. Se puede observar que los valores obtenidos de pH para cada uno de los vinos analizados se encuentran un poco por encima del rango reportado en la literatura que es de 3.5 – 4.0 (15). Los valores se encuentran dentro del rango de pH ácido, lo cual es algo bien importante, ya que a estos valores de pH restringen el crecimiento de microorganismos y permite que los vinos no sean tan susceptibles a daños por los mismos. Además es importante mencionar que la piña es una fruta ácida con un pH de 3.49 (5), por lo tanto es de esperarse una bebida con estas características.

Tabla 1. Resultados de pH de las muestras de vinos de piña

Muestras de vino de piña	pH vinos sin pasteurizar	pH vinos pasteurizados
Levadura EC-1118	4.05 ± 0.01	3.99 ± 0.01
Levadura Montrachet	4.50 ± 0.00	4.44 ± 0.02
Levadura KI-V1116	4.17 ± 0.01	4.10 ± 0.00
Levadura 71B-1122	4.11 ± 0.01	4.05 ± 0.02
Levadura IVC-GRE	4.36 ± 0.00	4.29 ± 0.01
Valor p	< 0.0001	< 0.0001

Para determinar si efectivamente existen diferencias significativas en los valores de pH en cada una de las muestras de vinos se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de 0.05. Según los resultados del ANOVA presentados en la Tabla 1, el valor de $p < 0.0001$ es menor al valor de $\alpha = 0.05$. Esto se observa tanto en los vinos sin pasteurizar como en los pasteurizados por lo tanto existen diferencias en cuanto al valor del pH en al menos una de las muestras de los vinos. Se realizó una prueba de Fisher, los resultados demostraron que existen diferencias significativas en cuanto al pH entre cada una de las muestras estudiadas. Por lo tanto se puede inferir que posiblemente cada levadura produce un vino con un determinado pH específico. Según estudios reportados en la literatura (37), cepas de levaduras de *Sacharomyces cerevisiae* producen cantidades diferentes de ácidos orgánicos que son los responsables de la acidez total. En cuanto al efecto del proceso de pasteurización en el pH de los vinos de piña no se observa un cambio drástico en los valores, por lo que se puede inferir que la pasteurización no afecta este parámetro.

La muestra de vino de piña que tuvo el menor valor de pH fue el elaborado con la levadura EC-1118. Por lo tanto se esperaría que corresponde a la muestra de vino de mayor acidez. La muestra de vino que tuvo el mayor valor de pH fue el elaborado con la levadura Montrachet. Por lo tanto se esperaría que esta muestra de vino sea la que tenga menor acidez. Este comportamiento se observa tanto en los vinos sin pasteurizar como en los pasteurizados. Estos resultados se compararon con los obtenidos en el estudio realizado por Pérez (2006) (36) en los cuales los vinos de piña fueron sometidos a una evaluación por medio de un panel sensorial utilizando la escala de Davis. En este estudio se encontraron que no existen diferencias significativas en cuanto a la acidez en los vinos. Sin embargo los vinos elaborados

con las siguientes levaduras EC-1118 e IVC-GRE fueron los que obtuvieron las mejores puntuaciones. Eso quiere decir que esos vinos son los que presentan un balance apropiado en la acidez con respecto a otros sabores. Según lo anterior no hay una relación entre los resultados obtenidos por medio de técnicas instrumentales vs el análisis sensorial, debido a que el vino que obtuvo el valor de pH mas ácido fue el que sensorialmente tuvo la mayor puntuación en cuanto al contenido de acidez total.

4.2 Resultados de Acidez Titulable en las muestras de vinos de piña

Los valores de acidez titulable en las muestras de vinos se muestran en la Tabla 2, se presentan como el promedio de las tres mediciones con su correspondiente desviación estándar. En la literatura no se encontraron muchos estudios relacionados a vinos elaborados a partir de piña, sin embargo la acidez titulable reportada para los vinos de uva se encuentran en un rango que oscila entre 0.6 – 1.2 g/100 mL, dependiendo del tipo de uva (15). Para el caso de los vinos de piña analizados se observa que el valor de la acidez titulable se encuentra muy por debajo de este rango. Para el caso de estos vinos, la acidez titulable se reporta en base al ácido cítrico el cual es el que se encuentra en mayor cantidad en la fruta original.

Tabla 2. Valores de acidez titulable de las muestras de vinos de piña

Muestras de vino de piña	Acidez Titulable (g/100 mL) vinos sin pasteurizar	Acidez Titulable (g/100 mL) vinos pasteurizados
Levadura EC-1118	0.491 ± 0.005	0.480 ± 0.001
Levadura Montrachet	0.301 ± 0.004	0.301 ± 0.001
Levadura KI-V1116	0.468 ± 0.001	0.451 ± 0.004
Levadura 71B-1122	0.483 ± 0.010	0.458 ± 0.006
Levadura IVC-GRE	0.358 ± 0.007	0.336 ± 0.009
Valor p	< 0.0001	< 0.0001

Según los resultados del análisis de varianza de los valores de la acidez titulable para las muestras de vinos de piña pasteurizados y sin pasteurizar presentados en la Tabla 2, el valor de $p < 0.0001$ es menor al valor de $\alpha = 0.05$. Por lo tanto existen diferencias en cuanto a este parámetro en al menos una de las muestras de los vinos. Para determinar cuales de estas muestras son diferentes se realizó una prueba de Fisher, los resultados demostraron que no existen diferencias entre las muestras de vinos elaborado con la levadura EC-1118 y la 71B-1122 para los vinos sin pasteurizar. Para los vinos pasteurizados se encontró que no existen diferencias entre las muestras de vinos elaborados con las levaduras KI-V1116 y 71B-1122. Los valores de la acidez titulable tienen una relación directa con los valores del pH de los vinos tanto en los pasteurizados como los no pasteurizados. Esto se puede demostrar ya que el vino que presentó el pH más bajo fue el de mayor valor de acidez titulable, al igual que el vino con el mayor valor de pH fue el de menor valor de acidez titulable. Al comparar los valores de la acidez titulable de los vinos sin pasteurizar con los pasteurizados se puede observar que los vinos pasteurizados presentan valores un poco por debajo, realmente no se puede determinar si hay diferencias debido a que estadísticamente no se pudieron comparar. Pero se puede inferir que el

proceso de pasteurización no afecta este parámetro en base a la relación directa que se encontró entre los valores de pH y de acidez titulable.

4.3 Resultados de Grados Brix en las muestras de vinos de piña

Los valores de grados Brix en las muestras de vinos se muestran en la Tabla 3, se presentan como el promedio de las tres mediciones con su correspondiente desviación estándar. Se observa que las muestras de vinos sin pasteurizar y pasteurizados presentaron valores de 6.7 °Brix a excepción de las muestras de vinos de piña elaborado con la levadura 71B-1122 que tuvieron valores de 7.7 y 7.6 °Brix respectivamente. Según estos datos de los grados Brix aparente en las muestras de vinos de piña, éstos se pueden clasificar como vinos dulces (1).

Tabla 3. Valores de Grados Brix de las muestras de vinos de piña

Muestras de vinos de piña	Grados Brix vinos sin pasteurizar	Grados Brix vinos pasteurizados
Levadura EC-1118	6.7 ± 0.1	6.7 ± 0.0
Levadura Montrachet	6.7 ± 0.0	6.7 ± 0.1
Levadura KI-V1116	6.7 ± 0.1	6.7 ± 0.1
Levadura 71B-1122	7.7 ± 0.0	7.6 ± 0.0
Levadura IVC-GRE	6.7 ± 0.1	6.7 ± 0.1

4.4 Resultados de los ácidos orgánicos por HPLC para las muestras de vinos de piña

Para el análisis de los ácidos orgánicos por HPLC se realizaron análisis previos de las muestras de los vinos variando la temperatura de la columna del equipo a 20 °C, 25 °C y 30 °C. Esto se realizó para determinar la temperatura óptima de la columna que permitiera una buena separación de los ácidos orgánicos presentes en las muestras. Los resultados obtenidos demostraron que la mejor separación de los ácidos orgánicos en las muestras de vino de piña se llevó a cabo a 20 °C.

La Tabla 4 presenta la composición de los ácidos orgánicos encontrados en las muestras de vinos de piña sin pasteurizar. Los ácidos encontrados en mayor proporción fueron ácido cítrico, málico, succínico, fórmico, acético y butírico. Estos ácidos se lograron identificar por medio del tiempo de retención los cuales se muestran en la Tabla 3. Estos valores presentaron una buena precisión ya que la desviación estándar es mínima y el coeficiente de variación es menos del 5 %. La concentración de cada uno de los ácidos se determinó por medio de las curvas de calibración de las soluciones estándar de los ácidos (Apéndice 1). En la Tabla 3 se puede observar que las concentraciones de los ácidos son diferentes para cada muestra de vino. Se esperaba que el ácido cítrico por su naturaleza de ácido predominante en la piña, debería ser el ácido que se encontrara en mayor concentración en todas las muestras de los vinos. Sin embargo se observa que solo en las muestras de los vinos elaborados con las levaduras EC-1118, K1-V1116 y 71B-1122 se presenta este comportamiento. Por lo tanto es de esperarse que estos vinos tengan sensaciones agradables, frutales y aromáticas. La concentración del ácido málico varía en cada una de las muestras de vinos de piña. Este ácido proviene de la piña y su presencia

Tabla 4. Composición de ácidos orgánicos en las muestras de vinos de piña sin pasteurizar

Ácidos Orgánicos	Tiempo de Retención (min)	EC-1118	Montrachet	K1-V1116	71B-1122	IVC-GRE
Ácido cítrico (g/L)	12.09 ± 0.01	3.08 ± 0.04	1.77 ± 0.03	2.90 ± 0.03	2.68 ± 0.01	0.83 ± 0.01
Ácido málico (g/L)	14.13 ± 0.05	2.08 ± 0.05	0.32 ± 0.01	1.64 ± 0.05	1.85 ± 0.03	0.20 ± 0.02
Ácido succínico (g/L)	17.45 ± 0.06	0.82 ± 0.01	2.82 ± 0.13	2.01 ± 0.03	1.45 ± 0.02	3.88 ± 0.02
Ácido fórmico (g/L)	18.54 ± 0.03	1.25 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.33 ± 0.01	1.21 ± 0.01	0.39 ± 0.02
Ácido acético (g/L)	21.00 ± 0.08	0.34 ± 0.01	0.62 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.19 ± 0.00	1.09 ± 0.01
Ácido butírico (g/L)	31.41 ± 0.06	1.09 ± 0.03	2.89 ± 0.03	2.48 ± 0.05	0.73 ± 0.01	1.99 ± 0.01

en los vinos tiene un efecto bien importante, debido a que provoca una tonalidad verdosa que en los vinos blancos es deseable en términos de apariencia. Las muestras de vinos elaborados con las levaduras EC-1118, K1-V1116 y 71B-1122 son los que presentaron concentraciones altas de este ácido, por lo tanto es de esperarse que estos vinos presenten este comportamiento. El ácido succínico es producto de la fermentación alcohólica. Su presencia en el vino, según la literatura, debe ser de 0.6 – 2 g/L (3). Este ácido imparte una sensación agradable y además proporciona el sabor característico del vino. Las muestras de vinos elaborados con las levaduras EC-1118, K1-V1116 y 71B-1122 son las que presentaron concentraciones que se encuentran dentro de este rango. Los otros tres ácidos encontrados acético, fórmico y butírico son los llamados volátiles. Su presencia en el vino es desagradable debido a los sabores que imparten. El ácido acético provoca un daño en el vino que se conoce como “picado acético”, el contenido aceptado por la industria vinícola en los vinos es de 0.15 – 0.6 g/L. Las muestras de vinos elaborados con las levaduras EC-1118, K1-V1116 y 71B-1122 fueron las que presentaron concentraciones que se encuentran dentro de este rango. Las muestras de vinos elaborados con las levaduras Montrachet e IVC-GRE presentaron valores por encima de los recomendados por la literatura, por lo tanto es de esperarse que estas muestras de vinos presenten daño por picado acético. En el estudio realizado por Pérez (2006) (36) los panelistas evaluaron los vinos en cuanto al olor a vinagre. Los vinos que fueron mejor evaluados, es decir lo de menos sabor a vinagre fueron los elaborados con la levadura EC-1118 y la K1-V1116. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio. Por lo tanto se puede inferir que existe una relación entre el análisis sensorial vs el análisis químico para este parámetro analizado. En cuanto al ácido fórmico, se observan concentraciones que varían desde 0.33 –1.25 g/L. En la literatura no se encuentran

rangos para este tipo de ácido en los vinos, ya que se considera que su presencia sea o nula o se encuentre en concentraciones muy bajas. La presencia del ácido butírico en los vinos provee un sabor a rancidez que es fácilmente detectable, por lo que su presencia es indeseable en los vinos. La presencia de este ácido puede ser debido al desarrollo de la fermentación butírica, la cual es una de las tantas que puede surgir durante la fermentación alcohólica. Se puede observar que este ácido se encuentra en concentraciones altas en las muestras de vinos elaborados con las levaduras Montrachet, K1-V1116 e IVC-GRE por lo tanto se puede inferir que estas muestras de vinos tengan un sabor de mayor rancidez con respecto a las otras muestras de vinos restantes.

En la Tabla 5 se presenta la composición de los ácidos orgánicos encontrados en las muestras de vinos de piña pasteurizados. Se observa que los ácidos encontrados fueron los mismos que los determinados en las muestras de vinos sin pasteurizar. La concentración de cada uno de estos es muy similar a los de las muestras de vinos sin pasteurizar. La diferencia en la mayoría de los casos se encuentra dentro de la desviación estándar. Por lo tanto se puede inferir que el proceso de pasteurización no afectó la concentración de los ácidos orgánicos presentes en los vinos de piña.

Tabla 5. Composición de ácidos orgánicos en las muestras de vinos de piña pasteurizados

Ácidos Orgánicos	Tiempo de Retención (min)	EC-1118	Montrachet	K1-V1116	71B-1122	IVC-GRE
Ácido cítrico (g/L)	12.09 ± 0.01	3.05 ± 0.00	1.78 ± 0.03	2.87 ± 0.10	2.71 ± 0.01	0.86 ± 0.04
Ácido málico (g/L)	14.13 ± 0.05	2.06 ± 0.02	0.28 ± 0.01	1.62 ± 0.06	1.87 ± 0.02	0.21 ± 0.00
Ácido succínico (g/L)	17.45 ± 0.06	0.83 ± 0.02	2.81 ± 0.03	2.15 ± 0.05	1.40 ± 0.04	3.88 ± 0.11
Ácido fórmico (g/L)	18.54 ± 0.03	1.27 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.39 ± 0.02	1.22 ± 0.02	0.31 ± 0.00
Ácido acético (g/L)	21.00 ± 0.08	0.32 ± 0.01	0.65 ± 0.00	0.44 ± 0.02	0.23 ± 0.01	1.26 ± 0.01
Ácido butírico (g/L)	31.41 ± 0.06	1.16 ± 0.04	2.94 ± 0.05	2.47 ± 0.09	0.82 ± 0.02	2.11 ± 0.03

En la Figura 1 y 2 se puede observar un cromatograma característico de HPLC para una muestra de vino de piña sin pasteurizar y pasteurizado respectivamente elaborados con levadura EC-1118. Por medio del cromatograma se pudo identificar cada uno de los picos que allí aparecen con su respectivo tiempo de retención. La mayoría de los picos presentes en el cromatograma tienen una forma gaussiana y presentan una buena separación entre cada uno de ellos, lo cual indica que hay una buena separación entre los compuestos presentes en la muestra. También se pueden observar otros picos que no presentan una muy buena separación (10.155, 10.916, 11.351, 16.627) y por lo tanto no se pudo realizar su identificación. La identificación de cada uno de los picos se realizó por medio de los estándares de ácidos orgánicos con sus respectivos tiempos de retención y por medio de una solución de concentración conocida con lo cual se pudo identificar plenamente cada uno de los ácidos presentados en la Tabla 3 y 4. Este mismo comportamiento se observó en los cromatogramas de las muestras de vinos restantes. En el Apéndice 2 se muestran los cromatogramas para cada una de las muestras de vinos restantes.

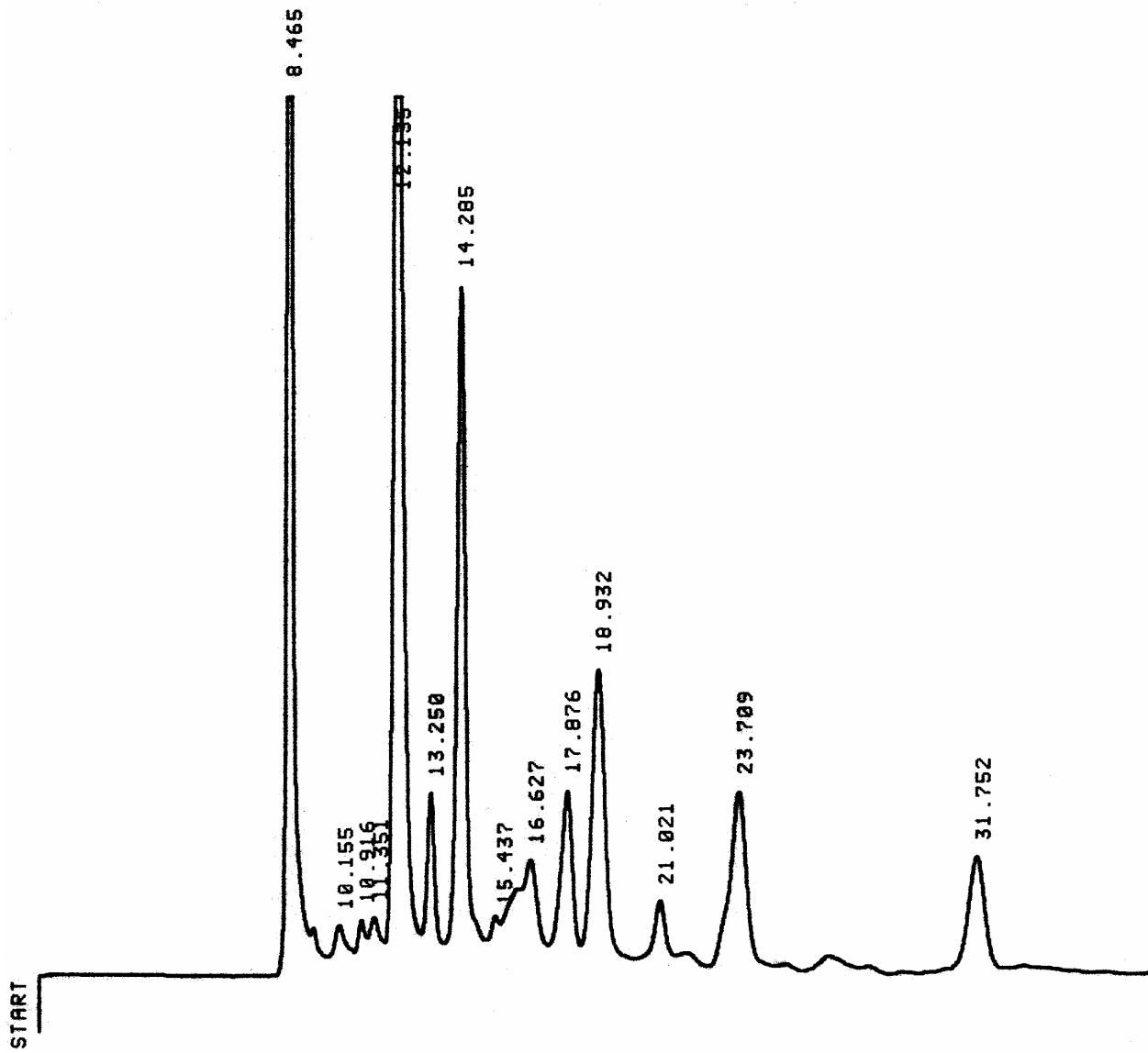


Figura 1. Cromatograma de HPLC de la muestra de vino de piña sin pasteurizar elaborado con la levadura EC-1118.

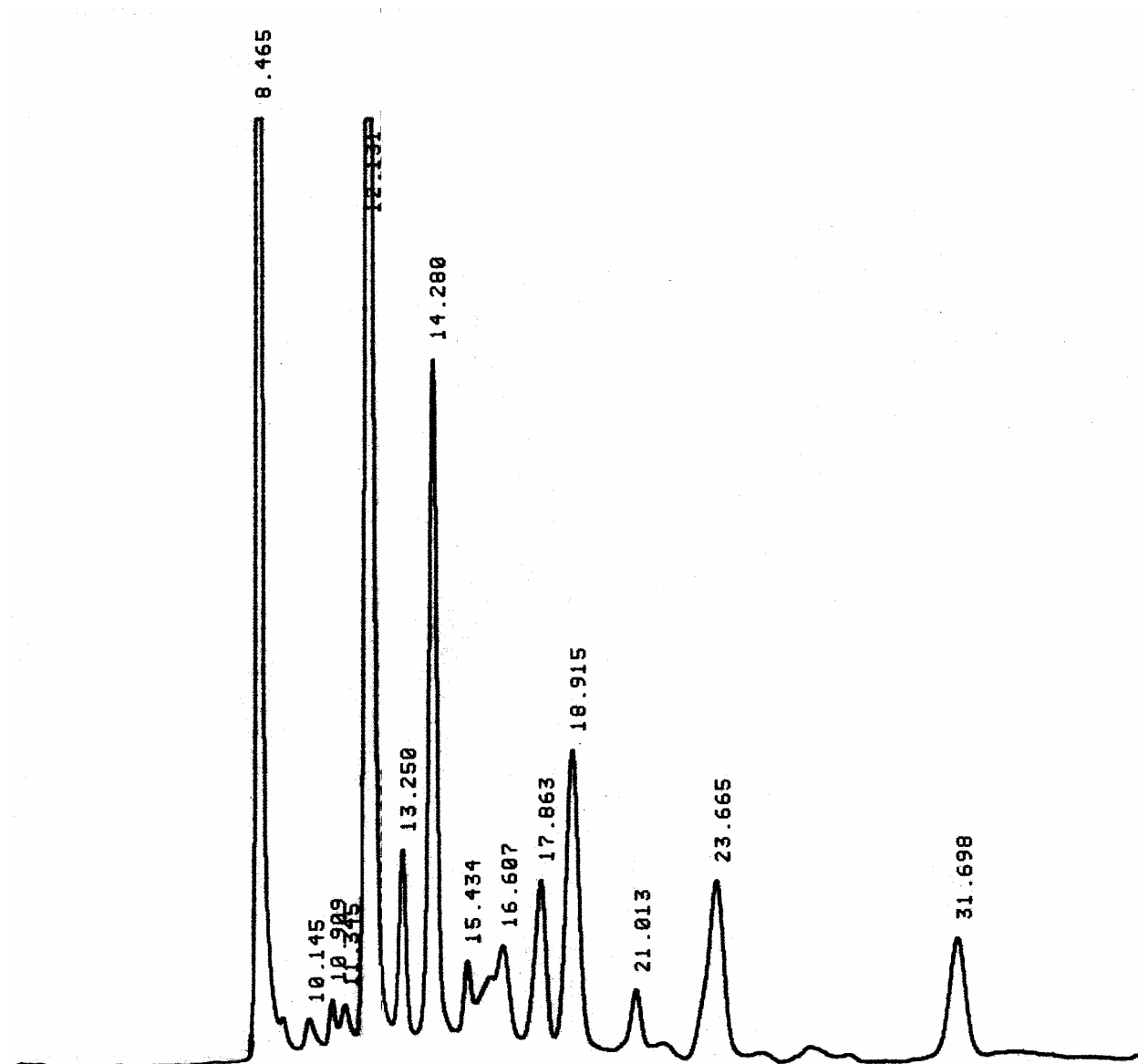


Figura 2. Cromatograma de HPLC de la muestra de vino de piña pasteurizado elaborado con la levadura EC-1118.

4.5 Análisis Estadístico de los ácidos orgánicos

Con el propósito de determinar si existen diferencias significativas en cuanto a la concentración de cada uno de los ácidos identificados en las muestras de vinos de piña se realizó un ANOVA a un nivel de significancia de 0.05. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados del ANOVA para las muestras de vinos de piña pasteurizados y sin pasteurizar.

Ácidos Orgánicos	Valor p	Prueba de Fisher
Ácido cítrico (g/L)	0.0001	diferentes
Ácido málico (g/L)	0.0001	diferentes
Ácido succínico (g/L)	0.0001	diferentes
Ácido fórmico (g/L)	0.0001	diferentes
Ácido acético (g/L)	0.0001	diferentes
Ácido butírico (g/L)	0.0001	diferentes

La Tabla 6 presenta los resultados del ANOVA de las concentraciones de cada uno de los ácidos presentes en las muestras de los vinos de piña pasteurizados y sin pasteurizar. El valor de $p = 0.0001$ en cada uno de los casos es menor al valor de $\alpha = 0.05$, por lo tanto existen diferencias en al menos una de las muestras de los vinos. Se realizó una prueba de Fisher y los resultados demostraron que existen diferencias significativas en cuanto a la concentración de cada ácido en las muestras de los vinos elaborados con las diferentes cepas de levaduras. Por lo tanto se puede inferir que la concentración de los ácidos varían con la levadura utilizada.

Estudios realizados por Torija (2002) (37) demuestran que las levaduras utilizadas en la elaboración de vinos siguen rutas metabólicas distintas y esto influye en la formación de los ácidos orgánicos. Se ha encontrado que muchos de los ácidos orgánicos son formados por medio del ciclo de Krebs, en el cual el piruvato puede ser metabolizado por dos rutas diferentes. Una ruta reductora en la que se forma ácido málico y succínico y otra ruta oxidativa en la que se forma el ácido cítrico, el cual puede ser degradado para formar α -cetoglutarato.

4.6 Resultados del Límite de Cuantificación

Se determinaron los límites de cuantificación para cada uno de los ácidos orgánicos identificados y cuantificados en los vinos de piña. La tabla 7 presenta los valores de los límites de cuantificación expresados en ppm. Estos valores representan las concentraciones mínimas que pueden ser detectadas por medio de la metodología usada en el presente trabajo. Los resultados obtenidos se presentan como el promedio de tres repeticiones y la desviación estándar para cada solución estándar del ácido correspondiente. A cada solución estándar se le determinó el porcentaje del coeficiente de variación y las concentraciones mínimas que se aceptaron fueron las que presentaron valores menores del 5 %. Con los resultados anteriores se puede observar que la metodología utilizada presenta una precisión del 95 %.

Tabla 7. Resultados del límite de cuantificación de los ácidos orgánicos identificados en las muestras de vinos de piña

Soluciones de Estándares	Límite de Cuantificación (ppm)	Área	Coefficiente de Variación (%)
Ácido Cítrico	2	37073 ± 929	0.17
Ácido Málico	3	36891 ± 618	1.68
Ácido Succínico	7	61049 ± 421	0.69
Ácido Fórmico	5	72247 ± 1466	2.03
Ácido Acético	5	37280 ± 1427	3.83
Ácido Butírico	20	137488 ± 4953	3.60

4.7 Resultados del Porcentaje de Recuperación

Se determinaron los porcentajes de recuperación para cada uno de los ácidos identificados en las muestras de vinos de piña. La muestra utilizada fue la de vino de piña elaborado con la levadura EC-1118. Los resultados se muestran en la tabla 8. Por medio de este análisis se pudo lograr la confirmación de los ácidos orgánicos identificados por las soluciones estándares. Además se pudo establecer la exactitud de la metodología utilizada. Los valores obtenidos muestran que la metodología utilizada en el presente trabajo presenta una buena exactitud, ya que los valores de recuperación son altos.

Tabla 8. Resultados del porcentaje de recuperación de los ácidos orgánicos identificados en las muestras de vinos de piña

Ácido Orgánico	Concentración (ppm) Añadida	Concentración (ppm) Determinada	Porcentaje de Recuperación (%)
Ácido Cítrico	200	196	98
Ácido Málico	215	212	99
Ácido Succínico	200	201	100
Ácido Fórmico	278	278	100
Ácido Acético	195	193	99
Ácido Butírico	327	332	101

5. CONCLUSIONES

Las muestras de vinos de piña pasteurizados y sin pasteurizar presentaron valores de pH que se encuentran dentro de un rango de acidez en el cual es casi imposible el crecimiento de microorganismo. Por lo que se puede concluir que son vinos estables y no son susceptibles a sufrir deterioro de este tipo. En cuanto a los valores de pH y de acidez titulable determinados se encontró que existen diferencias significativas tanto en las muestras de vinos de piña pasteurizados como no pasteurizados. Se puede inferir que estos tienen diferentes concentraciones de ácidos, posiblemente atribuibles a la variedad de levadura utilizada para la fermentación de cada vino.

Se logró la caracterización de los vinos de piña en cuanto a la composición de los ácidos orgánicos por medio de la cromatografía líquida de alta resolución. Los ácidos encontrados en todas las variedades de vinos de piña fueron: cítrico, málico, succínico, fórmico, acético y butírico. De los ácidos mencionados anteriormente sólo el ácido cítrico, málico y succínico son ácidos beneficiosos para el vino, ya que su presencia le imparte ciertas características organolépticas agradables. Los otros tres restantes se conocen como ácidos volátiles y son indeseables en vinos ya que su presencia genera sabores desagradables. En base a esto se puede inferir que la muestra de vino de piña elaborado con la levadura 71B-1122, es él que presenta una acidez balanceada debido a que fue él que presentó una mayor concentración de ácido cítrico, málico y succínico. Además presentó concentraciones menores de butírico y acético. En cambio se puede inferir que la muestra de vino de piña elaborado con la levadura Montrachet tenga el de mayor sabor desagradable debido a la alta concentración de ácido butírico comparada

con la concentración de cítrico, málico y succínico. Este comportamiento se observó tanto en los vinos pasteurizados como los no pasteurizados.

Las muestras de vinos de piña elaborados con las levaduras EC-1118 e IVC-GRE presentaron concentraciones altas de ácidos volátiles. Sin embargo estas mismas muestras de vinos fueron las que el panel de catadores en el estudio realizado por Pérez (2006) evaluó como las de mejor calidad. Por lo que se puede concluir que al parecer este tipo de ácidos no influyó en la calidad del vino.

Se pudo determinar mediante un análisis de varianza (ANOVA) que existen diferencias significativas en cuanto a la concentración de cada ácido en cada una de las muestras de los vinos elaborados con las diferentes cepas de levaduras, tanto en los vinos pasteurizados como los no pasteurizados. Estas diferencias pueden ser atribuidas a que cada cepa de levadura utilizada en la elaboración de los vinos actúa de manera diferente durante el proceso de fermentación.

Se puede concluir que la metodología utilizada para la extracción, identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos presentes en el vino, presenta una buena exactitud y precisión. Esto se demostró con los valores del porcentaje de recuperación, con los valores de las desviaciones estándar y con el coeficiente de variación. Todas las mediciones que se realizaron presentan menos de un 5 % de error. En las curvas de calibración se obtuvieron ecuaciones con un rango de $R^2 = 0.999-0.998$, con lo que se demuestra la linealidad de la metodología utilizada.

6. RECOMENDACIONES

Monitorear el contenido de ácidos orgánicos durante el proceso de fermentación.

Realizar simultáneamente análisis sensorial y análisis químico con el fin de correlacionar los datos obtenidos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Vogt E, Jacob L. 1986. El Vino: Obtención, elaboración y análisis. Zaragoza: Editorial ACRIBIA S.A. 52-54 pp.
- (2) Vanaclocha AC, Requena JA. 1998. Procesos de Conservación de Alimentos. España: Ediciones Mundi Prensa. 93-121 pp.
- (3) Karen K, Lorenz K. 2003. Handbook of Dough Fermentations. New York: Marcel Dekker.
http://www.foodnetbase.com/books/1379/dke256_fm.pdf
- (4) <http://www.lexjuris.com/LEXLEX/LEY1998/lex98265.htm>
- (5) Bartolomé PA, Rupérez P, Fúster C. 1996. Non Volatile Organics Acids, pH and Titrable Acidity Changes in Pineapple Fruits Slices During Frozen Storage. J Sci Food Agric 70: 475-480.
- (6) National Agricultural Statistics Service 2004. 2002 Census of Agricultura: Puerto Rico. 1 (52) 98 USDA, Washington DC.
- (7) Mamede MEO, Cardello H MAB, Pastore GM. 2005. Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: Sensory and gas chromatography analyses of fermented grape must. Food Chem 89: 63-68.
- (8) Stashenko H, Macku C, Shibamoto T. 1992. Monitoring Volatile Chemicals Formed from Must during Yeast Fermentation. J Agric Food Chem 40: 2257-2259.

- (9) Mateo JJ, Jiménez MJ, Huerta T, Pastore A. 1991. Contribution of different yeast isolated from must of monastrell grapes to the aroma of wine. *Inter. J of Food Microbiology* 14: 153-160.
- (10) Gil JV, Mateo JJ, Jimenez MJ, Huerta T, Pastor A. 1996. Aroma Compounds in Wine as Influenced by Apiculate Yeast. *J Food Sci* 61(6): 1247-1249.
- (11) Perez CSM, Briones PIA, Ubeda IFJ, Martin AJP. 1999. Characteristic of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. *Food Microbiology* 16: 563-573.
- (12) Steffen A, Pawliszyn J. 1996. Analysis of Flavor Volatiles Using Headspace Solid-Phase Microextraction. *J Agric Food Chem* 44: 2187-2193.
- (13) Nurgel C, Pickering G, Inglis LD. 2004. Sensory and chemical characteristics of Canadian ice wines. *J Sci Food Agric* 84: 1675-1684.
- (14) Mirarefi S, Menke DS, Lee YS. 2004. Sensory Profiling of Chardonal Wine by Descriptive Analysis. *J Food Sci* 69 (6): s211-s217.
- (15) Boulton BR, Singleton LV, Bisson FL, Kunkee ER. 1996. Principles and Practices of Winemaking. New York: Chapman & Hall. 521-537 pp.
- (16) Morales LM, Gonzalez GA, Troncoso MA. 1998. Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars. *J Chromatogr A* 822: 45-51.
- (17) Lamikarra O. 1997. Changes in Organic Acid Composition during Fermentation and Aging of Noble Muscadine Wine. *J Agric Food Chem* 45: 935-937.
- (18) García PA, Martínez SC, Heras MJM. Manejo de la acidez del vino base cava desde el punto de vista organoléptico. *Revista de Enología*.

<http://www.ACE Revista de Enología-CIENCIAacidez.htm>

- (19) Liu QS. 2002. Malolactic fermentation in wine-beyond deacidification. *J of Applied Microbiology* 92: 589-601.
- (20) Maicas S. 2001. The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 35-39.
- (21) Lee SH. 1993. HPLC Method for Separation and Determination of Nonvolatile Organic Acids in Orange Juice. *J Agric Food Chem* 41: 1991-1993.
- (22) Krape KM, Abram V, Kac M, Ferjancic S. 2001. Determination of Organic Acids in White Wines by RP-HPLC. *Food Technol Biotechnol* 39: 93-99.
- (23) Escobal A, Iriondo C, Laborra C, Elejalde E, Gonzalez I. 1998. Determination of acids and volatile compounds in red Txakoli wine by high performance liquid chromatography and gas chromatography. *J Chromatogr A* 823: 349-354.
- (24) Kotany A, Miyaguchi Y, Tomita E, Kiyoko T, Kusu F. 2004. Determination of Organic Acids by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection during Wine Brewing. *J Agric Food Chem* 52: 1440-1444.
- (25) Walker T, Morris J, Threlfall R, Main G. 2003. Analysis of Wine Components in Cynthiana and Syrah Wines. *J Agric Food Chem* 51: 1543-1547.
- (26) Marcé MR, Calull M, Olucha CJ, Borrull F, Rius XF. 1991. Optimization of the derivatization method for the liquid-chromatographic determination of carboxylic acids in wines. *Anal Chim Acta* 242: 25-30.

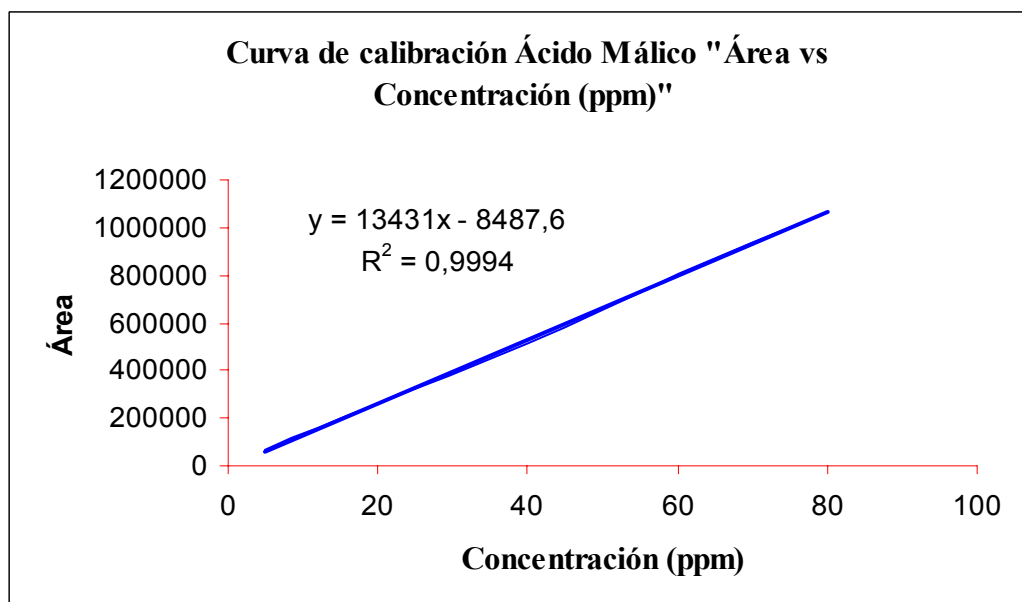
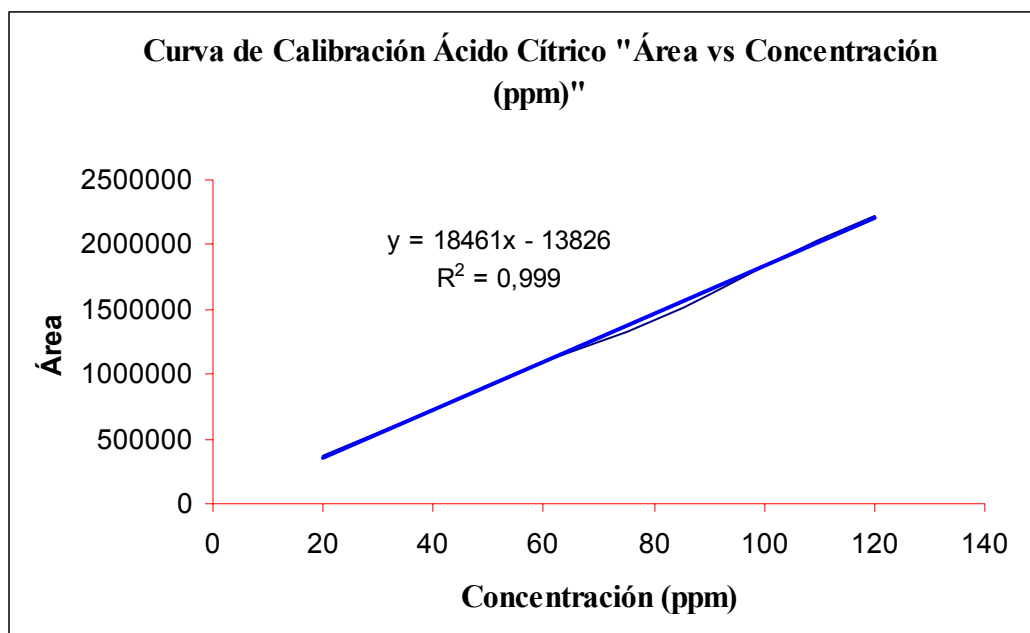
- (27) Gey M, Nagel B, Weissbrodt E, Stottmeister U. 1998. Fast liquid chromatographic determination of organic acids in fermentation media with short glass columns. *Anal Chim Acta* 213: 227-230.
- (28) Skoog D, Leary JJ. 1994. *Análisis Instrumental*. España: Editorial McGraw-Hill. 731 pp.
- (29) Kerem Z, Bravdo B, Shoseyov O, Tugendhaft Y. 2004. Rapid liquid chromatography-ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. *J Chromatogr A* 1052: 211-215.
- (30) Romero GE, Sanchez MG, Martin AJP, Cabezudo IDM. 1993. Determination of organic acids in grape must, wines and Vinegars by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 655: 111-117.
- (31) Shui G, Peng LL. 2002. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit and drinks by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 977: 89-96.
- (32) Ashoor, H.S., Welty, J. 1984. Liquid Chromatographic Determination of Acetic Acid in Foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67: 885-887.
- (33) Picha D. 1985. Organic Acid Determination in Sweet Potatoes by HPLC. *J Agric Food Chem* 33: 743-745.
- (34) *Chromatography Products for Analysis & Purification*. 2005-2006. Bellefonte: Supelco. 50 pp.
- (35) Okoh AI, Shonukan O, Bamidele T. 1997. Investigation of the Fermentation potential of a Palmine Yeast (*Saccharomyces p.*) in the Production of Pineapple Wine. *MBBA Technical Quarterly* 34(3): 171-173.

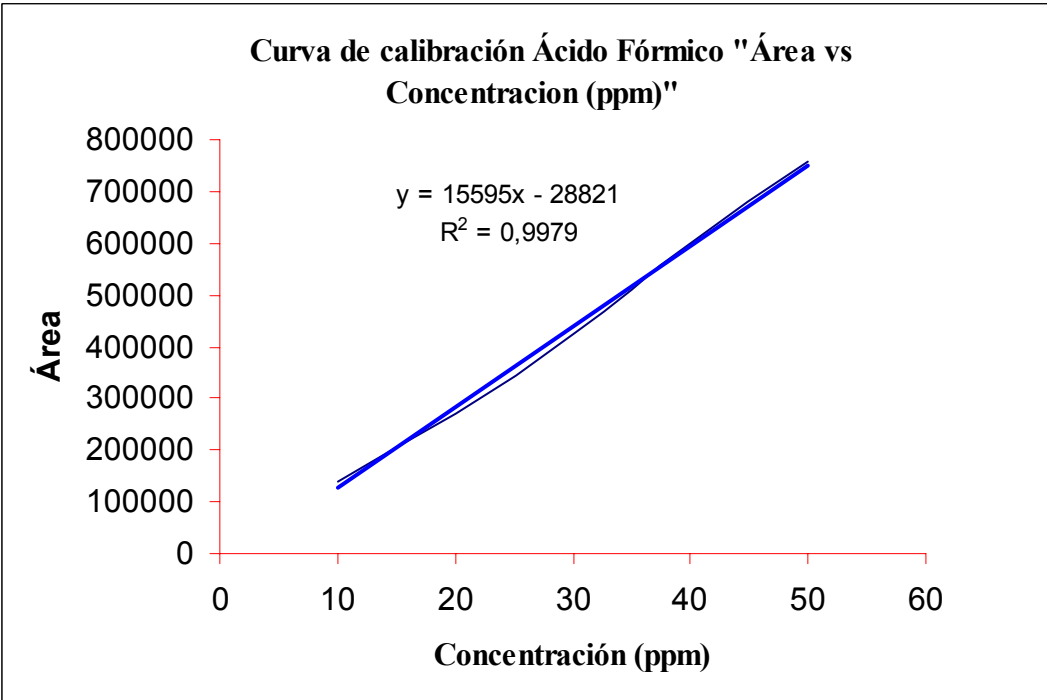
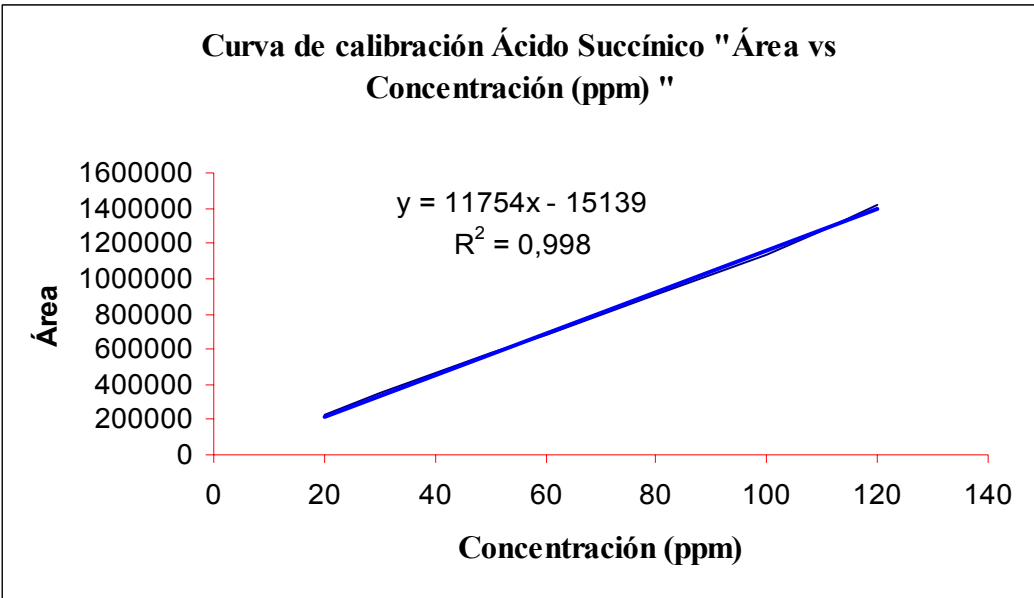
(36) Pérez GJM. 2006. Efecto de pasteurización y adición de sulfitos en la fermentación de vinos de piña. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R., 41-45 pp.

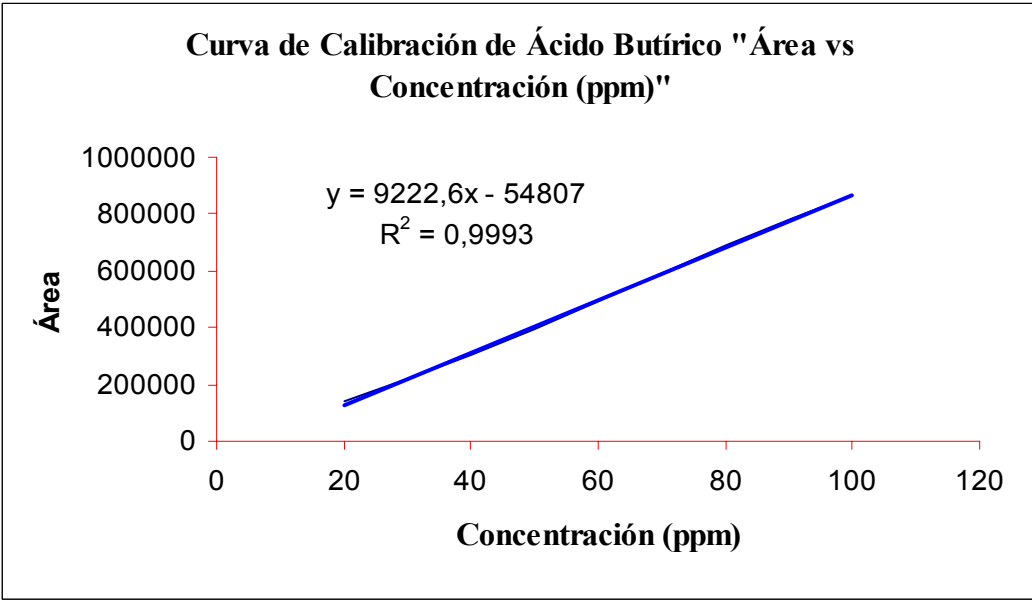
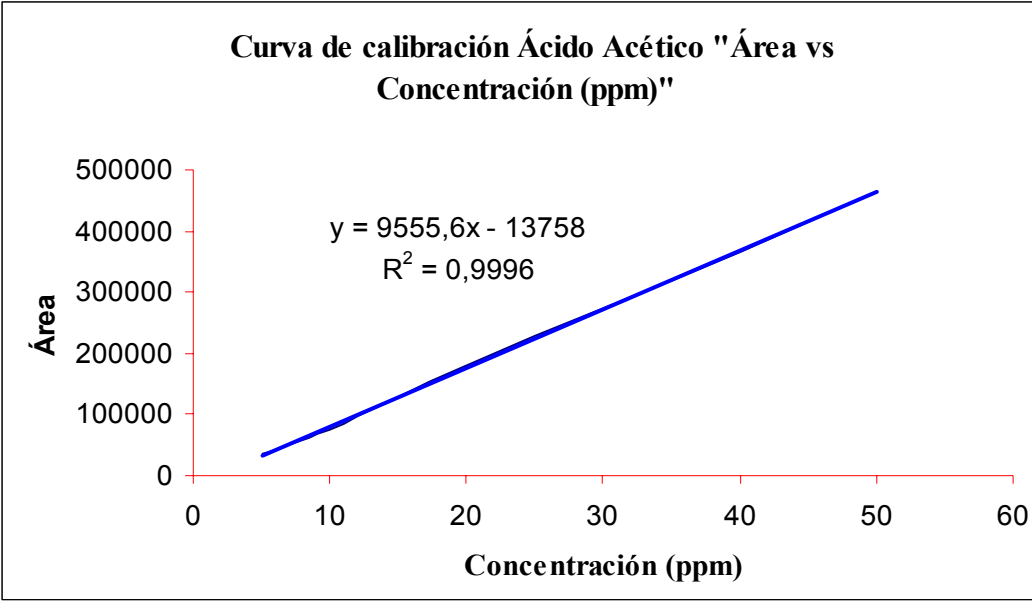
(37) Torija MMJ. 2002. Ecología de levaduras selección y adaptación a fermentaciones vinicas. Tesis Ph.D. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, España., 163-173 pp.

8. APÉNDICE

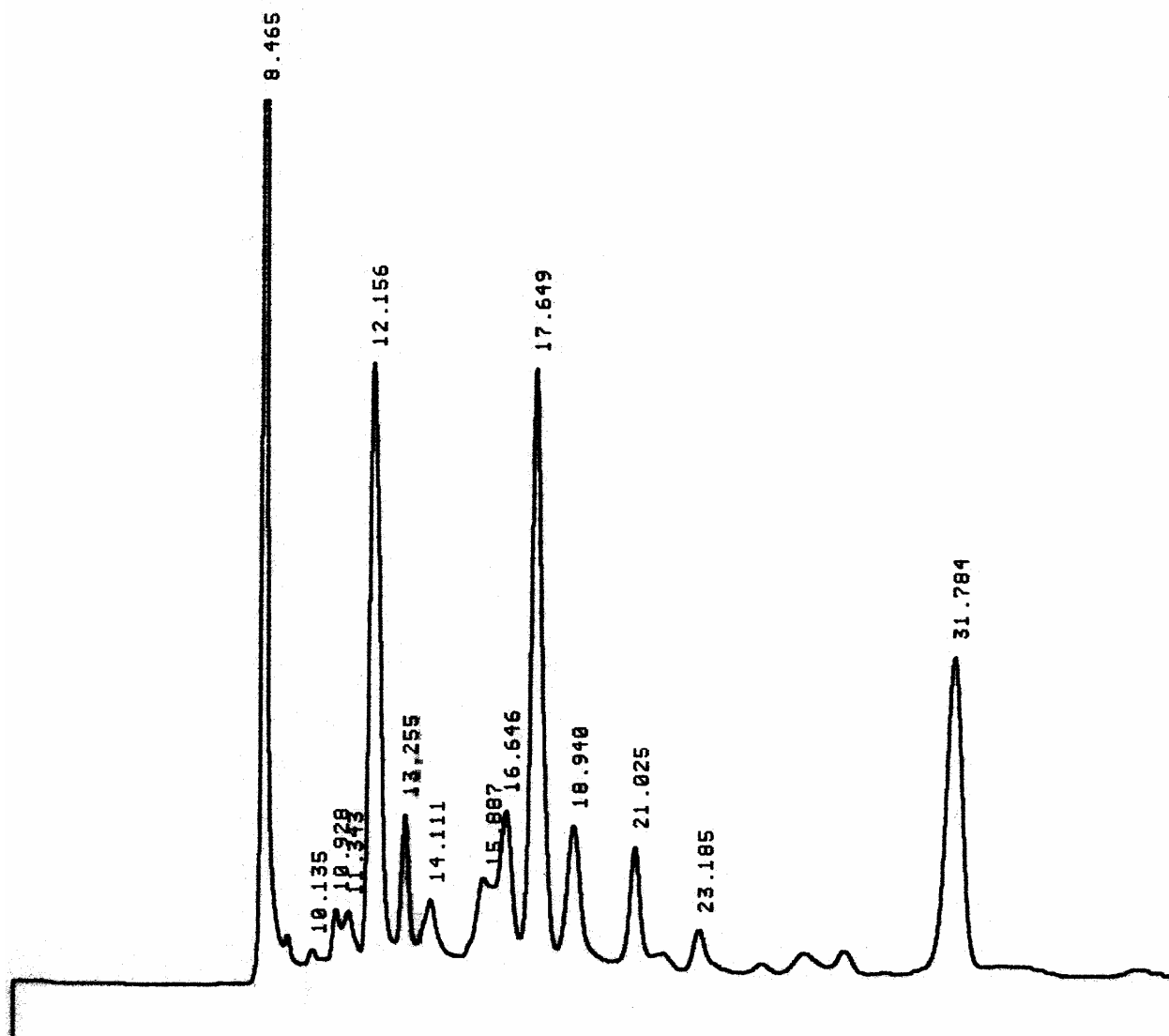
APÉNDICE 1



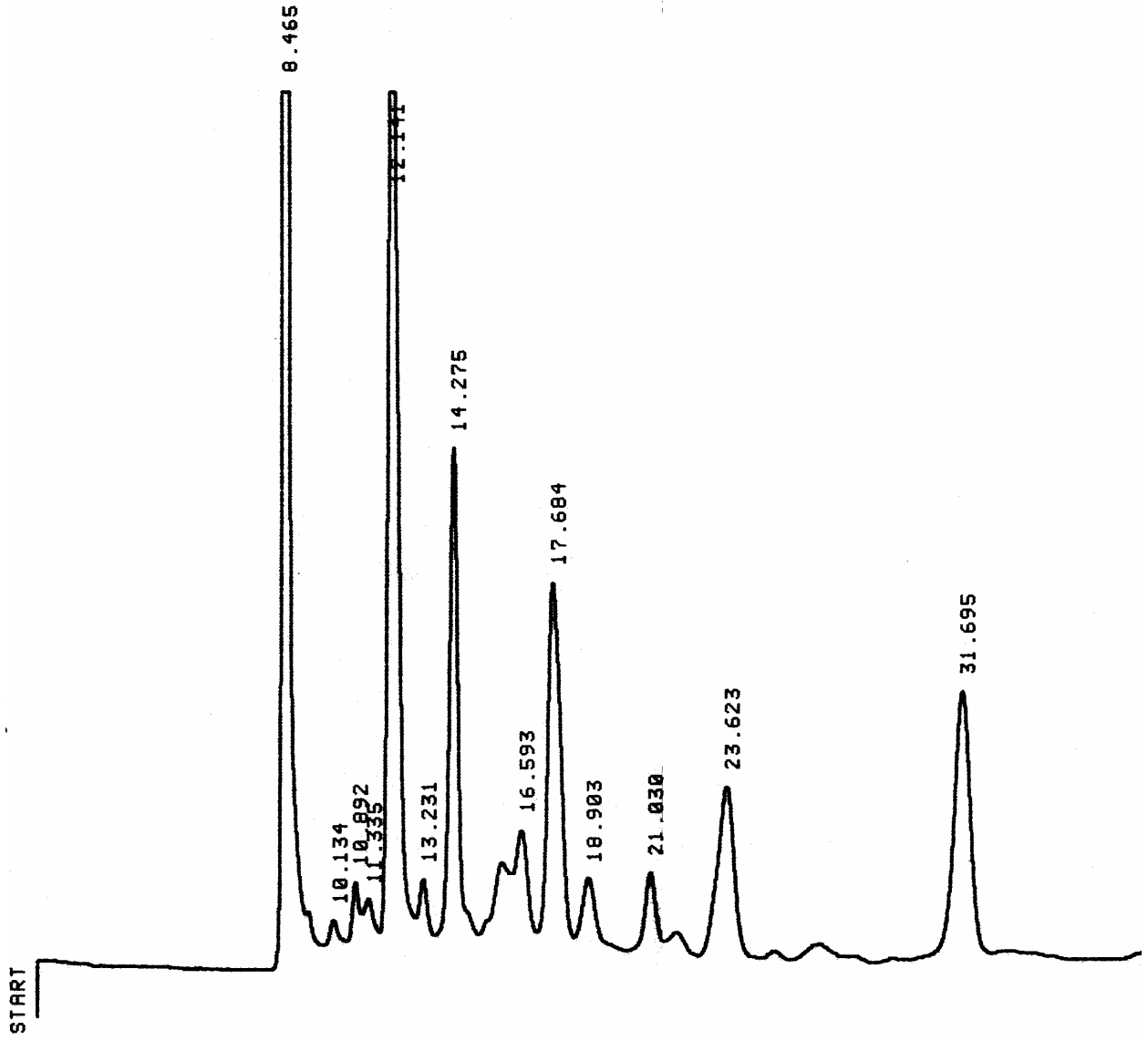




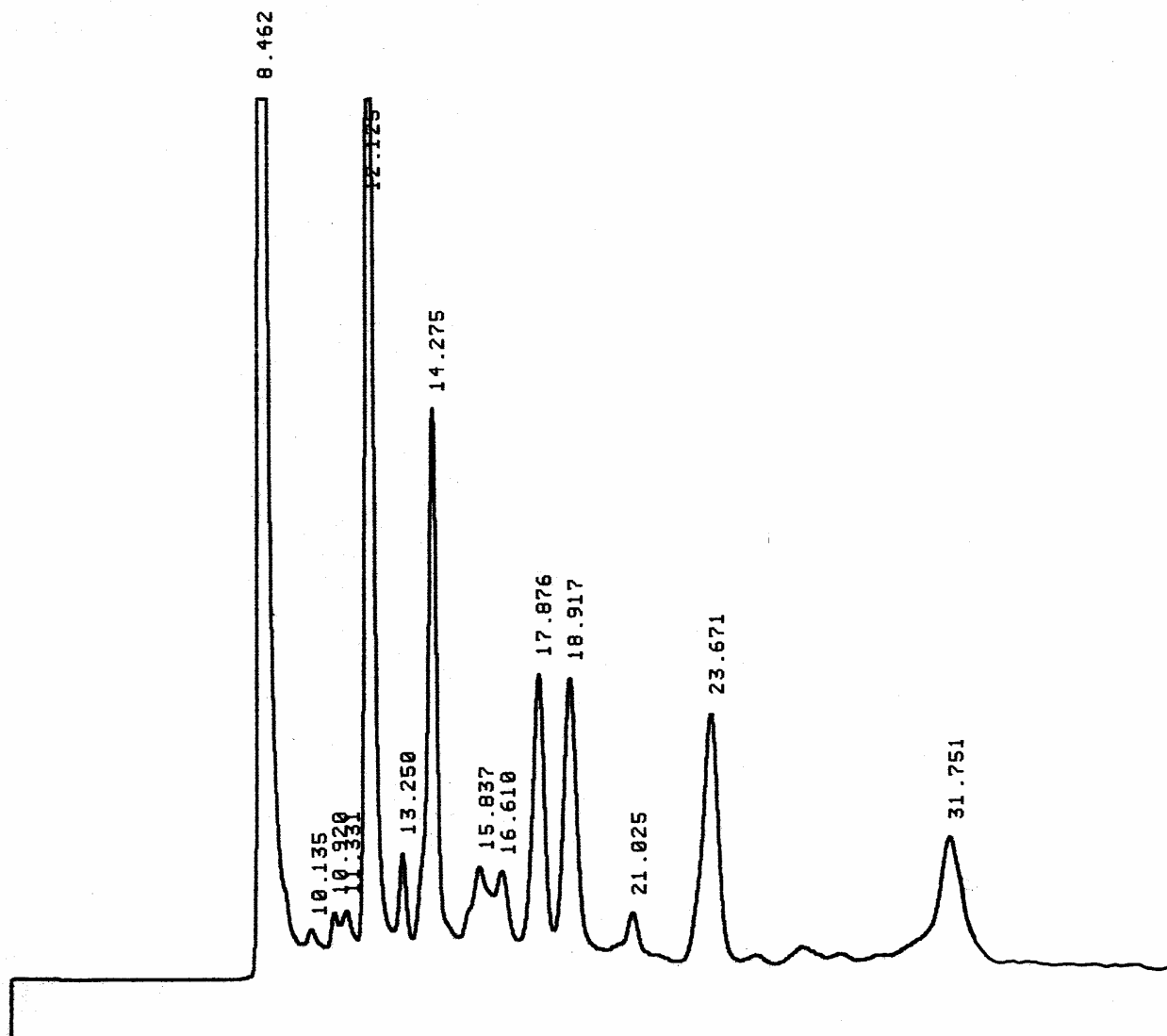
APÉNDICE 2



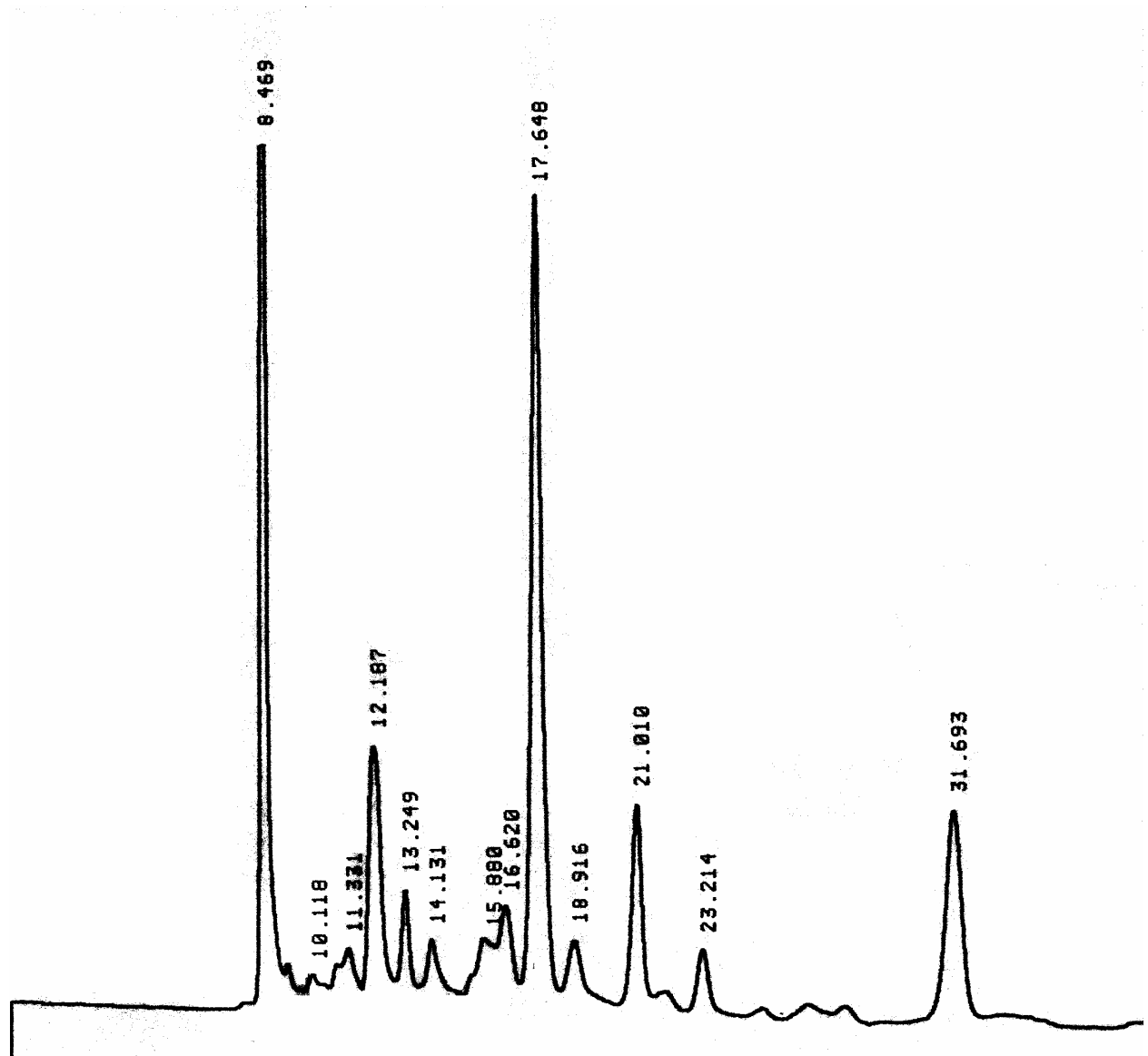
Cromatograma de HPLC de la muestra de vino de piña sin pasteurizar elaborado con la levadura Montrachet.



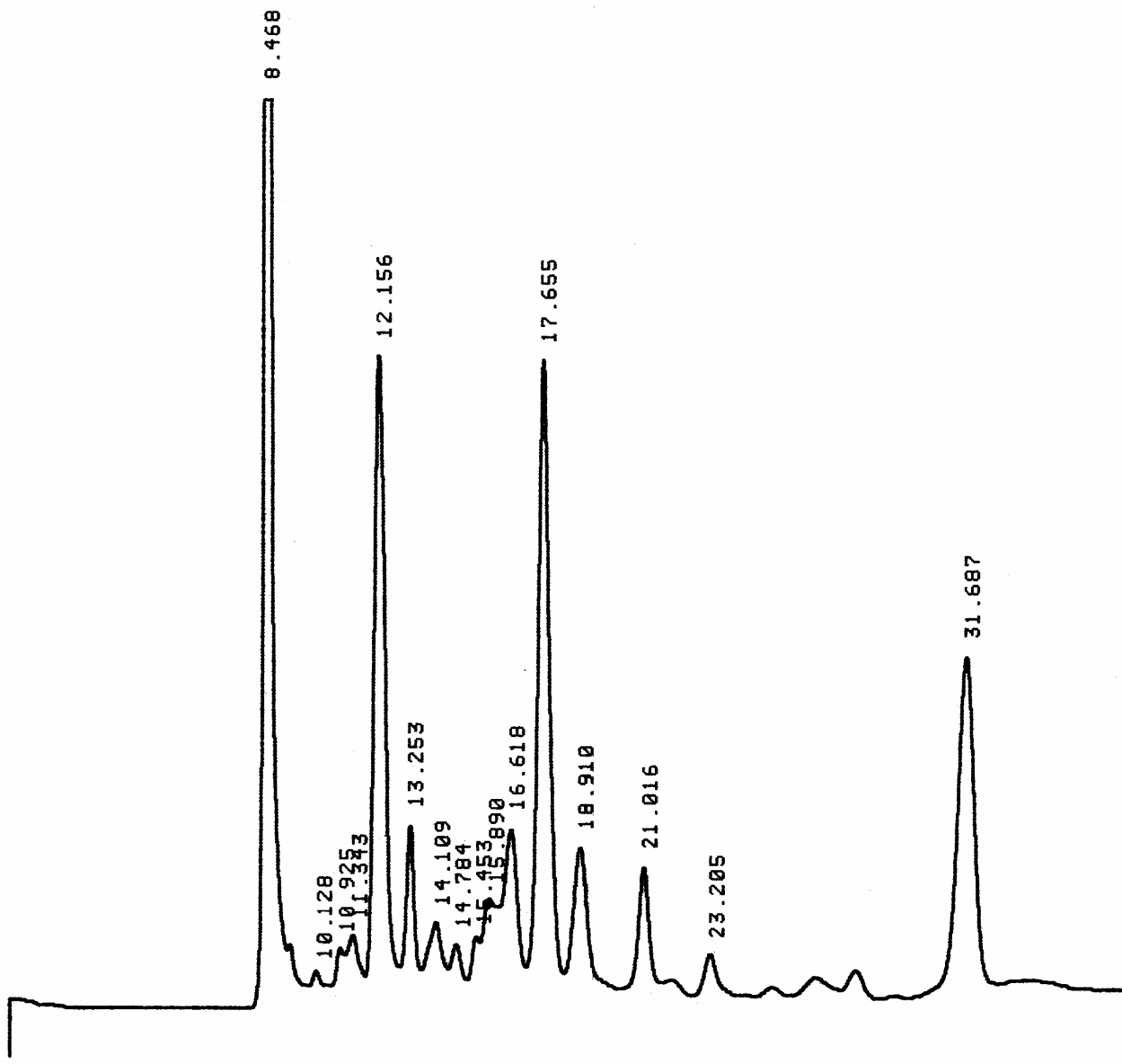
Cromatograma de HPLC de la muestra de vino de piña sin pasteurizar elaborado con la levadura K1-V1116.



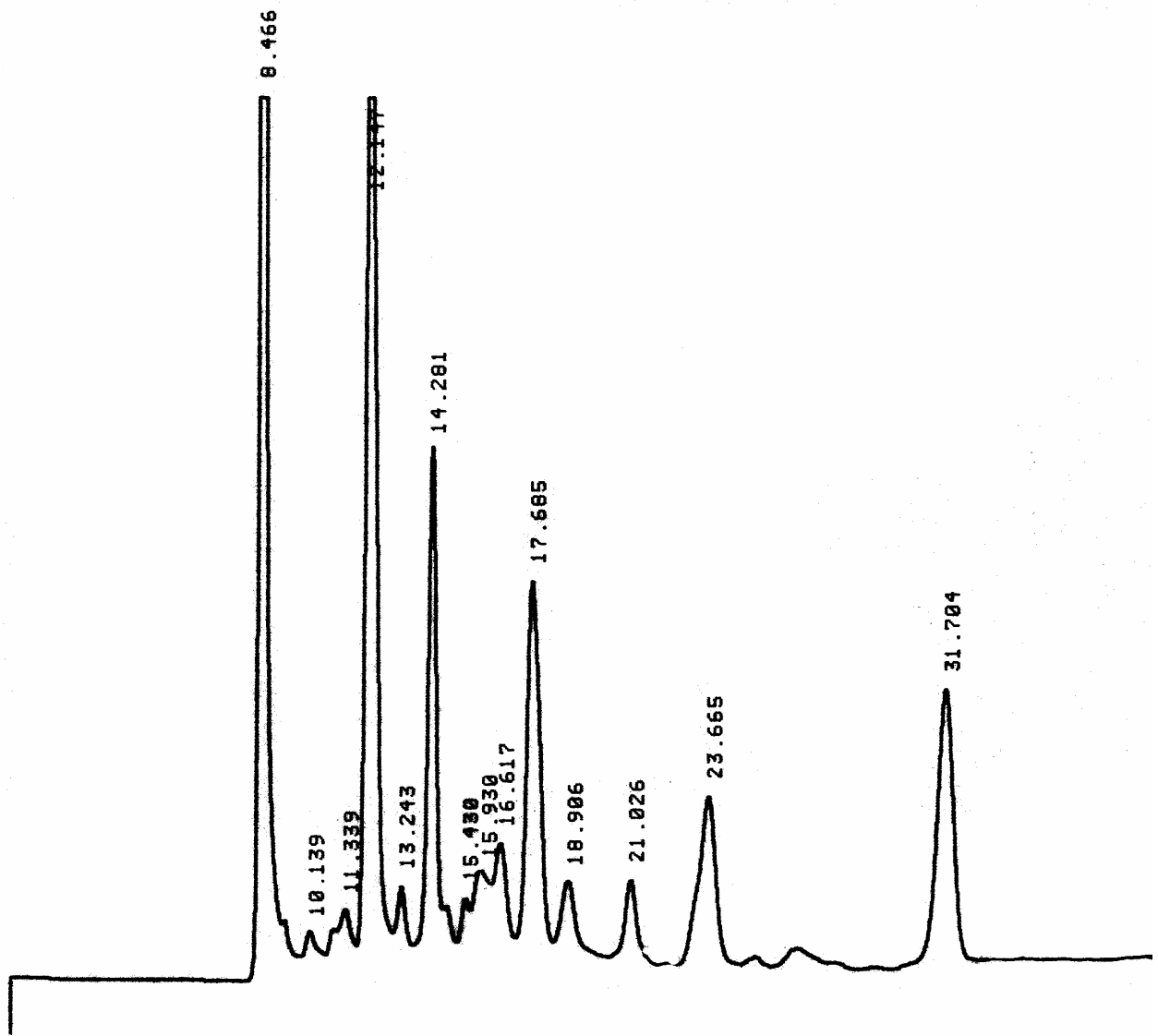
Cromatograma de HPLC de la muestra de vino de piña sin pasteurizar elaborado con la levadura 71B-1122.



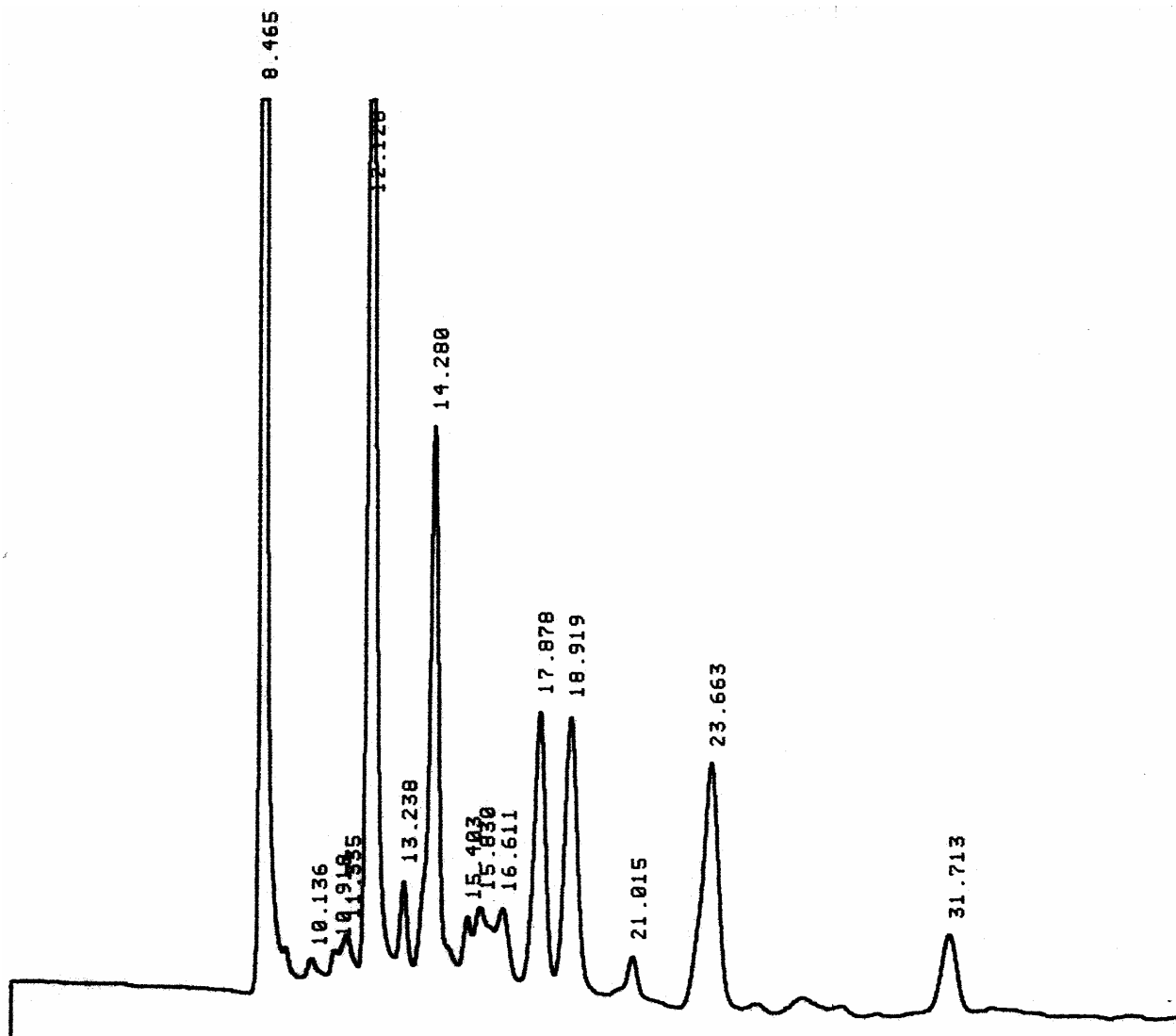
Cromatograma de HPLC de la muestra de vino de piña sin pasteurizar elaborado con la levadura IVC-GRE.



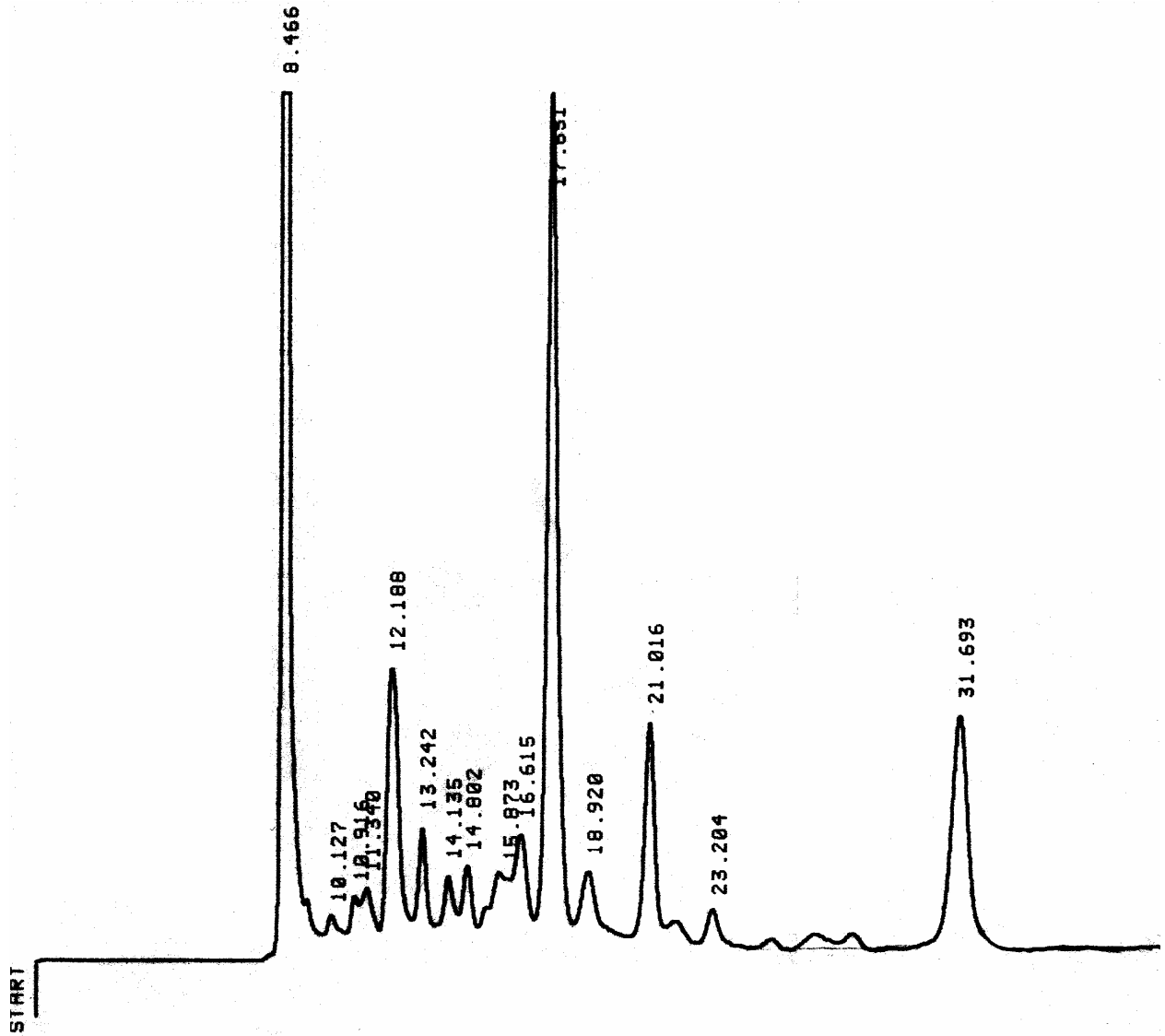
Cromatograma de HPLC de la muestra de vino de piña pasteurizado elaborado con la levadura Montrachet.



Cromatograma de HPLC de la muestra de vino de piña pasteurizado elaborado con la levadura K1-V1116



Cromatograma de HPLC de la muestra de vino de piña pasteurizado elaborado con la levadura 71B-1122.



Cromatograma de HPLC de la muestra de vino de piña pasteurizado elaborado con la levadura IVC-GRE.