UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE:

INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

MODELADO DEL CRECIMIENTO DE DOS LEVADURAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA UVA VARIEDAD BORGOÑA (*VITIS LABRUSCA L.)* A DIFERENTES TEMPERATURAS, NITRÓGENOS FÁCILMENTE ASIMILABLE Y DIÓXIDO DE AZUFRE

TESIS

PRESENTADO POR:

BACH: ALDO EDHUAR, BARRA MAMANI

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

MOQUEGUA - PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

REGISTRO N°.....007.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN

Los miembros del Jurado que suscriben, reunidos para evaluar la sustentación de tesis presentada por: Aldo Edhuar Barra Mamani,
denominada: Modelado del Crecimiento de dos levaduras comerciales durante la fermentación de la uva variedad Borgoña a diferentes temperaturas, Nitrogenos fasimonte y dioxido de azufre para cumplir con uno de los requisitos para optar el título profesional de INGENIERO AGROINDUSTRIAL.

Teniendo en consideración los méritos del referido trabajo así como los conocimientos demostrados por el sustentante, se declara la tesis como:

Aprobado

Con la nota de : Doce

Calificativo de : Regular

En consecuencia de todos los actuados el Tesista queda apto para poder recibir el título profesional de INGENIERO AGROINDUSTRIAL, de conformidad con lo establecido en el reglamento de grados y títulos de la Universidad Nacional de Moquegua.

Moquegua 13 de Setiembre del 2018

M.Sc. Mario R. Cotacallapa S.
PRESIDENTE DE JURADO

M. Sc. César Nan Almeyda.
PRIMER MIEMBRO DE JURADO

Ing. Yeison Quille Quille
SEGUNDO MIEMBRO DE JURADO

DEDICATORIA

A aquellos que creyeron en apostar al prójimo. Ayudar, persuadir y conseguir logros. Con el enorme objetivo de tener en mente la idea humanitaria, que uno crea, pero dos a más forjaran mejor el horizonte. Y a ti por leer esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA y a la escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial, por haberme brindado la oportunidad de acceder a muchos conocimientos compartidos de nuestros docentes.

A MI ASESOR Y CO – ASESORES DE TESIS, Ing. Jerónimo Martin Sarco Burgos, Mg. Nilton Cesar Leon Calvo, Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina, por compartir sus conocimientos en el desarrollo de esta tesis.

A MI COMITÉ REVISOR DE TESIS, Ing. M. Sc. Mario Roger Cotacallapa Sucapuca, Ing. Mg. Cesar Augusto Napa Ameyda, Ing. Lenin Quille Quille por enriquecer la presentación del informe final de esta tesis.

A MIS AMIGOS DE LA UNIVERSIDAD JORGE BASADRE GROHMANM, Por el apoyo en la realización de este proyecto.

¡Muchas Gracias!

RESUMEN

El modelado del crecimiento de dos levaduras comerciales durante la fermentación de la uva de variedad Borgoña (*Vitis labrusca L*) a diferentes temperaturas, nitrógenos fácilmente asimilable y dióxido de azufre, contribuirá a la estandarización del proceso de elaboración del vino, en la ciudad de Moquegua, para lo cual se determinó la temperatura, cantidad de nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre que permitió el mejor desarrollo de los microorganismos en relación al tiempo y ajustar al modelo matemático (Modelo Gompertz), los datos obtenidos en la etapa de fermentación de uva y el comportamiento del crecimiento microbiano (levaduras), son apropiados para la simulación del estudio experimental, para lo cual se utilizó biorreactores, controlando temperaturas de; 22, 26 y 30 °C, con adición de nitrógeno fácilmente asimilable; 140, 160 y 180 g/hL y adición de dióxido de azufre; 5, 7.5 y 10 g/hL , en las levaduras fermol rouge, fermol associees. Teniendo Las condiciones adecuadas para el crecimiento microbiano de tiempo igual a 30 horas, temperatura de 30 °C, nitrógeno fácilmente asimilable (160 g/hL), dióxido de azufre (5 g/hL) para ambas levaduras, el modelo matemático; LEVADURA = a*Exp [-Exp(b-c*T)] permitió ajustar los resultados obtenidos para su simulación en las fases de adaptación, logarítmica y estacionaria en la etapa de fermentación de la uva, se encontró que el factor de temperatura a 30 °C, factor dióxido de 5 g/hL son significativos en tanto el factor Nitrógeno (p-valor=0.5853) no es significativo, para el crecimiento de microorganismos en Conclusión, el tratamiento número 6 de ambas levaduras permite la estandarización del proceso de elaboración del vino generando beneficios favorables para el productor frente al mercado.

Palabras claves: fermentación, microorganismos, modelado Gompertz.

ABSTRACT

The modeling of the growth of two commercial yeasts during the fermentation of the Burgundy grape variety (Vitis labrusca L) at different temperatures, easily assimilable nitrogens and sulfur dioxide, will contribute to the standardization of the winemaking process in the Moquegua city. Determine the control parameters to adjust to the mathematical model (Gompertz Model), the data obtained in the grape fermentation stage and simulate the behavior of microbial growth (yeast), for the experimental study bioreactors were used, controlling temperatures of; 22, 26 and 30 degrees centigrade, with the addition of easily assimilable nitrogen; 140, 160 and 180 grams per Hectoliter and addition of sulfur dioxide; 5, 7.5 and 10 grams per Hectoliter, in the two yeasts respectively. The appropriate conditions for microbial growth are: time equal to 30 hours, temperature of 30 degrees Celsius, easily assimilable nitrogen = 160 grams per Hectoliter, sulfur dioxide 5 grams per Hectoliter for both yeasts fermol rouge, fermol asoccies, the mathematical model; LEVADURA = a*Exp [-Exp(b-c*T)], Tallows to adjust the results obtained for its simulation in the phases of adaptation, logarithmic and stationary in the stage of fermentation of the grape, it was found that the temperature factor at 30 degrees centigrade, bisulphite factor of 5 grams per Hectoliter are significant in that the factor Nitrogen (p-value = 0.5853) is not significant, for the growth of microorganisms. In Conclusion, the treatment number 6 of both yeasts allows the wine to be standardized. generating favorable benefits for the producer against the market.

Keywords: fermentation, microorganisms, Gompertz modeling.

ÍNDICE

DEDICATORIA iii

AGRADECIMIENTOS iv

RESUMEN v

ABSTRACT vi

ÍNDICE vii

ÍNDICE DE TABLAS xii

ÍNDICE DE FIGURAS xiii

INTRODUCCIÓN 16

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 17

1.1. Problema principal 18

1.2. Problemas secundarios 18

1.3. Justificación 19

1.4. Objetivos 20

1.4.1. Objetivo general 20

1.4.2. Objetivos específicos 20

1.5. Hipótesis 21

1.5.1. Hipótesis general 21

1.5.2. Hipótesis específicos 21

II. MARCO TEÓRICO 22

2.1. Antecedentes 22

2.2. Definición de Borgoña 26

2.2.1. Morfología y organografía 26

2.2.2. Composición química de la uva 28

2.3. Vino 29

2.3.1. Antecedentes históricos a nivel mundial 30

2.4. Crecimiento microbiano 31

2.4.1. Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) 32

2.4.2. Nutrición de levaduras 35

2.4.3. Ciclo de vida y reproducción 36

2.5. Crecimiento microbiano en la industria 37

2.6. Parámetros cinéticos de crecimiento microbiano 38

2.6.1. Tiempo de latencia 38

2.6.2. Tiempo de generación 40

2.6.3. Velocidad de crecimiento 41

2.6.4. Fermentación alcohólica 41

2.7. Factores que afectan a la fermentación 44

2.7.1. Composición del mosto 44

2.7.2. Composición química 44

2.7.3. Nitrógeno fácilmente asimilable 45

2.7.4. Dióxido de azufre 45
2.7.5. Temperatura 46
2.7.6. Acidez 46
2.7.7. Potencial de hidrógeno 47
2.8. Concepto histórico de la microbiología predictiva 47
2.9. Métodos basados en la técnica de PCR 48
2.10. Clasificación de los modelos predictivos 48
2.10.1. Modelos primarios 49
2.10.2. Modelos secundarios 55
2.10.3. Modelos terciarios 57
2.11. Construcción de modelo 58
2.11.1. Selección de cepa de microorganismos 58
2.11.2. Generación de datos 58
2.11.3. Método de recuento total en placa 59
2.12. Descripción matemática del modelo 59
2.12.1. Bondad de ajuste y validación de modelos 60
2.13. Validación de modelo 61
2.14. Definición de términos 62
2.15. Adaptación de microorganismos 62
2.16. Levaduras 63

2.17. Unidad formadora de colonia (UFC) 63

III. MARCO METODOLÓGICO 64

3.1. Lugar de ejecución 64

3.2. Tipo y diseño 65

3.3. Nivel de investigación 65

3.4. Operacionalización de variables 65

3.4.1. Variables independientes temperatura en centígrados 65

3.4.2. Variables dependientes indicadores..... 65

3.5. Materiales y equipos 66

3.5.1. Materiales de laboratorio (material de vidrio pírex) 66

3.5.2. Equipos 66

3.5.3. Materiales..... 68

3.5.4. Insumos y reactivos..... 69

3.6. Población y muestra 69

3.6.1. Población 69

3.6.2. Muestra 70

3.6.3. Análisis inicial del mosto experimentado..... 70

3.7. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos 71

3.7.1. Metodología experimental del crecimiento de microorganismos 71

3.8. Método y técnicas para la presentación y análisis de datos 74

3.8.1. Método para la siembra de microorganismos 74

3.9. Método para el análisis del tiempo de crecimiento microbiano (levadura) 74

3.9.1. Etapas de crecimiento de S*accharomyces cerevisiae* 75

Fuente: Elaboración propia, 2017..... 76

3.10. Método para determinar crecimiento microbiano y simulación ... 76

3.10.1. Ajuste y validación al modelo matemático..... 76

3.10.2. Modelo matemático..... 76

Gompertz modificado 76

3.10.3. Análisis de tratamientos con respecto al tiempo de levadura 77

3.11. Diseño experimental y análisis de datos..... 77

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES..... 79

4.1. Parámetros, de temperatura, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre en la fermentación..... 79

4.1.1. Levadura fermol rouge 81

4.1.2. Levadura fermol associees 83

4.1.3. Analizando por tipo de levadura..... 84

4.2. Ajuste de la fermentación de la uva (*Vitis labrusca L.*) al modelo matemático (Gompertz)..... 90

4.2.1. Para la levadura fermol rouge 90

4.2.2. Para la levadura fermol associees 93

4.3. Crecimiento de levaduras con los parámetros obtenidos de la fermentación de uva. 97

4.3.1. Tipo de levadura 1 fermol rouge 97

4.3.2. Tipo de levadura 2 fermol associees. 99

V. CONCLUSIONES 101

VI. RECOMENDACIONES 103

VII. BIBLIOGRAFÍA 104

ANEXOS 110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las especies actualmente existentes dentro del género Vitis 28

Tabla 2. Composición química de la vid (*Vitis vinífera*) 29

Tabla 3. Clasificación de algunos modelos utilizados. 49

Tabla 4. Análisis inicial del mosto experimentado 71

Tabla 5. Tratamientos ajustados con Box Ben ken 74

Tabla 6. Faces de crecimiento 76

Tabla 7. Comparación múltiple según tratamientos, levadura tipo 1 81

Tabla 8. Comparación múltiple según tratamientos, levadura tipo 2 83

Tabla 9. Tratamiento 6 datos modelo Gompertz 91

Tabla 10. Tratamiento 9 datos modelo Gompertz 92

Tabla 11. Tratamiento 3 datos modelo Gompertz 94

Tabla 12. Tratamiento 6 datos modelo Gompertz 95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae* 37

Figura 2. Representación gráfica de la ecuación de Gompertz 53

Figura 3. Esquema experimental del crecimiento microbiano. 73

Figura 4. Tratamiento 6 simulación de modelo Gompertz. 97

Figura 5. Tratamiento 9 simulación de modelo Gompertz. 98

Figura 6. Tratamiento 3 simulación de modelo Gompertz. 99

Figura 7. Tratamiento 6 simulación del modelo Gompertz. 100

ABREVIATURA

RNA, ARN	Ácido Ribonucleico
DNA, ADN	Ácido Desoxirribonucleico
GCAT	En conjunto son Cebadores
GC	Guanina, Citosina
AT	Adenina, Timina
SO_2	Dióxido de Azufre
O.I.V.	Oficina Internacional de la Vid y del Vino
pH	Potencial de Hidrogeno
PCR	Polymerase Chain Reaction.
UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
μ_m	La Velocidad de Crecimiento
λ	Fase de Adaptación
µm	Tasa de Crecimiento Exponencial
tg	Tiempo de Generación
RTP	Recuento Total en Placa
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
MSE	Mean squared error
Bf	Denominados Factor Sesgo
Af	Factor Exactitud
g/hL	Gramos por Hectolitro

g	Gramos
kg	Kilógramos
hL	Hectolitros
ATP	Adenosín de trifosfato
mg	Miligramos
ISO	Sistema de gestión de calidad
MSE	Mean squared error
SSQ	Suma de cuadrados
SD	Desviación estándar
mL	Mililitros
CO_2	Dióxido de oxigeno
aW	Actividad de agua
Cº	Grados centígrados
Log	Logaritmo
Ln	Logaritmo natural

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación es determinar el crecimiento microbiano en la etapa de fermentación del mosto de uva en la elaboración del vino, describiendo únicamente en la variedad Borgoña (*Vitis labrusca L.).*

El crecimiento de microorganismos (levadura), tiene etapas de adaptación, la cual es típicamente observada como la respuesta retardada de la población microbiana ante un repentino cambio en el ambiente (Swinnem, 2004). El tiempo de generación; es el tiempo necesario para duplicar la población microbiana (Stanier., 1989) lo cual también puede ser medido como un incremento en masa microbiana. En este contexto, la velocidad de crecimiento se define como el cambio en número de células o masa celular por unidad de tiempo (Madigan, 1999) o la etapa estacionaria.

El modelo de Gompertz de tres parámetros, se considera los modelos de Gompertz y Logístico, modificados por Gibson, como los mejores para modelar y predecir el crecimiento del microorganismo en estudio.

Para analizar el trabajo de investigación modelado del crecimiento de dos levaduras comerciales durante la fermentación de la uva variedad Borgoña (*Vitis labrusca L.)* a diferentes temperaturas, nitrógenos fácilmente asimilable y dióxido de azufre, es necesario resolver el problema de estandarización del proceso de elaboración del vino, en la región Moquegua. Determinando parámetros de control, aplicado en una etapa crítica lo cual se desarrolla en el contenido del trabajo.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las actividades económicas más importantes del productor de la Región de Moquegua es la producción de vid y derivados, en la actualidad no se cuenta con un producto de calidad para satisfacer al consumidor nacional e internacional que cada vez es más exigente; las microempresas y pequeñas empresas dedicadas a la producción de vinos encuentran dificultades de estandarización de parámetros como la temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable, dióxido de azufre, en la fermentación de uva que trae consecuencias negativas en la aceptabilidad del producto final; por otro lado la presencia de vinos nacionales desplazan del mercado a vinos producidos en la Región Moquegua.

La uva ha sido estudiada desde un punto de vista fisiológico, biológico, microbiológico, pero aún no se estudió el comportamiento de las levaduras más utilizadas en la fermentación de la uva, mediante parámetros controlados de tiempo, temperatura, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre ajustado a un modelo matemático para la estandarización del proceso de fermentación de uva lo cual es un proceso unitario, donde el vino adquiere las características organolépticas y de tipicidad.

Así mismo en todas las técnicas de vinificación requieren parámetros óptimos que deben ser controlados como tiempo, temperatura, nitrógeno

fácilmente asimilable y dióxido de azufre que son indispensables reconocer dichos parámetros en la etapa de fermentación para obtener vino de calidad en la Región Moquegua.

1.1. Problema principal

¿De qué manera el modelado del crecimiento de dos levaduras comerciales (*Saccharomyces cerevisiae L.)* durante la fermentación de la uva variedad Borgoña (*Vitis labrusca L.*) determinan los parámetros (temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), en el vino?

1.2. Problemas secundarios

- ¿Cuál de los parámetros (temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), determina significativamente la calidad de vino en la etapa de fermentación de uva variedad Borgoña?
- ¿De qué manera el modelo matemático se aproxima al mejor ajuste durante el crecimiento de dos levaduras comerciales *(Saccharomyces cerevisiae L.)* en la fermentación de uva?
- ¿Cuál será el comportamiento grafico del crecimiento microbiano con parámetros controlados durante la fermentación de uva?

1.3. Justificación

El consumo moderado de vino aporta beneficios a la salud de los consumidores, como efecto cardioprotector, efectos preventivos para la arteriosclerosis y el cáncer, como parte de la dieta en la alimentación diaria. La producción de vino se mostró como una alternativa de industrialización, lo cual permitió aprovechar la producción de la materia prima que tiene mayor productividad y uso en la industria, con la adición de dióxido de azufre para garantizar el crecimiento de la levaduras comerciales e inhibir microorganismos ajenas a la investigación, presentes en la vaya de la uva, y externos a la fermentación, al mismo tiempo el nitrógeno fácilmente asimilable como nutriente para el consumo de los microorganismos, para la adaptación e inicio del crecimiento microbiano, y de este modo acrecentar el valor agregado del producto en el mercado, brindando diferente opción de generar ingresos económicos a los productores.

Esta investigación da la opción de adquirir conocimientos sobre la elaboración del vino y condiciones óptimas de desarrollo de microorganismos, es decir, (temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), en dos levaduras comerciales en la fermentación del mosto de uva.

Desde el punto de vista técnico, el estudio trata de determinar el tiempo adecuado de fermentación con temperaturas, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre como variable de respuesta en la obtención de vino, mediante la aplicación del modelo matemático Gompertz en la etapa de fermentación.

Desde el punto de vista social, la determinación del parámetro controlado en la fermentación del mosto contribuirá a la obtención de un vino de buena calidad para el público consumidor.

Desde el punto de vista económico, al obtener vinos mediante un control adecuado de los parámetros mencionados permitirá mejorar las ventas de los productores de vino de la Región de Moquegua.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Modelar el crecimiento de dos levaduras comerciales (*Saccharomyces cerevisiae L.*) durante la fermentación de uva (*Vitis labrusca L.*), ajustar los parámetros (temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), del vino variedad Borgoña.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar los parámetros (temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), en la fermentación de uva variedad Borgoña.
- Ajustar al modelo matemático (Modelo Gompertz), los datos obtenidos en la etapa de fermentación de uva (*Vitis labrusca L.*).
- Simular el comportamiento del crecimiento de levaduras con los parámetros obtenidos de la fermentación de uva.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis general

- El modelado del crecimiento de dos levaduras comerciales (*Saccharomyces cerevisiae L*.) durante la fermentación de uva (*Vitis labrusca L*.), si permiten ajustar los parámetros de temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable, dióxido de azufre, del vino variedad Borgoña.

1.5.2. Hipótesis específicos

- Los parámetros (temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), si determinan la fermentación de uva variedad Borgoña.
- El modelo matemático (Modelo Gompertz), si ajusta con los datos obtenidos en la etapa de fermentación de uva (*Vitis vinífera L*.).
- La simulación del crecimiento de levaduras con parámetros obtenidos de la fermentación de uva si aproxima al modelo matemático en la obtención de vino.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

(Castro G. V., 2008) Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de Lactococcus lactis subsp. Lactis en la que muestran. La microbiología predictiva es una herramienta útil para describir y predecir el crecimiento bacteriano en los alimentos. Para comparar la aplicación de diferentes modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de Lactococcus lactis subsp. lactis, se analizaron muestras de leches tomadas del total del ordeño matutino de dos rebaños, bufalino (n=6) y vacuno (n=6), manejados bajo las mismas condiciones, ubicados en el municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. Se determinaron algunos parámetros, tales como pH, acidez titulable y presencia de inhibidores. Se preparó una serie de tubos de ensayo con leche esterilizada a 110 ± 2°C por 10 min. y se inocularon con Lactococcus a 1 x 102 UFC/mL. Posteriormente, fueron incubados a 36 ± 0,5°C y cada dos horas se prepararon diluciones y siembra en placas con agar M-17. Se determinó el Log 1 alpha de UFC/mL para las 0; 2; 4; 6; 8 y 10 horas de incubación. Se realizó un análisis de regresión con los modelos de Gompertz, Logístico, Stannard y Richards, por medio del algoritmo de Marquardt. Se encontró similitud en el ajuste de los modelos aplicados. Los modelos de Stannard y Richards resultaron ser iguales en la estimación de los datos y fueron los que presentaron mayor dificultad

para alcanzar el criterio de convergencia. El modelo de Gompertz de tres parámetros presentó diferencia significativa con los modelos de cuatro parámetros. Se considera los modelos de Gompertz y Logístico (con cuatro parámetros), modificados por Gibson, como los mejores para modelar y predecir el crecimiento del microorganismo en estudio.

(Valbuena, 2009) El Lactococcus lactis subsp. Lactis es una bacteria ácido-láctica muy utilizada como cultivo iniciador principalmente en quesos madurados, capaz de producir algunas bacteriocinas, entre estas la nisina, por lo cual su uso como preservador es importante. En el presente trabajo se utilizaron modelos cinéticos con el objeto de describir el crecimiento de este microorganismo en leche en polvo reconstituida, con los cuales es posible predecir su dinámica dentro del rango de temperatura estudiado, entre 9 y 39° C. Se utilizó la ecuación de Gompertz con cuatro parámetros de regresión para modelar cada una de las curvas de crecimiento obtenidas experimentalmente. Como resultado de este proceso, se obtuvieron los parámetros necesarios para calcular la fase de adaptación (i), tasa de crecimiento exponencial (μm) y el tiempo de generación (Tg). Estos parámetros microbiológicos fueron relacionados con la temperatura en un modelo secundario, en el cual, la fase de adaptación y el tiempo de generación fueron bien ajustados utilizando una ecuación hiperbólica, obteniendo un R^2 = 0,922 y 0,991 respectivamente, mientras que la tasa de crecimiento se modeló utilizando la ecuación de la raíz cuadrada (R^2 = 0,991). Se recomienda utilizar la metodología descrita para estudiar el

crecimiento de este microorganismo en quesos frescos, incluyendo en el modelo la cinética de producción de nisina.

(Rafaela, 2008) El objetivo del estudio fue modelar el crecimiento microbiano de *Escherichia coli* O157 en carne vacuna (hamburguesas) como parte de una evaluación cuantitativa de riesgos. Se seleccionaron artículos científicos que exponían de manera completa modelos predictivos de crecimiento del patógeno en carne en función de la temperatura y dos modelos predictivos terciarios. A partir de éstos se generaron datos sobre el tiempo de latencia y tasa de crecimiento en un rango de temperaturas (5°C a 34°C) y pH (5,6 – 6,5), obteniéndose la relación lineal entre cada parámetro y temperatura. Se incluyeron las ecuaciones lineales en distribuciones de probabilidad para cada parámetro y se corrió un modelo para analizar el comportamiento de las ecuaciones logarítmico-exponencial y Gompertz en la predicción del crecimiento de *E. coli* O157. La metodología expuesta permite incluir diferentes condiciones ambientales presentes en la carne a lo largo del proceso, considerando la variabilidad y las incertidumbres de los parámetros que caracterizan el crecimiento microbiano. Gompertz fue el modelo microbiológico que generó mejores resultados, ya que al considerar la concentración de bacterias que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, evita obtener valores extremadamente elevados.

(Esteve, 2001) Para seleccionar una cepa nativa y utilizarla como inóculo iniciador del proceso. Para este fin, primero llevaron a cabo una

caracterización genética mediante el análisis de los perfiles de restricción para el ADN, que les sirvió de ayuda a la hora de simplificar el número de aislamientos como posibles candidatos para ser seleccionados. Demostraron además que las cepas autóctonas seleccionadas son importantes contribuidoras a la fermentación del vino, y que están mejor adaptadas a las condiciones de la fermentación que las levaduras comerciales foráneas.

(Naumov, 2002) *Bayanus var uvarum* puede distinguirse de *S. cerevisiae* por su cariotipo electroforético ya que las cepas de la primera especie presentan dos bandas de tamaño molecular comprendido entre 245-370 kb frente a las tres que presentan las cepas de *S. cerevisiae*. Por otro lado, analizaron las poblaciones de levaduras relacionadas con tres regiones de Francia productoras de vino, poniendo de manifiesto que estas poblaciones variaron según el área estudiada y el tipo de vinificación realizada en cada una, cambiando la frecuencia de aparición de algunas cepas en una misma localidad de un año a otro. Además, mostraron la presencia de cepas de *S. bayanus var. uvarum* en las uvas de los viñedos, relacionando además estas cepas con fermentaciones llevadas a cabo a bajas temperaturas, como posteriormente también observaron en los vinos de Tokaj.

2.2. Definición de Borgoña

Cuando se habla de Borgoña, mal se estaría hablando de una variedad de uva, porque en realidad el nombre identifica a una Región vitivinícola de Francia ubicada al sureste de París, cuya capital es la ciudad de Dijón. Pero además de esta acepción, la palabra Borgoña también caracteriza a los estilos de vinos que se producen en esa región, así como cuando se habla de vinos Burdeos se hace referencia a los vinos elaborados con uvas y estilos propios de esa otra región francesa (Bordeaux en francés). Entonces, el vino que beben los peruanos con el nombre de “vino Borgoña” No es, por supuesto, de ninguna cepa que provenga de esa Región. Ni siquiera algún estilo. Lo que se bebe en el Perú con ese nombre es, en realidad, un vino elaborado con una cepa conocida en el mundo entero como “Isabella” (Chávez, 2011).

Mencionan que los principales productores y exportadores de ella son Brasil, Colombia, Uruguay, Perú, Argentina y Chile. A pesar de las pocas características vínicas de la uva Isabella *(Vitis labrusca L.)*, su bajo contenido de azúcares y su alta concentración de ácidos le otorgan el potencial para la elaboración de un vino que presenta sabores y aromas intensos. La combinación de color, aroma y sabor provoca la denominada textura del vino (Chávez, 2011).

2.2.1. Morfología y organografía

La planta de vid está compuesta por dos individuos, uno constituye el sistema radical (*Vitis spp*. del grupo americano, en su mayoría),

denominado patrón o porta injerto y, otro la parte aérea (*V. vinifera L.),* denominada púa o variedad. Esta última constituye, en el futuro; el tronco, los brazos y los pámpanos que portan las hojas, los racimos y las yemas. La unión entre ambas zonas se realiza a través del punto de injerto. El conjunto es lo que se conoce con el nombre de cepa (Toda., 2012).

La vid es una planta angiosperma, de la clase de las dicotiledóneas, subclase con flores más simples (choripetalae), pero en el grupo dotado de cáliz y corola (Dyalypetalae). Pertenece al orden Rhamnales, que son plantas leñosas de vida larga. Por ello, tiene un largo periodo juvenil (3-5 años), durante el cual no produce frutos. Las yemas que se forman durante un ciclo se abren hasta el siguiente, y son las encargadas de la producción (Infoagro, 2008). En la tabla 1 se resume la clasificación de las variedades más cultivadas en la actualidad, propuesta por Planchón (Salazar, 2005).

Tabla 1. Clasificación de las especies actualmente existentes dentro del género Vitis

TAXONOMÍA	ESPECIES	PROCEDENCIA
División: Espermatofitas		
Subdivisión: Angiospermas		
Clase: Dicotiledoneas		
Orden: Rhamnales		
Familia: Vitáceas		
Género: *Vitis*		
Subgénero: Euvitis (30 especies)	*Vitis vinifera L.*	Europeo-asiática
	Vitis silvestris	Europeo-asiática
	Vitis riparia	América
	Vitis labrusca	América
	Vitis rupestris	América
	Vitis berlandieri	América
Subgénero: Muscadinea (3 especies)	*Vitis rotundifolia*	América-México

Fuente: Adaptado de (Salazar, 2005)

2.2.2. Composición química de la uva

Uno de los atributos más importantes sobre la calidad de uvas tintas lo representa el color. Los compuestos involucrados en esta característica son atribuibles a los antocianos. La concentración y composición de estructuras antocianinas pueden ser utilizadas como atributos específicos en la caracterización de variedades, cepas o híbridos. De igual manera permite

que las híbridas presentan una gran resistencia a enfermedades y son más adaptables a suelos pobres que las variedades de *Vitis vinífera*, sin embargo, se han considerado de baja calidad cuando son utilizados en la confección de vinos, ya que producen cambios sensoriales en el almacenamiento (I. García, 2001).

Tabla 2. Composición química de la vid (*Vitis vinífera*)

COMPONENTE PARA 100g	**%**
Agua	70 - 78 %
• Azúcares	12 - 25 %
• Ác. orgánicos libres	0.3 - 0.6 %
• Ác. salificados	0.3 – 1.0 %
• Sustancias minerales	0.2 - 0.3 %
• Sust. Nitrogenadas	
(20 a 25 % del N del grano)	0.10%
• Pectinas en poca cantidad	0.05 - 0.1 %
• Pocas sustancias aromáticas	
• Pocos compuestos polis fenólicos	

Fuente: (Ebeler., 2001)

2.3. Vino

De un complejo proceso de biocatálisis en el que se encadenan distintos pasos hasta lograr un producto final. Empecemos tomando como materias

primas unas sales minerales y compuestos orgánicos del suelo, agua, y CO_2 atmosférico, fuente de energía, la luz solar, producto final el vino. En este proceso, hacen falta tres tipos de biocatalizadores imprescindibles para ello: la vid, los microorganismos y el hombre. En el presente número de la Revista vamos a recopilar distintos puntos de vista de investigadores españoles que nos van a acercar a la bioquímica de algunos de los procesos más importantes para la elaboración de vinos y derivados (Molecular, 2013).

2.3.1. Antecedentes históricos a nivel mundial

En la Península Ibérica, aunque existen pruebas de presencia de viñedos desde el III milenio a.C., manifestado por restos de pepitas encontrados en diversos yacimientos arqueológicos y otros estudios polínicos realizados, fueron probablemente los comerciantes fenicios quienes en los siglos IX a VIII a.C., introdujeron el vino y consecuentemente el cultivo de la vid, con los criterios que esencialmente hoy día continúan en vigor. Primero directamente desde los puertos fenicios de Asia y más tarde desde sus colonias avanzadas en Iberia o del norte de África (Cartago). En un principio el vino era importado por el propio consumo de la colonia fenicia y también con destino a las clases dirigentes locales. Una vez introducido el cultivo de vid en la Península Ibérica de la mano de los fenicios y pueblos helenos, la conquista de Iberia por los romanos supuso primero una continuidad en la producción de vino, que fundamentalmente se centraba en la zona costera del mar Mediterráneo y, en segundo lugar, una extensión de los

viñedos al resto del territorio y como consecuencia de la cultura romana que siempre era fiel compañera de sus conquistas. Las referencias sobre la vid y el vino en esta etapa de la historia, son numerosísimas y desde entonces en los países ibéricos la cultura del vino se consolidó como parte de la forma de vida de sus habitantes (Hidalgo, 2003).

Los romanos extendieron la cultura del vino, los métodos de cultivo de la vid y posiblemente también algunas variedades de vid durante su conquista por Europa. Estos hicieron avances vinícolas importantes, como la primera clasificación de variedades de vid, inventaron el barril de madera y sometían al vino a calor en habitaciones llenas de humo, lo que podría considerar como un procedimiento primitivo de pasteurización (Valencia, 2010).

2.4. Crecimiento microbiano

Una de las bases de la microbiología de alimentos es el estudio del crecimiento microbiano en función del medio que le rodea (el alimento). Cada uno de los factores intrínsecos de un alimento influye sobre el desarrollo microbiano y hace que favorezca el desarrollo de unos microorganismos en detrimento de otros. Teóricamente el gran número de factores que interviene podría ser cuantificado, por lo que se podría establecer si ese alimento en cuestión es o no un posible medio adecuado para que se desarrollen. Si consideramos la cantidad de alimentos diferentes que existen llegaríamos a la conclusión de que sería una tarea enorme recoger todos los datos sobre la relación de cada factor con cada

microorganismo (Buchanan, 1991). Por suerte los factores determinantes que predominan en el crecimiento de microorganismos son sólo unos pocos, entre los que destacan pH, aW y temperatura (Pooni y Mead., 1984). Esta es la base de la subdisciplina que se está desarrollando dentro de la microbiología de alimentos, la microbiología predictiva (Buchanan, 1991). La microbiología predictiva se basa en la premisa de que las respuestas de las poblaciones de microorganismos a los factores ambientales son reproducibles y de este modo es posible, desde observaciones realizadas, predecir las respuestas de esos microorganismos en otras condiciones similares (Ross T. M., 2000).

2.4.1. Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

Las levaduras son hongos unicelulares. Su nombre procede del verbo latino *levare* (levantar), debido al efecto característico producido en algunos sustratos sobre los que actúan, como por ejemplo la masa del pan. Pueden ser clasificadas dentro de dos grupos filogenéticos: levaduras ascomicetas (teleomórficas y anamórficas) y levaduras basidiomicetas (teleomórficas y anamórficas). La forma teleomórfica es la forma imperfecta de la levadura o forma asexual, mientras que la forma anamórfica es la forma perfecta o sexual. La especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* pertenece al grupo de los ascomicetos, que se caracterizan por encontrarse las esporas sexuales o ascosporas en el interior de una bolsa o asca (Fernández Espinar, 2000).

2.4.1.1. Estructura celular

La estructura celular de una levadura es bastante sencilla. Son los organismos eucariotas más primitivos, y por tanto presentan las estructuras típicas de este modelo de organización celular, aunque no tienen cloroplastos. Presentan una pared celular que cumple con varias funciones, sirve de protección y en ella se establecen enzimas de vital importancia para el organismo, muchas de ellas de carácter hidrolítico. Está formada en su mayor parte por polisacáridos, cuyos monómeros son principalmente glucosa, manosa, galactosa, xilosa y arabinosa, que aparecen estructurados de dos maneras, formando cadenas de orientación radial o helicoidal entre polisacáridos sensibles a hidrólisis ácida o alcalina, o formando capas orientadas de forma paralela a la superficie celular resistentes a hidrólisis ácida o alcalina. Otros componentes mayoritarios son las proteínas y lípidos, aparte de componentes minoritarios como la quitina (Kocková-Kratochvilová, 1990).

Un adecuado tratamiento de las células, utilizando mezclas de enzimas hidrolíticos procedentes de otros microorganismos en una solución estabilizada osmóticamente, permite la degradación total o parcial de la pared celular obteniéndose respectivamente protoplastos o esferoplastos. Estas estructuras se introdujeron a mediados del siglo XX como un nuevo modelo de investigación de hongos que permitía un fácil aislamiento de orgánulos y otros componentes celulares, así como el estudio detallado de la propia estructura de la pared. También han sido de vital importancia en estudios genéticos, ya que se ha logrado la fusión y la transformación de

protoplastos con material genético exógeno. Las levaduras poseen además mitocondrias. Una célula diploide de *S. cerevisiae* contiene de 15 a 29 mitocondrias, que ocupan alrededor del 12% del volumen celular (Kocková-Kratochvilová, 1990).

2.4.1.2. Constitución genética de las levaduras

El material genético de las levaduras se reparte entre el genoma nuclear, genoma mitocondrial y plásmidos citoplasmáticos. Además, pueden aparecer en el citoplasma dos moléculas de doble cadena de ARN que confieren a la levadura el llamado “factor killer” (Kocková-Kratochvilová, 1990).

2.4.1.3. Análisis de restricción del ADN mitocondrial

La utilidad de esta técnica reside en dos características del ADN mitocondrial: posee un alto polimorfismo intraespecífico, y es muy estable durante los procesos de multiplicación celular (Ribereau-Gayon, 2000). Esto hace que sea una de las técnicas más aplicadas para la caracterización de cepas *Saccharomyces cerevisiae* y de otras especies. El método se basa en la digestión del ADN con endonucleasas de restricción del tipo GCAT, que no reconocen las secuencias ricas en GC ni ricas en AT, típicas del ADN mitocondrial. El alto número de puntos de corte en el ADN nuclear con respecto al de la mitocondria, hace que se fraccione en trozos de pequeño tamaño que no interfieren en la visualización de las distintas bandas correspondientes al ADN mitocondrial, al separarlos por electroforesis, no todos los enzimas revelan el mismo grado de

polimorfismo y es muy dependiente de la especie. En el caso de *S. cerevisiae* los enzimas más apropiados para diferenciar a nivel de cepa son HinfI y HaeIII (Fernández Espinar, 2000).

2.4.2. Nutrición de levaduras

La célula es capaz de detectar la presencia de fuentes de nitrógeno más ricas. Esto desencadena una fuente de señales, que culmina con la activación de los genes implicados en el transporte y metabolismo de estas fuentes ricas y en la represión de aquellos genes implicados en el transporte y utilización de fuentes más pobres. Una vez consumidas las fuentes de nitrógeno más ricas (amonio, glutamina y esparraguina), la levadura activa la maquinaria metabólica para la utilización de las más pobres (arginina, glutamato, alanina, etc.), sin embargo, la importancia del nitrógeno no reside exclusivamente en ser necesario para la formación de biomasa, el contenido en nitrógeno también tiene una influencia clara sobre la velocidad fermentativa. La mayor parte de la fermentación alcohólica se produce en una fase de no proliferación celular o estacionaria. En este punto el nitrógeno del medio es utilizado para el recambio proteico de las diferentes enzimas celulares (ATP sintetasa, bomba de protones, transporte de azucares, etc.). Este contenido en nitrógeno tiene una influencia manifiesta en los diferentes metabolitos producidos durante la fermentación, muchos de ellos con un impacto muy claro en el aroma del vino, El nitrógeno es el substrato limitante del crecimiento celular hasta alcanzar valores cercanos a los 200 mg/L, aunque esto depende de la fuente de nitrógeno utilizada (Varela y cols, 2004).

2.4.3. Ciclo de vida y reproducción

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* tienen un ciclo de vida complejo, teniendo la capacidad para reproducirse como haploides o diploides y de formar zigotos entre células haploides. El tipo de reproducción es normalmente por brote o gemación mediante mitosis, que es un tipo de reproducción asexual. Bajo privación de nutrientes, durante la fase estacionaria, se induce la esporulación o reproducción sexual. Tras la meiosis, en una célula diploide se generan cuatro esporas haploides encapsuladas en un asca (ascosporas). Las esporas libres pueden entrar en un ciclo vegetativo haploide o bien formar un zigoto diploide mediante conjugación (Degre R. e., 1993).

Ciclo de vida y reproducción de microorganismos (levadura)

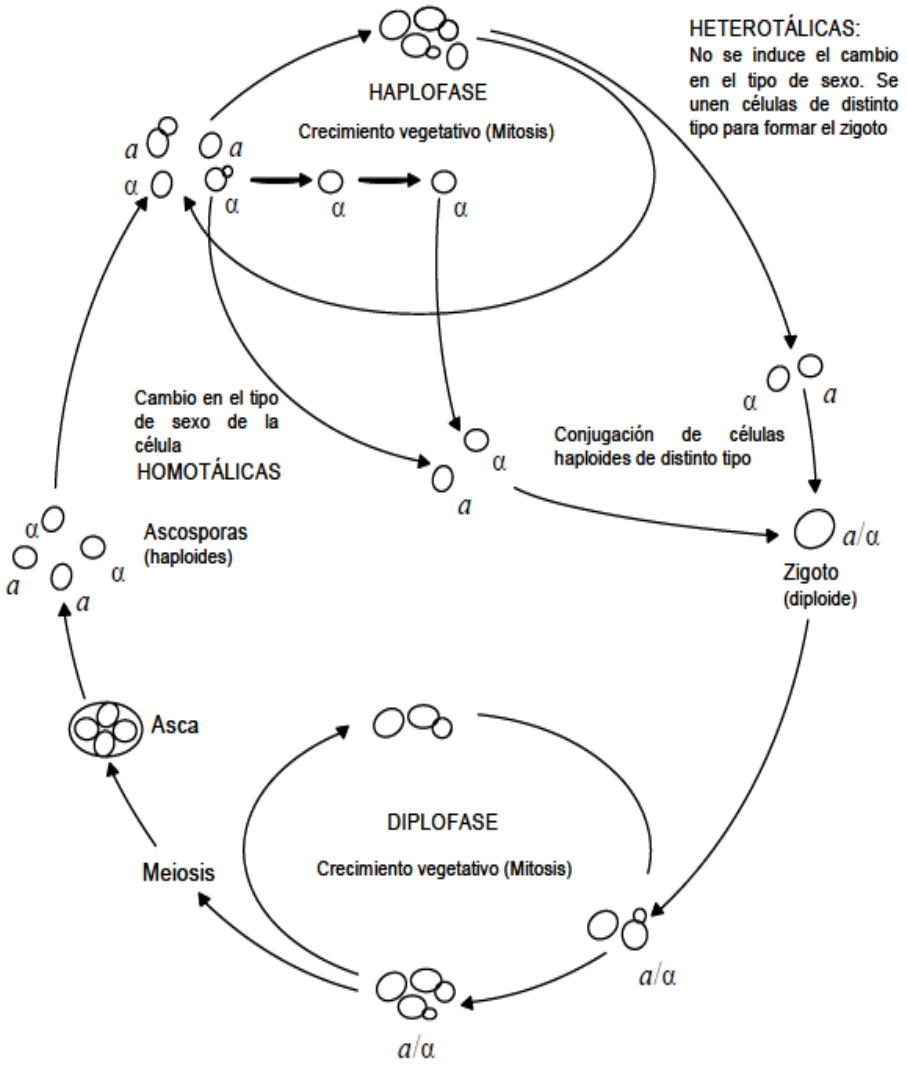


Figura 1. Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*. *a* y *α* hacen referencia a los alveolos que controlan los tipos sexuales (Degre R. e., 1993).

2.5. Crecimiento microbiano en la industria

Los microorganismos crecen o se multiplican cuando se exponen a un ambiente favorable, como el alimento. Su crecimiento se asocia a la descomposición de alimentos, las enfermedades de origen alimentario y el vio procesamiento de los mismos. El crecimiento también es importante

para aislar una cepa microbiana desconocida relacionada con la descomposición de los alimentos, las enfermedades transmitidas por ellos o en vio procesamiento de los alimentos, en una forma pura, y para estudiar sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas a fin de diseñar métodos para controlar y estimular su crecimiento en los alimentos, destruirlos, o mejorar su composición genética para su mejor uso (Ray & Bhunia, 2010).

En microbiología, la palabra “crecimiento” se define como un incremento en el número de células o de masa celular por unidad de tiempo de una población microbiana (Madigan, Brock Biology of Microorganisms., 1997). Si un microorganismo es cenocítico, es decir, multinucleado, en el que las divisiones nucleares no se acompañan de división es células, el crecimiento produce un incremento de tamaño, pero no del número de células. El crecimiento ocasiona un aumento del número de células cuando los microorganismos se multiplican por procesos como gemación o fisión binaria. En este caso las células individuales se agrandan y dividen para originar dos células hijas de un tamaño aproximadamente igual (Prescott, 1999).

2.6. Parámetros cinéticos de crecimiento microbiano

2.6.1. Tiempo de latencia

El tiempo de latencia es la duración de la fase de latencia. Un fenómeno inherente a la cinética microbiana es la latencia, la cual es típicamente observada como la respuesta retardada de la población microbiana ante un

repentino cambio en el ambiente. La fase de latencia puede producirse en ambos procesos, de crecimiento y de inactivación (Swinnem, 2004).

En el caso de las condiciones de crecimiento, la fase de latencia es el período de ajuste durante el cual las células levaduras se modifican por si mismas con el objetivo de sacar ventaja del nuevo ambiente e iniciar el crecimiento exponencial, (Buchanan, 1991). Por tanto, durante la fase de latencia las células se adaptan a su nuevo entorno induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de determinadas enzimas, iniciando la replicación de su material genético, y, en el caso de las esporas, diferenciándose en células vegetativas (Montville, 2000).

La fase de latencia del crecimiento microbiano fue definida en 1914 por Penfold como el intervalo entre la inoculación del cultivo y el tiempo del comienzo de su velocidad máxima de crecimiento. Y suele ser convencionalmente medido como el punto en el cuál la pendiente de la fase exponencial de crecimiento (en una gráfica semi-logarítmica) intercepta la línea horizontal trazada desde la concentración celular inicial, como refiere (Robinson, 1998).

La fase de latencia como el tiempo necesario para que la densidad de población se duplique (Robinson, 1998).La duración de la fase de latencia se ve afectada por factores como la identidad y el fenotipo de la bacteria, el tamaño del inóculo, la historia fisiológica de la población, y por los cambios en el medio físico-químico, tales como la temperatura, el pH, la actividad de agua y la disponibilidad de nutrientes (Buchanan, 1991).

2.6.2. Tiempo de generación

El tiempo de generación es el tiempo necesario para duplicar la población microbiana. Según se define como el tiempo requerido para que todos los componentes del cultivo aumenten en un factor (Stanier, 1998).

Durante este período de generación el número de células y la masa celular se duplica. El tiempo de generación varía entre los distintos microorganismos. Muchas bacterias tienen tiempos de generación de 1–3 horas, conociéndose pocos microorganismos que crezcan muy rápidamente dividiéndose en menos de 10 minutos. Otras tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días. El tiempo de generación es útil como indicador del estado fisiológico de una población celular, y es usado con frecuencia para comprobar el efecto negativo o positivo de un determinado tratamiento (Madigan, Brock Biology of Microorganisms., 1997).

El tiempo de generación está directamente relacionado con la velocidad decrecimiento exponencial, que se define como la pendiente de la curva de crecimiento logarítmico en la fase de crecimiento exponencial. Generalmente, estos dos parámetros son estimados por el ajuste de los modelos primarios, (Delignette-Muller,1998), tales como la ecuación modificada de Gompertz por Gibson, 1988, o el modelo propuesto por (Baranyi, 1994), (Zwietering M. J., 1990).

2.6.3. Velocidad de crecimiento

Como ya se ha indicado anteriormente, el crecimiento se define como un incremento en el número de células microbianas en una población, lo cual también puede ser medido como un incremento en masa microbiana. En este contexto, la velocidad decrecimiento se define como el cambio en número de células o masa celular por unidad de tiempo (Madigan, 1999).

Un cultivo microbiano creciendo en equilibrio imita una reacción auto catalítica de primer orden, es decir, la velocidad del aumento de bacterias en un tiempo dado es proporcional al número o masa de bacterias presentes durante ese tiempo (Stanier, 1998).

La tasa del crecimiento exponencial se ve influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio), así como por las características genéticas del microorganismo (Madigan, Brock Biology of Microorganisms., 1997).

2.6.4. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica comienza en los depósitos de fermentación, una vez que el mosto corregido se ha dejado decantar. el nombre de fermentación, que procede de la palabra latina fervere, que significa hervir, se dio en principio a los fenómenos de descomposición de la materia orgánica con rápido y tumultuoso desprendimiento de gas. La transformación del mosto en vino es un proceso microbiológico muy complejo en el que están implicadas diversas especies de levaduras y

bacterias. El principal papel de las levaduras vínicas es catalizar la conversión del azúcar del mosto en etanol y dióxido de carbono de una forma rápida y completa sin que se desarrollen sabores indeseables. la reacción química más simple del proceso fermentativo fue la propuesta por Gay- Lussac, en la cual el azúcar del mosto es transformado en etanol y dióxido de carbono, aunque el proceso es mucho más complejo y en él están involucradas al menos doce reacciones distintas y diversos subproductos (Epifanio, 1999).

a.- Prácticas pre-fermentativas: como clarificación y adición de SO_2 al mosto. En los mostos sulfitados la población de levaduras presente durante la fermentación está representada por cepas *S. cerevisiae,* ya que se causa una represión de las levaduras sensibles como las no-*Saccharomyces* (Longo C. A., 1991).y además previene contra efectos no deseados como la elevada acidez volátil (Constantí, 1998).La clarificación puede provocar una reducción mayor en la totalidad de la población nativa de levaduras (Ciani, 2002).

También se ha puesto de manifiesto que operaciones como el estrujado y el prensado de las uvas afectan significativamente a la diversidad de levaduras, en general, los tratamientos técnicos van a tener una cierta influencia sobre el desarrollo de las cepas de *S. cerevisiae* durante la fermentación espontánea (Epifanio, 1999).

b.- Temperatura de fermentación: Hace que disminuya la proporción de células de levaduras en crecimiento y modifica la ecología de la fermentación (Beltran, y otros, 2002). Además, determinadas levaduras no

pertenecientes al género *Saccharomyces* evolucionan mejor a bajas temperaturas, como por ejemplo las apiculadas de los géneros *Kloeckera*, con lo cual contribuyen más en las fermentaciones que se dan por debajo de 20 °C, y tal influencia se puede ver reflejada posteriormente en la composición química y en las propiedades sensoriales del vino (Degre R. e., 1993).

c.- Adición de un inóculo iniciador realizado con levadura comercial: La utilización de cultivos de levaduras iniciadores de la fermentación, producen un desorden en el equilibrio del ecosistema, dando lugar al desarrollo de otras cepas silvestres en minoría, pudiendo inhibir el crecimiento de las cepas naturales responsables de la fermentación (Querol, 1992). También se produce una disminución en la heterogeneidad de cepas (Gutiérrez; Egli, 1997; 1998; Blanco, 2006). La utilización de un correcto cultivo iniciador, que tenga una alta población de *S. cerevisiae*, inhibe el crecimiento de las cepas no-*Saccharomyces* (Ganga; Martínez 2004) y esto puede permitir que la adición de SO_2 se disminuya o evite, lo cual es más beneficioso para la salud (Constantí, 1998).

d.- Las bodegas: Se ha comprobado que la variabilidad de las distintas cepas de levaduras que existen en el ecosistema de las bodegas depende de la edad de éstas, y las condiciones de cada cosecha (composición del mosto, procesos elaboración, sulfitación, temperatura, etc.) van a determinar el desarrollo posterior de las cepas durante la fermentación (Santamaría, 2005).

e.- Condiciones climáticas: Van a afectar al desarrollo de las levaduras durante la fermentación, por ejemplo, las condiciones de lluvia y humedad hacen que, durante la fermentación, si además la uva no está en condiciones sanitarias buenas, se detecten levaduras apiculadas y oxidativas como *Pichia*, ambas no pertenecientes al género *Saccharomyces* (Longo C. A., 1991).

2.7. Factores que afectan a la fermentación

2.7.1. Composición del mosto

Cada zona enológica se puede considerar como un ecosistema en el que existirá una amplia diversidad de cepas de levaduras representativas de esa área. La presencia de estas cepas en el mosto, una vez prensado, y posteriormente en la fermentación estará condicionada por diversos factores entre los que destacan las prácticas pre-fermentativas y las condiciones medioambientales, como se ha mencionado anteriormente. Pero también, el desarrollo de estas cepas va a depender en parte de la composición química y microbiológica del mosto (Longo & Vezinhet, 1993).

2.7.2. Composición química

En general el mosto contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las levaduras. Sin embargo, la composición química puede variar de un año a otro en función de varios parámetros como las condiciones climáticas, que condicionan la calidad de la cosecha y por tanto del mosto, o el grado de maduración de la uva antes de

vendimiar. La variación en la concentración de algunos de los nutrientes del mosto puede dar lugar a fermentaciones difíciles. Por ejemplo, la alta concentración de azúcar afecta directamente a las levaduras provocando inicios del proceso complicados, a no ser que se utilicen levaduras capaces de fermentar esos mostos. La variación en las concentraciones de nitrógeno asimilable en el mosto puede producir un “efecto selectivo” sobre las cepas de levaduras (Granchi, 2003), pero cuando se agota el nitrógeno afecta al crecimiento celular pudiendo ser causa de parada fermentativa (Bisson, 1999).

2.7.3. Nitrógeno fácilmente asimilable

Las levaduras no pueden asimilar el nitrógeno elemental ni los iones de nitrato. Algunas cepas pueden utilizar los iones de amonio, pero la mayor parte de nitrógeno requerido por la síntesis de constituyentes celulares esenciales, procede los aminoácidos y de los di y tri- péptidos del mosto. Estos han sido originados proporcionalmente por la propia materia orgánica. Como es en el caso de la utilización de carbohidratos por levaduras, los aminoácidos son captados y utilizados consecuentemente, de acuerdo con la presencia de encimas adecuadas de transferencia en la membrana (Hornsey, 2003).

2.7.4. Dióxido de azufre

De una forma general, el anhídrido sulfuroso ejerce, frente a los microorganismos presentes en el mosto de forma natural, una acción

antimicrobiana. Las bacterias son más sensibles al SO_2 que las levaduras, en particular las bacterias acéticas (Flanzy, 2000).

La reglamentación relativa a la adición de este producto es estricta; en particular, la limitación es cada vez más estricta en lo que se refiere a las dosis máximas autorizadas; actualmente 210 mg/L para los vinos secos (menos de 5 g de azúcares por L) y 150 mg/L para los vinos secos comunes. Además, ciertos compradores en el marco formalizado de su certificación ISO 9002, imponen a sus suministradores de vino a granel un límite de 80 ó 100 mg/L (Flanzy, 2000).

2.7.5. Temperatura

La influencia de la temperatura sobre el desarrollo de la fermentación alcohólica es relativamente compleja. La disminución o el aumento de la temperatura en un intervalo comprendido entre 4 y 40 °C afecta el funcionamiento de numerosas actividades enzimáticas, pero en ausencia de productos tóxicos no induce mortalidad celular. En este intervalo, una variación de temperatura afecta negativamente la tasa de crecimiento alrededor de un óptimo situado en torno a 30 °C (Flanzy, 2000).

2.7.6. Acidez

La acidez de titulación es la cantidad total disponible de iones hidrógenos en solución y da una medida de los protones que están unidos a aniones como también de todos los libres (Alonzo, 2005).

2.7.7. Potencial de hidrógeno

El pH es la medida de la concentración de iones hidrógenos libres y es un término utilizado para determinar la acidez, el pH es una de las determinaciones más importantes ya que ejerce influencia sobre la presencia de microorganismos, sobre el matiz del vino, el sabor, potencial redox, sobre la razón sulfuroso libre/ sulfuroso combinado, etc; (Alonzo, 2005).

2.8. Concepto histórico de la microbiología predictiva

El concepto de la microbiología predictiva es que un detallado conocimiento de las respuestas microbianas a las condiciones ambientales permite una evaluación objetiva del efecto de las operaciones de procesado y almacenamiento en la seguridad alimentaria y en la calidad de los alimentos sobre el comportamiento microbiano en los alimentos y sus derivados en modelos matemáticos (McMeekin T. A., 2002).

La microbiología predictiva combina el conocimiento de las respuestas del crecimiento microbiano sobre un rango de condiciones, con el poder de la modulación matemática, para permitir predicciones del crecimiento. Con el uso de esta técnica, cuestiones sobre el deterioro microbiano de los alimentos y sobre la seguridad alimentaria pueden responderse mediante análisis objetivos basados en conocimientos científicos (Presser, 1997).

2.9. Métodos basados en la técnica de PCR

Las técnicas moleculares más rápidas de identificación de especies y cepas vínicas son las basadas en la PCR (Polymerase Chain Reaction). Consiste en la amplificación de una secuencia conocida del material genético por acción de un ADN polimerasa, tras la unión de cebadores complementarios a zonas diana, conocidas como “primeros”, de ambas hebras de la cadena molde de ADN. Las técnicas más utilizadas para la diferenciación de levaduras a nivel de cepa son microsatelites, aunque se han desarrollado otras metodologías como la amplificación de secuencias o la amplificación de “intron splice sites” (Fernández Espinar M. T., 2001).

2.10. Clasificación de los modelos predictivos

Los modelos predictivos microbiológicos pueden dividirse en modelos cinéticos y modelos de probabilidad. Los primeros calculan la vida microbiológica de los productos alimentarios, es decir, el período de tiempo durante el cual el número de microorganismos en el alimento es menor que un determinado valor. Los últimos determinan si el microorganismo puede crecer, e identifica las condiciones de almacenamiento con baja o nula probabilidad de crecimiento (Tienungoon, 2000). Ambos modelos suelen estar estrechamente relacionados, porque la probabilidad de detección de crecimiento durante un período de tiempo específico depende de la multiplicación del microorganismo, así como de la fase de latencia y del tiempo de generación, es decir, depende de los parámetros cinéticos. hacen referencia a algunos ejemplos en los que, por una simple

transformación matemática, de un modelo de probabilidad se ha derivado a un modelo cinético (Tienungoon, 2000).

Propusieron un esquema de clasificación de microbiología predictiva que está siendo muy utilizada actualmente. En ella se distinguen tres niveles entre modelos predictivos microbiológicos: modelos primarios, modelos secundarios y modelos terciarios (Whiting, 1993).

Tabla 3. Clasificación de algunos modelos utilizados.
Fuente: Gutiérrez, 2011

2.10.1. Modelos primarios

Los modelos primarios se ocupan de la descripción de los cambios del número microbiano en función del tiempo crecimiento, supervivencia, inactivación los cuales son constituidos por expresiones matemáticas que describen el cambio del número de bacterias con el tiempo, bajo unas condiciones particulares del entorno y cultivo. La respuesta se puede medir directamente por recuento total unidades formadoras de colonias, (UFC), formación de toxina, nivel de substrato o productos del metabolismo, o bien indirectamente, por medida de densidad óptica o impedancia. Se puede generar información acerca de los parámetros de crecimiento microbianos, como el tiempo de generación, duración de la fase de adaptación, velocidad o tasa de crecimiento exponencial y densidad máxima de población, otros ejemplos de modelos primarios serían, el que describe los recuentos decrecientes con el tiempo durante el procesamiento térmico, tal como el

Modelos primarios	Modelos secundarios	Modelos terciarios
Función de Gompertz	Modelo Belehradek (modelo de raíz cuadrada)	Pathogen Modeling Program: USDA.
Gompertz modificada	Modelo Ratkowsky (modelo de raíz cuadrada)	Seafood Spoilage (and Safety) Predictor of SSP o SSSP.
Modelo logístico	Modelo de Arrhenius	Salmonella enteritidis Risk Assessment (SERA): USDA
Modelo Baranyi	Modelo modificado de Arrhenius (Davey o Schoolfield)	Como Base
Modelo de primer orden de Monod	Modelos probabilísticos	MicroFit
Modelo de primer orden modificado	Valores Z	Perfringens predictor
Valores D de inactivación térmica	Polinomiales o respuesta	Food MicroModel: UK
Modelo de declinación de crecimiento de Whiting y Cygnarowicz	Modelos de superficie	
Modelo lineal de tres fases	Modelo de William-LandelFerry	
	Modelos de redes neuronales	

ampliamente usado "tiempo de reducción decimal", o valor D, y el que describe la producción de una toxina microbiana u otro producto metabólico a lo largo del tiempo (Whiting, 1993).

Ejemplo de ello son:

Modelo de Gompertz

Gibson y col. (1987) trabajaron con la ecuación de Gompertz para ajustar curvas de crecimiento, la cual se describe a continuación:

$$Y_t = Y_0 + Cexp\{-exp[-B(t-M)]\} \quad (1)$$

Donde:

Y_t : Es el logaritmo de UFC/mL en el tiempo, *t*

Y_0 : Es el logaritmo del inóculo

C: Es el cambio en el número de células entre el inóculo y la fase estacionaria

B: Es la velocidad o tasa de crecimiento relativa

M: Es el tiempo al que se alcanza la velocidad máxima de crecimiento.

La fase de adaptación o latencia y la velocidad de crecimiento exponencial se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$Tiempo\ de\ latencia(t_{lag}) = M - {}^{1}/_{B}\text{(Horas)} \quad (2)$$

Donde:

M: Es el tiempo al que se alcanza la velocidad máxima de crecimiento.

1: Constante

B: Es la velocidad o tasa de crecimiento relativa

$$Velocidaddecrecimientoexponenial(\mu_{max}) = \frac{BC}{e} \text{ (Log UFC/mL)/h} \quad (3)$$

$$Tiempo\ de\ generacion(t_g) = \frac{log(2)e}{BC} = \frac{0.8183}{BC} \text{ (Horas)} \quad (4)$$

Junto con la fase de adaptación y la densidad máxima de población, la velocidad o tasa máxima específica de crecimiento de la curva son los parámetros cinéticos más importantes. Esta última mide la pendiente de la curva de crecimiento cuando el microorganismo crece exponencialmente. Normalmente este parámetro es estimado decidiendo cuál es la parte de la curva que es aproximadamente lineal y posteriormente determinando la pendiente de ésta por regresión lineal (Zwietering M. C., 1994). La pendiente de la parte de la curva propuesta a ser lineal es una relación de primer orden. La representación de la ecuación de Gompertz (1) se puede observar en la Figura 2.

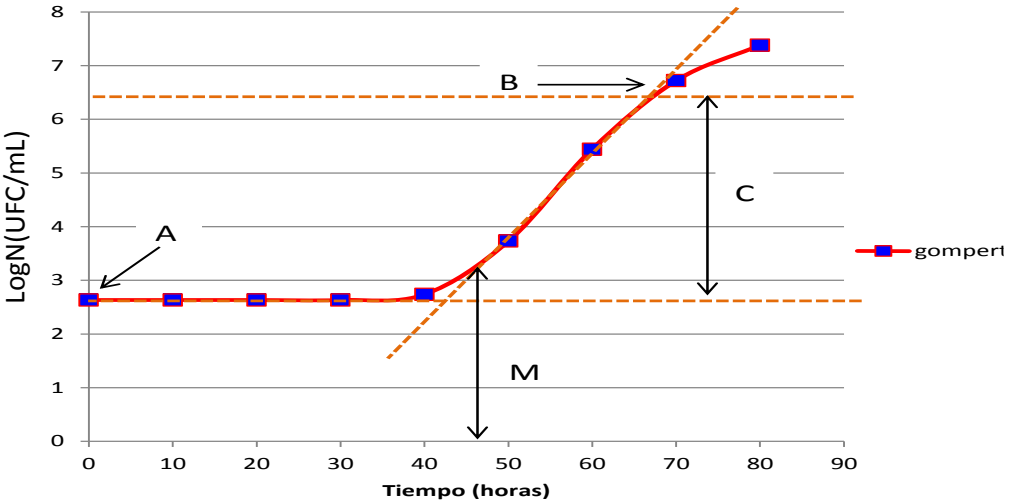


Figura 2. Representación gráfica de la ecuación de Gompertz (Zwietering M. C., 1994).

Dónde: logN(UFC/mL) = Células por mililitro

Compararon estadísticamente diferentes curvas sigmoidales (modelo logístico, ecuaciones de Gompertz, Richards, Schnute y Stannard) usando el t-test y f-test. En la mayoría de los casos la ecuación de Gompertz se mostró como el mejor modelo para ajustar los datos de crecimiento microbiológicos, en términos de exactitud estadística y facilidad de uso (Zwietering M. J., 1990).

Modelo de Gompertz modificada

La ecuación de Gompertz fue modificada (Zwietering M. J., 1990), con el fin de incluir directamente en ella tres parámetros cinéticos de interés biológico: la velocidad de crecimiento (μ_m), fase de adaptación (λ) y máxima densidad de población (A). La ecuación toma la forma siguiente:

$$Y = Aexp\left\{-exp\left[\frac{\mu_m e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \qquad (5)$$

Dónde: A es la asíntota del recuento decimal cuando el tiempo desciende indefinidamente (UFC^{-1}); y es del logaritmo del tamaño de la población; μ_m es la tasa máxima específica de crecimiento (S^{-1}); λ es la duración de la fase de adaptación (s), t esel tiempo (s).

Ecuación de Baranyi y Roberts

Describen el crecimiento microbiano mediante un par de ecuaciones diferenciales, las cuales pueden ser usadas en casos en los cuales se dan ensayos de crecimiento con variación simultánea de temperatura y tiempo. Para condiciones isotermas, sin embargo, la ecuación que describe el crecimiento se presenta a continuación (Baranyi, 1994).

$$y(t) = y_0 + \mu A(t) - \frac{1}{m} ln\left(1 + \frac{e^{m\mu A(t)} - 1}{e^{m(y_{max} - y_0)}}\right) \qquad (6)$$

Donde:

$$A(t) = t + \frac{1}{v} ln(e^{vt} + e^{-ho} - e^{-vt-ho}) \qquad (7)$$

Y_0 es el logaritmo natural de la concentración inicial de microorganismos, y_{max} es el logaritmo natural de la concentración de células al alcanzar la fase estacionaria, μ es el ratio máximo específico de crecimiento, v es el parámetro de curvatura que caracteriza la transición a la fase exponencial, y es el producto de m y de la duración de la fase logarítmica, el parámetro m caracteriza la curvatura antes de alcanzar la fase estacionaria.

Cuando m = 1 la función se reduce a una curva logística, una simplificación del modelo que es asumida con frecuencia.

Modelo logístico

Cuya expresión matemática es:

$$logN = A + \frac{C}{1+e^{(D-F*t)}} \qquad (8)$$

Donde:

Log N: es logaritmo decimal del número de microorganismos al tiempo t, A: es el valor asintótico cuando el tiempo decrece indefinidamente (aproximadamente equivalente al logaritmo decimal del número inicial de microorganismos) y que presenta el incremento en el logaritmo del número de microorganismos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (número de ciclos decrecimiento), D: es un parámetro adimensional y F: es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo medio de la fase exponencial.

2.10.2. Modelos secundarios

Menciona que los modelos secundarios caracterizan los parámetros que pueden aparecer en los modelos primarios en función de las condiciones del medio (temperatura, pH, actividad de agua, etc.), permiten considerar cómo dos o más factores interactúan sobre el crecimiento microbiano (Santos., 2007).

En el pasado los modelos secundarios para el tiempo de latencia solamente incorporaban el efecto del ambiente de incubación, hoy en día han surgido muchos más modelos que incluyen otros factores relevantes como las condiciones de pre incubación (Santos., 2007).

Estos modelos podríamos agruparlos en dos secciones

Modelos que calculan la duración de la fase de latencia en función de las condiciones de incubación;

Modelos que calculan la duración de la fase de latencia en función de las condiciones de pre-incubación y de incubación.

En el caso de los primeros, se han publicado algunas revisiones y discusiones (Adairy, 1989; Ratkowsky, 1991; Ross y McMeekin, 1994; Skinner, 1994; (Whiting, 1993).Otros autores han desarrollado modelos secundarios independientemente del tiempo de generación y del tiempo de latencia, como, por ejemplo, enfoques polinomiales (Gibson, 1988), (Buchanan, 1991) y Phillips, 1990; Zaika, 1998) y enfoques de redes neurales artificiales de baja complejidad (Geeraerd; García-Gimeno, 1998; 2002). En el segundo caso, se han publicado diversos estudios, como los de Zwietering, Augustin y Whiting; Bagi (Santos., 2007).

Ejemplo de ello es:

Modelo de la raíz cuadrada (Ratkowsky, 1982).

En este modelo el ratio específica de crecimiento, estimado en condiciones isotermas se ha modelizado como función de la temperatura de incubación (Ratkowsky; Pin, 1982; 2002):

$$\sqrt{\mu_{max}} = b(T - T_{min}) \qquad (9)$$

Donde b es una constante, T (°C) es la temperatura de incubación y T_{min} es la temperatura teórica mínima para el crecimiento del organismo, estimada por extrapolación en la línea de regresión a $\mu_{max} = 0$.

2.10.3. Modelos terciarios

Los modelos terciarios pueden tener varias formas, comenzando por combinar los dos primeros niveles de modelos basados en experimentos laboratoriales (por ejemplo, el “Pathogen Modeling Program”, creado y puesto a disposición de la comunidad científica gratuitamente por la USDA); versiones más extendidas que incluyen la posibilidad de importar una historia de temperatura para predecir la vida útil restante con respecto a un organismo deteriorador específico, como es el caso del “Seafood Spoilage Predictor” (Dalgaard, 2002); o llegando hasta la incorporación de modelos predictivos en una red de evaluación de riesgos microbiológicos, como, por ejemplo, el será “Salmonella enteritidis Risk Assessment” del USDA (Geeraerd, 2004).

Ejemplos de ellos son:

- Pathogen Modeling Program: USDA
- Seafood Spoilage (and Safety) Predictor o SSP o SSSP.
- Risk Palisade Corporation: USA
- Com Base
- Micro Fit
- Food Micro Model: UK

2.11. Construcción de modelo

Para la elaboración de un modelo existen algunos procedimientos básicos que han de ser tenidos en cuenta para la generación de datos. Para ello, es necesario hacer la elección de la cepa microbiana a estudiar, y, a continuación, decidir el método para la generación de datos (Rasch, 2004).

2.11.1. Selección de cepa de microorganismos

Existen varios enfoques que pueden utilizarse para elegir que cepa debe ser utilizada con el propósito de la construcción del modelo. Se puede elegir entre una cepa sola o una mezcla de diferentes cepas. Antes de elegir cuál de las cepas va a estudiarse, es importante clarificar la intención a la que va dirigido el modelo: ¿el modelo va a ser usado para predecir un posible crecimiento de una especie de patógeno en particular, o es un modelo de una flora alterante de un producto alimentario específico? Utilizar una cepa que haya sido previamente utilizada en varios estudios, o incluso con el propósito de crear modelos, proporciona el beneficio de los conocimientos previamente acumulados sobre la cepa en particular, por otro lado, una cepa aislada a partir de un producto alimentario concreto, el cual es el objeto de la aplicación del modelo, proporciona la ventaja al producto (Rasch, 2004).

2.11.2. Generación de datos

Para seguir el curso del crecimiento es necesario efectuar mediciones cuantitativas. El crecimiento exponencial es, por lo general, equilibrado, de

modo que para poder determinar la velocidad de crecimiento puede utilizarse la medición de cualquier propiedad de la biomasa, por comodidad, las propiedades habitualmente medidas son la masa celular o el número de células (Stanier, 1998).

2.11.3. Método de recuento total en placa

La calidad de un alimento depende de sus propiedades físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales, la calidad microbiológica puede estimarse en términos generales mediante el análisis microbiológico de recuento total en placa (RTP). En algunos alimentos un RTP elevado indica una pobre calidad, los alimentos pueden tener una apariencia normal pero su RTP puede ser elevado lo que indica que la alteración del producto está muy cercana, el análisis de un alimento para estimar su RTP implica la homogenización de la muestra, la preparación de diluciones seriadas de la muestra homogeneizada, la siembra en agar para recuento en placa, la incubación de estas aeróbicamente a 35 – 37 °C durante 48 horas, la enumeración de colonias desarrolladas y el cálculo de las UFC/mL o UFC/g de alimento (Yousef, 2006).

2.12. Descripción matemática del modelo

Los datos obtenidos son convenientemente seleccionados y se ajustan a un modelo primario, que explica la evolución del comportamiento microbiano a lo largo del tiempo de análisis, posteriormente, los parámetros obtenidos del modelo se relacionan con los factores considerados mediante un modelo secundario, el ajuste de las funciones puede emplear métodos

de regresión lineal o no lineal dependiendo del tipo de modelo, el ajuste del modelo a los datos observados está basado en el método de mínimos cuadrados, por el cual se intenta minimizar los valores residuales, esto es, la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores observados y predictivos (McMeekin O. T., 1993).

2.12.1. Bondad de ajuste y validación de modelos

Para determinar qué predicciones proporcionan una buena descripción del crecimiento en los alimentos, los modelos deben validarse y evaluarse en su habilidad predictiva, cuando un modelo matemático se construye y valida adecuadamente, permite, por ejemplo, la predicción del efecto del cambio de las condiciones de tratamiento sobre la evolución microbiana (Geeraerd, 2004).

La precisión de los modelos puede ser valorada gráficamente enfrentando los valores observados contra las correspondientes predicciones del modelo, además, el error cuadrado medio (“Mean squared error”, MSE), los valores de R^2 y los factores de sesgo y de exactitud pueden utilizarse como indicación de la confianza de los modelos cuando son aplicados a los alimentos (Giffel, 1999).

Existen muchos parámetros estadísticos utilizados para evaluar la bondad del ajuste de unos datos experimentales a un modelo determinado, entre ellos destacan los siguientes:

- Raíz cuadrada del error cuadrático medio

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(fitted - observed)^2}{n-p}} \qquad (10)$$

Dónde:

- n: Es el número de observaciones
- p: Es el número de parámetros a estimar

Coeficiente de regresión corregido (R^2-corregido)

$$CorrectedR^2 = \left[1 - \frac{(m-1)\left(1-\frac{SSQ_{reression}}{SSQ_{total}}\right)}{(m-j)}\right] \qquad (11)$$

Dónde:

- m : Es el número de observaciones
- j : Es el número de parámetros del modelo
- SSQ : Es la suma de cuadrados
- SD : Es la desviación estándar.

2.13. Validación de modelo

Se puede definir como la demostración de su exactitud para una aplicación concreta, un tipo de validación muy útil en modelización matemática, cuando trabajamos sobre sistemas ensayados experimentalmente, es la validación funcional (Ross T. , 1999).

Dicha validación consiste en la verificación del modelo frente a observaciones obtenidas de manera independiente, la evaluación ideal consiste en obtener los datos pertinentes del mundo real y realizar una

comparación estadística de los resultados predichos por el modelo y las observaciones obtenidas experimentalmente, entre los índices más utilizados para validar un modelo destacan los propuestos por, (Ross T. , 1999). Estos índices, denominados factor sesgo (Bf) y exactitud (Af), proporcionan un fácil resumen de la fiabilidad de los modelos y han sido ampliamente utilizados en estudios de validación de modelos microbiológicos (Ross T. , 1999).

Proporcionan información sobre la desviación media entre las predicciones del modelo y los datos observados experimentalmente, siendo tanto más próximos a 1 cuanto mejor es el ajuste dado por el modelo. Los citados indicadores proporcionan de forma efectiva y práctica de predecir la validez del modelo. El bias y accuracy factors se definen como sigue; Accuracy(Af) y Biasfactors (Bf) (Ross T. , 1999).

$$Bf = \frac{\sum log(predicted/observed)}{n} \qquad (12)$$

$$Af = 10^{\frac{\sum|log(predicted/observed)|}{n}} \qquad (13)$$

Donde *n* es el número de observaciones llevadas a cabo, el ratio de valores predichos frente a observados se refiere a la relación entre la fracción de supervivientes dada por el modelo y los valores obtenidos experimentalmente.

2.14. Definición de términos

2.15. Adaptación de microorganismos

Las variaciones en el número de cromosomas halladas en las cepas de levaduras que participan en procesos industriales, como la elaboración del pan, cerveza o vino, se interpretó como una consecuencia de los mecanismos de adaptación de estos microorganismos a las condiciones del entorno industrial, que implica la existencia de una fuerte presión de selección actuando sobre el genoma nuclear (Bakalinsky & Snow 1990).

2.16. Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares. Pueden ser clasificadas dentro de dos grupos filogenéticos: levaduras ascomicetas (teleomórficas y anamórficas) y levaduras basidiomicetas (teleomórficas y anamórficas), que se caracterizan por encontrarse las esporas sexuales o ascosporas en el interior de una bolsa o asca (Fernández Espinar, 2000).

2.17. Unidad formadora de colonia (UFC)

Los microorganismos filamentosos forman las colonias a partir de una espora o de un fragmento de hifa o de un cúmulo de hifas. Debido a esto, el número de UFC/mL puede variar dependiendo de las condiciones de homogeneización de la muestra (a mayor tiempo de homogeneización mayor será la ruptura de las hifas y por lo tanto se aumentarían las UFC/ mL), por lo que se debe poner especial cuidado en esta etapa. Los tiempos de homogeneización citados en esta metodología son los recomendados

en la Norma Oficial Mexicana para este grupo microbiano (Fernández Espinar, 2000).

III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Lugar de ejecución

La ejecución del proyecto modelado del crecimiento de dos levaduras comerciales durante la fermentación de la uva variedad Borgoña (*Vitis labrusca l.*) a diferentes temperaturas, nitrógenos fácilmente asimilable y dióxido de azufre, se realizó en dos etapas. La primera etapa de estrujado,

la obtención del mosto y conservación en la bodega el “Viejo Molino” y en el laboratorio de Tecnología de Alimentos en la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Moquegua de la ciudad de Moquegua. La segunda etapa de experimentación se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias; Laboratorio de Micología y Virología de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann en la ciudad de Tacna.

3.2. Tipo y diseño

Es una investigación de tipo experimental cuantitativa, sobre el modelado del crecimiento de dos levaduras comerciales durante la fermentación de la uva variedad Borgoña (*Vitis labrusca l.)* a diferentes temperaturas, nitrógenos fácilmente asimilable y dióxido de azufre.

3.3. Nivel de investigación

Investigación es experimental.

3.4. Operacionalización de variables

3.4.1. Variables independientes temperatura en centígrados

Indicadores (22 °C, 26°C, 30°C)

- **Nitrógeno fácilmente asimilable en g/hL (NFA)**

  Indicadores (140 g/hL, 160 g/hL, 180 g/hL)

- **Dióxido de azufre en g/hL (SO2)**
- Indicadores (5 g/hL, 7.5 g/hL, 10 g/hL)

3.4.2. Variables dependientes indicadores

- Modelado del crecimiento
- Tiempo de Generación (horas)
- Velocidad máxima de crecimiento (μmáx.) (horas)
- Fase de latencia (λ) (horas)

3.5. Materiales y equipos

3.5.1. Materiales de laboratorio (material de vidrio pírex)

- 30 Matraces Erlenmeyer (250 mL)
- 02 Micro pipetas (50 y 100 mL)
- 02 Pipetas de vidrio (1 y 10 mL)
- 01 Probetas de vidrio (50, 100, 250 mL)
- 30 Tubos de ensayo
- 03 Vasos de precipitados de vidrio (50, 100, 250 mL)
- 02 Pipeta Pasteur
- 02 Pipeta serológica
- 03 Gradilla de polipropileno
- 02 Mechero lamparilla de alcohol de laboratorio de 100 mL

3.5.2. Equipos

- **02 Cámara de neubauer chamber cell counting.** Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. En una cámara simple, la porción central, que es donde se realiza el conteo, está dividida en 3 partes. El cuadrado central es el destinado al recuento de hematíes y plaquetas. Se divide en 25 cuadrados medianos de 0,2 mm de lado

y cada uno de estas tablas se subdivide a su vez en 16 cuadrados pequeños. El cuadrado central está por tanto formado por 400 cuadrados pequeños.

- **01 pH metro digital pH-2005.** Pantalla táctil con funcionamiento ergonómico, Incluye brazo portazondas. Compensación automática de temperatura de 5 a 105 °C. Conector BNC para conexión de electrodo conexión directa a impresora ref. TR-PH2006-1.
- **Características técnicas.** Compensación de temperatura automática o manual de 0 a 99,9°C, calibración automática en 2 puntos con reconocimiento de tres patrones: 4, 7 y 9,21, salida RS-232 para lectura e impresión de parámetros por ordenador, conector BNC para la conexión del electrodo, entrada para sonda de temperatura Rt-2252 incluye brazo porta sondas.
- **01 Refractómetros portátil manual Serie HR.** Proporciona una lectura segura, puesto que no debe calcularse primero el valor de medición. Algunos modelos están equipados con compensación automática de la temperatura. De este modo, se aumenta la precisión de la medición en casos en los que la medición se realiza a 10, 40 °C en lugar de a 20 °C. Para la calibración se utiliza agua destilada o se suministra un cuerpo de calibración pequeño.
- **30 Biorreactores (adecuados con termómetro respirador)** Biorreactores adaptados a matraz de vidrio pírex, implementadas con termómetro de mercurio, pipeta Pasteur, pipeta serológica y tapón de goma.

- **03 Estufa L-C oven (marca lab line)** Estufa L-C oven (Marca Lab Line), la adaptación de las estufas es de 22 °C, 26 °C y 30 °C, adaptados con termómetro de mercurio para su mejor desempeño y control.
- **01 Refrigeradora (marca bosch)** Electro lux, con capacidad de 150 L y temperatura mínima de 5 °C, fuente de alimentación de energía.
- **01 Balanza analítica (RADWAG AS22OC2)** Gama de pesaje (máx.) 160 g 220 g, lectura (d) 0,1 mg 0,1 mg, carga mínima 10 mg 10 mg, valor de verificación 1 mg 1 mg, clase de verificación I, reproducibilidad 0,2 mg 0,2 mg, linealidad ± 0,2 mg ± 0,2 mg, tiempo de estabilización (típico) 4 sec 4 sec, peso mínimo de pieza con piezas contadas g > 0,5 mg > 0,5 mg, tiempo de calentamiento 8 horas.
- **02 Microscopio** Compensación dióptrica con escala de compensación, trípode de metal estable, enfoque de precisión y aproximativo, coaxial en ambos lados (0–200 µm, división 2 µm), área de enfoque aproximativo: 30 mm, área de enfoque de precisión: 30 mm.
- **01 Frigo bar** El frigo bar electro lux, con capacidad de 50 L y temperatura mínima de 5 °C, transportable, fuente de alimentación de energía.

3.5.3. Materiales

- Papel aluminio
- Algodón

- Gel de hielo (Los acumuladores de frío de están indicados como complemento para reducir la temperatura del ambiente a condiciones deseadas, refrigerada de 2°C a 8°C o para temperaturas negativas de transporte a -15 °C).

3.5.4. Insumos y reactivos

- Levaduras (fermol de rouge, fermol associees)
- Alcohol Etanol 96º
- **Azul de lacta fenol.** con pH 3, punto de fusión, punto de congelación 180 °C, punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición. Densidad relativa, solubilidad: 40 g/L en agua a 20 °C, coeficiente de reparto n-octano/agua.
- **Nitrógeno fácilmente asimilable (nutriente)** Los compuestos nitrogenados presentes en mosto y vino desempeñan una función importante en la fermentación de las levaduras y por eso su control es imprescindible. La cantidad de estos compuestos oscila entre 60-2400 mg NFA/L y lo forman una gran variedad de moléculas: aminoácidos, amonio, proteínas, péptidos y polipéptidos y en menor medida aminas, amidas, urea, pirimidinas, purinas, nitratos y nitritos.
- **Dióxido de azufre (meta bisulfito)** Punto de ebullición: -10 °C, punto de fusión: -75,5 °C, densidad relativa (agua = 1): 1,4 at -10 °C (líquido) solubilidad en agua, mL/100 mL a 25 °C: 8,5 presión de vapor, kPa a 20 °C: 330 densidad relativa de vapor (aire = 1): 2,25.

3.6. Población y muestra

3.6.1. Población

La investigación se realizó en la jurisdicción del valle de la Provincia Mariscal Nieto, donde se encuentra la producción de vid y derivados de la Región de Moquegua, se estudió el comportamiento del crecimiento de microorganismos (levadura) en la etapa de fermentación de la uva variedad Borgoña.

3.6.2. Muestra

Fue adquirida de la bodega el “Viejo Molino”.

Para la determinación de los experimentos se tomó una muestra de 15 L de mosto, estrujado de la cuba de fermentación, los cuales fueron almacenados en refrigeración, inhibiendo crecimiento de microorganismos y cambios en su composición, seguidamente es distribuida en una cantidad de 150 mL en cada biorreactor para su análisis y siembra de levaduras, teniendo un total de 30 experimentos. Realizando conteos en intermedios de 2 horas de acuerdo al crecimiento de levaduras en cada experimento, así mismo analizando los parámetros principales del mosto y la viabilidad del microorganismo. El experimento fue realizado en la ciudad de Tacna en la Universidad Jorge Basadre Grohmann de Tacna, facultad de Ciencias.

3.6.3. Análisis inicial del mosto experimentado

El análisis inicial del mosto experimentado se ha realizado para el inicio del experimento con fines de obtener los parámetros iniciales y la calidad de mosto como se muestra en la tabla 4.

Entre estos métodos se encuentran los grados Brix. Los grados Brix o Balling indican los gramos de sacarosa por 100 g de mosto. Es decir, un mosto con 180 g de azúcares por kg de mosto tiene 18 Brix. El método oficial de análisis se basa en la refractometría y está publicado en el Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE, 2005).

Los valores adecuados de pH para el mosto y el vino están comprendidos entre 3,4 y 3,5; valores inferiores indicarían excesiva acidez, y valores superiores a 3,6 harían necesario realizar una corrección para disminuir el pH. La determinación del pH y de la acidez titulable se realiza de forma tradicional por el método oficial de análisis (DOUE, 2005).

Tabla 4. Análisis inicial del mosto experimentado

MOSTO	°BRIX	POTENCIAL DE HIDROGENO	RECUENTOS VIABLES
INICIAL	22	3.19	Área $_{25}$ = 0

Fuente Elaboración propia.

3.7. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

3.7.1. Metodología experimental del crecimiento de microorganismos

La investigación se realizó de acuerdo a las bodegas de nuestra localidad usando como metodología experimental el diagrama de flujo en la etapa de fermentación de uva y crecimiento microbiano, así como se presenta en la figura 3 en el siguiente ítem, en tanto para la fermentación del mosto de uva se utilizó biorreactores acondicionados con termómetro para el control de temperatura del mosto, pipeta para toma de muestra y filtro de aire, al

mismo tiempo se utilizó estufas para el control de temperaturas de (22, 26, y 30 °C), según los tratamientos.

Los tratamientos fueron preparados de la siguiente manera con nitrógeno fácilmente asimilable de (140, 160 y 180 g/hL) y dióxido de azufre de (5, 7.5 y 10 g/hL), y levadura de 30 g/hL posteriormente se utilizó (Box Ben ken) como herramienta de trabajo para aleatorizar los experimentos y selección del tratamiento más significativo, y para su comprobación se utilizó un análisis de varianza test Duncan (anexo 6 a 14).

Esquema experimental

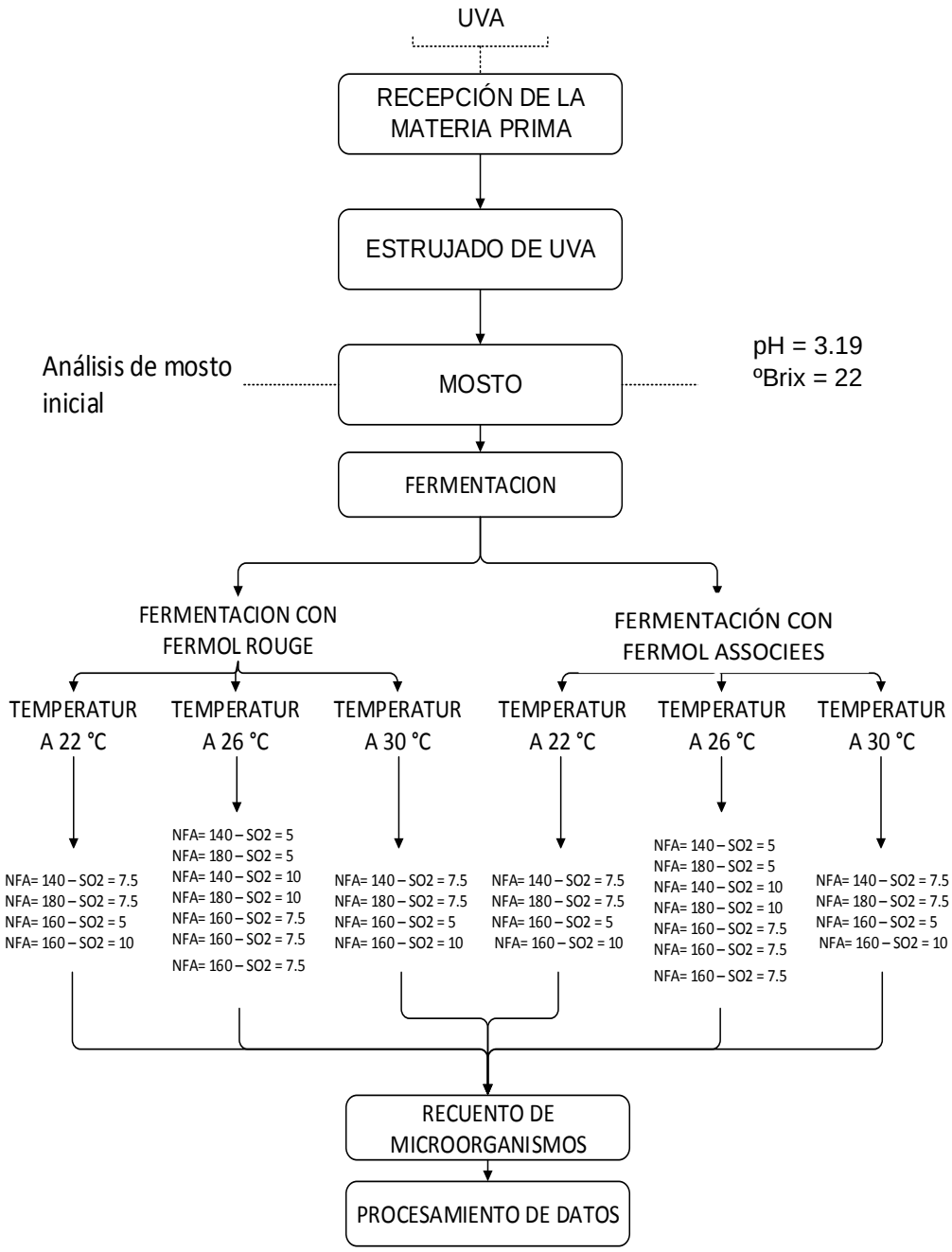


Figura 3. Esquema experimental del crecimiento microbiano, fuente: elaboración propia, 2017

3.8. Método y técnicas para la presentación y análisis de datos

3.8.1. Método para la siembra de microorganismos

El método utilizado en la siembra de microorganismos (levaduras) se emplea la metodología de elaboración de vino tal y como se realiza en los viñedos y bodegas de la Región Moquegua, la figura 3, se muestra el método experimental para determinar los parámetros más adecuados de crecimiento microbiano el cual es ajustado al software estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.I\sgwin.exe", instrumento de trabajo Box Ben ken para su respectiva variación para cada experimento, como se muestra en el tabla 5. Tratamientos ajustados con Box Ben ken.

Tabla 5. Tratamientos ajustados con Box Ben ken

EXP	TEMPERATURA °C	NITROGENO g/hL	DIÓXIDO g/hl	PRODUCCIÓN Cel/mL
1	22	140	7.5	1600000000
2	30	140	7.5	950000000
3	22	180	7.5	1125000000
4	30	180	7.5	850000000
5	22	160	5	1075000000
6	30	160	5	1375000000
7	22	160	10	1025000000
8	30	160	10	1375000000
9	26	140	5	1350000000
10	26	180	5	1375000000
11	26	140	10	1025000000
12	26	180	10	1225000000
13	26	160	7.5	1150000000
14	26	160	7.5	1625000000
15	26	160	7.5	1150000000

Fuente: Elaboración propia, 2017

3.9. Método para el análisis del tiempo de crecimiento microbiano (levadura)

El control de tiempo del crecimiento microbiano es con relación a las variables de estudio, como se muestra en el anexo 1, 2 y 3, utilizando equipos ópticos de recuento y controlando los parámetros establecidos en cada tratamiento, lo cual fue cuantificado mediante una fórmula de recuento de microorganismos.

$$A_{25} = N = X.\ 25.10^4\ Cel/mL$$

Donde:

A25 = área de recuento

N= número de células

X= conteo óptico

25.10^4= constante

Cel./mL= células por mililitros

3.9.1. Etapas de crecimiento de S*accharomyces cerevisiae*

Junto con la fase de adaptación y la densidad máxima de población, la velocidad o tasa máxima específica de crecimiento de la curva son los parámetros cinéticos más importantes. Esta última mide la pendiente de la curva de crecimiento cuando el microorganismo crece exponencialmente. Normalmente este parámetro es estimado decidiendo cuál es la parte de la curva que es aproximadamente lineal y posteriormente determinando la pendiente de ésta por regresión lineal (Zwietering M. C., 1994). La pendiente de la parte de la curva propuesta a ser lineal es una relación de primer orden. La representación de la ecuación de Gompertz.

Tabla 6. Faces de crecimiento

Parámetros de crecimiento	***Saccharomyces cerevisiae (L1)***	***Saccharomyces cerevisiae (L2)***
Tiempo de fase de latencia (λ)		
Velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{máx.}$)		
Tiempo de generación (T_g)		

Fuente: Elaboración propia, 2017.

3.10. Método para determinar crecimiento microbiano y simulación

3.10.1. Ajuste y validación al modelo matemático

Para el ajuste y validación de los parámetros de crecimiento se analizaron con los softwares estadísticos. Statgraphics\STATGRAPHICS Centurión XVI.I\sgwin.exe" y el Info Stat/l.

3.10.2. Modelo matemático

Gompertz modificado

En función de parámetros de crecimiento

Y=a+c*exp(-exp(-b*(x-d)))

Y: Número de microrganismos en función al tiempo

a: Población inicial de la curva de crecimiento

b: Velocidad de crecimiento.

c: La diferencia de la población máxima la población inicial.

d: Fase de latencia.

3.10.3. Análisis de tratamientos con respecto al tiempo de levadura

Para el análisis de datos de datos de recuento de levadura consideraremos como variable dependiente o de respuesta Y=UFC/mL y como variable independiente o predictor X=tiempo. Lo que nos proporciona resultados para el modelo matemático y su posterior simulación.

Formula: $Y_{i=}\beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i$

Donde:

$Y_i =$ Es la UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae L.*

$X_i =$ Es el tiempo en el proceso de fermentación

$\beta_0 =$ Parámetro desconocido que indica la ordenada donde la línea de regresión lo intersecta.

$\beta_1 =$ Parámetro desconocido que indica la pendiente de la línea de mejor ajuste.

$\varepsilon_i =$ Error de perturbación que puede tomar valores positivos o negativos.

3.11. Diseño experimental y análisis de datos

Se realizó mediante un diseño de 3 factores, tales como temperatura, nitrógeno fácilmente asimilable, dióxido de azufre. Los experimentos se realizaron según el software estadístico Statgraphics\STATGRAPHICS Centurión XVI.I\sgwin.exe" utilizando su herramienta de trabajo (Box Ben ken) de lo que se ha obtenido 15 tratamientos, experimento donde

todas las condiciones fueron controladas, se optó por aplicar un diseño completamente al azar (D.C.A), obedeciendo a un arreglo factorial AxBxC, para las variables: temperatura, nitrógeno fácilmente asimilable, dióxido de azufre, mientras que para las variables: tiempo y crecimiento microbiano se utilizó un diseño completamente al azar (D.C.A) con arreglo factorial AxB, ver figura 3.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Parámetros, de temperatura, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre en la fermentación

Las variables planteadas de nitrógeno fácilmente asimilable (140, 160, 180 g/hL), dióxido de azufre (5, 7.5, 10 g/hL) y temperatura (22, 26, 30 ºC); proponen como mejor combinación tras la experimentación al tratamiento (T6), que comprende de 160 g/hL de nitrógeno fácilmente asimilable, 5 g/hL de dióxido de azufre y 30 ºC; donde se observaron crecimiento de microorganismos afirmado a través del análisis de varianza test Duncan (anexo 6 al 14). Este resultado ajusta al modelo matemático Gompertz para generar la ecuación del modelo Gompertz.

El mejor tiempo de crecimiento microbiano expresa fermentación alcohólica, siendo la variable de análisis; tiempo (t) y crecimiento microbiano (UFC/mL), los datos en análisis fueron: 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34 horas como bloques, se usó esos tiempos para el análisis de varianza, debido a que, en todos los experimentos los microrganismos de la levadura se desarrollan de manera uniforme, por tal razón nos planteamos resolver las hipótesis del proyecto de investigación, que es determinar los mejores combinaciones de (nitrógeno fácilmente asimilable, dióxido de azufre, temperatura en relación al tiempo), determinantes en la fermentación alcohólica (anexo 6), que nos permite encontrar el p-valor,

correspondiente al tratamiento (T6) como el más significativo de la experimentación, en tanto (R. McKellar, 2002) afirma en su investigación que los factores (temperatura, pH, concentración de sustrato) influyen en la etapa de crecimiento microbiano, en las condiciones iniciales del inóculo, influencian, a desarrollar los modelos existentes, incorporando mayor cantidad de datos acerca de los mecanismos biológicos subyacentes que provocan el crecimiento logarítmico, teniendo un conocimiento completo sobre el comportamiento de células individuales, así como también (Castro G. V., 2008) en su investigación demuestran la preparación de una serie de muestras de tubos de ensayo con leche esterilizada a 110 ± 2°C por 10 min. y se inocularon con Lactococcus a 1 x 102 UFC/mL. posteriormente, fueron incubados a 36 ± 0,5°C y cada dos horas se prepararon diluciones y siembra en placas con agar M-17, determinó el Log de UFC/mL para las 0; 2; 4; 6; 8 y 10 horas de incubación. Se realizó un análisis de regresión con los modelos de Gompertz, Logístico, Stannard y Richards, por medio del algoritmo de Marquardt. Se encontró similitud en el ajuste de los modelos aplicados, el resultado mostrado en este estudio corrobora la utilización del modelo Gompertz, como alternativa de estudio, siempre teniendo como variables de estudio a temperatura, tiempo, pH, porque son esenciales para el crecimiento de microrganismos.

4.1.1. Levadura fermol rouge

Tabla 7. Comparación múltiple según tratamientos, levadura tipo 1

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 21302.4198 gl: 112

Tratamiento	Medias	n	E.E.						
T7	601.67	9	48.65	A					
T5	740.00	9	48.65	A	B				
T4	740.56	9	48.65	A	B				
T3	761.39	9	48.65		B	C			
T12	765.28	9	48.65		B	C			
T8	766.11	9	48.65		B	C			
T11	790.83	9	48.65		B	C			
T2	813.89	9	48.65		B	C	D		
T15	840.28	9	48.65		B	C	D		
T10	856.94	9	48.65		B	C	D		
T1	901.94	9	48.65			C	D		
T13	905.56	9	48.65			C	D		
T14	954.17	9	48.65				D	E	
T9	1069.44	9	48.65					E	F
T6	1103.06	9	48.65						F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

En la tabla 7 se observa el mejor crecimiento de los microorganismos (levadura), de tipo 1 fermol rouge, propone a los tratamientos (T9, T6) como la combinación con mayor desarrollo microbiano, estos a su vez son significativamente iguales y, significativamente diferentes al resto, por otra parte, los tratamientos que registraron el crecimiento promedio de microrganismos más bajo, son los tratamientos T7, T5 y T4, que son significativamente iguales entre sí y, significativamente diferentes de los demás tratamientos, analizada por la prueba Duncan a un nivel se significancia del 0.05.

En el Anexo 6, observamos que a un nivel se significancia del 0.01, existe diferencia significativa en bloque y en tratamientos, esto nos indica que al

menos un valor medio de algún tratamiento difiere del resto, de igual forma para el tiempo de fermentación (crecimiento microbiano), al menos un valor medio difiere del resto, lo que indica que en tiempos que se controló tiene diferencia.

El crecimiento de microrganismos en función a tiempo (t) de la levadura tipo 1(fermol rouge) se desarrolla significativamente hasta las 30 horas, anexo 7, posterior a ello se mantiene estable la cantidad de microorganismos mostrando el inicio de la etapa estacionaria en 30, 32 y 34 horas, donde se observa el consumo total del sustrato en la fermentación alcohólica.

El análisis de varianza anexo 13 nos muestra que los parámetros de estudio nitrógeno fácilmente asimilable, dióxido de azufre, temperatura, de la levadura tipo 1 fermol rouge no son significativos, solo el dióxido de azufre es significativo por lo que explica que el dióxido de azufre es un parámetro importante en el control y dosificación, en tanto a la interacción nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre, temperatura y dióxido de azufre son parámetros significativos, por lo que es importante el control y su dosificación, mientras que el nitrógeno fácilmente asimilable y temperatura no es significativo.

El análisis del comportamiento de dióxido de azufre propuestos a; 5 g/hL y de 7.5 g/hL y 10 g/hL, son significativos entre sí, por lo cual, el más adecuado para la experimentación es de 5 g/hL, tal y como se muestra en la tabla de test Duncan anexo 14.

4.1.2. Levadura fermol associees

Tabla 8. Comparación múltiple según tratamientos, levadura tipo 2

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 13620.9652 gl: 112

Tratamientos	Medias	n	E.E.				
T7	103.87	9	38.90	A			
T1	134.01	9	38.90	A			
T12	153.61	9	38.90	A	B		
T13	159.94	9	38.90	A	B		
T14	178.03	9	38.90	A	B		
T11	179.44	9	38.90	A	B		
T15	208.58	9	38.90	A	B		
T10	276.11	9	38.90		B	C	
T4	327.78	9	38.90			C	D
T9	340.28	9	38.90			C	D
T8	343.33	9	38.90			C	D
T5	360.83	9	38.90			C	D E
T2	406.94	9	38.90				D E
T3	428.89	9	38.90				D E
T6	478.89	9	38.90				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

El crecimiento más alto de microrganismos en levadura tipo 2 (fermol associees), es el tratamiento T6 como registro con mayor crecimiento de microrganismos, como muestra la tabla 8, mientras que el registro más bajo fue el tratamiento T7, como se muestra el análisis Duncan a un nivel se significancia del 0.05, estableciendo la producción media de microorganismos en los tratamientos T5, T2, T3 y T6 son homogéneos.

En el anexo 8, Observamos que a un nivel se significancia del 0.01, existe diferencia significativa en bloque y en tratamientos, esto nos indica que al menos un valor medio de algún tratamiento difiere del resto, de igual forma para el tiempo de fermentación, al menos un valor medio difiere del resto.

En el anexo 9, observamos que el crecimiento promedio de los

microorganismos a través de las horas de fermentación, es de manera constante, en las horas 30, 32 y 34 donde se registraron los crecimientos más altos, siendo estos no significativas. Lo que indica que desde la hora 30 – 34 ya inicia la etapa estacionaria, que es netamente la producción de etanol (alcohol) en el proceso de fermentación, en el test Duncan del anexo 11, se estableció que la temperatura adecuada para la fermentación, crecimiento microbiano es de 30°C, que es significativo, de las temperaturas 22°C, 26°C que son no significativos, y no se toma en cuenta en el resultado final.

4.1.3. Analizando por tipo de levadura.

El análisis de crecimiento microbiano por tipo de levadura (fermol rouge, fermol associees), presenta como mejor tratamiento (T6) del tipo de levadura (fermol rouge), con la siguiente combinación; 160 g/hL de nitrógeno fácilmente asimilable, 5 g/hL de dióxido de azufre, 30 ºC y 30 horas (t), este resultado ajusta al modelado matemático de la ecuación Gompertz, en la producción de vino mediante la fermentación alcohólica, como (Valbuena, 2009) indica la utilización de modelos cinéticos con el objeto de describir el crecimiento de este microorganismo en leche en polvo reconstituida, con los cuales es posible predecir su dinámica dentro del rango de temperatura estudiado, entre 9 y 39° C, utilizó la ecuación de Gompertz con cuatro parámetros de regresión para modelar cada una de las curvas de crecimiento obtenidas experimentalmente. Como resultados, se obtuvieron los parámetros necesarios para calcular la fase de

adaptación, tasa de crecimiento exponencial y el tiempo de generación. A lo que resalta (Valbuena, 2009) estos parámetros microbiológicos fueron relacionados con la temperatura en un modelo secundario, en el cual, la fase de adaptación y el tiempo de generación fueron bien ajustados utilizando una ecuación matemática.

El comportamiento de crecimiento de microorganismos se observa en los (anexos 6 al 14) de tes Duncan y análisis de varianza, para fermol rouge obteniendo el mejor tratamiento (T6), con un desarrollo de $1.3875x19^{9}$ UFC/mL en 30 horas y para fermol associees el tratamiento (T6) con un desarrollo de $6.625x10^{8}$ UFC/mL en 32 horas, datos que ajustan a la ecuación Gompertz, como muestra (I. Swinnen, 2004) en su investigación, mediante modelar y simular a nivel de individuos son buenas herramientas para explorar los mecanismos biológicos de los microorganismos. También es una buena manera de estudiar en profundidad las restricciones físicas de las células individuales, algo no tomado en cuenta en los antes mencionados tratamientos matemáticos.

Factor nitrógeno fácilmente asimilable

La dosificación y adición de nitrógeno fácilmente asimilable en la experimentación no es significativo, es decir que la dosis adicionada presenta comportamientos similares de crecimiento microbiano, anexo 10 y anexo 13, el factor Nitrógeno fácilmente asimilable (p-valor=0.5853) y (p-valor=0.0516), pero resalta la importancia de la utilización como un factor importante en la iniciación de la fermentación alcohólica (Torija 2003)

consideran que el margen para que el nitrógeno fácilmente asimilable presente en el medio, es suficiente o ser limitado para las levaduras, es notable que los primeras síntomas de estrés en las levaduras es provocado por falta de nitrógeno fácilmente asimilable que aparecen repentinamente, esto explicaría que fermentaciones con bajo contenido de nitrógeno fácilmente asimilable se desarrollan con normalidad aunque se encuentran próximas a este punto crítico, siempre que no lleguen a alcanzarlo, la explicación en última instancia, estaría en relación con mayor habilidad de ciertas cepas para utilizar el nitrógeno fácilmente asimilable disponible (Bisson y Butzke, 2000) ya que se ha comprobado que tanto los requerimientos en nitrógeno fácilmente asimilable como la eficacia en su utilización es diferente en función a la levadura (Julian, 2000), que esta diferencia tiene una base genética (poole, 2000) la disponibilidad de Nitrógeno fácilmente asimilable afecta también a la formación de compuestos volátiles y no volátiles, los cuales son de gran importancia para las calidades organolépticas del vino final. La concentración de compuestos no volátiles, como son el glicerol, el ácido málico, ácido succínico o ácido acetoglutárico, pueden variar dependiendo de la cantidad y la fuente nitrogenada presente en los mostos. En un trabajo de (Beltran y cols. 2005) observaron que la concentración de glicerol disminuye en fermentaciones con limitación de Nitrógeno fácilmente asimilable. Este demuestra que la producción de glicerol es directamente proporcional a la producción de biomasa (G. Beltran. Bisson, 2005).

Factor dióxido de azufre

La dosificación de dióxido de azufre establecidos en el estudio (5, 7.5, 10 g/hL) en la fermentación alcohólica, proponen como mejor dosis a 5 g/hL, el cual permite y garantiza la inocuidad inhibiendo microorganismos externos al estudio y permitiendo solo el desarrollo de la cepa en estudio (fermol rouge, fermol associees), tal y como se muestra en el tabla de test Duncan anexo12, y En el anexo 13, observamos que solo el factor Dióxido (p-valor=0.0516) es significativo a nivel de 0.05, esto indica que los diferentes niveles de dióxido de azufre aplicados a los tratamientos generan diferentes crecimientos de microorganismos, esto se visualiza en el anexo 14, la prueba Duncan establece que los niveles de dióxido de azufre de 7.5 y 5, generan igual crecimiento de microrganismos, en tanto (Analía, 2013) en su investigación evalúa la resistencia de la levadura con adición de dióxido de azufre, en tres concentraciones aplicadas a mosto estéril (50-100-200 ppm). En los resultados se observó que sólo el 10% de las cepas no lograron crecer en presencia de dióxido de azufre, mientras que el 12,5% toleró la presencia de 50 ppm, el 77,5% restante pudo desarrollar con 100 ppm, pero ningún aislado sobrevivió en concentraciones de 200 ppm de dióxido de azufre, el sulfitado produce una esterilización parcial del mosto, permitiendo el control de microorganismos indeseables favoreciendo el desarrollo de cepas de Sacchromyces cerevisiae que son resistentes, por ello resulta importante conocer la tolerancia a la acción de este compuesto, no para su adición en forma indiscriminada sino para hacerlo de la manera adecuada, ya que un exceso en la dosis produce

alteraciones organolépticas y genera problemas legales ya que su contenido en mostos y vinos se encuentra legislado por el Instituto Nacional del Vino (vino tinto seco 130 mg/L, para blanco y rosado seco y tinto abocado y dulce 180 mg/L en vino, vinos blanco y rosado abocado y dulce 210 mg/L, (Vino, 2004) esto indica que los diferentes niveles de dióxido aplicados a los tratamientos generan crecimientos medios de microorganismos diferentes, en el anexo 13, la prueba Duncan establece que a un nivel de dióxido de 7.5 y 5, los crecimientos de microorganismos son significativamente iguales.

Factor temperatura

El control de la temperatura es determinante en la experimentación por lo que se planteó trabajar a 22, 26 y 30 ºC, encontrando el máximo crecimiento microbiano a 30 ºC con un valor significativo (0.01), esto indica que los diferentes niveles de temperatura aplicados a los tratamientos generan crecimientos medios de microorganismos, en el anexo 11, la prueba Duncan establece que a una temperatura de 30°C el crecimiento de microorganismos es significativamente diferente de las temperaturas 26°C y 22°C, (Valbuena, 2009) para predecir su dinámica dentro del rango de temperatura, para calcular la fase de adaptación (i), tasa de crecimiento exponencial (µm) y el tiempo de generación (Tg), Estos parámetros microbiológicos fueron relacionados con la temperatura, incluyendo en el modelo la cinética, (Rafaela, 2008) a partir de la temperatura se generaron datos sobre el tiempo de latencia y tasa de crecimiento en un rango de temperaturas (5°C a 34°C) y pH obteniéndose la relación lineal entre cada

parámetro y temperatura (Ross T. M., 2000) los factores determinantes que predominan en el crecimiento de microorganismos son sólo unos pocos, entre los que destacan pH, aW y temperatura (Madigan, Brock Biology of Microorganisms., 1997) como también la tasa del crecimiento exponencial se ve influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio), así como por las características genéticas del microorganismo, así mismo hace que disminuya la proporción de células de levaduras en crecimiento y modifica la ecología de la fermentación (Beltran, y otros, 2002) las condiciones de cada cosecha (composición del mosto, procesos elaboración, sulfitación, temperatura, etc.) van a determinar el desarrollo posterior de las cepas durante la fermentación (Santamaría, 2005), En este intervalo una variación de temperatura afecta negativamente la tasa de crecimiento alrededor de un óptimo situado en torno a 30 °C (Flanzy, 2000).

4.2. Ajuste de la fermentación de la uva (*Vitis labrusca L.*) al modelo matemático (Gompertz)

4.2.1. Para la levadura fermol rouge

Obteniendo los resultados de los datos del análisis estadístico análisis de varianza, test Duncan se encontró los tratamientos de mejor comportamiento a los experimentos T 6, y T9. Del tipo de levadura 1 fermol rouge, los que se ajustó al modelamiento en el modelo Gompertz, y al mismo que se obtiene los variables dependientes de estudios de; el umax = 0.6049392, landa = 5.85979561, G(tg)= 1.14581296 que proporcionan el resultado que se asemeja a la curva de crecimiento microbiano, en la simulación gráfico, con el R^2 = 0.96978276, que valida el análisis y el modelo matemático como se muestra en la tabla 9, así como el (Consejo Nacional de Investigaciones, 2008), generaron datos sobre el tiempo de latencia (ë) y tasa de crecimiento (µ) en un rango de temperaturas (5°C a 34°C) y pH (5,6 – 6,5), obteniéndose la relación lineal entre cada parámetro y temperatura, al mismo se incluyeron las ecuaciones lineales en distribuciones de probabilidad para cada parámetro y se corrió un modelo para analizar el comportamiento de las ecuaciones logaritmo exponencial y Gompertz en la predicción del crecimiento, así como en la investigación citada también encontró (Rafaela, 2008) Gompertz fue el modelo microbiológico que generó mejores resultados, ya que al considerar la concentración de bacterias que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, evita obtener valores extremadamente elevados, en tanto que (Castro G. V., 2008) de la misma forma llegan a un resultado que modelos

de Stannard y Richards resultaron ser iguales en la estimación de los datos y fueron los que presentaron mayor dificultad para alcanzar el criterio de convergencia, por lo cual el modelo de Gompertz de tres parámetros presentó diferencia significativa con los modelos de cuatro parámetros. Se considera los modelos de Gompertz y Logístico (con tres parámetros), modificados por Gibson, como los mejores para modelar y predecir el crecimiento del microorganismo en estudio.

Tabla 9. Tratamiento 6 datos modelo Gompertz

CONSTANTES		
A	**B**	**C**
3.240063	2.094059	0.186706
Umax	0.6049392	
Lamda	5.85979561	
G(tg)	1.14581296	
R2	0.96978276	
R	0.98477549	

Dónde: a, b, c = Constantes

Umax = Velocidad especifica de crecimiento (horas E-1)

Landa = Duración de la fase de latencia (horas)

G = Tiempo de generación(horas)

Como resultado final al análisis de datos llegamos a la siguiente ecuación de **(Modelo Gompertz).**

$$LEVADURA_P = a * Exp(-Exp(b - c * T))$$

Remplazado los datos obtenidos de la tabla 9, para la simulación en el gráfico de crecimiento microbiano que se expresara en el resultado 4.3.

$$LEVADURA_P \ Y = (3.34006) * Exp(-Exp((2.09406) - (0.186706 * x))$$

Dónde: LEVADURA Y = cantidad de microorganismos

Exp = exponentes

x = tiempo en horas

Tabla 70. Tratamiento 9 datos modelo Gompertz

CONSTANTES		
A	**B**	**c**
3.340043	1.860643	0.166444
Umax	0.55593012	
Lamda	5.17076614	
G(tg)	1.2468243	
R2	0.95942574	
R	0.9795028	

Dónde: a, b, c = Constantes

Umax = Velocidad especifica de crecimiento (horas E-1)

Landa = Duración de la fase de latencia (horas)

G = Tiempo de generación(horas)

Como resultado final al análisis de datos llegamos a la siguiente ecuación de **(Modelo Gompertz).**

$$LEVADURA_P = a * Exp(-Exp(b - c * T))$$

Remplazado los datos obtenidos para la simulación en el gráfico de crecimiento microbiano que se expresara en el resultado 4,3.

$$LEVADURA_P\ Y = (3.34004) * Exp(-Exp(2.0946) - (1.86064) * x))$$

Dónde: LEVADURA Y = cantidad de microorganismos

Exp = exponentes

x = tiempo en horas

4.2.2. Para la levadura fermol associees

El resultado obteniendo mediante los datos del análisis estadístico (análisis de varianza, test Duncan, se encontró como tratamiento de mejor comportamiento a los experimentos T3, y T6. Del tipo de levadura 2 fermol associees, los que son llevados al modelamiento en el modelo Gompertz, y al mismo que se obtiene los variables dependientes de estudios de; el umax = 5.20925288, landa = 25.6920528, G(tg)= 0.13306077 que proporcionan el resultado que se asemeja a la curva de crecimiento microbiano, en la simulación gráfico, con el R^2 = 0.88407125, que valida el análisis y el modelo matemático como se muestra en la tabla 11, asi también el (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas, 2008). Ralizo una investigación para comprobar en el estudio realizado u objetivo del

estudio fue modelar el crecimiento microbiano de *Escherichia coli* O157 en carne vacuna (hamburguesas) como parte de una evaluación cuantitativa de riesgos. Gompertz fue el modelo microbiológico que mejores resultados generó, ya que al considerar la concentración de bacterias que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, evita obtener valores extremadamente elevados.

Tabla 81. Tratamiento 3 datos modelo Gompertz

CONSTANTES		
A	**B**	**C**
2.699250	50.582810	1.929889
Umax	5.20925288	
Lamda	25.6920528	
G(tg)	0.13306077	
R2	0.88407125	
R	0.94025063	

Dónde: a, b, c = Constantes

Umax = Velocidad especifica de crecimiento (horas E-1)

Landa = Duración de la fase de latencia (horas)

G = Tiempo de generación(horas)

Como resultado final al análisis de datos llegamos a la siguiente ecuación de **(Modelo Gompertz).**

$$LEVADURA \quad = a * Exp(-Exp(b - c * T))$$

Remplazado los datos obtenidos para la simulación en el gráfico de crecimiento microbiano que se expresara en el resultado 4.3.

$$LEVADURA_A \ Y = (2.69925) * Exp(-Exp((50.5828) - (1.92989) * x))$$

Dónde: LEVADURA Y = cantidad de microorganismos

Exp = exponentes

x = tiempo en horas

Tabla 92. Tratamiento 6 datos modelo Gompertz

CONSTANTES		
A	**B**	**C**
2.990315	2.026951	0.164010
Umax	0.49044156	
Lamda	6.26151454	
G(tg)	1.41331248	
R2	0.9609467	
R	0.98027889	

Dónde: a, b, c = Constantes

Umax = Velocidad especifica de crecimiento (horas E-1)

Landa = Duración de la fase de latencia (horas)

G = Tiempo de generación(horas)

Como resultado final al análisis de datos llegamos a la siguiente ecuación de **(Modelo Gompertz).**

$$LEVADURA \quad = a * Exp(-Exp(b - c * T))$$

Remplazado los datos obtenidos para la simulación en el gráfico de crecimiento microbiano que se expresara en el resultado 4.3.

$$LEVADURA_A \ Y = (2.99031) * Exp(-Exp((2.02695) - (o.16401) * x))$$

Dónde: LEVADURA Y = cantidad de microorganismos

Exp = exponentes

x = tiempo en horas

4.3. Crecimiento de levaduras con los parámetros obtenidos de la fermentación de uva.

4.3.1. Tipo de levadura 1 fermol rouge

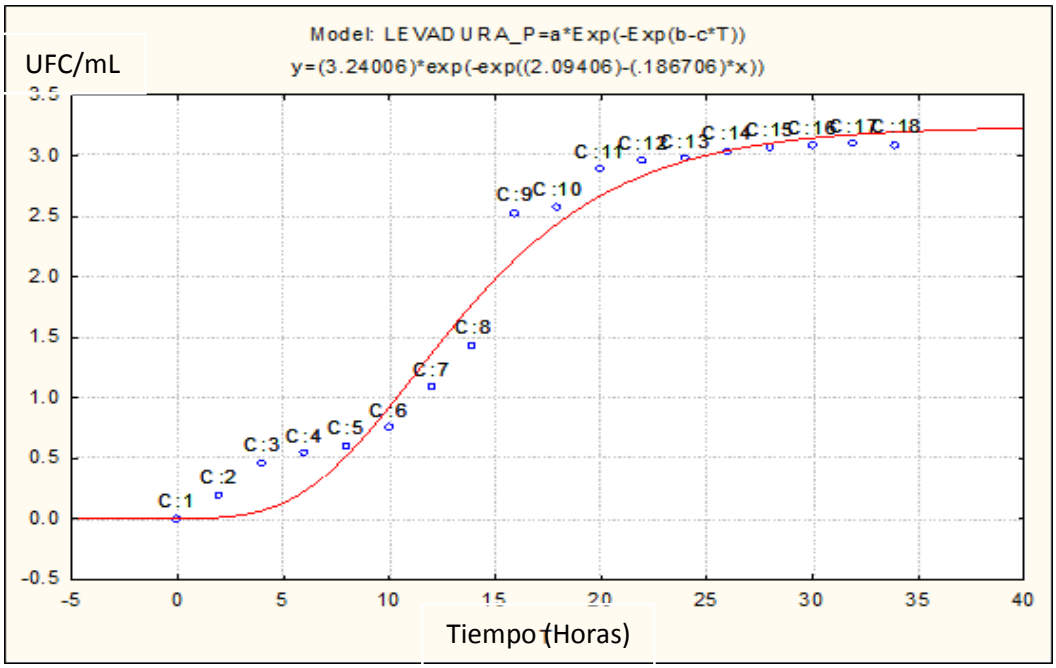


Figura 4. Tratamiento 6 simulación de modelo Gompertz.

Como resultado final se describe la simulación del modelo Gompertz del tratamiento 6, (tiempo = 30 horas, temperatura 30°C, nitrógeno fácilmente asimilable = 160 g/hL, dióxido de azufre 5 g/hL) se observa el desarrollo de los microorganismos de acuerdo al tiempo y unidades formadoras de colonia UFC, obteniendo sus etapas de adaptación, logarítmica, estacionaria. Lo cual se ve fase de adaptación tiempo C1, C2, C3, C4, C5, la fase logarítmica ya inicia desde el punto C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, la fase estacionaria esta del C13, hasta el final en tiempo 34 horas.

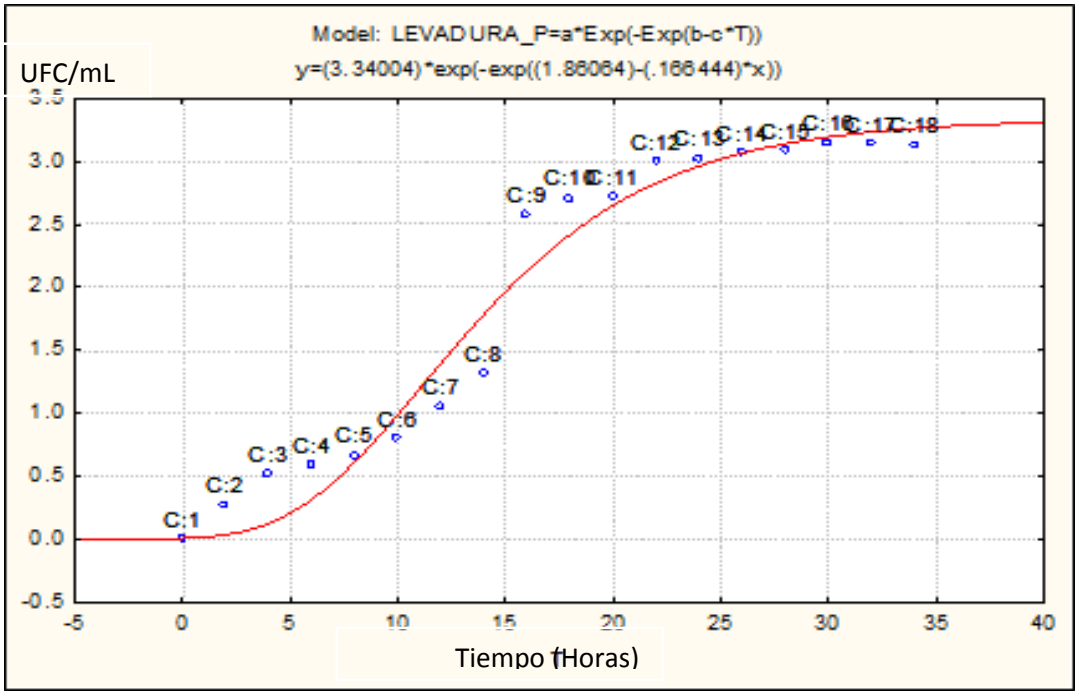


Figura 5. Tratamiento 9 simulación de modelo Gompertz.

Se describe la simulación del modelo Gompertz del tratamiento 9, (tiempo = 30 horas, temperatura 26°C, nitrógeno fácilmente asimilable = 140 g/hL, dióxido de azufre 5 g/hL) se observa el desarrollo de los microorganismos de acuerdo al tiempo y unidades formadoras de colonia UFC, obteniendo sus etapas de adaptación, logarítmica, estacionaria. Lo cual se ve fase de adaptación tiempo C1, C2, C3, C4, C5, la fase logarítmica ya inicia desde el punto C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, la fase estacionaria esta del C13, a más como se muestra en la figura 5.

4.3.2. Tipo de levadura 2 fermol associees.

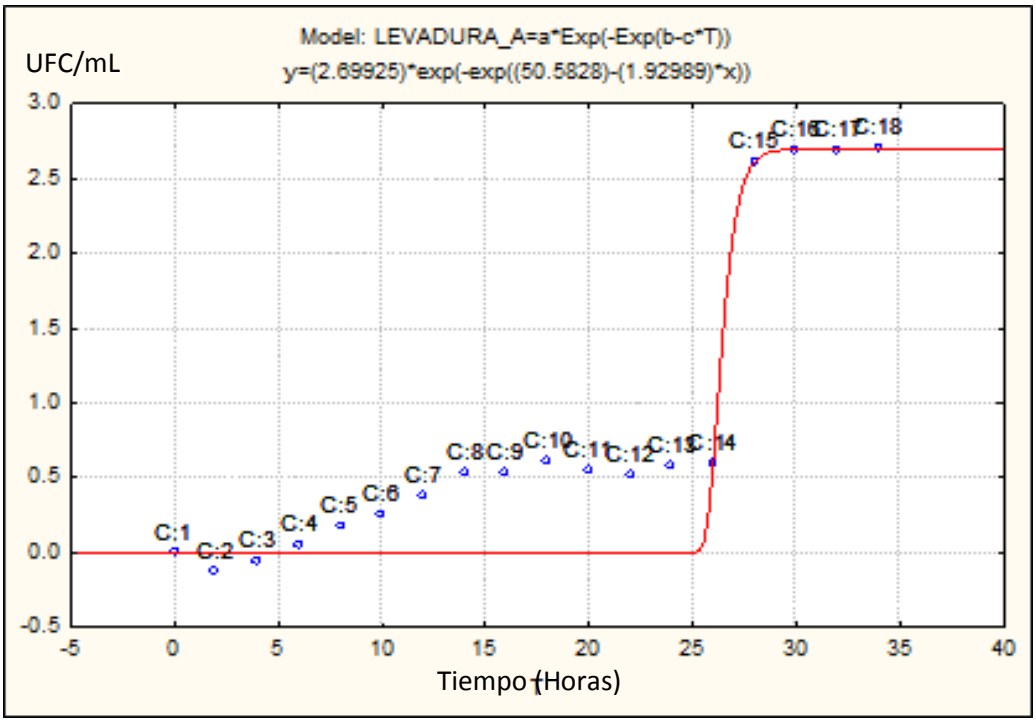


Figura 6. Tratamiento 3 simulación de modelo Gompertz.

Se explica la simulación del modelo Gompertz del tratamiento 3, (tiempo = 30 horas, temperatura 22°C, nitrógeno fácilmente asimilable = 180 g/hL, dióxido de azufre 7.5 g/hL) se observa el desarrollo de los microorganismos de acuerdo al tiempo y unidades formadoras de colonia UFC, obteniendo sus etapas de adaptación, logarítmica, estacionaria. Lo cual se ve fase de adaptación tiempo. C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, la fase logarítmica ya inicia desde el punto, C14, C15, la fase estacionaria esta del C16, a más como se muestra en la figura 6.

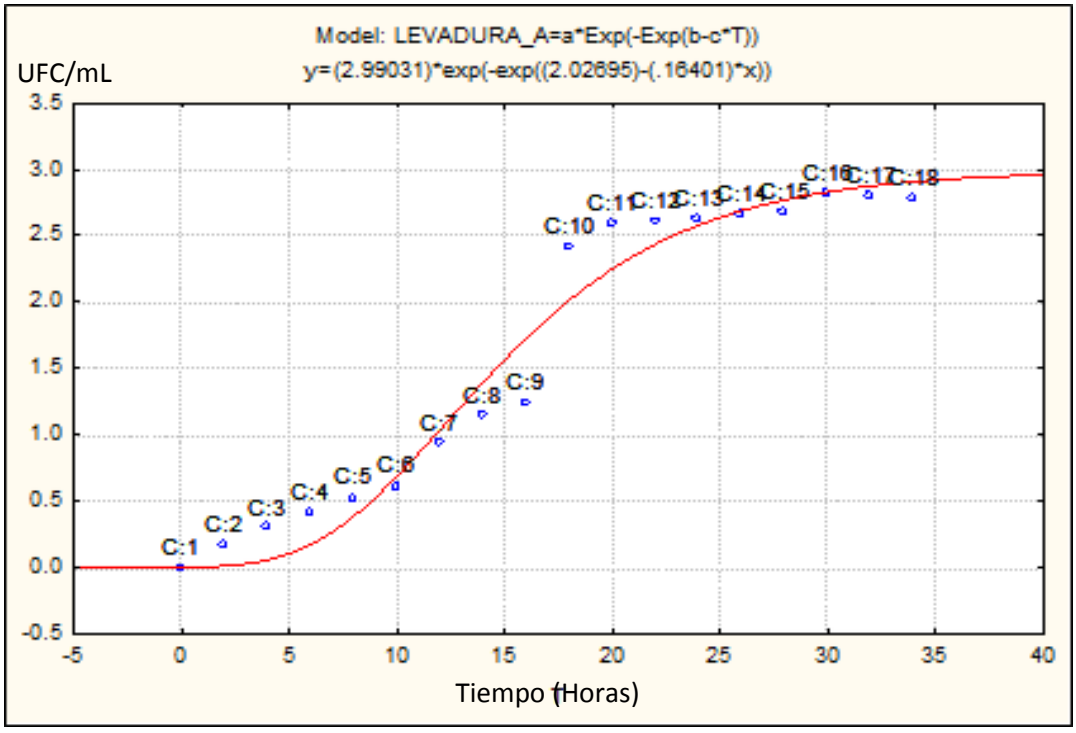


Figura 7. Tratamiento 6 simulación del modelo Gompertz.

Se explica la simulación del modelo Gompertz del tratamiento 6, (tiempo = 30 horas, temperatura 26°C, nitrógeno fácilmente asimilable = 140 g/hL, dióxido de azufre 5 g/hL) se observa el desarrollo de los microorganismos de acuerdo al tiempo y unidades formadoras de colonia UFC, obteniendo sus etapas de adaptación, logarítmica, estacionaria. Lo cual se ve fase de adaptación tiempo C1, C2, C3, C4, C5, la fase logarítmica ya inicia desde el punto C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, la fase estacionaria esta del C13, a más como se muestra en la figura 7.

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los análisis experimentales del estudio de investigación empleadas en este trabajo, se concluye:

La levadura fermol rouge, se adaptó a las condiciones establecidas (temperatura de 30 °C, nitrógeno fácilmente asimilable de 160 g/hL y dióxido de azufre de 5 g/hL), obteniéndose un desarrollo de microrganismos 1.3875x19^{9} UFC/mL en un tiempo de 32 horas que corresponde al tratamiento N° 6 del estudio, en tanto para la levadura fermol associees, se observó que ha (temperatura de 30 °C, nitrógeno fácilmente asimilable de 160 g/hL y dióxido de azufre de 5 g/hL), desarrollaron 6.625x10^{8} UFC/mL en un tiempo de 30 horas que corresponde al tratamiento N° 6 del estudio de la investigación.

Los parámetros determinados en la etapa de experimentación (temperatura de 30 °C, nitrógeno fácilmente asimilable de 160 g/hL y dióxido de azufre de 5 g/hL), permitió ajustar al modelo matemático Gompertz ($\mathrm{LEVADURA} = \mathrm{a} * \mathrm{Exp}(-\mathrm{Exp}(\mathrm{b} - \mathrm{c} * \mathrm{T}))$), estandarizando el proceso en la etapa de fermentación mediante el control del tiempo en relación al máximo desarrollo de microrganismos

El modelo Gompertz ($\mathrm{LEVADURA} = \mathrm{a} * \mathrm{Exp}(-\mathrm{Exp}(\mathrm{b} - \mathrm{c} * \mathrm{T}))$) ajustado con los parámetros determinados en la etapa de experimentación (temperatura de 30 °C, nitrógeno fácilmente asimilable de 160 g/hL y dióxido de azufre de 5 g/hL), permitió la simulación del grafico e identificando las etapas (Tiempo de generación, Velocidad máxima de crecimiento, Fase de latencia), a la curva de crecimiento microbiano de las dos cepas más utilizadas en la producción del vino de la Región de Moquegua.

VI. RECOMENDACIONES

1. Determinar el tiempo adecuado de adición de las levaduras comerciales al mosto para la producción de vino.

2. Realizar estudios de análisis de efectos secundarios que puedan ocasionar la adición de dióxido de azufre en el proceso de fermentación del vino y su posible justificación.

3. Realizar estudios del desarrollo identificación selección y aislamiento de la levadura nativa existente en la uva para su análisis y aplicación al proceso de elaboración del vino.

4. Realizar estudios de aplicación de la ecuación con los parámetros de control ajustado al modelo Gompertz y así mismo hacer las pruebas y análisis fisicoquímico y sensorial del producto terminado.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Adaams, P. R. (1992). Adaptation and major chromosomal changes in populations of Saccharomyces cerevisiae. Curr. Biol. 22: 13-19.

Alonzo, A. L. (2005). Merlot sobre la composición química y sensorial de los vinos en el valle del maipo. *Efecto del momento de cosecha de uva cv.* .

Analía, B. (2013). Resistencia al ioxido de azufre. *Resolución I.N.V*, C-143/94.

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

Beltran, G., Torija, M. J., Nova, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Rozès. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *System Appl. Microbiol.*, 25: 287-293.

Bisson, L. A. (1999). Stuck and sluggish fermentation. . *Enol. Vitic.*, 50: 107-119.

Buchanan, R. L. (1991). Effect of temperature history on the growth of Listeria monocytogenes Scott A at refrigeration temperatures.International Journal of Food Microbiology . *And Klawutter, L.A.*, 12: 235-246.

Castro, G. V. (2008). *Comparacion de modelos sigmoidales aplicados al creciiento de Lactococcus lactis subsp. lactis.* Venezuela.

Castro, G. V. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de Lactococcus lactis subsp. *Lactis en la que muestra*.

Chávez, J. (2011). estudio de las cualidades morfologicas y ampelograficas de la variedad de uva Borgoña cultivada en la cuenca del Alto Jequetepeque. . *Revista Cientifica de la Escuela de Post Grado Universidad de Cajamarca, Peru*.

Ciani, V. (2002). The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. *Sci. Food Agric.*, 82: 573-578.

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas, T. (2008). Modelo matemático predictivo del crecimiento de Escherichia coli O157 en carne vacuna. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Rafaela*.

Consejo Nacional de Investigaciones, C. (2008). Modelo matemático predictivo del crecimiento de Escherichia coli O157 en carne vacuna. *Técnicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*.

Constantí, R. P. (1998). Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol*, 41: 169-175.

Dalgaard, P. B. (2002). Seafood Spoilage Predictor Development and distribution of a product specific application software. . *International Journal of Food Microbiology* , 73:343 – 349.

Degre, R. e. (1993). Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In Wine Microbiology and Biotechnology. *Switzerland: Harwood Academic*, 421-447.

Degre, R. e. (1993). Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In Wine Microbiology and Biotechnology. *Switzerland: Harwood Academic* , 421-447.

Ebeler., S. E. (2001). Wine and grape flavor. Composition, Analysis. *Recent Research*.

Epifanio, G. S. (1999). The influence of enological practices on the selection of wild yeast strain spontaneous fermentation. *Enol. Vitic.*, 50 (2): 219-224.

Esteve, Z. (2001). Estudio de la micro biota presente durante la fermentación espontánea de los mostos procedentes de distintas variedades de uvas en la zona de El Penedés.

F., E. (2004). El vino, conózcalo y disfrutalo. *Editorial Roma. Bogota Colombia*, 188 p.

Fernández Espinar, E.-Z. Q. (2000). Analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus

Saccahromyces: a fast method for species identification and the differentiation. *RFLP offlor Yeat. Anton. Leeuw.*, 78: 87-97.

Fernández-Espinar, M. T., López, V., Ramón, D., Bartra, E., & Querol, A. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. . *Int. J. Food. Microbiol.*, 70: 1-10.

Flanzy, C. (2000). Enologia fundamentos científicos tecnológicos, en vinificación en vinos tintos.

G. Beltran. Bisson, B. E.-Z. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J Agric. Food Chem*, 53: 996-1002.

Geeraerd, A. H. (2004). Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology. *incorporation of microbiological knowledge in black box polynomi*.

Giffel, M. C. (1999). Validation of predictive models describing the growth of Listeria monocytogenes . *International Journal of*.

Granchi, G. V. (2003). Saccharomyces cerevisiae biodiversity in spontaneous commercial fermentations of grape musts with ‘adequate’ and ‘inadequate’ assimilable-nitrogen. *Appl. Microbiol.*, 36: 54-58.

Hidalgo, L. (2003). Tratado de Vinicultura General . *Ed. Mundi-Prensa. Madrid*.

Hornsey, I. (2003). Elaboración de cerveza: microbiología. *bioquímica y tecnología Acrivia S.A. Zaragoza, España.*

I. García, M. J.-A.-B. (2001). Composición química de la vid. *Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2002, 19: 332-337*.

I. Swinnen, K. B. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. . *International Journal of Food Microbiology.* , 94: 137–159.

Kocková-Kratochvilová, A. (1990). Kolodner, R. D.; Putnam, C. D.; Myung, K. Maintenance of genome stability in Saccharomyces cerevisiae. . *Yesast and yeast-like organisms. VCH*.

Longo, C. A. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape must from Northwest Spain. *Enol. Vitic*, 42: 141-144.

Longo, E., & Vezinhet, F. (1993). Chromosomal rearrangements during vegetative growth of wild strain of Saccharomyces cerevisiae. . *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 322- 326.

Madigan, M. T. (1997). Brock Biology of Microorganisms. *Ed. Prentice Hall International*, pp. 149 – 177.

Madigan, M. T. (1999). Brock Biología de los Microorganismos. . *Ed. Prentice Hall Iberia. 8ª Ed. Revisada.*, 149 – 177.

Madigan, M. T. (1999). Brock Biología de los Microorganismos. Ed. Prentice Hall Iberia. *8ª Ed. Revisada, Inc. pp.* , 149 – 177.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (1999).Brock Biología de los Microorganismos. Ed. Prentice Hall Iberia. 8ª Ed. Revisada. (s.f.). , Inc. pp. 149 – 177.

McMeekin, O. T. (1993). Predictive microbiology.Theory and application. *Research studies Press Ltd., Taunton.*

McMeekin, T. A. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. . *International Journal of Food Microbiology* , 78:133 – 153.

Molecular, S. E. (2013). Bioquimica del proceso del vino. *SEBBM*, 176.

Montville, T. J. (2000). Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos. In: Doyle, M. P.; Beuchat, L.R.; and Montville, T. J. (2000). Microbiología de los Alimentos. Fundamentos and Fronteras. *Editorial Acribia S. A. Zaragoza España*, 13-30.

Motville, T. J. (s.f.). Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos. In: Doyle, M. P.; Beuchat, L.R.; and Montville, T. J. (2000). Microbiología de los Alimentos. . *Fundamentos and Fronteras. Editorial Acribia, s. A.*

Naumov, M. N. (2002). Association of Saccharomyces bayanus var. uvarum with some French wines: genetic. *Res. Microbiol*, 151.

Prescott, L. (1999). M., Harley, J.P., and Klein, D.A. Microbiologia. *4° Edicion, McGraw-Hill. Linteramericana.*, 114-136.

Presser. (1997). La microbiología predictiva combina el conocimiento del crecimiento microbiano . *Conocimientos Cientificos*.

R. McKellar, X. L. (2002). Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of Listeria monocytogenes. *International Journal of Food Microbiology.*, 73: 127–135.

Rafaela, I. N. (2008). Modelo matemático predictivo del crecimiento de Escherichia coli O157 en carne vacuna. *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas*.

Rasch, M. (2004). Experimental design and data collection. In: R. C. McKellar and X. Lu (Ed.). Modelling microbial responses in food. *CRC Series in Contemporary Food Science.CRC Press.* , 1 – 14.

Robinson, T. P. (1998). The effect of growth environment on the lag phase of Listeria monocytogenes. *International Journal of Food Microbiology*, 44:83-92.

Ross, T. (1999). Predictive Microbiology for the Meat Industry.Meat and Livestock Australia,. *North Sydney.*, 196 .

Ross, T. M. (2000). Predictive microbiology and food safety. En: . *Encyclopedia of Food Microbiology. R.K. Robinson, C.A. Batt and P.D. Patel (eds), Academic Press, San Diego*, 1699-1710.

Salazar, D. y. (2005). Viticultura. Tecnicas de Cultivo de la Vid, calidad . *THE HISTORY OF WINE AND THE GROWING OF GRAPES; AS EXPRESSED*.

Santamaría. (2005). Variabilidad de cepas de levaduras . *Vino Borgoña*.

Santos. (2007). Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos. Memoria presentada para optar al Título de Doctor en Veterinaria,. *correspondiente al programa de Doctorado*.

Stanier, R. Y. (1998). Microbiología 2 . *Ed. Ed. Reverté.* , pp. 195 – 209.

Swinnem, I. A. (2004). Predictive modelling oh the microbial lag phase: a review. International Journal of Food Microbiology. *And Van Impe, J. F:*, 94: 137-159.

Tienungoon, S. R. (2000). Growth limits of Listeria monocytogenes as a function of temperature, NaCl, pH, and lactic. *Applied and EnvironmentalMicrobiology* , 66:4979 –4987.

Toda., M. d. (2012). Historia del cultivo de la vid y el vino; su expresion en la Biblia. *ENSAYOS, Revista de la Faculdad de Educacion N° 27*.

V., A. (2008). *Aprende a conocer los vinos.* Barcelona , España: Robinbook.

Valbuena, E. B. (2009). Modelos cinéticos aplicados al crecimiento de Lactococcus lactis subsp. Lactis en leche.

Varela y cols, C. P. (2004). Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. . *Appl Env Microbiol* , 70:3392–3400.

Vino, I. N. (2004). ley general de vinos 14878. DecretoSupremo Nº 57/2004.

Whiting, R. C. (1993). A classification of models in predictive microbiology – a replay to K. R. . *Davey.Food Microbiology* , 10:175 – 177.

Yousef, C. C. (2006). Microbiología de los alimentos, manual de laboratorio. *Editorial Acribia. Zaragoza, España.*

Zwietering, M. C. (1994). Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. . *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 195-203.

Zwietering, M. J. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1875-1881.

ANEXOS

ANEXOS 1

Recolección de datos de la experimentación del control de crecimiento de microorganismos para el tipo de levadura fermol rouge.

TIEPO	HORA	EXP 1	EXP 2	EXP 3	EXP 4	EXP 5	EXP 6	EXP 7
		CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL
9:00:00 a. m.	0	750000	625000	875000	750000	1000000	1125000	875000
11:00:00 a. m.	2	1500000	1250000	1750000	1500000	2125000	1750000	2250000
1:00:00 p. m.	4	2000000	1750000	2000000	2375000	3000000	3250000	2750000
3:00:00 p. m.	6	3250000	3125000	3625000	3125000	3250000	3875000	3875000
5:00:00 p. m.	8	4500000	4250000	4375000	4000000	4000000	4500000	4250000
7:00:00 p. m.	10	5500000	5375000	5000000	6000000	7000000	6250000	4875000
9:00:00 p. m.	12	5875000	15000000	9250000	7500000	11875000	13625000	5000000
11:00:00 p. m.	14	14750000	27750000	14875000	13875000	13750000	30250000	6250000
1:00:00 a. m.	16	22750000	350000000	15250000	575000000	225000000	375000000	14500000
3:00:00 a. m.	18	250000000	450000000	350000000	600000000	240000000	415000000	150000000
5:00:00 a. m.	20	400000000	500000000	412500000	607500000	457500000	850000000	315000000
7:00:00 a. m.	22	455000000	600000000	565000000	582500000	487500000	1012500000	325000000
9:00:00 a. m.	24	537500000	625000000	700000000	712500000	675000000	1037500000	375000000
11:00:00 a. m.	26	762500000	800000000	650000000	762500000	750000000	1212500000	475000000
1:00:00 p. m.	28	1137500000	1150000000	875000000	800000000	875000000	1312500000	800000000
3:00:00 p. m.	30	1375000000	1125000000	1075000000	900000000	1050000000	1325000000	950000000
5:00:00 p. m.	32	1600000000	1125000000	1100000000	850000000	1050000000	1387500000	1000000000
7:00:00 p. m.	34	1600000000	950000000	1125000000	850000000	1075000000	1375000000	1025000000

EXP	EXP	EXP	EXP	EXP	EXP	EXP	EXP
8	9	10	11	12	13	14	15
CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL
1125000	1000000	1000000	1250000	1750000	1250000	1125000	1625000
1750000	1875000	2250000	1750000	2000000	1750000	2000000	2000000
2500000	3250000	3250000	3500000	3000000	4000000	3375000	3875000
2750000	3875000	4250000	4375000	4000000	4375000	4250000	5250000
3750000	4625000	4625000	5625000	4500000	5500000	4875000	5750000
5625000	6250000	5250000	6000000	5375000	6000000	5500000	6625000
7000000	11000000	11375000	6250000	6050000	13375000	12500000	13750000
11625000	20250000	25500000	12500000	13750000	20000000	19500000	19375000
175000000	375000000	275000000	250000000	100000000	350000000	112500000	125000000
225000000	512500000	350000000	287500000	150000000	437500000	237500000	375000000
280000000	525000000	350000000	280000000	387500000	450000000	287500000	525000000
390000000	1000000000	487500000	700000000	412500000	812500000	450000000	737500000
450000000	1062500000	600000000	850000000	450000000	925000000	600000000	800000000
700000000	1175000000	925000000	950000000	762500000	987500000	1000000000	850000000
975000000	1225000000	1100000000	1000000000	1137500000	1062500000	1237500000	950000000
1150000000	1400000000	1175000000	1025000000	1162500000	1200000000	1550000000	1050000000
1350000000	1375000000	1350000000	1000000000	1200000000	1125000000	1600000000	1125000000
1375000000	1350000000	1375000000	1025000000	1225000000	1150000000	1625000000	1150000000

ANEXOS 2

Recolección de datos de la experimentación del control de crecimiento de microorganismos para el tipo de levadura fermol associees.

TIEPO	HORA	EXP 1	EXP 2	EXP 3	EXP 4	EXP 5	EXP 6	EXP 7
		CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL
9:00:00 a. m.	0	2250000	2500000	2000000	1000000	1250000	1000000	1000000
11:00:00 a. m.	2	1500000	2750000	1500000	1250000	3000000	1500000	2000000
1:00:00 p. m.	4	1750000	2250000	1750000	1500000	2500000	2000000	2250000
3:00:00 p. m.	6	2500000	2750000	2250000	2000000	3125000	2625000	2625000
5:00:00 p. m.	8	3250000	3375000	3000000	3125000	3500000	3375000	3625000
7:00:00 p. m.	10	4000000	3625000	3625000	4000000	3875000	4125000	3750000
9:00:00 p. m.	12	5000000	6250000	4750000	9250000	4750000	8625000	4500000
11:00:00 p. m.	14	5600000	8625000	6750000	12500000	5650000	14000000	4900000
1:00:00 a. m.	16	7125000	15625000	6750000	11125000	8125000	17500000	7000000
3:00:00 a. m.	18	7750000	300000000	8250000	162500000	137500000	262500000	3450000
5:00:00 a. m.	20	7250000	300000000	7125000	212500000	150000000	387500000	4875000
7:00:00 a. m.	22	7625000	325000000	6625000	250000000	200000000	400000000	5500000
9:00:00 a. m.	24	8500000	375000000	7500000	212500000	425000000	425000000	6000000
11:00:00 a. m.	26	125000000	437500000	8000000	387500000	437500000	462500000	125000000
1:00:00 p. m.	28	200000000	450000000	825000000	375000000	425000000	475000000	125000000
3:00:00 p. m.	30	250000000	500000000	990000000	437500000	485000000	662500000	207500000
5:00:00 p. m.	32	300000000	500000000	992500000	462500000	512500000	625000000	220000000
7:00:00 p. m.	34	300000000	475000000	1015000000	450000000	475000000	610000000	237500000

EXP	EXP	EXP	EXP	EXP	EXP	EXP	EXP
8	9	10	11	12	13	14	15
CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL	CELULAS/mL
750000	1000000	1000000	1250000	1500000	1000000	1000000	1250000
2000000	1250000	1000000	1250000	1500000	1250000	1000000	1500000
2000000	1750000	2000000	2000000	2000000	1750000	2250000	2250000
3000000	2750000	3375000	3000000	2500000	3000000	3000000	3000000
3750000	4250000	4875000	3500000	3500000	3500000	3625000	4125000
4000000	4375000	5125000	3750000	4125000	4125000	4000000	4500000
5000000	5500000	5000000	4000000	5500000	4875000	4500000	3150000
6450000	11000000	13500000	8750000	4375000	7500000	4500000	6625000
12000000	11625000	212500000	7750000	10000000	6550000	7250000	6375000
87500000	112500000	137500000	62500000	62500000	12000000	7250000	7250000
225000000	150000000	150000000	125000000	87500000	62500000	87500000	100000000
287500000	187500000	262500000	125000000	150000000	125000000	137500000	187500000
350000000	375000000	250000000	162500000	105000000	155000000	175000000	187500000
387500000	412500000	312500000	187500000	175000000	175000000	225000000	250000000
400000000	425000000	300000000	180000000	150000000	182500000	150000000	225000000
400000000	450000000	347500000	220000000	165000000	240000000	207500000	295000000
465000000	475000000	350000000	265000000	237500000	225000000	300000000	300000000
487500000	475000000	375000000	287500000	250000000	262500000	312500000	325000000

ANEXOS 3. Crecimiento de microorganismos en relación de variables con el tiempo.

TIEMPO HORA	N° h	T. 1	T. 2	T. 3	T. 4	T. 5	T. 6	T. 7	T. 8	T. 9	T. 10	T. 11	T. 12	T. 13	T. 14	T. 15
9:00: am.	0															
11:00:am.	2															
1:00:p m.	4															
3:00 pm.	6															
5:00:pm.	8															
7:00:pm.	10															
9:00:pm.	12															
11:00:pm.	14															
1:00:am.	16															
3:00:am.	18															
5:00:am.	20															
7:00:am.	22															
9:00:am.	24															
11:00:am.	26															
1:00:pm.	28															
3:00:pm.	30															
5:00:pm.	32															
7:00:pm.	34															
9:00:pm.	36															

Fuente: Elaboración propia 2017.

ANEXO 4. Resultados de anova para el crecimiento de microorganismos y encontrar el mejor tratamiento en cuanto a al tiempo para encontrar la fase estacionaria.

HORA	LEVADURA 1	TRATAMIENTO	HORA
18	250	T1	HORA_18
20	400	T1	HORA_20
22	455	T1	HORA_22
24	537.5	T1	HORA_24
26	762.5	T1	HORA_26
28	1137.5	T1	HORA_28
30	1375	T1	HORA_30
32	1600	T1	HORA_32
34	1600	T1	HORA_34
18	450	T2	HORA_18
20	500	T2	HORA_20
22	600	T2	HORA_22
24	625	T2	HORA_24

26	800	T2	HORA_26
28	1150	T2	HORA_28
30	1125	T2	HORA_30
32	1125	T2	HORA_32
34	950	T2	HORA_34
18	350	T3	HORA_18
20	412.5	T3	HORA_20
22	565	T3	HORA_22
24	700	T3	HORA_24
26	650	T3	HORA_26
28	875	T3	HORA_28
30	1075	T3	HORA_30
32	1100	T3	HORA_32
34	1125	T3	HORA_34
18	600	T4	HORA_18
20	607.5	T4	HORA_20
22	582.5	T4	HORA_22
24	712.5	T4	HORA_24
26	762.5	T4	HORA_26
28	800	T4	HORA_28
30	900	T4	HORA_30
32	850	T4	HORA_32
34	850	T4	HORA_34
18	240	T5	HORA_18
20	457.5	T5	HORA_20
22	487.5	T5	HORA_22
24	675	T5	HORA_24
26	750	T5	HORA_26
28	875	T5	HORA_28
30	1050	T5	HORA_30
32	1050	T5	HORA_32
34	1075	T5	HORA_34
18	415	T6	HORA_18
20	850	T6	HORA_20
22	1012.5	T6	HORA_22
24	1037.5	T6	HORA_24
26	1212.5	T6	HORA_26
28	1312.5	T6	HORA_28
30	1325	T6	HORA_30
32	1387.5	T6	HORA_32
34	1375	T6	HORA_34
18	150	T7	HORA_18
20	315	T7	HORA_20
22	325	T7	HORA_22
24	375	T7	HORA_24

26	475	T7	HORA_26
28	800	T7	HORA_28
30	950	T7	HORA_30
32	1000	T7	HORA_32
34	1025	T7	HORA_34
18	225	T8	HORA_18
20	280	T8	HORA_20
22	390	T8	HORA_22
24	450	T8	HORA_24
26	700	T8	HORA_26
28	975	T8	HORA_28
30	1150	T8	HORA_30
32	1350	T8	HORA_32
34	1375	T8	HORA_34
18	512.5	T9	HORA_18
20	525	T9	HORA_20
22	1000	T9	HORA_22
24	1062.5	T9	HORA_24
26	1175	T9	HORA_26
28	1225	T9	HORA_28
30	1400	T9	HORA_30
32	1375	T9	HORA_32
34	1350	T9	HORA_34
18	350	T10	HORA_18
20	350	T10	HORA_20
22	487.5	T10	HORA_22
24	600	T10	HORA_24
26	925	T10	HORA_26
28	1100	T10	HORA_28
30	1175	T10	HORA_30
32	1350	T10	HORA_32
34	1375	T10	HORA_34
18	287.5	T11	HORA_18
20	280	T11	HORA_20
22	700	T11	HORA_22
24	850	T11	HORA_24
26	950	T11	HORA_26
28	1000	T11	HORA_28
30	1025	T11	HORA_30
32	1000	T11	HORA_32
34	1025	T11	HORA_34
18	150	T12	HORA_18
20	387.5	T12	HORA_20
22	412.5	T12	HORA_22
24	450	T12	HORA_24

26	762.5	T12	HORA_26
28	1137.5	T12	HORA_28
30	1162.5	T12	HORA_30
32	1200	T12	HORA_32
34	1225	T12	HORA_34
18	437.5	T13	HORA_18
20	450	T13	HORA_20
22	812.5	T13	HORA_22
24	925	T13	HORA_24
26	987.5	T13	HORA_26
28	1062.5	T13	HORA_28
30	1200	T13	HORA_30
32	1125	T13	HORA_32
34	1150	T13	HORA_34
18	237.5	T14	HORA_18
20	287.5	T14	HORA_20
22	450	T14	HORA_22
24	600	T14	HORA_24
26	1000	T14	HORA_26
28	1237.5	T14	HORA_28
30	1550	T14	HORA_30
32	1600	T14	HORA_32
34	1625	T14	HORA_34
18	375	T15	HORA_18
20	525	T15	HORA_20
22	737.5	T15	HORA_22
24	800	T15	HORA_24
26	850	T15	HORA_26
28	950	T15	HORA_28
30	1050	T15	HORA_30
32	1125	T15	HORA_32
34	1150	T15	HORA_34

Resultados de anova para el crecimiento de microorganismos y encontrar el mejor tratamiento en cuanto a variables de estudio.

LEVADURA 2	NITROGENO	TEMPERATURA	DIÓXIDO
7.75	140	22°C	7.5
7.25	140	22°C	7.5
7.625	140	22°C	7.5
8.5	140	22°C	7.5

125	140	22°C	7.5
200	140	22°C	7.5
250	140	22°C	7.5
300	140	22°C	7.5
300	140	22°C	7.5
300	140	30°C	7.5
300	140	30°C	7.5
325	140	30°C	7.5
375	140	30°C	7.5
437.5	140	30°C	7.5
450	140	30°C	7.5
500	140	30°C	7.5
500	140	30°C	7.5
475	140	30°C	7.5
8.25	180	22°C	7.5
7.125	180	22°C	7.5
6.625	180	22°C	7.5
7.5	180	22°C	7.5
8	180	22°C	7.5
825	180	22°C	7.5
990	180	22°C	7.5
992.5	180	22°C	7.5
1015	180	22°C	7.5
162.5	180	30°C	7.5
212.5	180	30°C	7.5
250	180	30°C	7.5
212.5	180	30°C	7.5
387.5	180	30°C	7.5
375	180	30°C	7.5
437.5	180	30°C	7.5
462.5	180	30°C	7.5
450	180	30°C	7.5
137.5	160	22°C	5
150	160	22°C	5
200	160	22°C	5
425	160	22°C	5
437.5	160	22°C	5
425	160	22°C	5
485	160	22°C	5
512.5	160	22°C	5
475	160	22°C	5
262.5	160	30°C	5
387.5	160	30°C	5
400	160	30°C	5
425	160	30°C	5

462.5	160	30°C	5
475	160	30°C	5
662.5	160	30°C	5
625	160	30°C	5
610	160	30°C	5
3.45	160	22°C	10
4.875	160	22°C	10
5.5	160	22°C	10
6	160	22°C	10
125	160	22°C	10
125	160	22°C	10
207.5	160	22°C	10
220	160	22°C	10
237.5	160	22°C	10
87.5	160	30°C	10
225	160	30°C	10
287.5	160	30°C	10
350	160	30°C	10
387.5	160	30°C	10
400	160	30°C	10
400	160	30°C	10
465	160	30°C	10
487.5	160	30°C	10
112.5	140	26°C	5
150	140	26°C	5
187.5	140	26°C	5
375	140	26°C	5
412.5	140	26°C	5
425	140	26°C	5
450	140	26°C	5
475	140	26°C	5
475	140	26°C	5
137.5	180	26°C	5
150	180	26°C	5
262.5	180	26°C	5
250	180	26°C	5
312.5	180	26°C	5
300	180	26°C	5
347.5	180	26°C	5
350	180	26°C	5
375	180	26°C	5
62.5	140	26°C	10
125	140	26°C	10
125	140	26°C	10
162.5	140	26°C	10

187.5	140	26°C	10
180	140	26°C	10
220	140	26°C	10
265	140	26°C	10
287.5	140	26°C	10
62.5	180	26°C	10
87.5	180	26°C	10
150	180	26°C	10
105	180	26°C	10
175	180	26°C	10
150	180	26°C	10
165	180	26°C	10
237.5	180	26°C	10
250	180	26°C	10
12	160	26°C	7.5
62.5	160	26°C	7.5
125	160	26°C	7.5
155	160	26°C	7.5
175	160	26°C	7.5
182.5	160	26°C	7.5
240	160	26°C	7.5
225	160	26°C	7.5
262.5	160	26°C	7.5
7.25	160	26°C	7.5
87.5	160	26°C	7.5
137.5	160	26°C	7.5
175	160	26°C	7.5
225	160	26°C	7.5
150	160	26°C	7.5
207.5	160	26°C	7.5
300	160	26°C	7.5
312.5	160	26°C	7.5
7.25	160	26°C	7.5
100	160	26°C	7.5
187.5	160	26°C	7.5
187.5	160	26°C	7.5
250	160	26°C	7.5
225	160	26°C	7.5
295	160	26°C	7.5
300	160	26°C	7.5
325	160	26°C	7.5

ANEXOS 5.

Resumen de parámetros estimados para la aplicación del modelo matemático gomperzt para las levaduras del tipo 1 y 2 fermol rouge y associees.

Nro	PARAMETROS ESTIMADOS															
	a		b		C		um		lamda		G		R2		R	
	Lev. P	Lev. A	Lev. P	Lev. A	Lev. P	Lev. A	Lev. P	Lev. A	Lev. P	Lev. A	Lev. P	Lev. A	Lev. P	Lev. A	Lev. P	Lev. A
EXP. 1	3.826	5.633	1.45	2.001	0.111	0.063	0.424	0.356	4.057	15.85	1.635	1.949	0.971	0.917	0.985	0.957
EXP. 2	3.406	2.298	1.629	5.972	0.161	0.399	0.549	0.916	3.906	12.47	1.263	0.757	0.971	0.975	0.986	0.988
EXP. 3	3.48	2.699	1.585	50.58	0.127	1.93	0.442	5.209	4.613	25.69	1.57	0.133	0.954	0.884	0.977	0.94
EXP. 4	3.23	2.856	1.946	1.945	0.183	0.154	0.593	0.44	5.155	6.133	1.17	1.576	0.934	0.968	0.966	0.984
EXP. 5	3.251	2.823	1.659	2.472	0.146	0.172	0.475	0.485	4.512	8.566	1.46	1.429	0.966	0.94	0.983	0.969
EXP. 6	3.24	2.99	2.094	2.027	0.187	0.164	0.605	0.49	5.86	6.262	1.146	1.413	0.97	0.961	0.985	0.98
EXP. 7	3.731	10442	1.412	2.389	0.1	0.008	0.372	84.53	4.129	171.6	1.863	0.008	0.948	0.876	0.973	0.936
EXP. 8	3.26	3.285	1.855	1.446	0.147	0.112	0.479	0.368	5.816	3.978	1.446	1.882	0.973	0.945	0.986	0.972
EXP. 9	3.34	3.029	1.861	1.713	0.166	0.13	0.556	0.393	5.171	5.495	1.247	1.764	0.959	0.969	0.98	0.984
EXP. 10	3.36	2.69	1.541	1.823	0.137	0.167	0.461	0.45	3.941	4.917	1.503	1.54	0.967	0.95	0.983	0.975
EXP. 11	3.153	2.553	1.911	1.968	0.159	0.143	0.5	0.365	5.744	6.764	1.386	1.897	0.951	0.961	0.975	0.98
EXP. 12	2.987	2.321	2.349	2.312	0.173	0.164	0.516	0.38	7.801	8.003	1.342	1.822	0.98	0.961	0.99	0.98
EXP. 13	3.15	3.016	1.905	1.467	0.169	0.096	0.533	0.291	5.35	4.844	1.3	2.383	0.96	0.959	0.98	0.979
EXP. 14	3.537	3.537	1.488	1.488	0.119	0.119	0.421	0.421	4.103	4.103	1.647	1.647	0.983	0.933	0.991	0.966
EXP. 15	3.017	2.934	1.998	1.835	0.167	0.115	0.504	0.336	5.973	7.289	1.375	2.061	0.972	0.928	0.986	0.963

Anexo 6. Análisis de varianza, crecimiento de microrganismos, Experimentos (tratamientos) vs Tiempo de fermentación (bloques), Tipo de levadura 1.

Análisis de variancia

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16030829.91	22	728674.09	34.21	<0.0001
Bloques	13868090.09	8	1733511.26	81.38	<0.0001
Tratamiento	2162739.81	14	154481.42	7.25	<0.0001
Error	2385871.02	112	21302.42		
Total	18416700.93	134			

Fuente: Elaboración propia 2017

Anexo 7. Comparación múltiple de los tiempos de fermentación, levadura tipo 1.

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 21302.4198 gl: 112

Bloques	Medias	n	E.E.					
HORA_18	335.33	15	37.69	A				
HORA_20	441.83	15	37.69		B			
HORA_22	601.17	15	37.69			C		
HORA_24	693.33	15	37.69			C		
HORA_26	850.83	15	37.69				D	
HORA_28	1042.50	15	37.69					E
HORA_30	1167.50	15	37.69					F
HORA_32	1215.83	15	37.69					F
HORA_34	1218.33	15	37.69					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 8. Análisis de varianza, crecimiento de microrganismos, Experimentos. (tratamientos) vs Tiempo de fermentación (bloques), Tipo de levadura 2.

Análisis de varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3663820.95	22	166537.32	12.23	<0.0001
Bloques	1848554.69	8	231069.34	16.96	<0.0001
Tratamientos	1815266.26	14	129661.88	9.52	<0.0001
Error	1525548.10	112	13620.97		
Total	5189369.05	134			

Fuente: Elaboración propia 2017.

Anexo 9. Comparación múltiple de los tiempos de fermentación, levadura tipo 2.

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 13620.9652 gl: 112

Bloques	Medias	n	E.E.				
HORA_18	91.40	15	30.13	A			
HORA_20	137.12	15	30.13	A	B		
HORA_22	177.15	15	30.13	A	B		
HORA_24	214.63	15	30.13		B	C	
HORA_26	273.87	15	30.13			C	D
HORA_28	325.83	15	30.13				D E
HORA_30	390.50	15	30.13				E F
HORA_32	415.33	15	30.13				F
HORA_34	422.50	15	30.13				F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 10. Análisis de varianza con factores nitrógeno, temperatura y dióxido, Tipo de levadura 2.

Análisis de varianza con factores

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1804387.09	12	150365.59	5.42	<0.0001
Nitrogeno	29853.80	2	14926.90	0.54	0.5853
Temperatura	729151.32	2	364575.66	13.14	<0.0001
Dióxido	536772.98	2	268386.49	9.67	0.0001
Nitrogeno*Temperatura	458725.96	3	152908.65	5.51	0.0014
Nitrogeno* Dióxido	16718.06	2	8359.03	0.30	0.7404
Temperatura* Dióxido	33164.96	1	33164.96	1.20	0.2764
Error	3384981.96	122	27745.75		
Total	5189369.05	134			

Anexo 11. Comparación múltiple según niveles de temperatura, levadura tipo 2.

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 27745.7538 gl: 122

Temperatura	Medias	n	E.E.		
26°C	226.33	63	23.12	A	
22°C	256.90	36	27.76	A	
30°C	389.24	36	27.76		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 12. Comparación múltiple según niveles de dióxido, levadura tipo 2.

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 27745.7538 gl: 122

Dióxido	Medias	n	E.E.		
10.00	195.06	36	27.76	A	
7.50	295.96	63	23.12		B
5.00	364.03	36	27.76		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 13. Análisis de varianza con factores nitrógeno, temperatura y dióxido, Tipo de levadura 1.

Análisis de varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2103955.09	12	175329.59	1.31	0.2206
Nitrogeno	231371.34	2	115685.67	0.87	0.4235
Temperatura	413977.97	2	206988.99	1.55	0.2168
Dióxido	812375.75	2	406187.87	3.04	0.**0516**
Nitrogeno*Temperatura	466439.06	3	155479.69	1.16	0.3268
Nitrogeno*Dióxido	91036.63	2	45518.32	0.34	0.7121
Temperatura*Dióxido	88754.34	1	88754.34	0.66	0.4168
Error	16312745.83	122	133711.03		
Total	18416700.93	134			

Anexo 14. Comparación múltiple según niveles de dióxido, levadura tipo 1.

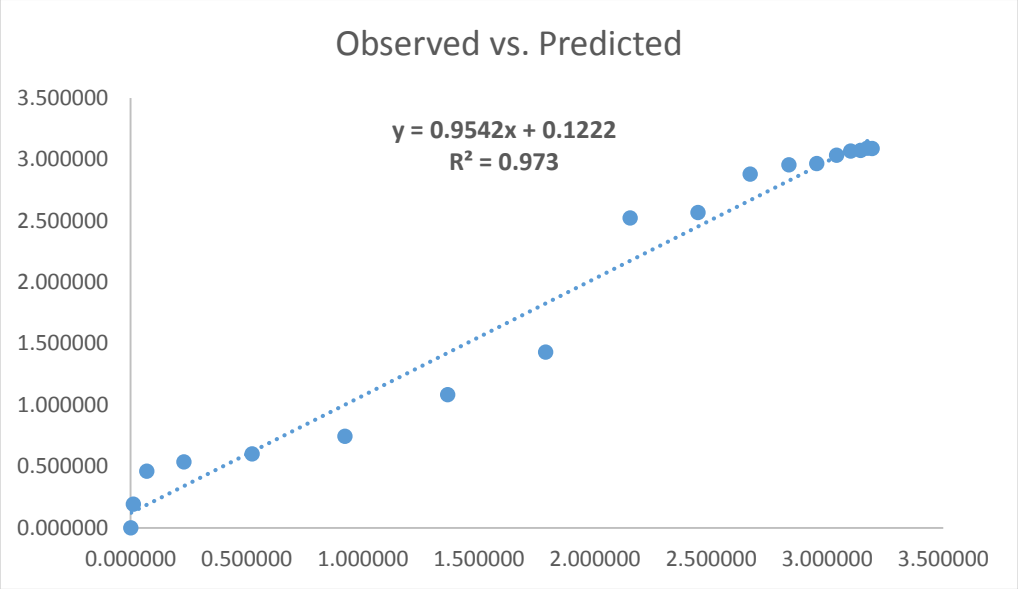
Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 133711.0314 gl: 122

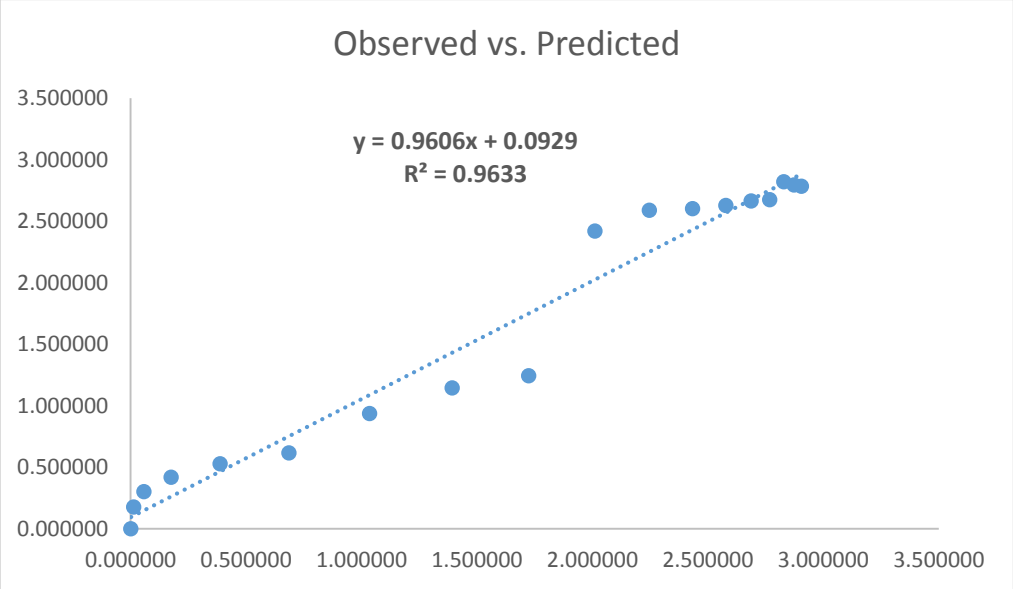
Dióxido	Medias	n	E.E.		
10.00	730.97	36	60.94	A	
7.50	823.56	63	50.75	A	B
5.00	942.36	36	60.94		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

ANEXOS 15. Resultados de la obtención de los datos de Y, R2 para la aplicación el modelo gomperzt y simulación del grafico de crecimiento de microorganismos. Del tratamiento número 6 del tipo de levadura 1 fermol rouge.



ANEXOS 16. Resultados de la obtención de los datos de Y, R2 para la aplicación el modelo gomperzt y simulación del grafico de crecimiento de microorganismos. Del tratamiento número 6 del tipo de levadura 2 fermol associees.



ANEXOS 17. Demostración y obtención de la ecuación diferencial del modelo gomperzt para el ajuste de los datos obtenidos en las pruebas con parámetros controlados.

$$Y = a\,.\,e^{-e\,(b-cT)}$$

$$Y/a = a\,.\,e^{-e\,(b-cT)}$$

$$\ln(\frac{Y}{a}) = ln.\,e^{-e\,(b-cT)}$$

$$\frac{dy}{dT} = a\,.\,e^{-e\,(b-cT)}.\,[-e^{-e\,(b-cT)}]^1$$

$$\frac{dy}{dT} = a\,.\,e^{-e\,(b-cT)}.\,[-e^{-e\,(b-cT)}.\,tc]$$

$$\frac{dy}{dT} = ac.\,e^{-e\,(b-cT)}.\,e^{-e\,(b-cT)}$$

$$\frac{dy}{dT} = c\;y.\,e^{(b-cT)}$$

$$\frac{Y}{a} = e^{-e\,(b-cT)}$$

$$\ln(\frac{Y}{a}) = ln.\,e^{-e\,(b-cT)}$$

$$\ln\left(\frac{Y}{a}\right) = -e^{\,(b-cT)}$$

$$-\ln\left(\frac{Y}{a}\right) = e^{\,(b-cT)}$$

$$\ln\left(\frac{Y}{a}\right) - 1 = e^{\,(b-cT)}$$

$$\ln\left(\frac{a}{y}\right) = e^{\,(b-cT)}$$

$$\frac{dy}{dT} = cy.\ln\left(\frac{a}{y}\right)$$ Ecuación Diferencial