

RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA N° 168-2017-UNAM

Moquegua, 02 de Mayo de 2017

VISTOS, el Informe N° 094-2017-EPIA/VIPAC/UNAM de fecha 19.04.2017, Oficio N° 125-2017-VIPAC-CO/UNAM, de fecha 21.04.2017, Sesión Ordinaria de Comisión Organizadora de fecha 27 de Abril de 2017, y;

CONSIDERANDO:

Que, el párrafo cuarto del artículo 18° de la Constitución Política del Estado, concordante con el artículo 8° de la Ley N° 30220, Ley Universitaria, reconoce la autonomía universitaria, en el marco normativo, de gobierno, académico, administrativo y económico, que guarda concordancia con el Capítulo IV del Estatuto de la UNAM;

Que, el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, aprobado con Resolución Presidencial N° 856-2015-UNAM de 31 de Julio de 2015, establece en el Artículo 13°, que el proyecto de tesis es un trabajo de investigación individual que presentan los estudiantes del último año académico, egresados o bachilleres al Director de la Escuela Profesional, con la finalidad de resolver un problema objeto de estudio, asimismo, precisa en el Artículo 16° que todo proyecto de tesis debe tener un asesor, quien deberá ser docente ordinario de la Escuela Profesional o en forma facultativa un docente contratado en la especialidad en el área que se investiga. El jurado dictaminador del proyecto, será designado por el Comité Asesor y el Director de la Escuela Profesional, el mismo que estará compuesto por tres miembros elegidos entre los docentes ordinarios y/o contratados, conforme se indica en el artículo 19° del precitado Reglamento.

Que, mediante Informe N° 094-2017-EPIA/VIPAC/UNAM de fecha 19.04.2017, el MSc. Mario Roger Cotacallapa Sucapuca, Director de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial solicita a Vicepresidencia Académica la aprobación del proyecto de tesis denominado: "MODELADO DEL CRECIMIENTO DE DOS LEVADURAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA UVA VARIEDAD BORGOÑA (Vitis labrusca L.) A DIFERENTES TEMPERATURAS, NITRÓGENO FACILMENTE ASIMILABLES Y DIOXIDO DE AZUFRE", presentado por el bachiller Aldo Edhuar Barra Mamani, el mismo que según ficha de evaluación de proyecto de tesis de 16 de Diciembre de 2016 fue declarado apto, el mismo que fue registrado en los libros respectivos solicitando se emita el acto resolutorio de reconocimiento de aprobación de proyecto de tesis, así como la designación de asesor y miembros del jurado dictaminador, conforme se precisa en el Artículo 29° del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua;

Que, con Oficio N° 125-2017-VIPAC-CO/UNAM, de fecha 21.04.2017, la Dra. María Elena Echevarría Jaime Vicepresidencia Académica de la Universidad Nacional de Moquegua, solicita al Dr. Washington Zeballos Gámez Presidente de la Comisión Organizadora – UNAM, aprobación de Proyecto de Tesis, Reconocimiento de Asesor y Jurado Dictaminador vía acto resolutorio;

Que, en Sesión Ordinaria de Comisión Organizadora de fecha 27 de Abril de 2017, se acordó por UNANIMIDAD, Aprobar el Proyecto de Tesis denominado "MODELADO DEL CRECIMIENTO DE DOS LEVADURAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA UVA VARIEDAD BORGOÑA (Vitis labrusca L.) A DIFERENTES TEMPERATURAS, NITRÓGENO FACILMENTE ASIMILABLES Y DIOXIDO DE AZUFRE", presentado por el bachiller en Ingeniería Agroindustrial Tesista Aldo Edhuar Barra Mamani, así como el reconocimiento de Asesor, Co-Asesor, Asesor Externo, del Jurado Dictaminador y Revisor correspondiente, en mérito al Informe N° 094-2017-EPIA/VIPAC/UNAM;

Por las consideraciones precedentes y en uso de las atribuciones que le concede la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto de la Universidad Nacional de Moquegua y lo acordado en Sesión Ordinaria de Comisión Organizadora de fecha 27 de Abril de 2017;

SE RESUELVE:

ARTÍCULO PRIMERO.- APROBAR, el Proyecto de Tesis denominado: "MODELADO DEL CRECIMIENTO DE DOS LEVADURAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA UVA VARIEDAD BORGOÑA (Vitis labrusca L.) A DIFERENTES TEMPERATURAS, NITRÓGENO FACILMENTE ASIMILABLES Y DIOXIDO DE AZUFRE", presentado por el Bachiller ALDO EDHUAR BARRA MAMANI, el mismo que obra inscrito en el Registro de Trabajos de Tesis de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.

RESOLUCIÓN DE COMISIÓN ORGANIZADORA N° 168-2017-UNAM

ARTÍCULO SEGUNDO.- DESIGNAR, al Asesor de Tesis, Co-Asesor, Asesor Externo y Jurado Dictaminador y Revisor del Proyecto de Tesis: “MODELADO DEL CRECIMIENTO DE DOS LEVADURAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA UVA VARIEDAD BORGONA (*Vitis labrusca* L.) A DIFERENTES TEMPERATURAS, NITRÓGENO FACILMENTE ASIMILABLES Y DIOXIDO DE AZUFRE”, conforme al siguiente detalle:

- | | | | |
|---|--------------------------------------|---|----------------|
| ➤ | ING. JERONIMO MARTIN SARCO BURGOS | : | ASESOR |
| ➤ | MG. NILTON CESAR LEÓN CALVO | : | CO-ASESOR |
| ➤ | DR. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA | : | ASESOR EXTERNO |

JURADO DICTAMINADOR Y REVISOR:

- | | | | |
|---|---------------------------------------|---|-----------------|
| ➤ | MSC. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA | : | PRESIDENTE |
| ➤ | MG. CESAR AUGUSTO NAPA ALMEYDA | : | PRIMER MIEMBRO |
| ➤ | ING. LENIN QUILLE QUILLE | : | SEGUNDO MIEMBRO |

ARTÍCULO TERCERO.- ENCARGAR, a la Vicepresidencia Académica, adoptar las acciones administrativas necesarias, para el cumplimiento de la presente resolución.

Regístrese, Comuníquese, Publíquese y Archívese.




DR. WASHINGTON ZEBALLOS GÁMEZ
PRESIDENTE

Presidencia
VIPAC
VPI
EPIA
Interesado
Arch. (2)




ABOG. GUILLERMO S. KUONG CORNEJO
SECRETARIO GENERAL



PERÚ

SUNEDU

Superintendencia Nacional de Educación Superior Universitaria

UNAM

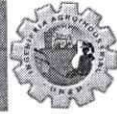
Universidad Nacional de Moquegua

VIPAC

Vicepresidencia Académica

EPIA

Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial



"AÑO DEL BUEN SERVICIO AL CIUDADANO"

INFORME N° 094-2017-EPIA/VIPAC/UNAM

A : **DRA. MARIA ELENA ECHEVARRIA JAIME**
Vicepresidenta Académica - UNAM

DE : **ING. M.Sc. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA**
Director de la Escuela Profesional de INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

ASUNTO : **Aprobación de Proyecto de Tesis, Ratificación de Asesor y Jurado Dictaminador.**

FECHA : **Moquegua, 18 de abril del 2017**



Es grato dirigirme a usted, con la finalidad de saludarla cordialmente, y a la vez mediante el presente informarle que mediante Ficha de Evaluación del Proyecto de Tesis de fecha 16 de diciembre del 2016, se declara APTO el Proyecto de Tesis denominado **"MODELADO DEL CRECIMIENTO DE DOS LEVADURAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA UVA VARIEDAD BORGÑO (Vitis labrusca L.) A DIFERENTES TEMPERATURAS, NITROGENO FACILMENTE ASIMILABLES Y DIÓXIDO DE AZUFRE."** presentado por el Bachiller **ALDO EDHUAR BARRA MAMANI**; Para lo cual se adjunta un (01) ejemplar del Proyecto de Tesis Aprobado.

En tal sentido y en amparo del Reglamento de Grados y Títulos de la UNAM, según se indica en su art. 30° se inscribe el Proyecto de Tesis en el Registro de Trabajos de Tesis de la Escuela y se notifica al Tesista sobre la aprobación del referido proyecto.

Por lo mismo, solicito a usted que mediante su despacho se realice el trámite correspondiente para la emisión del acto resolutorio según se precisa:

Artículo Primero: Aprobar el Proyecto de Tesis denominado **"MODELADO DEL CRECIMIENTO DE DOS LEVADURAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA UVA VARIEDAD BORGÑO (Vitis labrusca L.) A DIFERENTES TEMPERATURAS, NITROGENO FACILMENTE ASIMILABLES Y DIÓXIDO DE AZUFRE."** presentado por el Bachiller **ALDO EDHUAR BARRA MAMANI**.

Artículo Segundo: Ratificación de Asesor de Proyecto de Tesis:

- Asesor : Ing. Jerónimo Martín Sarco Burgos
- Co Asesor : Mg. Nilton Cesar León Calvo
- Asesor Externo : Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina

Artículo Tercero: Ratificación de Jurado Dictaminador y Revisor, según el siguiente detalle:

- Presidente : Ing. M.Sc. Mario Roger Cotacallapa Sucapuca
- Primer Miembro : Ing. Cesar Augusto Napa Almeyda
- Segundo Miembro : Ing. Lenin Quille Quille

Es todo cuanto informo a usted, para su conocimiento y acciones necesarias.

Atentamente,




M.Sc. MARIO ROGER COTACALLAPA SUCAPUCA
 DIRECTOR DE LA EPIA

VICEPRESIDENCIA ACADÉMICA

Fecha: Prov. N°: 1220
 Folios: Pasa a:
 Para:

 Firma





Universidad Nacional de Moquegua
Vicepresidencia Académica

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
COMISION ORGANIZADORA
PRESIDENCIA
RECIBIDO

21 ABR 2017 1558

5:00 pm

Nº Reg.

Folio: -2+1 FILE

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

Moquegua 20 de Abril del 2017



OFICIO N° 125 – 2017 – VIPAC - CO/UNAM

SEÑOR:
Dr. WASHINGTON ZEBALLOS GAMEZ
PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ORGANIZADORA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
Presente.-

ASUNTO : APROBACIÓN DE PROYECTO DE TESIS, RATIFICACIÓN DE ASESOR Y JURADO DICTAMINADOR
REFERENCIA : INFORME N° 94-2017-EPIA/VIPAC/UNAM

Mediante el presente es grato dirigirme a usted, para saludarlo cordialmente y en atención al documento en referencia, remito a usted el proyecto de tesis denominado: "MODELO DEL CRECIMIENTO DE DOS LEVADURAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA UVA VARIEDAD BORGOÑA (Vitis labrusca L.) A DIFERENTES TEMPERATURAS, NITROGENO FACILMENTE ASIMILABLES Y DIÓXIDO DE AZUFRE." Presentado por el Bachiller ALDO EDHUAR BARRA MAMANI, otorgándose conformidad por haber cumplido con presentar los requisitos exigidos en el reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Moquegua, aprobado con Resolución de Comisión Organizadora N° 190-2016-UNAM.

Por lo expuesto, solicito a usted se apruebe mediante acto resolutivo lo siguiente:

Artículo Primero: Aprobar el Proyecto de Tesis denominado "MODELO DEL CRECIMIENTO DE DOS LEVADURAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA UVA VARIEDAD BORGOÑA (Vitis labrusca L.) A DIFERENTES TEMPERATURAS, NITROGENO FACILMENTE ASIMILABLES Y DIÓXIDO DE AZUFRE".

Artículo Segundo: Ratificación de Asesor de Proyecto de Tesis:

- Asesor : Ing. Jerónimo Martín Sarco Burgos
- Co Asesor : Mg. Niltón Cesar León Calvo
- Asesor Externo : Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina

Artículo Tercero: Ratificar de Jurado Dictaminador y Revisor:

- Presidente : Ing. MSc. Mario Roger Cotacallapa Sucapuca
- Primer Miembro : Ing. Cesar Augusto Napa Almeyda
- Segundo Miembro : Ing. Lenin Quille Quille

Agradeciendo la atención al presente, hago propicia la ocasión para reiterarle los sentimientos de mi especial consideración y estima personal.

Atentamente,

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

Dra. MARIA ELENA ECHEVARRIA JAIME
VICEPRESIDENTA ACADÉMICA



MEEJ/VIPAC
MASM/SEC
C.c./Archivo.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA SECRETARIA GENERAL Calle Ancash S/N Telefax 053 – 461227 053 – 463514 Anexo (202) 053-461471

PROVEIDO: [83]
FECHA : 28/04/2017
PASE A : Dña. Cuene
PARA : Emisión de Resolución

www.unam.edu.pe

Vice_presidencia@unam.edu.pe

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TITULO

MODELADO DEL CRECIMIENTO DE DOS LEVADURAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACION DE LA UVA VARIEDAD BORGONA (*Vitis labrusca L.*) A DIFERENTES TEMPERATURAS, NITROGENO FACILMENTE ASIMILABLES Y DIÓXIDO DE AZUFRE.

EJECUTORES DEL PROYECTO:

RESPONSABLE : Bach: Aldo Edhuar, Barra Mamani

ASESOR : Ing. Jeronimo Martin, Sarco Burgos

CO - ASESOR : Mg. Nilton Cesar, León Calvo

MOQUEGUA NOVIEMBRE DEL 2016

Vº Bº
Msc. Cesar Mapa A.
Primer Miembro.

Vº Bº
Ing. Leifer Guillo D.

Jerónimo Martín Sarco Burgos
ING. AGROINDUSTRIAL
C.R. N° 127340

ÍNDICE

I.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
II.	JUSTIFICACIÓN.....	7
III.	OBJETIVOS.....	8
3.1.	Objetivo general.....	8
3.2.	Objetivos específicos.....	8
IV.	HIPÓTESIS.....	9
4.1.	Hipótesis general.....	9
4.2.	Hipótesis específico.....	9
V.	MARCO TEÓRICO.....	10
5.1.	ANTECEDENTES.....	10
5.2.	UVA ISABELLA (<i>Vitis labrusca</i>).....	11
5.2.1.	La Palabra Borgoña.....	12
5.2.2.	Morfología y organografía.....	13
5.2.3.	Composición Química de la Uva.....	14
5.3.	VINO.....	14
5.3.1.	Antecedentes históricos a nivel mundial.....	15
5.4.	CRECIMIENTO MICROBIANO.....	15
5.4.1.	Levaduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	16
5.4.2.	Nutrición.....	18
5.4.3.	Ciclo de vida y Reproducción.....	19
5.5.	CRECIMIENTO MICROBIANO.....	20
5.6.	FASES DE CRECIMIENTO MICROBIANO.....	21
5.7.	PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO.....	22
5.7.1.	Tiempo de latencia.....	22
5.7.2.	Tiempo de generación.....	23
5.7.3.	Velocidad de crecimiento.....	24
5.7.4.	Fermentación Alcohólica.....	24
5.8.	FACTORES QUE AFECTAN AL CURSO DE LA FERMENTACIÓN.....	26
5.8.1.	Composición del mosto.....	26

5.8.2.	Nitrógeno Fácilmente Asimilable	27
5.8.3.	Dióxido de Azufre	27
5.8.4.	Temperatura	28
5.8.5.	Acidez	28
5.8.6.	Potencial de Hidrogeno	29
5.9.	CONCEPTO HISTÓRICO DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	29
5.10.	MÉTODOS BASADOS EN LA TÉCNICA DE PCR	29
5.11.	CLASIFICACIÓN DE LOS MODELOS PREDICTIVOS	30
5.11.1.	Modelos primarios	32
5.11.2.	Modelos secundarios	36
5.11.3.	Modelos terciarios	38
5.12.	CONSTRUCCIÓN DE MODELO	38
5.12.1.	Selección de Cepa de Microorganismos	39
5.12.2.	Generación de Datos	39
5.12.3.	Método de Recuento Total en Placa	39
5.13.	DESCRIPCIÓN MATEMÁTICA DEL MODELO	40
5.13.1.	Bondad de Ajuste y Validación de Modelos	40
5.14.	VALIDACION DE MODELO	41
VI.	DEFINICION DE TERMINOS	42
6.1.	Adaptación de Microorganismos	42
6.2.	Levaduras	43
6.3.	Unidad Formadora de Colonia (ufc)	43
6.4.	Población microbiana	43
VII.	MARCO METODOLOGICO	44
7.1.	Localización del Experimento	44
7.2.	MATERIAL EXPERIMENTAL	44
7.2.1.	Material experimental	44
7.2.2.	Materiales de oficina	44
7.2.3.	Materiales de campo	45
7.2.4.	Instrumentos de laboratorio	45

7.2.5.	Materia Prima Insumos y Reactivos	45
7.2.6.	Equipos	46
7.3.	TIPO DE INVESTIGACIÓN	46
7.3.1.	Método estadístico	46
7.3.2.	Técnicas de investigación	46
7.3.3.	Factores y niveles	47
7.4.	ESQUEMA DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL	47
7.4.1.	Obtención de mosto en el proceso de elaboración del vino	47
7.4.2.	Grafico del Diseño Experimental	48
7.5.	PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS	50
7.5.1.	Variables de experimentación.....	50
7.6.	MODELOS MATEMÁTICOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51
7.6.1.	Relación de variables de acuerdo al experimento.....	51
7.6.2.	Parámetros de crecimiento de <i>saccharomyces cerevisia</i>	52
7.7.	AJUSTE Y VALIDACIÓN DE MODELOS MATEMÁTICOS.....	52
7.8.	MODELOS MATEMÁTICOS:	52
7.8.1.	Gompertz modificado	52
7.8.2.	Otros modelos a usar en función de parámetros cinéticos	53
7.8.3.	MODELO BARANYI	53
7.8.4.	MODELO GOMPERTZ	53
7.8.5.	MODELO LOGISTICO.....	53
7.9.	MEDICIONES EXPERIMENTALES	54
7.10.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	54
7.10.1.	Cuantificación de levaduras	54
7.10.2.	Determinación del Nitrógeno Fácilmente Asimilable en Mostos (NFA)	54
7.10.3.	Expresión del resultado:.....	54
7.11.	SULFUROSO LIBRE Y TOTAL (mostos y vinos)	55
7.11.1.	Procedimiento.....	55
7.11.2.	Dióxido de azufre libre:	55
7.12.	RECuento DE LEVADURAS	55

7.12.1. Recuento	56
7.12.2. Material y reactivos.....	56
7.12.3. Técnicas Usuales de Análisis en Enología	57
VIII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	59
8.1. DIAGRAMA DE GANTT.....	59
IX. RECURSOS.....	60
X. BIBLIOGRAFIA.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01. Ciclo de vida.....	20
Figura 02. Representación gráfica de la ecuación.....	33
Figura 03. Diagrama de flujo.....	46
Figura 04. Método experimental.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de las especies.....	13
Tabla 2 composición química de la vid (<i>Vitis vinifera</i>)	14
Tabla 3 Clasificación de Algunos Modelos Utilizados.....	31
Tabla 4 Variables de Respuesta.....	48
Tabla 5 Parámetros de Crecimiento.....	49
Tabla 6 Parámetros de crecimiento.....	50

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Una de las actividades económicas más importantes del productor vitivinícola 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 competencia desleal de otras empresas productoras de vino, 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 un vino de calidad en la Región Moquegua.

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?

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 gráfico del crecimiento microbiano con parámetros controlados durante la fermentación de uva?

II. JUSTIFICACIÓN.

El consumo de vino ha sido relacionado con muchos beneficios, en específico medicinales. Es una bebida alcohólica antioxidante y energizante.

La producción de vino se mostró como una alternativa de industrialización local lo cual permitió aprovechar la producción de la materia prima que tiene mayor productividad y uso en la industria, 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, 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 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.

III. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo general.

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

3.2. Objetivos específicos.

- Determinar los parámetros (temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), en la fermentación de uva variedad borgoña.
- Ajustar el modelo matemático (Modelo Gompertz), a 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.

IV. HIPÓTESIS.

4.1. 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.

4.2. Hipótesis específico.

- 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 labrusca* 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.

V. MARCO TEÓRICO.

5.1. ANTECEDENTES

Esteve-Zarzoso y colaboradores (2000) llevaron a cabo un estudio de la microbiota presente durante la fermentación espontánea de los mostos procedentes de distintas variedades de uvas en la zona de El Penedés, 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.

Eslovaquia, Hungría y 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.

Querol. (1992). Mediante los perfiles de restricción obtenidos con determinadas enzimas, hicieron un seguimiento de la cepa inoculada y estudiaron como incidió ésta cepa en la población silvestre de levaduras que participaban en la fermentación, así como su capacidad de implantación frente a ellas. Estos mismos autores estudiaron, aplicando la misma técnica, la dinámica de las poblaciones de levaduras que se van

sucedido durante una fermentación espontánea del mosto, poniendo de manifiesto el elevado polimorfismo que existe entre las cepas de la especie *S. cerevisiae*.

Versavaud y colaboradores (1995) utilizaron el cariotipo electroforético, RFLP-ADNmt, y PCR para estudiar la variabilidad genética, afinidades filogenéticas y la distribución geográfica de levaduras silvestres de *S. cerevisiae* involucradas en los procesos de fermentación espontánea en la región de Charentes (Francia). Nuevamente, con las dos primeras técnicas pusieron de manifiesto un elevado polimorfismo además de la sucesión de especies de levaduras que se dan durante la fermentación espontánea. Observaron que las iniciadoras del proceso fueron cepas no-*Saccharomyces*, predominando en la mitad y final de la fermentación cepas de *S. cerevisiae*, afirman que las cepas predominantes durante la fermentación se pueden considerar representativas de una determinada zona enológica, igual que se observó en estudios previos en otra zona distinta de Francia.

Combina y colaboradores (2005) En las fermentaciones espontáneas de vinos tintos, llevadas a cabo en condiciones industriales en Mendoza (Argentina) también se han realizado estudios acerca de la dinámica de las poblaciones de las levaduras. Mediante el método de PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS de los genes ribosómicos identificaron al comienzo (y mitad, en algunos casos) de tres fermentaciones, realizadas con tres mostos procedentes de distintas variedades de uvas, diversas especies de levaduras no-*Saccharomyces*, siendo la especie *S. cerevisiae* la que se implantó hacia la mitad y final en cada proceso. Pusieron de manifiesto la distinta frecuencia de aparición de las distintas especies de levaduras en función del tipo de mosto.

5.2. UVA ISABELLA (*Vitis labrusca*)

La uva Isabella, perteneciente a la familia *Vitaceae*, especie *Vitis labrusca*, conforma un grupo de plantas de hábito arbustivo o lianas, las cuales se encuentran distribuidas en casi todo el mundo en zonas de clima templado (Terral, 2010).

Algunas especies como la *Vitis rupestris* o *Vitis riparia* son utilizadas como base para realizar injertos debido a su resistencia a patógenos, aunque el mayor uso comercial de la uva se encuentra en la fabricación de vino, con un 66% de la producción a nivel mundial, un 18.7% para su consumo como fruta fresca y el 7.7% de la producción se deshidrata para la producción de uvas pasas (Jackson, Terral; 2008, 2010).

La uva Isabella es una variedad domesticada que evidencia cambios morfológicos considerables, dentro de los que destacan el incremento en el tamaño de los órganos de la planta (como el tamaño de los frutos, de las hojas y de la semilla) así como la evolución de plantas silvestres unisexuales a domesticadas hermafroditas (Jackson, 2008).

5.2.1. La Palabra Borgoña

Chávez, (2011), 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”.

Toro; Suarez (2012), mencionan que los principales productores y exportadores de ella son Brasil, Colombia, Uruguay, Perú, Argentina y Chile. A pesar de las pocas características vnicas 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.

5.2.2. 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 (Martínez de Toda, 1991).

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 1-1 se resume la clasificación de las variedades más cultivadas en la actualidad, propuesta por Planchón (Salazar; Melgarejo, 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: <i>Vitis</i>		
Subgénero: Euvitis (30 especies)	<i>Vitis vinifera L.</i>	Europeo-Asiática
	<i>Vitis silvestris</i>	Europeo-Asiática
	<i>Vitis riparia</i>	America
	<i>Vitis labrusca</i>	America
	<i>Vitis rupestris</i>	America
	<i>Vitis berlandieri</i>	America
Subgénero: Muscadinea (3 especies)	<i>Vitis rotundifolia</i>	America-México

Fuente: Adaptado de Salazar y Melgarejo (2005)

5.2.3. Composición Química de la Uva

Tabla 2 composición química de la vid (*Vitis vinifera*)

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 poli fenólicos	

Fuente: Susan E. Ebeler. (2001)

5.3. VINO.

El vino es el alimento, producto de un complejo de interacciones biológicas y bioquímicas entre el jugo de la uva y diferentes microorganismos (hongos, levaduras, bacterias ácido láctico, bacterias ácido acéticas), obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva (BOE; Jolly, 2003; 2006).

5.3.1. Antecedentes históricos a nivel mundial.

Los primeros testimonios del cultivo de la vid datan del año 12000 a. C., en Asia menor, en las regiones cercanas al mar caspio y al mar negro. En el año 3000 a. C. los egipcios ya contaban con conocimientos para la elaboración de vinos. En china en el año 2285 a. C., se castigaba a quien adulteraran el vino de uva (André, 2008). Los griegos

convirtieron el vino en un artículo de comercio muy importante, habiéndose encontrado ánforas de vino griego por todo el Mediterráneo, Egipto y el oriente medio (Gimeno, 2007)

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). Después de la caída del imperio romano, durante la época medieval, la iglesia fue la depositaria de los conocimientos de la civilización y durante siglos fue propietaria de muchos de los grandes viñedos de Europa (España, 2004).

5.4. CRECIMIENTO MICROBIANO.

Entendemos por **crecimiento microbiano** el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por tanto, no nos referimos al crecimiento de un único microorganismo (*ciclo celular*) sino al demográfico de una población. En este tema nos centraremos en el **crecimiento microbiano**, el estudio que se hace puede servir también para entender el crecimiento de levaduras y de otros hongos. El crecimiento de los virus se produce de otra forma diferente Denominamos **ciclo celular** al proceso de desarrollo de una bacteria considerada de forma aislada. A lo largo del ciclo celular, tiene lugar la replicación del material de la bacteria, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento para alcanzar un tamaño doble de la inicial y su división por bipartición de la bacteria para dar lugar a dos células hijas. La duración del ciclo celular coincide con el tiempo de generación y depende, en general, de los mismos factores de los que depende este.

El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos sus individuos. Este crecimiento suele ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular. Por consiguiente, en un momento

determinado en una población se encuentran células que acaban de dividirse, otras que están replicando su ADN y elongándose, otras que están iniciando la división celular, etc. (Prescott, 1999)

5.4.1. 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)

5.4.1.1. 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 hidrolíticas 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).

5.4.1.2. 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 RNA que confieren a la levadura el llamado "factor killer". (Kocková-Kratochvilová, 1990).

5.4.1.3. Análisis de restricción del DNA mitocondrial

La utilidad de esta técnica reside en dos características del DNA 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 DNA 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 DNAm_t al separarlos por electroforesis (Fernández-Espinar, 2005). 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 (Guillamon, 1994).

5.4.2. Nutrición

Las levaduras necesitan asimilar, vía heterótrofa, carbono y nitrógeno. La fuente de carbono utilizada principalmente por estos organismos consiste en azúcares metabolizados por vías aerobias o anaerobias. (Adams, 1992).

Los azúcares básicos asimilados son: (i) hexosas: D-glucosa, D-fructosa y D-manosa, utilizadas por todas las levaduras vía oxidativa y por algunas especies vía fermentativa, (ii) disacáridos: sacarosa y maltosa, fermentados por algunas especies y lactosa, asimilado raras veces por vía fermentativa y (iii) trisacáridos: rafinosa, asimilado por varias rutas metabólicas distintas, en cuanto a las fuentes de nitrógeno utilizadas por las levaduras destacan principalmente los ácidos orgánicos. También asimilan nitrógeno por medio de sales de amonio como sulfato, fosfato y nitrato. Los aminoácidos pueden ser utilizados como fuentes potenciales tanto de carbono como de nitrógeno otros elementos indispensables para la fabricación de nuevos componentes celulares son: oxígeno, hidrógeno, fósforo y magnesio. Además, en cantidades muy pequeñas son necesarios los oligoelementos: potasio, calcio, silicio, azufre, hierro, cloro, boro, cobre, yodo, manganeso, molibdeno y cinc. Las vitaminas que requieren son: biotina, pantotenato de calcio, tiamina, etc. (Adams, 1992).

5.4.3. 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 cigotos entre células haploides. El tipo de reproducción es normalmente por brote ó 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 cigoto diploide mediante conjugación. (Degre, R. 1993)

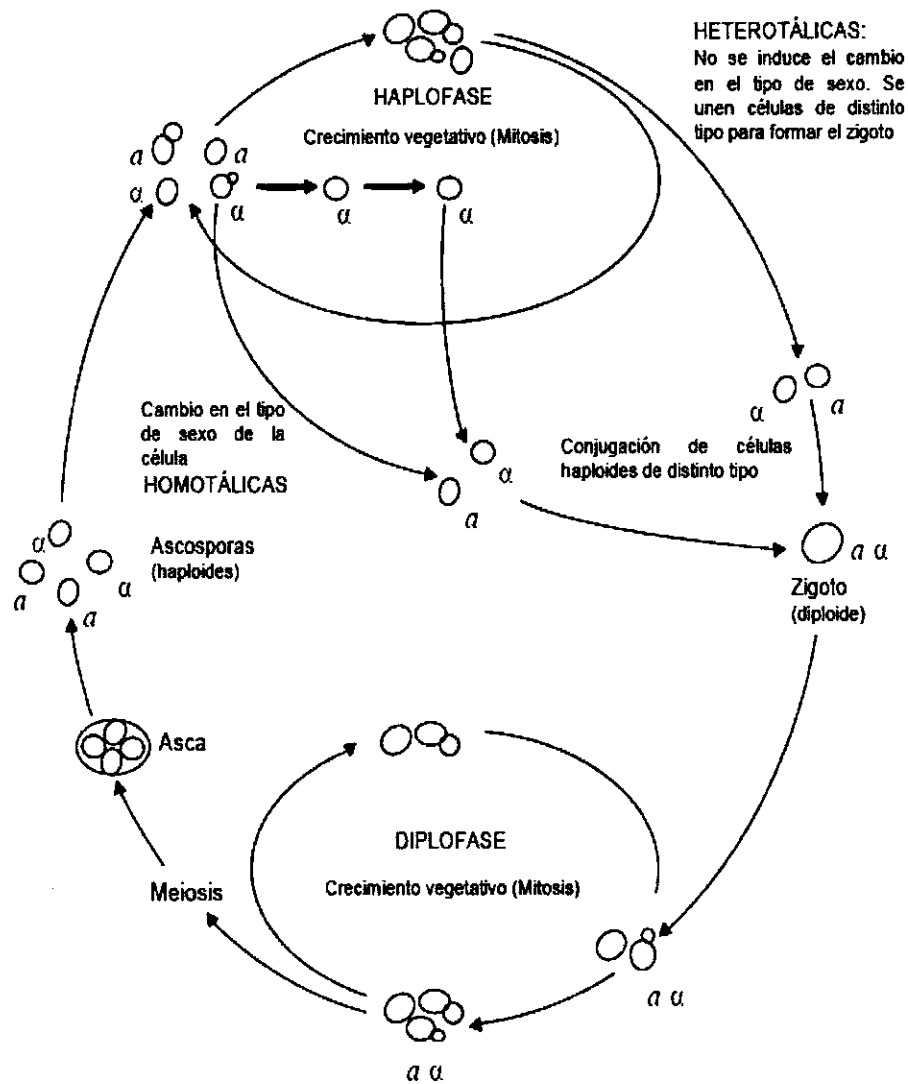


Figura 1. Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*. a y α hacen referencia a los alelos que controlan los tipos sexuales. (Degre, R. 1993)

5.5. CRECIMIENTO MICROBIANO

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 vicio 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 vivo 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, 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).

5.6. FASES DE CRECIMIENTO MICROBIANO

a.- Fase de latencia, o período de adaptación de la levadura a un nuevo entorno (nutrientes, temperatura, pH, etc.). Durante esta fase, el número de células inoculadas permanece constante, o incluso disminuye. La duración de esta fase depende del tamaño del inóculo y del estado fisiológico de las células.

b.- Fase exponencial. En esta etapa se intensifica la actividad metabólica respecto a la fase anterior, y el número de divisiones celulares (mediante mitosis) crece en progresión geométrica. La duración de esta etapa depende de la especie de levadura y de las condiciones medioambientales.

c.- **Fase estacionaria.** Se da cuando los nutrientes comienzan a ser escasos, alcanzándose un equilibrio entre células no viables (muertas) y células viables que aún se siguen dividiendo, de manera que el número de individuos vivos permanece constante. Cuando se agotan los nutrientes, las células de levaduras comienzan a sintetizar metabolitos secundarios (no esenciales para mantener su viabilidad), algunos de los cuales pueden ser perjudiciales para la propia levadura.

d.- **Fase de muerte.** Se produce la muerte y lisis celular y el número de individuos no viables supera a los viables. El efecto conjunto se traduce en una disminución constante del número de células vivas hasta la desaparición total de las mismas.

5.7. PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO

5.7.1. 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 (Swinnen, 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 sí mismas con el objetivo de sacar ventaja del nuevo ambiente e iniciar el crecimiento exponencial (Buchanan; Klawitter, 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).

Buchanan y Solberg definieron en 1972 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 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; Cygnarowicz, 1990).

5.7.2. 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 de 2. (Stanier. 1989)

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, 1997).

El tiempo de generación está directamente relacionado con la velocidad de crecimiento 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 (Gibson, 1988; Zwietering, 1990) o el modelo propuesto por (Baranyi; Roberts 1994).

5.7.3. 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 de crecimiento 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, 1989).

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, 1997).

5.7.4. 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, S. 1999).

a.- Prácticas pre-fermentativas, como clarificación y adición de SO₂ 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 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; Vincenzo 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 (Sturm, 2006). 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 (Torija, 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 (Fleet; Heard, Lambrechts; Pretorius, 1993; 2000).

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 SO₂ 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, 1991).

5.8. FACTORES QUE AFECTAN AL CURSO DE LA FERMENTACIÓN

5.8.1. 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. (Vezinhet. 1992; Sabate, 1998; Martínez, 2004; Le Jenue, 2006).

a.- 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).

5.8.2. 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).

5.8.3. 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 SO₂ que las levaduras, en particular las bacterias acéticas (Flanzy, 2000).

De acuerdo a la utilización del anhídrido sulfuroso está permitida, pero no se debe sobrevalorar su efecto, pues las cantidades máximas permitidas no son suficientes para inhibir la fermentación alcohólica (Troost, G. 1985).

El sulfitado de los vinos aún en fermentación (detención de la fermentación) resulta eficaz también con cantidades menores de SO₂ si se emplea junto con otras medidas

inhibidoras de la fermentación. Así, con cantidades de 80-100 mg/l de SO₂, actúa casi siempre inhibiendo instantáneamente la fermentación si esta había sido ya frenada por el frío o la presión de ácido carbónico (Troost, 1985).

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 litro) 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).

5.8.4. 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).

5.8.5. Acidez

La Oficina Internacional de la Vid y del Vino (O.I.V.), define a la acidez total como la suma de todas las acideces valorables que contiene el vino, hasta pH 7.0, por adición de solución de hidróxido sódico. Los ácidos que se valoran son principalmente el tartárico, málico, láctico, succínico, acético, etc. La acidez total normalmente debe ser menor de 3,3 g/l expresadas como ácido tartárico.

5.8.6. Potencial de Hidrogeno

El pH es particularmente importante por su efecto sobre los microorganismos, matiz del color, sabor, potencial redox, relación entre el dióxido de azufre libre y combinado. El pH de los mostos para vinos de mesa debe estar en el rango de 3,1 a 3,6; mientras que

para vinos de postre se puede extender desde 3,4 hasta alrededor de 3,8 (Amerine y Ough, 1976).

5.9. 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 (Mc Meekin, 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).

5.10. 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 RAPD y microsatelites, aunque se han

desarrollado otras metodologías como la amplificación de secuencias o la amplificación de "intron splice sites" (Fernandez-Espinar, 2005).

5.11. 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).

Whiting y Buchanan (1993) propusieron un esquema de clasificación de microbiología predictiva que está siendo muy utilizada actualmente (Geeraerd, 2004). En ella se distinguen tres niveles entre modelos predictivos microbiológicos: modelos primarios, modelos secundarios y modelos terciarios (Whiting; Geeraerd, 1995; 2004).

Tabla 3 Clasificación de Algunos Modelos Utilizados.

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 o SSP o SSSP.
Modelo logístico	Modelo de Arrhenius	Salmonella enteritidis Risk Assessment (SERA): USDA ComBase
Modelo Baranyi	Modelo modificado de Arrhenius (Davey o Schoolfield)	
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	

Fuente: Gutiérrez, 2011

5.11.1. 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 (Whiting y Buchanan, 1993, 1994; Whiting, 1995). Otros ejemplos de modelos primarios serían, el que describe los recuentos decrecientes con el tiempo durante el procesamiento térmico, tal como el 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.

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:

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

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:

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

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

$$\text{Velocidad de crecimiento exponencial } (\mu_{max}) = \frac{BC}{e} (\text{Log ufc/ml})/h \quad (3)$$

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

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 y col., 1994a). 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.

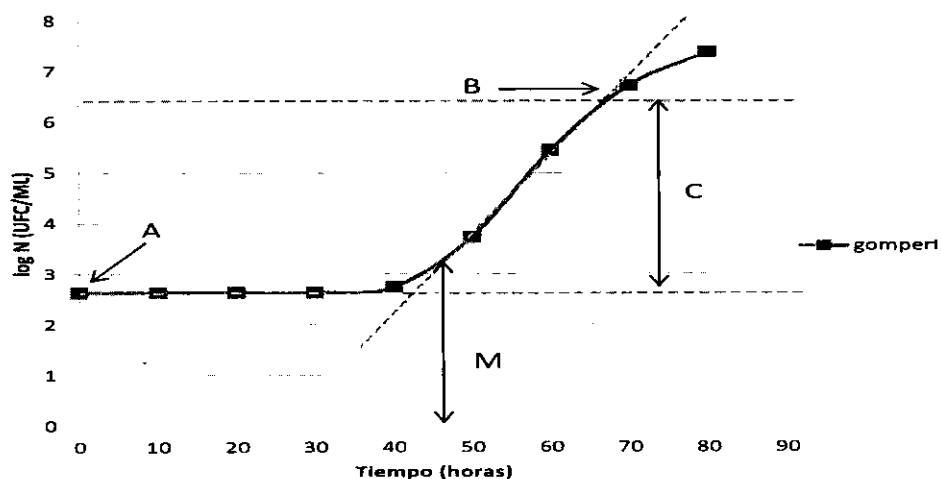


Figura 02. Representación gráfica de la ecuación de Gompertz y sus parámetros cinéticos.

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 1990).

➤ Modelo de Gompertz modificada

La ecuación de Gompertz fue modificada (Zwietering y col., 1991), 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:

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

Donde: 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 es el tiempo (s).

➤ Ecuación de Baranyi y Roberts

Baranyi y Roberts (1994) 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:

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

Donde:

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

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 lag. 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:

$$\log N = A + \frac{C}{1 + e^{(D-F \cdot t)}} \quad (8)$$

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.

5.11.2. 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, 1995). Otros autores han desarrollado modelos secundarios independientemente del tiempo de generación y del tiempo de latencia, como, por ejemplo, enfoques polinomiales (Gibson, 1988; Buchanan 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 1994), (Augustin; 2000b), y (Whiting; Bagi ; Santos, 002, 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):

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

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 $\mu_{max} = 0$.

5.11.3. 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 SERA ("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

5.12. 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.

5.12.1. 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).

5.12.2. 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, 1989).

5.12.3. 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; Carlstrom, 2006).

5.13. 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, 1993).

5.13.1. 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 R² 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; Zwietering, 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)

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

Dónde:

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

Coefficiente de regresión corregido (R²-corregido)

$$\text{Corrected}R^2 = \left[1 - \frac{(m-1)\left(1 - \frac{SSQ_{\text{regression}}}{SSQ_{\text{total}}}\right)}{(m-j)} \right] \quad (11)$$

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.

5.14. VALIDACION 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, 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, 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, 1999).

Accuracy(Af) y Biasfactors (Bf) (Ross, 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:

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

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

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.

VI. DEFINICION DE TERMINOS

6.1. 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).

6.2. 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).

6.3. Unidad Formadora de Colonia (ufc)

Los microorganismos filamentosos forman las colonias a partir de una spora 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).

6.4. Población microbiana

La fermentación se define como el conjunto de reacciones químicas que sufre una sustancia orgánica de origen vegetal como los carbohidratos o sus derivados por medio de ciertos microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) y que generalmente van acompañadas de un desprendimiento gaseoso y producción de energía

VII. MARCO METODOLOGICO

7.1. Localización del Experimento

La investigación se ejecutará en el laboratorio de microbiología, de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, ubicado en el campus de la Universidad Nacional de Moquegua, situado a 1410 m.s.n.m.

La determinación de Nitrógeno Fácilmente Asimilable y Dióxido de Azufre), se realizará en el laboratorio de análisis bromatológico de la facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano Puno.

La determinación de Método basado en la reacción en cadena de la polimerasa se realizará en la facultad de industrias alimentarias en la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa.

7.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

7.2.1. Material experimental

- Vid (*vitis labrusca*) procedente de los viñeros del valle de Moquegua.
- Levaduras comerciales (Fermol Rouge y Fermol Associees)

7.2.2. Materiales de oficina

- PC laptop
- Impresora
- Lápiz, Lapiceros, Marcador
- Cuaderno
- Cinco Paquetes de papel A4

7.2.3. Materiales de campo

- Baldés con medida

- Jarra plástica con medida
- Cocina
- Cilindro de gas
- Botellas de vidrio color ámbar para la fermentación 2500 ml
- Mangueras esterilizadas
- Botellas plásticas 500 ml (trampa de agua)
- Corchos
- Guantes, cofia, mandil
- Cubre boca (barvijo)
- Cinta de embalaje
- Hojas adhesivas
- Plástico negro
- Paleta de madera

7.2.4. Instrumentos de laboratorio

- Matraces Erlenmeyer de 50ml marca pírex
- Buretas de Titulación de 10 a 25ml marca pírex
- Placas Petri Marca Pírex
- Probetas Marca Pírex cap. 50ml
- Vasos de precipitado de 50ml marca pírex
- Pipetas volumetricas 1, 5, 10 y 20 ml
- Fiólas 500ml marca pírex

7.2.5. Materia Prima Insumos y Reactivos

- Uva isabella
- Cultivo YPD: Extracto de levadura 1%
- Agua de peptona 2%
- Glucosa 2%
- Agar 2.5% (medio sólido).
- Solución de EDTA 50 nm
- M 17 AGAR
- Agua destilada

- Solución de agua peptonada al 0.1%

7.2.6. Equipos

- Balanza analítica precisión marca AND FR – 300 Japón Cap. De 0.0001 a 310 gr.
- Incubador Gallenkamp, modelo IMR 250
- pH-metro digital modelo HM – 5S.
- Termómetro 5 - 120°C Pirex.
- Refrigeradora
- Estufa labor Muszeripari Muvek
- Equipo de Baño de agua termostático a 50°C
- Tubos de ensayo.

7.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Para la investigación se empleará un diseño experimental, completamente al azar (DCA) con arreglo factorial ($2 \times 3^2 \times 2$) con tres repeticiones, ya que es un estudio que prueba la relación entre las variables propuestas, es decir que se necesita de la práctica para determinar el proceso óptimo, mediante la aplicación de los diferentes tratamientos.

7.3.1. Método estadístico

Con la ayuda del software estadístico (Statgraphics Centurion XVII), se cuantificará, tabulará y ordenará los datos obtenidos mediante análisis, los mismos que permitieran encontrar los resultados.

7.3.2. Técnicas de investigación

Las técnicas de investigación, Son las siguientes:

- Investigación en el laboratorio
- Revisión de libros
- Revisión bibliográfica de artículos científicos e internet

7.3.3. Factores y niveles

El planteamiento de los factores y niveles en estudio de la presente investigación tienen el siguiente esquema del desarrollo experimental.

7.3.4. ESQUEMA DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL

7.3.4.1. Obtención de mosto en el proceso de elaboración del vino

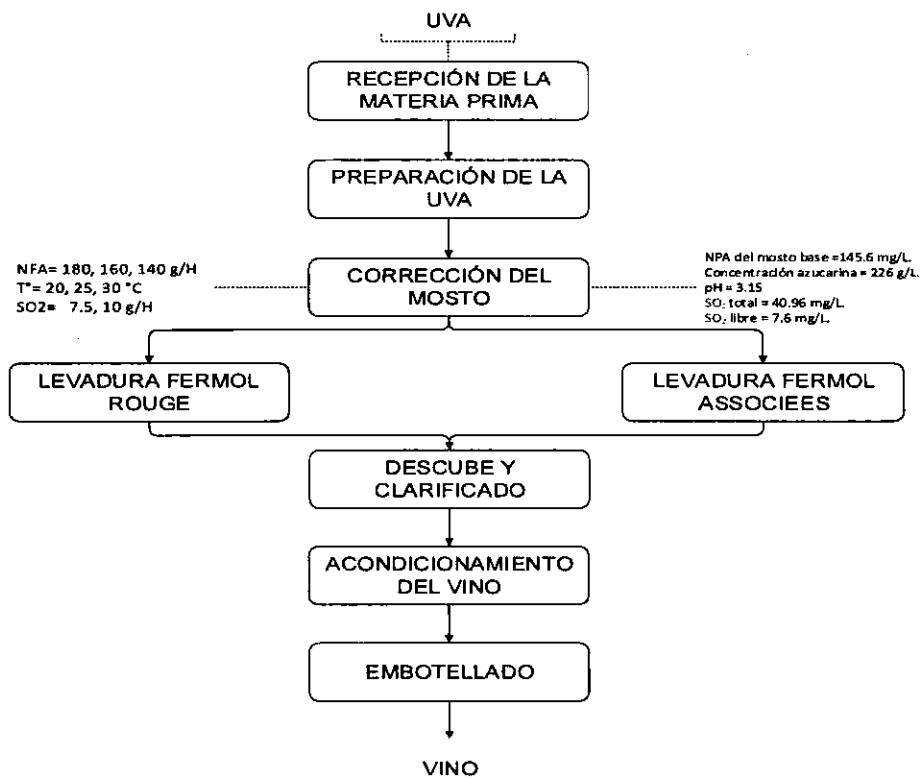
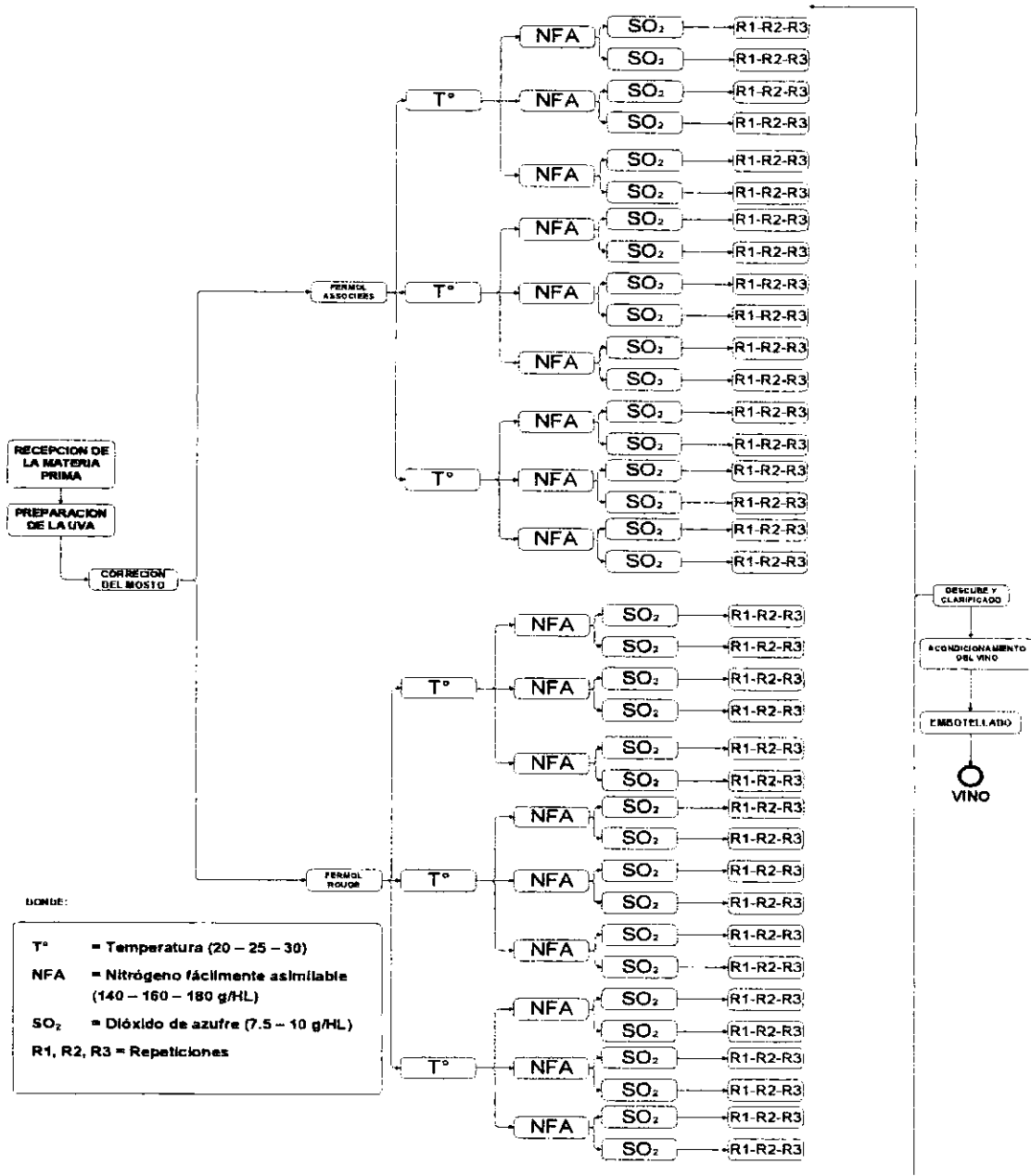


Diagrama de flujo para la elaboración de vino.

Fuente: elaboración propia, 2016

7.4.2. Grafico del Diseño Experimental



Fuente: Elaboración propia , 2016

7.5. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

7.5.1. Variables de experimentación

Tabla 4 Variables

Variable Independiente	Variable Dependiente
<ul style="list-style-type: none">✓ Temperatura✓ Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA)✓ Dióxido de Azufre (SO₂)	<ul style="list-style-type: none">✓ Modelado del crecimiento✓ Tiempo de Generación (h)✓ Velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx.}}$) (h)✓ Tiempo de fase de latencia (λ) (h)
Indicadores <ul style="list-style-type: none">✓ T° = 20 – 25 – 30 °C✓ NFA= 140 – 160 – 180 gr/hL✓ SO₂ = 7.5 – 10 gr/hL	Indicadores <ul style="list-style-type: none">✓ Modelo primario✓ Modelo secundario✓ Modelo terciario

Fuente: elaboración propia.

7.6. MODELOS MATEMÁTICOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

7.6.1. Relación de variables de acuerdo al experimento

Tabla 5 Parámetros de Crecimiento

Este método es para las diferentes temperaturas T = 20 °C, T = 25 °C, T = 30 °C

N°.	TIEMPO			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TIEMPO			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	t1	t2	t3	UFC/ml	t1	t2	t3	UFC/ml
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								

Consideraremos como variable dependiente o de respuesta Y=UFC/ml y como variable independiente o predictor X=tiempo.

$$\text{Modelo estadístico: } Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i$$

Donde:

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

X_i = Es el tiempo en el proceso de fermentación

β_0 = Parámetro desconocido que indica la ordenada donde la línea de regresión lo intersecta.

β_1 = Parámetro desconocido que indica la pendiente de la línea de mejor ajuste.

ε_i = Error de perturbación que puede tomar valores positivos o negativos.

7.6.2. Parámetros de crecimiento de *saccharomyces cerevisiea*

Tabla 6 Parámetros de crecimiento

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

7.7. AJUSTE Y VALIDACIÓN DE MODELOS MATEMÁTICOS

Los parámetros de crecimiento se ajustarán con un software estadístico. **Statgraphics Centurion XVII**

7.8. MODELOS MATEMÁTICOS:

7.8.1. Gompertz modificado

En función de parámetros de crecimiento

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

$$\text{Log } N= A+C*\exp[-\exp (-b(\text{Tiempo } -M))]$$

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.

7.8.2. Otros modelos a usar en función de parámetros cinéticos

Donde:

a: población inicial de la curva de crecimiento

b: Velocidad de crecimiento máximo.

c: Máxima población de crecimiento de la curva de crecimiento.

d: Fase de latencia.

7.8.3. MODELO BARANYI

$$Y=c+\text{Ln}((-1+\exp(b*d) +\exp(b*x)) /(-1+\exp(b*x) +\exp((b*d) +c-a)))$$

7.8.4. MODELO GOMPERTZ

$$Y=a+((c-a) *\exp(-\exp(1+(b*2.718*((d-x) /(c-a))))))$$

7.8.5. MODELO LOGISTICO

$$Y= a+((c-a) /(1+\exp((4*b*(d-x) /(c-a) +2)))$$

7.9. MEDICIONES EXPERIMENTALES

7.10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

7.10.1. Cuantificación de levaduras

Peptona 4%, extracto de levadura 2%, glucosa 4%, agar 4% y agua destilada. Se esteriliza en autoclave (126°C, 20 minutos, 1 atmósfera de presión). Si se quiere preparar 1 litro de medio MBM, habrá que preparar 500 mL de *Medio A*. el pH a 5.4, posteriormente se esterilizará a 121°C durante 15 min. A las cajas que contienen la muestra se les adicionará de 15-20 ml, de medio de cultivo a 40-45°C, se homogenizarán las muestras, se dejarán solidificar y se aplicará una segunda capa de medio y se incubarán a 37°C + 2°C, durante 72 h, la cuantificación se realizará contando el número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g), con la ayuda de un contador de colonias. Una de las cuantificaciones es mediante la utilización del PCR.

7.10.2. Determinación del Nitrógeno Fácilmente Asimilable en Mostos (NFA)

(Índice de formol) El NFA está constituido por el nitrógeno amínico (Aminoácidos) más el nitrógeno amoniacal menos la prolina (aminoácido no asimilable por las levaduras).

7.10.3. Expresión del resultado:

Se expresa en mg/l de Nitrógeno

$$\text{NFA} = 28 \times n$$

Donde

n = ml de NaOH 0.1 N consumidos en la valoración

7.11. SULFUROSO LIBRE Y TOTAL (mostos y vinos)

7.11.1. Procedimiento

Determinación del dióxido de azufre libre por valoración yodo métrica directa.

Determinación del dióxido de azufre combinado por valoración yodo métrica tras hidrólisis alcalina.

7.11.2. Dióxido de azufre libre:

Dióxido de azufre libre en miligramos por litro:

- $32 n =$ Dióxido de azufre combinado:
- Añadir 8ml. de solución 4M de hidróxido sódico, agitar una sola vez y dejar 5 minutos en contacto. Verter de un golpe, y agitando enérgicamente el contenido de un pequeño vaso en el que se hayan echado 10ml. de ácido sulfúrico al 1/10.
- Valorar inmediatamente con yodo 0,025M.
- Sea n' el volumen de yodo empleado.
- Añadir 20ml. de solución 4M de hidróxido sódico, dejar en contacto 5 minutos después de haber agitado una sola vez.
- Diluir con 200ml. de agua lo más fría posible.
- Agitando enérgicamente, verter de un golpe 30ml. de ácido sulfúrico al 1/10 previamente colocados en una probeta.
- Valorar el dióxido de azufre liberado con el yodo 0,025M. Sea el n'' el volumen de yodo empleado.

Dióxido de azufre total en miligramos por litro: $32 (n + n' + n'')$

7.12. RECuento DE LEVADURAS

La levadura más frecuente en enología es *Saccharomyces cerevisiae* –hongo unicelular eucariota de 2-10 μm de tamaño– que suele ser el principal responsable de la fermentación alcohólica y de la generación de aromas secundarios en el vino. El

recuento de levaduras se realiza en el control de los vinos, pero de forma más generalizada en “pie de cuba” y en el “tiraje” para la elaboración de vino espumoso. Asimismo, por medio de tinciones adecuadas se pueden identificar las levaduras viables.

7.12.1. Recuento

7.12.1.1. Fundamento

El recuento de levaduras totales y viables se realiza por microscopia mediante la medición con azul de Evans y/o azul de metileno.

7.12.2. Material y reactivos

- ✓ Microscopio de 600-900 aumentos.
- ✓ Cámara de recuento Thoma o Neubauer (Fig. 18.1, 18.2 y 18.3).
- ✓ Cubreobjetos.
- ✓ Pipeta semiautomática de volumen variable de 100 μL .
- ✓ Pipeta semiautomática de volumen variable de 1000 μL .
- ✓ Microtubo de 500 μL .
- ✓ Agua PA-ACS, Código 131074.
- ✓ Etanol 96% v/v PA, Código 121085.
- ✓ Azul de Evans DC, Código 255486.
- ✓ Azul de Metileno Fenicado según Khüne DC, Código 251172.

Portaobjetos de las cámaras de recuento Thoma y Neubauer: portaobjetos de 5mm de grosor con 4 ranuras transversales y 1 perpendicular para recoger el líquido sobrante. En el segmento central rebajado 0,1mm, se encuentran grabadas las 2 cuadrículas de recuento con ligeras variaciones entre ellas.

Cuadrículas de recuento Ranura perpendicular Ranuras transversales

7.12.3. Técnicas Usuales de Análisis en Enología

7.12.3.1. Procedimiento

Todo el material de vidrio que se utilice ha de ser lavado con agua destilada y alcohol del 96%.

Se colocan 400 μL de muestra homogeneizada en un micro tubo y se añaden 40 μL de azul de Evans o azul de metileno fenicado. La muestra y el colorante se mezclan y se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 5 min. Se deposita una gota en una de las 2 cuadrículas del portaobjetos procurando que quede llena

la superficie y se tapa con el cubreobjetos evitando la presencia de burbujas de aire. La cámara de recuento se ha de fijar en la platina del microscopio para realizar la observación microscópica.

El enfoque del microscopio se empieza con un objetivo de pocos aumentos que posteriormente pasaremos a uno de más. Se coloca el objetivo lo más cerca posible del cubre objetos, pero sin tocarlo y posteriormente se irá alejando hasta que la imagen sea lo más clara y nítida posible.

Sea cual fuese el modelo de cámara empleado, el procedimiento es el mismo, el recuento se realizará sobre 20

de los 400 (20 x 20) cuadrados pequeños de $0,0025 \text{ mm}^2$ (volumen total de $0,1 \text{ mm}^3$) elegidos al azar. Si el número de células/cuadrado es >10 es conveniente diluir la muestra. Por convenio para evitar contar dos veces la misma levadura, consideraremos que las levaduras que se encuentren en la intersección de una cuadrícula se apuntarán a la de abajo y a la de la izquierda, y las gemaciones se cuentan como $1/2$ levadura.

Detalle del cuadrículado de la cámara de recuento de Thoma. 0,25 - 3 mm - 0,025 0,05
1 mm - 0,025 0,05 - 1 mm

Detalle del cuadrículado de la cámara de recuento de Thoma. Por convenio para evitar contar

dos veces la misma levadura, consideraremos que las levaduras que se encuentren en la intersección de una cuadrícula se apuntarán Detalle del cuadrículado de la cámara de recuento de Thoma.

Las levaduras vivas se pueden diferenciar de las muertas porque el azul de Evans colorea las células viables mientras que el azul de metileno sólo colorea el no viables.

Sea n el número total de levaduras en las 20 cuadrículas. Cálculo

$$\text{Recuento levaduras} \frac{\text{totales}}{\text{mL}} = \frac{n * 20 * 1000 * f}{0,1} = n * 200000 * f$$

f = factor de dilución

$$\% \text{ Levaduras viables} = \frac{\text{Recuento levaduras viables} * 100}{\text{Recuento de levaduras totales}}$$

Los valores de carácter orientativo del recuento de levaduras totales en un "pie de cuba" son de 80 millón/mL, con $\geq 70\%$ de viables; y en el caso del "tiraje" 1-2 millón/mL con $\geq 60\%$ de viables.

VIII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

8.1. DIAGRAMA DE GANTT

N°	ACTIVIDADES	AÑO 2016 – 2017									
		OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL
1	Elaboración del Perfil de Proyecto Tesis	x									
2	Evaluación del Perfil de Proyecto Tesis		x								
3	Levantamiento de Observaciones		x	x							
6	Ejecución de Proyecto de Tesis				x	x	X				
7	Elaboración de Informe Final							x			
8	Levantamiento de Observaciones								x		
9	Sustentación de Proyecto de Tesis									x	
10	Levantamiento de Observaciones Finales									x	
11	Presentación del Proyecto Final										x

IX. RECURSOS

DESCRIPCION	UNIDAD	CANT	P. U. (S/.)	TOTAL (S/.)
BIENES				S/.2,032.00
Vid	Kg	300	S/.3.50	S/.1,050.00
Fermol Associees	Sobre	100	S/.0.16	S/.16.00
Fermol Rouge	Sobre	100	S/.0.16	S/.16.00
Endozyn cultivar	G	10	S/.5.00	S/.50.00
Endozyn active	G	10	S/.5.00	S/.50.00
Endozyn aromatic	G	10	S/.5.00	S/.50.00
Agar YED	G	1	S/.800.00	S/.800.00
SERVICIOS				S/.1,690.00
Análisis de PCR - UNSA	Muestra	1	S/.800.00	S/.800.00
Análisis microbiológico – UNA	Muestra	3	S/.180.00	S/.540.00
Alquiler de Laboratorio de – UNAM		1	S/.350.00	S/.350.00
Subtotal				
Imprevistos 3%				111.66
TOTAL				S/.3,833.66

X. BIBLIOGRAFIA

- André V. 2008. *Aprenda a conocer los vinos*. Editorial Robinbook. Barcelona España.
- Adams, J.; Puskas-Rozca, S.; Simlar, J.; Wilke, C. M. Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.* 22: 13-19 (1992).
- Aerny J., 1996. Composés azotés des moûts et des vins. *Revue suisse Vitic. Hortic.* Vol. 28 (3): 161-165.
- Beltran, G.; Torija, M. J.; Nova, M.; Ferrer, N.; Poblet, M.; Guillamón, J. M.; Rozès, N.; Mas, A. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *System Appl. Microbiol.* 25: 287-293 (2002).
- Bisson, L. Stuck and sluggish fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 107-119 (1999).
- Baranyi, J. and Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23:277– 294.
- Buchanan, R. L. and Klawitter, L. A. (1991). Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 12:235 – 246.
- Ciani, M.; Vincenzo, P. The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. *J. Sci. Food Agric.* 82: 573-578 (2002).
- Ciani, M.; Mannazzu, I.; Marinangeli, P.; Clementi, F.; Martini, A. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85: 159-164 (2004).
- Comitini, F.; Ciani, M. Survival of inoculated *Saccharomyces cerevisiae* strain on wine during two vintages. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 248-253 (2006).
- Chávez, J. (2011). Estudio de las cualidades morfológicas y ampelográficas de la variedad de uva borgoña cultivada en la cuenca del Alto Jequetepeque. *Revista Científica de la Escuela de Post Grado Universidad de Cajamarca, Peru.*

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

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

España f. 2004. *El vino, conózcalo y disfrútalo*. Editorial norma. Bogotá Colombia. 188 p.

Epifanio, S. I.; Gutierrez, A. R.; Santamaría, M. P.; López R. The influence of enological practices on the selection of wild yeast strain spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (2): 219-224 (1999).

Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A. Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337 (1999).

Esteve-Zarzoso, B.; Peris-Toran, M.; García-Maiquez, E.; Uruburu, F.; Querol, A. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of Sherry wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2056-2061 (2001).

Fernández-Espinar, M. T.; Esteve-Zarzoso, B.; Querol, A.; Barrio, E. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeast. *Anton. Leeuw.* 78: 87-97 (2000).

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

Granchi, L.; Ganucci, D.; Viti, C.; Giovannetti, L.; Vincenzini, M. *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in spontaneous commercial fermentations of grape musts with 'adequate' and 'inadequate' assimilable-nitrogen content. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 54-58 (2003).

Guillamón, J. M.; Sabaté, J.; Barrio, E.; Cano, J.; Querol, A. Rapid identification of wine yeast species base don RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169: 387-392 (1998).

Gutiérrez, A. R.; Lopez, R.; Santamaría, P.; Sevilla, M. J. Ecology of inoculated and spontaneous fermentations in Rioja (Spain) musts, examined by mitochondrial DNA restriction analysis. *Int. J. Food. Microbiol.* 36: 241-245 (1997).

Gutiérrez, A. R.; Santamaría, P.; Epifanio, S.; Garijo, P.; Lopez, R. Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 411-415 (1999).

Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J. and Van Impe, J. F (2004). Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International Journal of Food Microbiology* 91:229 – 244.

Gimero I. 2007. Identificación de estrategias mercadológicas exitosas implementadas por empresas vitícolas francesas para penetrar en el mercado mexicano. Para obtener el título en licenciaturas en administración de hoteles y restaurantes. Universidad de las Américas, escuela de negocios y economía, departamento de turismo puebla, México. PP. 14-36.

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

Gutiérrez, E. M., 2011, Modelos sugeridos como herramientas para la microbiología predictiva. Maestría en gestión en la industria de los alimentos.

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

Jackson, R. (2008). *Wine Science: Principles and Applications*. Tercera edición Elsevier. Burlington, USA.

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

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2004). *Brock. Biología de los Microorganismos*. 10a ed. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. pp. 122, 352, 400-402, 991.

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

McMeekin, T., J. Olley, T. Ross, and D. Ratkowsky.(1993) *Predictive microbiology. Theory and application*. Research studies Press Ltd., Taunton.

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.

Kocková-Kratochvilová, A. Yeast and yeast-like organisms. VCH (1990). Kolodner, R. D.; Putnam, C. D.; Myung, K. Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 297: 552-557 (2002).

Longo, E.; Cansado, J.; Agrelo, D.; Villa, T. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape must from Northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 141-144 (1991).

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

Terral, J., Taabrd, E., BoubY, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral. I., Picq, S., Chevance, J., Jung, C., Fabre, L., Tardy, C., Compan, M., Bacilieri, R., Lacombe, T. y This p. (2010). Evolution And History of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European.

Toro, N. y Suarez, L. (2012). Obtención y caracterización del aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) y evaluación de su actividad antioxidante. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.

Prescott, L. M., Harley, J.P., and Klein, D.A. (1999). *Microbiología* 4 Ediccion., McGraw-Hill. Interamericana. 114 – 136.

Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. (1999). *Microbiología* 4ª Edición., McGraw-Hill. Interamericana. 114 – 136.

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.

Ratkowsky, D.A., J. Olley, T.A. McMeekin, A. Ball. 1989. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J Bacteriol* Vol 149(1), 1-5.

Robinson, T. P., Ocio, M. J., Kaloti, A., Mackey, B. M. (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 pp.

Roos, T. and McMeekin, T.A. (1994) *Predictive microbiology*. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 241-246.

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

Santos. E. A. J. dos. 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 en Ciencia de los Alimentos de la UAB. Barcelona, España.

Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. and Painter, P. R. (1989). *Microbiología* 2 Ed. Ed. Reverté. pp. 195 – 209.

Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H., and Van Impe, J. F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:137 – 159.

Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., McMeekin, T. A., and Ross, T. (2000). Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, NaCl, pH, and lactic. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4979 – 4987.

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

Yousef A. E., Carlstrom C., 2006, *Microbiología de los alimentos, manual de laboratorio*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Valencia f. 2010. *Enología: vinos aguardientes y licores*. Editorial vértice. Málaga, España. 200 p.

Valcárcel, M. J.; Pérez, L.; González, P.; Domecq, B. *Levaduras responsables de la fermentación industrial de mostos de Jerez*. V Jornadas Universitarias de

Viticultura y Enología en Jerez. 135-142 (1989).

Zwietering, M.H., Cuppers, H.G., de Witt, J.C. y Van'tRiet, K. 1994a. 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.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. y Van'tRiet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1875-1881.

ANEXOS

MODELADO DEL CRECIMIENTO DE DOS LEVADURAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACION DE LA UVA VARIEDAD BORGOÑA (<i>Vitis labrusca</i> L.) A DIFERENTES TEMPERATURA, NITROGENO FACILMENTE ASIMILABLE, SO ₂ DEL VINO.				
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPTESIS	VARIABLES E INDICADORES	DISEÑO METODOLOGICO
Problema primario. ¿De qué manera el modelado del crecimiento de dos levaduras comerciales (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L.) durante la fermentación de la uva variedad borgoña (<i>Vitis labrusca</i> L.) determinan los parámetros (temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), en el vino?	Objetivo general. Modelar el crecimiento de dos levaduras comerciales (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L.) durante la fermentación de uva (<i>Vitis labrusca</i> L.), ajusta los parámetros (temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), del vino variedad borgoña. Objetivos específicos. Determinar los parámetros	Hipótesis general. El modelado del crecimiento de dos levaduras comerciales (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L.) durante la fermentación de uva (<i>Vitis labrusca</i> L.), si permiten ajustar los parámetros de temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable, dióxido de azufre, del vino variedad borgoña. Hipótesis específico. Los parámetros (temperatura, tiempo,	Variable Dependiente Modelado del crecimiento de dos levaduras comerciales Tiempo de Generación Velocidad máxima de crecimiento (μmáx.) Tiempo de fase de latencia (λ) Indicadores Primario Secundario Terciario Hora	Tipo de investigación Aplicada Nivel de investigación Experimental Método Experimental Población Problemas de estandarización de producción de vino en la etapa de fermentación de vino en la Región de Moquegua. Muestra Mosto de uva (<i>vitis labrusca</i> L.) Técnicas Análisis documental Observaciones
Problemas secundarios.				

<p>¿Cuál de los parámetros (temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), determina significativamente la calidad en la etapa de fermentación de uva variedad borgoña?</p> <p>¿De qué manera el modelo matemático se aproxima al mejor ajuste durante el crecimiento de dos levaduras comerciales (<i>Sacharomyces cerevisiae</i> L.) en la fermentación de uva?</p> <p>¿Cuál será el comportamiento grafico del crecimiento microbiano con parámetros controlados durante la fermentación de uva?</p>	<p>(temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), en la fermentación de uva variedad borgoña. Ajustar el modelo matemático (Modelo Gompertz), a los datos obtenidos en la etapa de fermentación de uva (<i>Vitis vinifera</i> L.). Simular el comportamiento del crecimiento microbiano con los parámetros de la fermentación de uva.</p>	<p>nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), si establecen la fermentación del vino variedad borgoña. El modelo matemático (Modelo Gompertz), si concuerda con los datos obtenidos en la etapa de fermentación de uva (<i>Vitis vinifera</i> L.). La simulación del crecimiento microbiano concuerda con los parámetros de la fermentación de uva en la obtención de vino.</p>	<p>Variable Independiente</p> <p>Temperatura</p> <p>Nitrógeno Fácilmente Asimilable (NFA)</p> <p>Dióxido de azufre (SO₂)</p> <p>Indicadores</p> <p>20 – 25 – 30 °C</p> <p>140 – 160 – 180 gr/HL</p> <p>7.5 – 10 gr/HL</p>	<p>Análisis en laboratorio</p> <p>Recuento de microorganismos</p> <p>Ensayos experimentales</p> <p>Instrumentos</p> <p>Materiales de laboratorio</p> <p>Equipo de PCR para recuento de reproducción de microorganismos.</p> <p>GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems</p>
---	--	--	--	---

Operacionalización de variables							
Objetivo	Hipótesis	Variable Dependiente	Variable Independiente	Concepto	Dimensiones	Unidades	Ítems
Determinar los parámetros (temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), en la fermentación de uva variedad borgeña.	Los parámetros (temperatura, tiempo, nitrógeno fácilmente asimilable y dióxido de azufre), si establecen la fermentación de uva variedad borgeña.	<p>Variable Dependiente</p> <p>✓ Modelado del crecimiento</p> <p>Variable Independiente</p> <p>✓ Nitrógeno fácilmente asimilable</p> <p>✓ SO₂.</p> <p>✓ Temperatura.</p>		Describe el comportamiento de la fermentación de uva en el momento de degradación de carbohidratos.	<p>✓ concentración de NPA del mosto base = 145.6 mg/L.</p> <p>✓ concentración azucarina = 226 g/L.</p> <p>✓ pH = 3.15</p> <p>✓ SO₂ total = 40.96 mg/L.</p> <p>✓ SO₂ libre = 7.6 mg/L.</p>	<p>✓ NPA</p> <p>NFA</p> <p>nitrógeno fácilmente asimilable.</p> <p>✓ Concentración de azúcar inicial.</p> <p>✓ Potencial de hidrogeno.</p> <p>✓ Dióxido de azufre.</p>	<p>Determinación de NFA</p> <p>Sulfuro libre y total.</p> <p>Acidos Titulable al 0,1 N</p> <p>Termómetro</p>
Ajustar el modelo matemático (Modelo Gompertz), a los datos obtenidos en la etapa de	El modelo matemático (Modelo Gompertz), si concuerda con los datos obtenidos en la etapa de	<p>Variable Dependiente</p> <p>✓ Modelo matemático</p> <p>Variable Independiente</p> <p>✓ Nitrógeno fácilmente</p>		La utilización de un PCR facilita la cuantificación y la reproducción de los microorganismos, levaduras.	<p>a: población inicial</p> <p>b: Velocidad.</p> <p>c: Máxima población.</p> <p>d: Fase de latencia.</p>	<p>a: población inicial de la curva de crecimiento</p> <p>b: Velocidad de crecimiento máximo.</p> <p>c: Máxima población de</p>	<p>PCR</p> <p>Análisis de laboratorio de siembra de levaduras.</p>

fermentación de uva (<i>Vitis vinifera</i> L.).	fermentación de uva (<i>Vitis vinifera</i> L.).	asimilable ✓ SO ₂ . ✓ Temperatura.			crecimiento de la curva de crecimiento. d: Fase de latencia.	
Simular el comportamiento del crecimiento microbiano con los parámetros de la fermentación de uva.	La simulación del crecimiento microbiano concuerda con los parámetros de la fermentación de uva en la obtención de vino.	Variable Dependiente Modelo matemático Variable Independiente Tiempo de Generación Velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x.}$) Tiempo de fase de latencia (λ).	El programa estadístico ayuda a comparar datos que se obtienen del análisis y modelado matemático.	a: población inicial de la curva de crecimiento b: Velocidad de crecimiento máximo. c: Máxima población de crecimiento de la curva de crecimiento. d: Fase de latencia.	Ecuación del modelo matemático. Programa estadístico	