

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**INCORPORACION DE UN PROBIOTICO EN EL PROCESO DE
ELABORACION DE VINO COMO PRODUCTO TERMINADO.**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

JOSE EDUARDO LOARCA GUEVARA
FRANCISCO ALBERTO PEÑA NAVARRETE

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

FEBRERO 2018

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

LIC. CRISTOBAL HERNAN RIOS BENITEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez.

TRIBUNAL CALIFICADOR

ASESORA DE AREA DE MICROBIOLOGIA

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez.

ASESORA DE AREA DE INDUSTRIA DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGIA.

MAE. Nancy Zuleyma González Sosa

DOCENTE DIRECTOR

Lic. Juan Agustín Cuadra Soto.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a nuestros docentes evaluadores del tribunal calificador: MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez, MAE. Nancy Zuleyma González Sosa y MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez, quienes han dirigido el presente trabajo de investigación, por sus consejos, sugerencias, apoyo y enseñanzas determinantes para alcanzar los objetivos propuestos, Dios todo poderoso les bendiga.

Agradecemos de manera particular al Lic. Juan Agustín Cuadra, por su apoyo incondicional y asesoría en cada uno de los momentos esenciales de nuestro proceso de graduación.

Expresamos nuestra gratitud a la Doctora Tania Cuadra Zelaya, por el apoyo y asesoría en muchos aspectos del área de microbiología, para la obtención de información en la investigación.

Agradecemos a la empresa 3 M, por facilitar la obtención de las placas Petrifilm para Bacterias Acido Lácticas, así como la debida accesoria técnica proporcionada.

De igual manera agradecemos a ASEAL El Salvador por facilitarnos la obtención de la cepa liofilizada de *Lactobacillus casei*.

José Loarca y Francisco Peña.

DEDICATORIA

Agradezco primeramente a Dios por haberme permitido culminar esta etapa de mi vida, por siempre bendecirme grandemente en la vida, por darme la fortaleza y sabiduría, por darme muchas cosas buenas, gracias Todopoderoso por mi éxito.

A mi familia, quienes siempre confiaron en que yo podía lograr grandes cosas en mi vida, por darme los mejores ejemplos y demostrarme que con humildad se pueden lograr grandes cosas, y por haberme enseñado a valorar todo lo que tengo.

A mi abuelita María Luz Guevara, que fue una de las mejores bendiciones en la vida, gracias por sus oraciones, las cuales siempre fueron escuchadas por Dios, aunque ya no esté conmigo, sé que desde el cielo siempre me cuidara.

A mi mamá Ángela del Carmen Guevara, que siempre ha sido un gran pilar en mi vida, sé que sin ella esto no hubiera sido posible, ha sido madre y padre para mí y un gran ejemplo a seguir, me ha demostrado que siendo humilde se puede salir adelante, gracias mamá eres la mejor.

A mi compañero, amigo y colega Alberto Navarrete, por su apoyo y esfuerzo para realizar el presente trabajo de graduación.

A mi novia, Lucy Cuellar por siempre darme palabras de ánimo cuando más las necesite, por siempre estar allí y por ser una luz en mi vida.

A mis compañeros, con los cuales pase buenos momentos en la Universidad, los cuales siempre son gratos recordar. A mis amigos, que siempre son un apoyo incondicional y que han creído en mí dándome palabras de ánimo y fortaleza cuando las he necesitado.

José Eduardo Loarca Guevara.

DEDICATORIA

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por darme la bendición de poder alcanzar todo lo que he logrado, sin duda alguna el fue la base de mi fuerza. Jamás hubiera imaginado estar donde estoy, y menos culminar esta parte de mi vida, la cual me llena de mucha satisfacción y alegría. Por lo cual dedico este gran triunfo a Él en primer lugar.

En especial quiero agradecer y dedicar esta meta alcanzada a mi mamá Blanca Isabel Navarrete, por el enorme ejemplo de valentía y carácter que me inculco desde pequeño. Además, que materialmente fue mi sostén en cada uno de mis momentos, desde el inicio, hasta el final de toda mi carrera. Gracias mamá, ¡Te amo!

A mí amigo y compañero de tesis José Eduardo Loarca, a quien también agradezco su ayuda y dedicación en este trabajo de grado.

A mi docente asesor, por tanto esfuerzo y dedicación en este trabajo de investigación, que Dios bendiga su vida y la de su familia.

Y finalmente a mis compañeros de estudio, especialmente a José Alfredo Flores, quien siempre me dio palabras de ánimo y apoyo.

Francisco Alberto Peña Navarrete.

INDICE

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xviii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	21
Capítulo III	
3.0 Marco teórico	23
3.1 Alimentos funcionales	23
3.1.1 Características de los alimentos funcionales	23
3.2 Composición del vino	23
3.3 Estructura y desarrollo de la uva	24
3.4 Composición química del vino	26
3.5 Vino en la salud	28
3.6 El resveratrol	28
3.7 Clasificación de los vinos	29
3.8 Caracterización de la Uva Red Globe	30
3.9 Los probióticos	30
3.9.1 Los probióticos y vino	31

3.9.2 Los probióticos del género <i>Lactobacillus spp</i> y Su injerencia en la salud gastrointestinal.	32
3.9.3 <i>Lactobacillus casei</i>	33
3.10 Procesos básicos de producción de vino	34
3.11 Bacterias lácticas del vino	36
3.12 Especies de levaduras de mayor relevancia enológica	37
3.13 Fermentación alcohólica	38
3.13.1 Productos secundarios de la fermentación alcohólica	38
3.13.2 Factores que influyen en la fermentación alcohólica	40
3.14 La fermentación maloláctica	41
3.14.1 Productos secundarios de la fermentación alcohólica	42
3.15 Empleo de sulfuros en vinos	44
3.16 Condiciones generales para la realización de test de Análisis sensorial en vinos y otras bebidas vinícolas.	45
3.16.1 Sala de cata	45
3.16.2 Preparación de muestras e instalaciones de almacenamiento.	46
3.16.3 Copas de cata	46
3.17 Metodología Petrifilm para bacterias ácido lácticas	46
3.17.1 Características de metodología Petrifilm	47

Capítulo IV

4.0 Diseño Metodológico	49
4.1 Tipo de estudio	49
4.1.1 Transversal	49
4.1.2 Experimental	49
4.1.3 Investigación bibliográfica	49
4.1.4 Investigación de campo	49
4.2 Parte experimental	50
4.2.1 Elaboración de vino por lote	50
4.3 Reconfirmación de bacterias ácido lácticas por gramo de cepa Liofilizada.	51
4.3.1 Inoculación de <i>Lactobacillus casei</i> al producto obtenido.	53
4.3.2 Inoculación de <i>Lactobacillus casei</i> al producto obtenido a una concentración de 10^4 UFC/mL por litro de vino	53
4.3.3 Inoculación de <i>Lactobacillus casei</i> al producto obtenido a una concentración de 10^6 UFC/mL por litro de vino	54
4.4 Determinaciones fisicoquímicas	54
4.4.1 Determinación de pH según AOAC 11.041	54
4.4.2 Determinación de acidez titulable según AOAC 11.042	55
4.4.3 Determinación de grados Brix	56
4.4.4 Determinación de grado alcohólico según AOAC 11.006.	56

4.4.5 Determinación de anhídrido sulfuroso total	57
4.5 Recuento de Bacterias Ácido Lácticas	58
4.6 Recuento de <i>Lactobacillus casei</i> en concentración de 10 ⁴ UFC/mL utilizando Agar MRS.	59
4.7 Análisis estadístico	60
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	62
5.1 Elaboración del vino.	62
5.2 Determinación de pH.	62
5.3 Determinación de Acidez titulable.	66
5.4 Determinación de grados brix.	70
5.5 Determinación de grado alcohólico.	72
5.6 Determinación de anhídrido sulfuroso total.	74
5.8 Reconfirmación de bacterias ácido lácticas por gramo de producto liofilizado.	75
5.9 Inoculación de <i>Lactobacillus casei</i> a concentración de 10 ⁴ y 10 ⁶ UFC/mL, utilizando la metodología Petrifilm en muestras elaboradas en laboratorio.	77
5.10 Inoculación de <i>Lactobacillus casei</i> a concentración de 10 ⁴ UFC/mL por litro de vino comerciales (MV7C1, MVC7C2 y MVX71).	78

5.11 Análisis de causa del no crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> en muestras elaboradas a nivel de laboratorio y muestras comerciales.	81
5.12 No cumplimiento del objetivo de prueba de catación	82
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	84
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	86
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Esquema general de fabricación de vino.
2. Materiales, equipos y cristalería para análisis fisicoquímico y microbiológico.
3. Certificado de Análisis de la cepa liofilizada utilizada de *Lactobacillus casei*.
4. Esquema para el recuento de bacterias ácido lácticas por gramo.
5. Cálculos para la inoculación de *Lactobacillus casei*.
6. Esquemas de Inoculación de *Lactobacillus casei*.
7. Esquemas de trabajo de análisis fisicoquímico.
8. Preparación de reactivos.
9. Esquema para el recuento de bacterias ácido lácticas por metodología Petrifilm.
10. Esquema para la preparación de Agar MRS.
11. Elaboración del vino
12. Volúmenes promedio gastados de NaOH, para la determinación de acidez total.
13. Volúmenes promedios gastados de I₂, para la determinación de anhídrido sulfuroso por el método Ripper.
14. Ficha técnica de la OVI.
15. Memoria de imágenes de la investigación.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°

1. Estructura de la uva.	25
2. Estructura del resveratrol.	28
3. Transformación del ácido málico en ácido láctico.	41
4. Gráfico de resultados obtenidos de pH (Lote1 [X10 ⁴] y Lote 1 [X10 ⁶]).	63
5. Gráfico de resultados obtenidos de pH (Lote 2 [X10 ⁴] y Lote 2 [X10 ⁶]).	64
6. Gráfico de resultados obtenidos de Acidez titulable (Lote1 [X10 ⁴] y Lote1 [X10 ⁶]).	67
7. Gráfico de resultados obtenidos de Acidez titulable (Lote 2 [X10 ⁴] y Lote 2[X10 ⁶]).	67
8. Gráfico de resultados obtenidos de grados brix.	71
9. Diagrama de Ishikawa	81

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	Pág.
1. Concentración en mg/L de algunos constituyentes polifenólicos del Vino, expresados como ácido gálico Tamaño del grano en función de su masa.	
2. Resultados de pH	
3. Resultados de pH aplicando ANOVA.	
4. Resultados de acidez titulable	
5. Resultados ANOVA de acidez titulable.	
6. Resultados obtenidos de grados brix.	
7. Resultados de grado alcohólico	
8. Resultados de anhidro sulfuroso	
9. Resultados de reconfirmación de bacterias ácido láctica por gramo de Liofilizado.	
10. Resultados de recuento de <i>Lactobacillus casei</i> .	
11. Resultados obtenidos del recuento microbiológico, utilizando la metodología tradicional.	
12. Resultados obtenidos del recuento microbiológico, utilizando la metodología Petrifilm.	
13. Resumen de resultados	

ABREVIATURAS

AOAC:	Association of Official Analytical Chemists (Asociación Oficial de Químicos Analíticos).
ANOVA:	Análisis de varianza.
FAO:	Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones para la Alimentación y la Agricultura).
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
MRS:	Man Rogosa Sharper

RESUMEN

El vino es una bebida obtenida de la uva (especie *Vitis Vinífera*) mediante la fermentación alcohólica de su mosto o jugo. La fermentación se produce por la acción metabólica de las levaduras que transforman los azúcares del fruto en alcohol etílico y gas en forma de dióxido de carbono. En esta investigación se realizó la incorporación de un probiótico: *Lactobacillus casei*, al vino, con la intención de mejorar los beneficios que ya posee el producto, resaltando las características como alimento funcional, debido a que las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, pueden ayudar a prevenir o tratar diversas enfermedades gastrointestinales. Para lograrlo se elaboró dos lotes de vino de 5 litros cada uno, mediante un proceso de fabricación. Con el vino elaborado, se procedió a inocular la bacteria probiótica, a cada uno de los lotes, a dos diferentes concentraciones: 10^4 UFC/mL y 10^6 UFC/mL, las concentraciones se realizaron por duplicado. Al realizar el conteo de bacteria mediante metodología Petrifilm, no fue posible recuperar bacteria ácido láctica. Durante un periodo de cuatro semanas se evaluó el comportamiento fisicoquímico de los vinos (acidez total, grados brix, pH, grado alcohólico y anhídrido sulfuroso total). Los resultados obtenidos de pH y acidez titulable, se les aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA), para conocer la diferencia significativa que existe entre estos parámetros, respecto a cada uno de los lotes inoculados. La cepa probiótica de *Lactobacillus casei*, no fue capaz de sobrevivir en la matriz del vino, en la fase de producto terminado, tanto en muestras ensayadas a nivel de laboratorio como en muestras comerciales; debido a que esta no es capaz de soportar el grado alcohólico de dicha matriz. Por lo cual se recomienda que en futuras investigaciones se utilice una cepa diferente al *Lactobacillus casei* que pueda resistir las condiciones inhóspitas que produce el vino.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

La transformación de la uva en vino es un proceso biotecnológico en el que los microorganismos presentes, fundamentalmente las levaduras, utilizan los nutrientes del mosto para su crecimiento, produciendo una gama de metabolitos que convierten un líquido azucarado en una solución hidroalcohólica de sabor y aroma agradable. El consumo habitual y moderado de vino puede producir efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular (12). Por su parte, el término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales (8).

En esta investigación se planteó la incorporación de un probiótico: *Lactobacillus casei*, sobre una matriz compleja como el vino, con la idea que esto traería beneficios adicionales a los que este posee, resaltando sus características como alimento funcional, ayudando a mejorar la salud del ser humano. Debido a que las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, pueden ayudar a prevenir o tratar diversas enfermedades gastrointestinales ya sea, impidiendo la ocupación de sitios específicos, produciendo sustancias antagónicas o modulando la respuesta inmune a nivel de las células epiteliales del tracto gastrointestinal (8).

Por lo anterior, se propuso la elaboración de vino con probiótico que contenga todos beneficios adicionales implícitos en el vino hecho a partir de la vid (*Vitis vinífera*), beneficios como: la comprobada actividad cardioprotectora y efecto antioxidante, ejercida por los compuestos polifenólicos como el resveratrol que este contiene; por su parte con la incorporación de los probióticos en el vino, se obtendrían beneficios como: beneficios sobre la salud gastrointestinal y respuesta inmune (4). La investigación se llevó a cabo en un periodo que

comprendido de junio a septiembre del 2017, en los laboratorios de Análisis Bromatológico del Departamento de Análisis Químico e Instrumental y en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

Se elaboraron dos lotes de vino de 5 litros cada uno, mediante un proceso de fabricación, que consta de tres fases principales: obtención del mosto, su fermentación y por último su conservación (11). Con el vino elaborado, se procederá a inocular la bacteria probiótica, a dos diferentes concentraciones: 10^4 UFC/mL y 10^6 UFC/mL, que se realizó por duplicado. Se evaluó el conteo de bacterias ácido lácticas, utilizando la metodología Petrifilm (14). Durante ese mismo periodo de tiempo se evaluó el comportamiento fisicoquímico de los vinos (acidez total, grados brix, pH, grado alcohólico y anhídrido sulfuroso total), como control en proceso. Al finalizar la evaluación, los resultados fisicoquímicos de pH y acidez titulable se sometieron a una evaluación estadística, aplicando el Análisis de Varianza (ANOVA) (23), para conocer la diferencia significativa que existe entre estos parámetros, respecto a cada uno de los lotes inoculados. Posteriormente si los lotes cumplían tanto las especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, se procedería a la evaluación de su nivel de aceptación, a través de la catación, con un grupo de personas no expertas a quienes se les entregaría una ficha técnica; dicha evaluación se había realizaría en la Biblioteca Benjamín Orozco, de la Facultad de Química y Farmacia, ya que cumple con las mínimas especificaciones de la Norma ISO 8589 (Guía para general para el diseño de una sala de cata) (17).

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Incorporar un probiótico en el proceso de elaboración de vino, como producto terminado.

2.2 Objetivos específicos:

- 2.2.1 Elaborar dos lotes de vino de 5 litros cada uno, a pequeña escala.
- 2.2.2 Inocular el probiótico *Lactobacillus casei* a la concentración de 10^4 y 10^6 UFC/mL, respectivamente a cada lote de vino, para evaluar su crecimiento y las características fisicoquímicas.
- 2.2.3 Realizar los análisis fisicoquímicos de pH, anhídrido sulfuroso, grados Brix y grado alcohólico de cada uno de los lotes de vinos elaborados.
- 2.2.4 Determinar el recuento de bacterias ácido lácticas en los dos lotes de vino, utilizando la metodología de Petrifilm.
- 2.2.5 Conocer el nivel de aceptación de cada uno de los lotes de vino a través de una prueba de catación.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Alimentos Funcionales. ⁽⁵⁾

International Life Science Institute(ILSI), estableció que un alimento funcional es aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido a su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional incluso saludable.

3.1.1 Características de los alimentos funcionales. ⁽⁵⁾

Desde un punto de vista práctico, un alimento funcional puede tener determinadas características:

- Tiene que ser alimentos que utilizan para conseguir algún beneficio extra, por eliminación, reducción, o adición de algún componente.
- Son básicamente alimentos clásicos, pero llevan incorporados nuevos componentes alimentarios o no alimentarios, siempre que tengan un efecto claramente beneficioso.
- Complementan la función nutritiva y la prevención de ciertas enfermedades.

3.2 Composición del vino. ⁽⁷⁾

El vino es el jugo fermentado de uvas (variedades *Vitis vinífera*); fermentando el jugo junto con las pieles de las uvas a una temperatura comprendida entre 21-29°C. El vino blanco se consigue fermentando solo el jugo a temperatura entre

15-17 °C; esto se logra eliminando el hollejo por 12-36 h, o mezclando vinos tintos y blancos.

La complejidad molecular del vino está aún por revelarse. Tradicionalmente se habla del vino como un alimento complejo en cuya composición entran a formar parte más de mil compuestos distintos. Sin embargo, los primeros análisis metabolómicos indican la posibilidad de detectar más de 4000 moléculas distintas, entre las cuales se encuentran algunas cuyos niveles pueden correlacionarse positiva o negativamente con su calidad. Esta cantidad de compuestos puede ser aún mayor si se considera globalmente la gran diversidad de tipos de vinos existentes. Una gran parte de estas moléculas tienen su origen en precursores que se hallan en la uva y, por ello, la elaboración de un vino de calidad requiere una uva en óptimos estados sanitario y de maduración. Esta complejidad también depende del proceso de elaboración del vino aplicado a la uva o al mosto y de los sucesivos procesos fermentativos y de crianza de los vinos.

3.3 Estructura y desarrollo de la Uva. ⁽²⁴⁾

La vid silvestre (*Vitis vinífera L.*) es una liana común en los bosques de ribera y cuya área de distribución se extiende por todas las regiones templadas. Se estima que los primeros sucesos de domesticación se produjeron hace más de 8000 años. Podríamos decir que cada variedad de vid es un genotipo irrepetible que la viticultura ha mantenido a lo largo de los años mediante propagación vegetativa. La vid produce frutos de tipo baya organizados en racimos. De modo similar a otras bayas, el proceso de desarrollo y maduración de la uva ha adoptado una serie de mecanismos durante la evolución dirigidos a favorecer la dispersión de las semillas y asegurar la propagación de la especie. Con este objetivo, los frutos de la vid, inicialmente pequeños, poco atractivos, astringentes

y de sabor ácido, se convierten después de la maduración en una uva que marca la diversidad y complejidad final de los vinos. En este proceso participa un componente genético o varietal muy importante y componentes ambientales y de interacción genotipo–ambiente nada despreciable que contribuyen a la variación entre zonas geográficas.

En la estructura de la uva (ver figura N°1), se pueden distinguir dos partes claramente diferenciadas, las semillas y el pericarpo o conjunto de tejidos que las envuelve las semillas se desarrollan a partir de los óvulos tras su doble fecundación, mientras que el pericarpo es el resultado del crecimiento y diferenciación de la pared del ovario. En el pericarpo pueden distinguirse tres tipos de tejidos, organizados concéntricamente alrededor de las semillas, el endocarpo más interno y con una textura más gelatinosa, el mesocarpo intermedio y que ocupa el mayor volumen de la baya y el exocarpo más externo que contiene la epidermis recubierta por una cutícula cerosa y algunas capas celulares subepidérmicas. Comúnmente, el exocarpo se conoce como hollejo y el mesocarpo junto con el endocarpo forma lo que se denomina la pulpa de la baya.

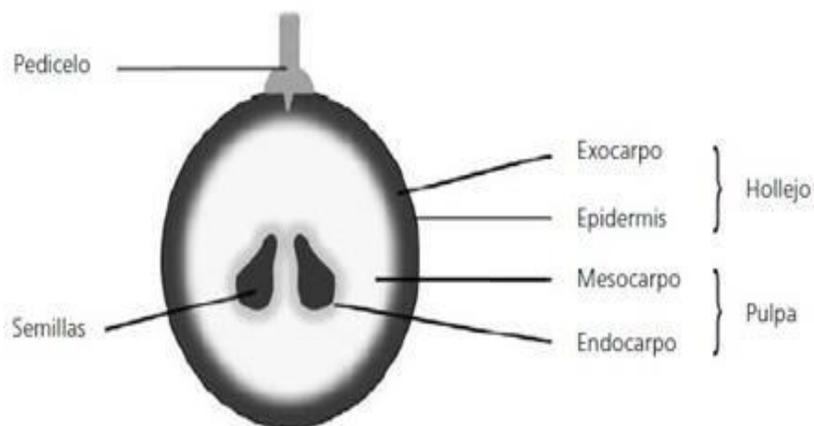


Figura N°1. Estructura de la Uva.

3.4 Composición química del vino. ⁽²⁴⁾

Los diferentes tejidos que forman el fruto contribuyen de manera diferencial a la composición final del mosto y del vino. La pulpa aporta el agua que constituye entre un 80-90 % del volumen del vino y componentes mayoritarios del metabolismo primario como son los azúcares glucosa y fructosa y los ácidos orgánicos. La sacarosa que es importada por las hojas es transformada en el fruto en las hexosas: glucosa y fructosa que se acumulan en las vacuolas de las células de la pulpa. Ambas serán transformadas en su mayor parte en etanol durante la fermentación generada por las levaduras, por lo que el contenido en azúcares de la uva determinará el grado alcohólico final del vino.

Los ácidos málico y tartárico constituyen más del 90% de los ácidos orgánicos del fruto y su concentración determina la acidez total de la uva. El ácido málico se acumula a niveles muy elevados en las uvas verdes y su contenido se reduce drásticamente durante la maduración. Por el contrario, los niveles de ácido tartárico permanecen bastante constantes después del cambio en la coloración de la uva estos suelen ser elevados en las uvas maduras. Una acidez moderada y un pH bajo son factores muy importantes en los vinos de calidad, dado que son necesarios para asegurar una buena crianza del vino y contribuyen de forma muy importante a su color y a su equilibrio gustativo.

Finalmente, es importante mencionar el proceso de ablandamiento de la pulpa que tiene lugar durante la maduración de la uva que se asocia con un incremento en la actividad de enzimas pectina metil esterases y que tiene una gran importancia en la elaboración del vino. El hollejo contribuye con un gran número de compuestos del metabolismo secundario que en su conjunto aportan al vino

características varietales. Entre ellos merece la pena mencionar los compuestos fenólicos solubles que contribuyen al color y al sabor del vino y los compuestos aromáticos que contribuyen al sabor y al aroma. Entre los compuestos fenólicos solubles se distinguen los compuestos flavonoides. Entre estos se encuentran las antocianinas, que son los pigmentos responsables del color de la uva y del vino tinto y rosado.

Todas las variedades con uvas coloreadas de la especie *Vitis vinífera*, con la excepción de unos pocos genotipos tintoreros, acumulan antocianinas en el hollejo pero no en la pulpa. Por ello, todos sus mostos son blancos y la elaboración de vinos tintos requiere la maceración de los mostos junto con los hollejos de las uvas tintas para extraer sus pigmentos.

Tabla N°1. Concentración en mg/L de algunos constituyentes polifenólicos del vino expresados como ácido gálico. (24)

Vino	Tinto	Blanco
Catequina	191	35
Epicatequina	82	21
Ácido Cafeico	7,1	2,8
Cianidina	2,8	0
Malvidina 3- glucosa	23,5	1,0
Rutina	9,1	0
Miricetina	8,5	0
Quercitina	7,7	0
Resvastrol	1,5	0,3

3.5 Vino en la salud. ⁽¹²⁾

El consumo habitual y moderado de vino, puede producir efectos beneficiosos adicionales sobre la morbilidad y mortalidad cardiovascular. El vino es rico en polifenoles, particularmente en Quercetinas y Resveratrol, los que son buenos candidatos para explicar el efecto protector del vino. Estudios epidemiológicos que relacionan la ingestión de polifenoles y el riesgo de cáncer y cardiopatía coronaria en humanos se inclinan por lo conveniente de esta práctica. Se ha planteado que la única propiedad cardioprotectora del vino tinto radica en la acción de sus flavonoides.

3.6 El Resveratrol. ⁽¹²⁾

El Resveratrol es un polifenol no flavonoide compuesto (ver figura N°2), encontrado en la piel de color oscura de las uvas y productos elaborados a partir de uvas, como el vino y el jugo de uva. Pertenece a la clase estilbeno de los compuestos fitoquímicos aromáticos y se presenta como una sustancia libre (configuraciones cis o trans), aglicona (menos soluble pero la forma activa) o como un glicósido. El Resveratrol es transferido a través de la frontera intestinal hacia el sistema circulatorio de la sangre como un Glicósido. El resveratrol también está implicado en los beneficios para la salud cardiovascular, tales como flujo sanguíneo, disminución de la inflamación y disminución del estrés oxidativo que se asocian con el consumo de productos de la uva.

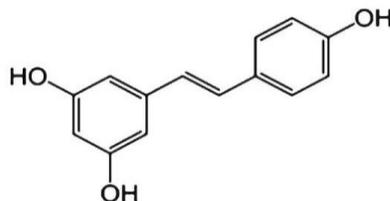


Figura N° 2. Estructura del Resveratrol.

3.7 Clasificación de los vinos. ⁽¹⁶⁾

El vino se clasifica en diferentes calidades que podrían ser: vino de mosto concentrado y vino de uva pasa y que a su vez podrán ser:

Vino blanco: Es el producto de la vinificación de los mostos de uvas blancas o de mostos blancos de uvas tintas.

Vino tinto: Es el producto de la vinificación de los mostos o de uvas tintas, con maceración más o menos prolongada de sus orujos, o de la vinificación de mostos de uvas cuyo jugo es tinto.

Vino rosado: Es el producto de la vinificación de los mostos de uvas rosadas o de uvas tintas con maceración parcial de sus orujos. Si se desea resaltar el que los vinos sean secos, semisecos o semidulces y dulces, para ese caso deberán de contemplar los siguientes parámetros:

Vino seco: El vino se considera seco, cuando su contenido sea menor de 10 g/L de materias reductoras expresadas en azúcar invertido.

Vino semiseco: El vino se considera semiseco o semidulce, cuando su contenido de materias reductoras expresadas en azúcar invertido sea mayor de 10 y menor de 30 g/L.

Vino dulce: El vino se considera dulce, cuando su contenido en materias reductoras expresada en azúcar invertido sea mayor de 30 g/L.

3.8 Caracterización de la uva Red Globe. ⁽¹⁵⁾

La variedad Red Globe presenta racimos de tamaño grande, bayas voluminosas que pueden asemejarse a una ciruela, es un fruto con semillas en su interior y de sabor dulce. Se mantiene en buenas condiciones en frío y es bastante resistente al transporte. No presenta problemas fitosanitarios.

Cuadro N°1. Ficha técnica de la Variedad de Uva “Red Globe”.

Ficha Técnica	
Nombre Científico	<i>Vitis Vinífera</i>
Familia	Vitácea
Variedad	Red Globe
Color de la Baya	Rojo Oscuro con ligero brillo
Forma de la Baya	Redonda
Calibre promedio	24-28 mm
Tamaño del racimo	Muy grande

3.9 Los probióticos. ⁽⁸⁾

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales.

Como microorganismos probióticos se utilizan, sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y el número de alimentos probióticos puestos a disposición de los consumidores es cada vez mayor. Para comprender la importancia del concepto de alimento probiótico para la salud humana son necesarias algunas consideraciones ecológicas acerca de la flora intestinal. Las bacterias viven normalmente en el cuerpo humano (así como en el de los animales superiores y los insectos), incluido el aparato digestivo, donde existen más de 400 especies bacterianas: más de la mitad del peso de la materia que se encuentra en el colon corresponde a células bacterianas cuyo número es diez veces superior al de las células de los tejidos que constituyen el cuerpo humano. El estómago contiene normalmente pocas bacterias (10^3 unidades formadoras de colonias por mL de jugo gástrico), mientras que la concentración bacteriana aumenta a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final en el colon de 10^{12} bacterias/g.

3.9.1 Los probióticos y vino. ⁽³⁾ ⁽⁸⁾

Los productos alimenticios con probióticos se consideran una parte del mercado de alimentos funcionales, un mercado que se está expandiendo a volúmenes de ventas 60-70% del mercado total de alimentos funcionales. Conforme a la FAO (Food and Drug Administration) / OMS (Organización Mundial de la Salud), los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, ejercen efectos beneficiosos sobre la salud del huésped. Estos efectos beneficiosos son principalmente asociados al mantenimiento de una microbiota intestinal sana y mejora de su resiliencia, así como la modulación de la intolerancia a la lactosa, función intestinal, prevención de la diarrea, alivio de los niveles de colesterol, la hipertensión, y la regulación del sistema respuesta, entre otros.

Los probióticos más utilizados pertenecen a los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pero otras bacterias del ácido láctico, tales como los géneros de *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* y ciertas cepas de levaduras también se utilizan como probióticos.

La mayoría de los probióticos comercializados y más estudiados han sido aislados de los productos lácteos y del tracto gastrointestinal. De hecho, las bacterias ácido lácticas ya se utilizan en muchos productos lácteos que son denominados alimentos con probióticos.

Estudios recientes han evaluado el potencial probiótico como lo es la resistencia a condiciones extremas del tracto gastrointestinal como: pH del estómago, enzimas digestivas, sales biliares, adhesión a la mucosa intestinal, persistencia prolongada y estable en el intestino además de propiedades antimicrobianas e inmunomoduladores.

Las bacterias ácido lácticas asociados con el proceso de vinificación pertenecen Los géneros de *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*, siendo *Oenococcus oeni* las principales especies responsables de la fermentación maloláctica del vino. Estas bacterias se adaptan para crecer en las condiciones hostiles impuestas durante la elaboración del vino bajo pH, alta concentración de etanol y pobre proporción de nutrientes, etc.

3.9.2 Los probióticos del género *Lactobacillus spp* y su injerencia en la salud gastrointestinal. (4)

Las bacterias del género *Lactobacillus spp* se utilizan como bacterias probióticas, término que se refiere a microorganismos no patógenos que, ingeridos en cantidad adecuada, proporcionan características de la microbiota normal del hospedero. Este microorganismo puede ayudar a prevenir o tratar diversas

enfermedades gastrointestinales, ya sea, impidiendo la ocupación de sitios específicos, produciendo sustancias antagónicas o modulando la respuesta inmune. Producen metabolitos conocidos como sustancias antagónicas, entre ellos, ácidos grasos de cadena corta (AGCCs) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Uno de los ácidos grasos de cadena corta es el ácido láctico, que disminuye el pH impidiendo el desarrollo de diversos microorganismos. Una novedad en lo que respecta a las aplicaciones probióticas es la actividad contra *Helicobacter pylori*, patógeno Gram positivo que causa gastritis de tipo B, úlceras pépticas y cáncer de estómago. Los datos disponibles *in vitro* y en animales indican que las bacterias del ácido láctico pueden inhibir el crecimiento del patógeno y reducir la actividad de la enzima ureasa necesaria para que el patógeno permanezca en el medio ácido del estómago.

3.9.3 *Lactobacillus casei*. (20)

Lactobacillus casei es una bacteria Gram positiva, anaeróbica y homofermentativa sin esporas; una cepa originalmente aislada de heces de un niño sano. Se ha utilizado por más de 10 años, por la industria lechera mostrando buenas propiedades de supervivencia en productos lácteos fermentados; así también se ha sido utilizado como un producto liofilizado en suplementos dietéticos. *Lactobacillus casei* ha mostrado influir de manera beneficiosa en la salud gastrointestinal, así como en el sistema inmunológico.

Adhesión y supervivencia a través del tracto gastrointestinal. (20)

En un estudio *in vitro* que investiga las propiedades de adhesión y supervivencia de *Lactobacillus spp*; *Lactobacillus casei* ha mostrado una moderada adhesión, y tolerancia a la bilis.

Efectos gastrointestinales. (20)

El equilibrio de la microbiota intestinal es de importancia significativa para la salud gastrointestinal. Estudios en ratones, la administración de *Lactobacillus casei* ya sea solo o junto con *L. acidophilus* ha demostrado ser eficaz contra infecciones por *S. sonnei*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *S. typhimurium*, este último con una tasa de supervivencia alta. La capacidad de *Lactobacillus casei* solo o en combinación con *L. acidophilus* tiene el potencial de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. sonnei*.

Respuesta inmune. (20)

Lactobacillus casei se ha visto involucrado en la producción de células secretoras de las inmunoglobulinas IgA, que son parte de la respuesta específica del sistema inmune, Estando asociada principalmente con la inmunidad mucosa intestinal, funcionando como un defensa contra bacterias, virus, toxinas y otros alérgenos alimentarios.

3.10 Procesos básicos de producción del vino. (11)

La vinificación comienza formalmente cuando las uvas, o el jugo llegan a la bodega. El primer paso consiste en retirar las hojas y otro material extraño de la uva. La fruta es entonces aplastada (o presionado) para liberar el jugo y comenzar el proceso de maceración. La maceración facilita la extracción de nutrientes, flavonoides y otros constituyentes de la pulpa, el hollejo y las semillas. Inicialmente, las enzimas liberadas de las células rotas promueven esta liberación. Las enzimas liberadas o activadas por muerte celular también pueden activar las síntesis de flavonoides e hidrolizan macromoléculas en formas

utilizables por levadura y bacterias. Para los vinos blancos, la maceración se mantiene al mínimo y rara vez dura más de unas pocas horas. Para los vinos tintos, la maceración es prolongada y se produce simultáneamente con la fermentación alcohólica.

El alcohol generado por la acción de las levaduras mejora la extracción de antocianinas y favorece la captación de taninos de las semillas y el hollejo. Los compuestos fenólicos solubilizados dan a los vinos sus propiedades básicas de apariencia, sabor y olor. También son necesarios para dar a los vinos tintos sus características de maduración. Además, aumenta la liberación de ingredientes aromáticos de la pulpa y el hollejo. Cuando la coloración de las uvas es baja, las uvas pueden ser trituradas y fermentadas con el hollejo hasta que se haya extraído el pigmento suficiente.

La fermentación alcohólica comienza a menudo sólo después de que el jugo se separa del hollejo. La fermentación puede comenzar espontáneamente, por la acción de las levaduras endémicas derivadas de la uva, sin embargo, es preciso inocular el jugo o el mosto con una levadura de características conocidas (Generalmente se usan levaduras del género *Sacharomyses cerevisae*). Las levaduras no sólo producen el alcohol sino también generan el cuerpo general del vino y los atributos aroma que tipifican los vinos.

Después de completar la fermentación alcohólica, el vino puede tratarse para fomentar una segunda fermentación: la maloláctica. La fermentación maloláctica es particular de regiones climáticas frías, donde una reducción en la acidez mejora las características gustativas del vino.

En el embotellado, los vinos generalmente se les administran Dióxido de Azufre para limitar la oxidación y el deterioro microbiano (Entre 0,8 y 1,5 mg/L de SO₂ molecular libre). Los vinos dulces suelen ser filtrados en forma estéril como protección adicional Contra el deterioro microbiano. Los vinos recién embotellados se envejecen normalmente en la bodega durante varios meses a años antes de la liberación.

3.11 Bacterias lácticas del vino. ⁽²⁾

Las bacterias lácticas son un grupo no taxonómico de bacterias que agrupa a todas aquellas bacterias capaces de producir ácido láctico a partir de azúcares. Dentro de este grupo hay especies capaces de desarrollarse en el vino a pesar de ser un medio inhóspito dado su contenido en alcohol y su bajo pH. A estas especies se las denomina bacterias lácticas del vino. A su vez algunas de estas especies son capaces, bajo determinadas condiciones, de transformar el ácido málico del vino en ácido láctico; el proceso se denomina fermentación maloláctica y las especies capaces de hacerlo se denominan bacterias de la fermentación maloláctica o bacterias malolácticas.

Muy abundantes en la naturaleza, las bacterias lácticas también llegan a la uva por el viento y los insectos y de ahí pasan al mosto durante el estrujado y prensado de las uvas. Sin embargo, lo más frecuente es que las bacterias lácticas presentes en mostos y vinos procedan de los utensilios y recipientes vinarios de las propias bodegas.

Su morfología cocoide o bacilar junto a sus características bioquímicas son los caracteres más utilizados en su clasificación. Entre las características bioquímicas utilizadas destaca la pureza fermentativa de los azúcares, lo que

permite agrupar estas bacterias en homofermentativas, aquellas que llevan a cabo una fermentación láctica pura generando exclusivamente ácido láctico y heterofermentativas, aquellas que a partir de azúcares producen, además de ácido láctico, gran cantidad de CO₂ y otros compuestos como etanol, ácido acético, succínico, manitol, etc.

3.12 Especies de levaduras de mayor relevancia enológica. (2)

Saccharomyces cerevisiae (S. ellipsoideus): es una de las más importantes en enología ya que es la responsable de la fermentación de la mayor parte de los azúcares del mosto. Su poder alcohológeno es elevado (17°C) y es bastante resistente al SO₂ (250 mg/L).

Saccharomyces bayanus (S. oviformis): semejante a la anterior resiste también 250 mg de SO₂/L, pero su poder alcohológeno es mayor pudiendo superar los 18°C. Es la levadura típica de las etapas finales de la fermentación y a menudo la responsable de refermentaciones de vinos embotellados.

Saccharomyces acidifaciens (S. baillii): con un poder alcohológeno de tan solo 10°C, su principal característica es su elevada resistencia al SO₂ (250 a 400 mg/L) lo que le permite iniciar la fermentación en mostos muy sulfitados, comportándose en estos casos como levadura de primera fase.

Torulasporea rosei (S. rosei): tiene un poder alcohológeno de 8 a 14°C y su principal característica es su capacidad para fermentar lentamente los azúcares con lo que los niveles de acidez volátil producidos son menores.

3.13 La fermentación alcohólica. (2)

Podemos definir la fermentación alcohólica como el proceso bioquímico por el cual las levaduras transforman los azúcares del mosto en etanol y dióxido de carbono. Para que la fermentación alcohólica tenga lugar, el mosto ha de hallarse en condiciones de limitación de oxígeno. En condiciones de aerobiosis las levaduras se multiplican abundantemente con un rendimiento en biomasa muy alto. En anaerobiosis las levaduras realizan la fermentación alcohólica; es decir degradan los azúcares de forma incompleta generando etanol, dióxido de carbono y energía.

3.13.1 Productos secundarios de la fermentación alcohólica. (2)

Durante la fermentación alcohólica; además de etanol y dióxido de carbono se produce cierta cantidad de otros compuestos, que en gran medida contribuyen al sabor y aroma final del vino. Los más significativos son los siguientes:

- a) **Glicerol:** Cuantitativamente es el segundo componente mayoritario del vino después del etanol. Se encuentra en cantidades de 6 a 10 g/L y a él se atribuyen los caracteres de suavidad y aterciopelado del vino. Se genera a partir de la fosfodihidroxiacetona por reducción y defosforilación de la misma.

- b) **Acetaldehido:** Aparece durante la fermentación alcohólica por descarboxilación del ácido pirúvico, aunque también puede proceder de la

oxidación del etanol. En exceso provoca en el vino la denominada maderización o gusto oxidado.

- c) **Ácido acético:** Componente mayoritario de la acidez volátil, se produce por la condensación de dos moléculas de acetaldehído, aunque puede tener otros orígenes no relacionados con la fermentación alcohólica. En exceso transmite al vino gusto a picado.

- d) **Ácido succínico:** Presente siempre en el vino, transmite a éste el típico sabor entre salado y amargo que caracteriza a las bebidas fermentadas. Procede de la carboxilación del ácido pirúvico y posteriores reacciones redox.

- e) **Ácido láctico:** Procede de la hidrogenación del pirúvico, aunque puede tener su origen en intervenciones bacterianas. La N- Acetoína, diacetilo y 2-3 butanodiol, son los metabolitos del ciclo diacetilo-acetoínico, estos siempre se encuentran presentes en el vino; en exceso transmiten sabores lácteos y amargos no deseables. Tienen su origen en la condensación y descarboxilación de dos moléculas de ácido pirúvico.

- f) **Otros compuestos:** estos compuestos tienen sus orígenes en los azúcares formando diversos ácidos cuantitativamente minoritarios como ácido cítrico, ácido propiónico, ácido fumárico y ácido fórmico. Con origen en las sustancias nitrogenadas se forman alcoholes superiores como el alcohol isoamílico y el alcohol isopropílico que proceden de la desaminación y descarboxilación de los aminoácidos.

3.13.2 Factores que influyen en la fermentación alcohólica. (2)

Existen diversos factores tanto físicos como químicos que inciden positiva o negativamente en el transcurso de la fermentación alcohólica; ya sea actuando sobre el desarrollo de las levaduras, ya sea incidiendo directamente sobre la propia fermentación alcohólica. Los más relevantes son los siguientes:

- a) **La temperatura:** a mayor temperatura la fermentación alcohólica transcurre más rápidamente, sin embargo, es menos pura. Se produce menos etanol y más cantidad de compuestos secundarios que a menudo no conllevan mejora de la calidad del vino. Por otro lado las levaduras tienen en los 30°C su temperatura óptima de desarrollo. Por encima de los 35°C la actividad decrece rápidamente y en torno al 45°C mueren. Por debajo de 10°C la mayor parte de las levaduras silvestres son inactivas.

- b) **El oxígeno:** aunque la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico las levaduras mantienen una leve respiración utilizando para ello el oxígeno combinado en las moléculas del mosto.

- c) **Los nutrientes:** por un lado, están los azúcares, que son fuente de carbono y de energía para las levaduras y que deben encontrarse en concentración superior a 20 g/L para que la fermentación alcohólica transcurra a su velocidad máxima. Por otro están las sustancias nitrogenadas, las sales y los factores de crecimiento (vitaminas) que normalmente se hallan en el mosto en concentración suficiente para el desarrollo de las levaduras.

3.14 La fermentación maloláctica. (2)

La fermentación maloláctica es una segunda fermentación que, a no ser que se impida, la sufren los vinos jóvenes cuando ha terminado o está a punto de terminar la fermentación alcohólica. Bioquímicamente es un proceso llevado a cabo por las bacterias lácticas que consiste en la transformación del ácido málico del vino en ácido láctico más dióxido de carbono, de ahí el nombre de maloláctica. Enológica va a tener importantes consecuencias para el vino ya que:

- Le brinda estabilidad, pues mientras haya ácido málico en un vino éste es inestable.
- Le proporcionará un afinamiento del gusto debido a que el ácido málico, más agresivo, da paso al ácido láctico que es más suave.
- Se va a producir una pérdida de acidez debida a que un diácido se convierte en un monoácido.

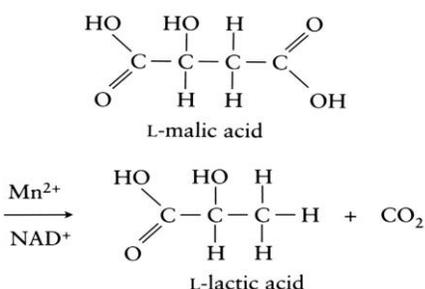


Figura 3. Transformación del ácido málico en ácido láctico.

Esta pérdida de acidez conlleva cambios importantes en las propiedades organolépticas del vino, tanto en el color como en el sabor y el aroma. Junto a estos cambios, considerados positivos y deseables en muchos vinos, se

producen otros menos deseables que conviene controlar, son el incremento de acidez volátil, que se debe básicamente a la transformación del ácido cítrico en ácido acético por las mismas bacterias lácticas y la aparición de aminas biógenas, debidas principalmente al desarrollo de pediococos.

3.14.1 Factores que influyen en la fermentación maloláctica. (2)

El hecho de que se dé o no fermentación maloláctica en un vino joven depende de una serie de factores que de forma resumida se detallan a continuación:

a) El ciclo bacteriano.

El ciclo bacteriano pasa por tres facetas. Una primera fase de multiplicación, que coincide con el inicio del encubado del mosto. En ella las bacterias se multiplican en paralelo con las levaduras. La producción de etanol y el consumo de nutrientes por parte de las levaduras paralizan el crecimiento de las bacterias que ven mermada su población desde aproximadamente 10^5 a 10^2 bacterias/mL.

Sigue una segunda fase denominada fase de latencia, en la que las bacterias se van adaptando al nuevo medio en espera de condiciones más favorables para su desarrollo. Esta fase puede durar desde unos días o unas semanas hasta varios meses.

Cuando las condiciones son idóneas tiene lugar la tercera fase, en realidad una segunda fase de multiplicación, en la que influyen notoriamente la temperatura y las levaduras que al finalizar la fermentación alcohólica mueren y cuando la población bacteriana alcanza valores de 10^6 bacterias/mL inician la fermentación

maloláctica que culmina en general con el agotamiento del ácido málico presente en el vino. Finalizada la fermentación maloláctica la población bacteriana vuelve a decrecer para situarse en valores residuales de 10^2 bacterias/mL.

b) El pH.

El pH influye en la fermentación maloláctica en dos sentidos. Por un lado, actuando sobre la multiplicación de las bacterias lácticas ya que éstas tienen su pH óptimo de desarrollo comprendido entre 4.2 y 4.5. Teniendo en cuenta que el pH de un vino puede oscilar entre 2.8 y 3.8, cuanto más bajo sea este mayor será la dificultad para el desarrollo de las bacterias. Por otro lado, el pH determina el tipo de sustrato que van a metabolizar las bacterias lácticas. En general a pHs más bajos utilizan ácido málico, aunque haya azúcares residuales en el vino y a pHs más altos suelen utilizar con preferencia los azúcares.

c) La temperatura.

La fermentación maloláctica presenta su actividad máxima entre 20°C y 25°C. A 15°C y a 30°C la fermentación maloláctica es lenta, pero mientras que por encima de 30°C puede llegar a pararse por completo, por debajo de 15°C puede continuar siempre que haya arrancado a temperaturas mayores.

d) La aireación.

La aireación es tal vez el factor menos importante ya que entre las bacterias lácticas hay microaerófilas y anaerobias facultativas, por lo tanto en general conviene cierta aireación para favorecer el proceso, pero nunca saturación con oxígeno ya que retardaría la fermentación maloláctica suele ser suficiente con el oxígeno captado durante se produce el vino.

e) Los nutrientes.

Las bacterias lácticas tienen mayor número de requerimientos nutricionales que las levaduras. De hecho, presentan múltiples auxotrofías tanto entre los aminoácidos y vitaminas, como entre las bases nitrogenadas, requieren además sales minerales que contengan manganeso, magnesio y potasio.

f) El grado alcohólico.

Las bacterias lácticas del vino son resistentes al etanol, de hecho, se desarrollan y sobreviven en el vino, sin embargo, a medida que aumenta el grado alcohólico se dificulta su crecimiento y con ello la fermentación maloláctica.

3.15 Empleo de sulfuroso en vinos. ⁽⁸⁾

Hay distintas formas en las que se comercializa el sulfuroso como aditivo alimentario en Europa. Estas formas se clasifican con la letra "E", de aditivo alimentario. El bisulfito de sodio se representa por (E 222). El uso de sulfitos de vino se adiciona con la función principal de antioxidante y bacteriostático.

La Unión Europea ha regulado el uso del sulfuroso como conservante de alimentos. En el vino, el Reglamento (CE) N° 1493/1999 del Consejo de 17 de mayo de 1999, y el Reglamento (CE) N° 1622/2000 de 24 de julio de 2000 estableció una concentración limitada total de sulfuroso de hasta 160 mg/L en los vinos tintos y 210 mg/L en los vinos blancos y rosados.

El nuevo reglamento de la UE para "vino ecológico" permite un máximo de hasta 100 mg/L en el vino tinto y 150 mg/L en blancos y rosados. En los vinos dulces se permite un extra de 30 mg/L, ya que es necesaria mayor cantidad de sulfuroso para evitar que el azúcar residual de lugar a la contaminación por microorganismos y, por tanto, a fermentaciones en botella.

3.16 Condiciones generales para la realización de test de análisis sensorial en vinos y otras bebidas vinícolas. ⁽¹⁷⁾

El Objeto de esta propuesta es presentar las condiciones generales para la realización de test de análisis sensorial. Aplicado a mostos, vinos y otras bebidas de origen vitivinícola. Esta propuesta no supone ningún tipo de obligación, sino que incluye una serie de aspectos que los estados miembros pueden utilizar con total libertad, de conformidad con sus necesidades y objetivos.

3.16.1 Sala de cata. ⁽¹⁷⁾

La sala de cata tiene que estar pensada para llevar a cabo análisis sensoriales en las condiciones conocidas y controladas tal como se describen en la norma ISO 8589: Se debe controlar el acceso y los suelos deben ser fáciles de limpiar. Las paredes, techo y cabinas de cata deben ser de colores claros y neutros. Debe haber aire acondicionado, regulación higrométrica e intercambiadores de aire en la sala. Las cabinas deben tener unas dimensiones estándar y estar equipadas con una lámpara de luz natural diurna, una escupidera/lavabo y un estante en la parte posterior, que facilite la distribución de los vinos que se deberán catar.

3.16.2 Preparación de muestras e instalaciones de almacenamiento.

Las salas deberán estar provistas de instalaciones con control de la temperatura para almacenar, conservar y atemperar los vinos antes del análisis sensorial (entre 12 y 20 °C, por ejemplo). La evaluación de la temperatura: es esencial que los productos idénticos se evalúen a la misma temperatura en la misma sesión. El organizador podrá escoger el rango de temperatura que crea apropiado para obtener los mejores resultados.

3.16.3 Copas de cata.

Las copas de cata deben ajustarse a los requisitos de la norma ISO 3591: Deben lavarse a mano o con una lava vasos que se utilice exclusivamente para este fin y con un detergente inodoro. Además, deben enjuagarse con agua pura (ultra filtrada y desionizada).

3.17 Metodología Petrifilm para bacterias ácido lácticas. ⁽¹⁴⁾

La placa Petrifilm Lactic Acid Bacteria Count, por sus siglas en inglés LAB; se trata de un sistema autónomo, preparado para muestras, que contiene nutrientes, agentes selectivos, un gelificante soluble en agua fría, y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias. La placa Petrifilm LAB contiene compuestos que eliminan el oxígeno, por lo que crean un ambiente anaerobio para la recuperación de compuestos lácticos homofermentativas y heterofermentativas, lo cual es aplicable en las industrias de alimentos y bebidas. La metodología Petri film es un sistema que ha sido certificado por la norma ISO 9001.

3.17.1 Características de la metodología Petrifilm para bacterias ácido lácticas:

Los resultados se hacen efectivos en un tiempo aproximado de 48 horas, posee un ambiente anaeróbico localizado, sin necesidad de un equipo especial ni generadores de gas, posee un sistema con la capacidad de diferenciar entre bacterias homo y hetero-fermentadoras, una amplia gama de temperaturas de incubación (28-37°C), gran compatibilidad con diluyentes estándar para la preparación de la muestra, una elevada eficiencia y facilidad de uso y además no requiere ajustar el pH de la muestra.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

3.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio.

4.1.1 Transversal: Se realizó, en el periodo comprendido entre los meses de junio a septiembre; evaluando parámetros fisicoquímicos, para la verificación de la calidad del vino, y microbiológicos para la evaluación de la supervivencia de *Lactobacillus casei* en el vino, como producto terminado.

4.1.2 Experimental: Los análisis fisicoquímicos se efectuaron en el laboratorio de análisis bromatológico del Departamento de Análisis Químico e Instrumental y los microbiológicos en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

4.1.3 Investigación Bibliográfica: se consultaron diferentes fuentes como: Artículos, revistas, libros, trabajos de graduación. Las consultas se realizaron en las bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia.

Central de la Universidad de El Salvador.

De la Facultad de Ingeniería Agronómica, de la Universidad de

El Salvador.

- Internet.

4.1.4 Investigación de campo:

Universo: Todas las variedades de uvas.

Muestra: Vino producido con uvas Red Globe seleccionadas.

4.2 Parte experimental.

Se elaboraron dos lotes de vino de 5 litro cada uno, el lote 1 se identificó como (L1), y el lote 2 se identificó como (L2). Al vino como producto terminado, se le inoculo el probiótico en las concentraciones de 10^4 UFC/mL y de 10^6 UFC/mL por litro de vino para cada lote, los que fueron codificados, como: $x10^4L1$, $x10^4L2$, $x10^6L1$, $x10^6L2$ (las pruebas se realizaron por duplicado).

El análisis microbiológico, se realizó aplicando la metodológica Petrifilm para verificar el recuento de las bacterias ácido lácticas. Los análisis fisicoquímicos (pH, acidez titulable, grados brix, grado alcohólico y anhidro sulfuroso total) de acuerdo con las especificaciones de la Norma Mexicana NMX-V-012-1986 ⁽¹⁶⁾.

4.2.1 Procedimiento de elaboración de vino por lote de 5.0 litros ⁽¹¹⁾ (ver anexo N° 1).

Materiales, equipo y cristalería empleada (ver anexo N°2).

- Realizar limpieza y sanitización del área de trabajo.
- Lavar la uva y quitar la parte del tallo del racimo.
- Pesar 10.0 kg de uva Red Globe en balanza.
- Proceder a triturar la uva liberando la pulpa y parte del mosto.
- Colocar la uva triturada en un contenedor de plástico de boca ancha.
- Verter 2.5 litros de agua a temperatura ambiente.
- Añadir la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a una proporción de 1.5g/L. Este se activa adicionando agua a 42°C, en un volumen 10 veces su peso, durante 15 minutos.
- Añadir 0.75 kilogramos de azúcar al contenedor en 1.25 litros de agua.
- Proceder a cerrar el contendor plástico y colocar trampa para la liberación del Dióxido de Carbono.

- Transcurrido 4 días se agregará la segunda parte del azúcar (0.75 Kilogramos en 1.25 litros de agua) y mezclar.
- Cerrar herméticamente el contenedor plástico y dejar en un lugar fresco y oscuro.
- Dejar 21 días más para que la fermentación se complete.
- Decantación: extraer por medio de mangueras succionando el líquido sobrenadante, y trasladar a otro recipiente plástico.
- Verificar que el vino se encuentra limpio y libre de cualquier partícula extraña.
- Efectuar la sulfatación con Bisulfito de Sodio a una concentración de 50 mg/L y mezclar hasta completa incorporación.
- Al producto obtenido realizar las determinaciones fisicoquímicas necesarias para conocer los siguientes parámetros (pH, grado Brix, acidez total, grado alcohólico y anhidro sulfuroso total).
- Envasar el vino en botellas previamente esterilizadas al calor, de capacidad de 745 mL.
- Almacenar en una temperatura ideal comprendida entre 21-29°C.

4.3 Reconfirmación de bacterias acidolácticas por gramo de cepa liofilizada. ⁽¹⁴⁾

Se realizó la reconfirmación de bacterias ácido lácticas por gramo de producto liofilizado, esto para verificar la potencia que indica el proveedor en el certificado (ver anexo N°3), y al mismo tiempo verificar la sensibilidad de la metodología por placas Petrifilm.

Procedimiento (Ver anexo N°4):

- Pesar un gramo de bacterias ácido lácticas liofilizadas.
- Medir 9.0 mL de solución salina y colocarlos en un tubo de ensayo de 10 mL.
- Agregar el gramo de liofilizado pesado, a los 9.0 mL de solución salina contenidos en el tubo de ensayo.
- Realizar diluciones sucesivas hasta una concentración de 10^{-10} UFC/ mL, seleccionar la dilución de 10^{-8} UFC/ mL.
- Colocar la placa Petrifilm sobre una superficie plana y levantar cuidadosamente la parte superior de la placa.
- Con una pipeta volumétrica, tomar 1.0 mL de la concentración seleccionada y colocar en el centro de la parte inferior de la placa, realizar por duplicado.
- Dejar caer lentamente la parte superior de la placa, evitando que esta forme burbujas.
- Distribuir homogéneamente la muestra de vino inoculada con ayuda de un dispersor, presionando suavemente sobre la parte superior de la placa Petrifilm.
- Incubar las placas dentro de una estufa a 37 °C cara arriba durante 48 horas.
- Contar la cantidad de bacterias ácido lácticas presente en esa placa. Las colonias de las bacterias ácido lácticas, homofermentativas se presentan como colonias teñidas de rojo sin gas. Contar el número de colonias presente en la placa y multiplicar por el factor de dilución, para estimar el recuento por placa.

4.3.1 Inoculación del probiótico *Lactobacillus casei* al producto obtenido.

Se procedió a inocular los dos lotes de vino obtenidos con *Lactobacillus casei* a las concentraciones de 10^4 UFC/mL y 10^6 UFC/mL, por litro de vino y por duplicado. Las cantidades inoculadas en cada concentración se calculó a partir de la potencia reconfirmada (Ver anexo N°5). La inoculación del probiótico se realizó en condiciones controladas y asépticas.

4.3.2 Inoculación de *Lactobacillus casei* al producto obtenido a una concentración de 10^4 UFC/mL, por litro de vino (Lote L1).

Procedimiento (Ver anexo N°6):

- Pesar una cantidad equivalente a 11.76 mg de la cepa de *Lactobacillus casei* liofilizada en balanza analítica.
- Medir un volumen de 1,000 mL de vino con probeta.
- Transferir a un contenedor de vidrio de capacidad de 1,000 mL. Disolver 11.76 mg de cepa de *Lactobacillus casei* (En cabina de flujo laminar).
- Agitar hasta completa incorporación.
- Rotular el recipiente como concentración 10^4 UFC/mL

Nota: La inoculación se efectuó por duplicado, referido a cada lote de concentración.

4.3.3 Inoculación de *Lactobacillus casei* al producto terminado a una concentración de 10^6 UFC/mL, por litro de vino (L2).

Procedimiento (Ver anexo N°6):

- Pesar una cantidad equivalente a 1,176 mg de la cepa de *Lactobacillus casei* liofilizada en balanza analítica.
- Medir un volumen de 1,000 mL de vino con probeta.
- Transferir a un contenedor de vidrio de capacidad de 1,000 mL. Disolver 1,176 mg de cepa de *Lactobacillus casei* (En cabina de flujo laminar).
- Agitar hasta completa disolución.
- Rotular el recipiente como concentración 10^6 UFC/mL

Nota: La inoculación se efectuó por duplicado, referido a cada lote de concentración.

4.4 Determinaciones fisicoquímicas (ver anexo N°7).

Preparación de reactivos ver anexo N°8

4.4.1 Determinación de pH según AOAC (1984) 11.041. ⁽⁶⁾

Fundamento: La concentración de iones hidrógeno se expresa como pH, este se mide utilizando un potenciómetro que se calibra con soluciones tampón y los

valores de pH de la muestra se determinan introduciendo directamente el electrodo en la muestra sin diluir a temperatura ambiente.

Determinación de pH. ⁽⁶⁾

Proceso:

Encender el potenciómetro. Calibrar el potenciómetro con las soluciones tampón siguiendo las instrucciones del fabricante. Lavar el electrodo con agua destilada y se secar el exceso de agua con papel absorbente. Colocar la muestra mezclada contenida en un vaso de precipitados. Colocar el electrodo sin que toque las paredes del vaso. Esperar a que se establezca la lectura del medidor y anotar el resultado.

Nota: El análisis se efectuó por duplicado, el rango de especificación es de 3.2-3.9 de acuerdo con lo establecido por la Norma Mexicana NMX-V-012-1986. ⁽¹⁶⁾

4.4.2 Determinación de acidez total titulable Según AOAC (1984) 11.042. ⁽⁶⁾

Fundamento: Una alícuota de la solución que contiene el ácido se titula con una solución estándar de álcali hasta el punto en el cual una cantidad equivalente de la base ha sido añadida.

Proceso:

Retirar el dióxido de carbono, si está presente, de la siguiente forma: Colocar alrededor de 25 mL de muestra (vino), en Erlenmeyer pequeño, calentar hasta ebullición y mantener 30 segundos, remover y se dejar enfriar.

Añadir 1 mL de indicador de Fenolftaleína a 200 mL de agua caliente en Erlenmeyer de 500 mL de boca ancha; se forma un color rosa. Añadir 5.0 mL de muestra desgasificada (vino), titular con NaOH 0.1 N (Hidróxido de sodio estandarizado) hasta el punto final usando un fondo blanco bien iluminado.

Cálculos (Expresados como gramos de ácido tartárico) ⁽⁶⁾

$$\text{Gramos de ácido Tartárico/100 mL de vino} = \frac{\text{mL NaOH. N .0,075}}{5}$$

Nota: El procedimiento se efectuó por duplicado. Rango de especificación acidez total titulable entre: 4.5 -10 de acuerdo a lo establecido por la Norma Mexicana NMX-V-012-1986. ⁽¹⁶⁾.

4.4.3 Determinación de grados Brix. ⁽²¹⁾

Proceso:

Limpiar el lente del brixómetro con una torunda de algodón impregnada de alcohol. Verificar si está calibrado colocando una gota de agua destilada sobre el lente del brixómetro, realizar la lectura observando en dirección a la luz. Con la ayuda de una micropipeta colocar 1 gota de muestra en el lente del brixómetro y realizar la lectura observando en dirección a la luz. Anotar el valor leído en el campo del lente del brixómetro.

4.4.4 Determinación de grado alcohólico, según AOAC 11.006. ⁽⁶⁾

Proceso:

Medir 50.0 mL de vino y colocar en un balón de destilación de 250 mL. Agregar 25 mL de agua destilada. Instalar el aparato de destilación colocando el

condensador verticalmente. Destilar alrededor de 25 mL. Con el destilado obtenido, proceder a determinar el grado alcohólico por densidad específica.

Fórmula:
$$w = \frac{m_g - m_o}{m_1 - m_o}$$

Donde:

W= grado alcohólico.

m_g= masa del picnómetro + líquido a analizar.

m_o= Picnómetro vacío.

m₁=masa del picnómetro + agua.

Encontrar el porcentaje de alcohol de acuerdo a las tablas Apéndice C de la AOAC correspondientes a la gravedad específica (6).

Nota: Rango de especificación es de 8.5 -14, acuerdo a lo establecido por la Norma Mexicana NMX-V-012-1986. (15)

4.4.5 Determinación de anhídrido sulfuroso total. (20)

Método Ripper

Procedimiento:

Tomar 10 mL de vino y colocar en un erlenmeyer de 250 mL, adicionar 10 mL de hidróxido de sodio 1N. Tapar y dejar 15 minutos en reposo. Luego acidificar con

5 mL de ácido sulfúrico al 33% y añadir 1 mL de almidón. Se titula con solución de yodo 0.05 N hasta viraje del almidón.

Cálculos: $\text{mg/L de SO}_2 \text{ Total} = \text{V Gastado de titulante} \times 64$.

***Nota 64=** Peso molecular del anhídrido sulfuroso.

4.5 Recuento de Bacterias Acidolácticas. (14)

Procedimiento (Ver anexo N°9):

- Medir 1.0 mL de vino en condiciones asépticas.
- Transferir a un tubo de ensayo de vidrio de 10 mL previamente lavado y esterilizado.
- Adicionar 9 mL de solución salina estéril y mezclar hasta completa incorporación.
- Una vez realizada la primera dilución 10^{-1} , efectuar diluciones seriadas sucesivas hasta 10^{-3} .
- Colocar la placa Petrifilm sobre una superficie plana y levantar cuidadosamente la parte superior de la placa Petrifilm de ensayo.
- Con una pipeta volumétrica, tomar 1.0 mL del tubo de ensayo de concentración 10^{-3} y colocar en el centro de la parte inferior de la placa Petrifilm.
- Dejar caer suavemente la parte superior de la placa, evitando que esta forme burbujas.
- Distribuir homogéneamente la muestra de vino inoculada con ayuda de un dispersor, presionando suavemente sobre la parte superior de la placa Petrifilm.

- Incubar las placas dentro de una estufa a 37 °C, cara arriba durante 48 horas.
- Contar la cantidad de bacterias ácido lácticas presente en placa. Las colonias de las bacterias ácido lácticas homofermentativas se presentan como colonias teñidas de rojo sin gas. Contar el número de colonias presentes en la placa y multiplicar por el factor de dilución, para estimar el recuento por placa.
- Para que el vino sea considerado como un alimento probiótico este debe de tener una cantidad mínima de 1×10^6 UFC/mL. ⁽¹⁴⁾

Nota: El procedimiento se efectuó por duplicado, para cada lote inoculado a diferentes concentraciones (Lotes: X10⁴L1, X10⁴L2, X10⁶L1, X10⁶L2).

4.6 Recuento de *Lactobacillus casei* en concentración de 10⁴ UFC/mL, utilizando la metodología tradicional Agar MRS.

Preparación de Agar MRS (Ver anexo N°10).

- Medir 10.0 mL de solución salina en un tubo de ensayo de 10 mL.
- Medir 1.0 de la muestra de vino.
- Realizar diluciones sucesivas hasta una concentración de 10^{-3} .
- Medir 1.0 del tubo rotulado como concentración de 10^{-3} y sembrar en placa vertida, adicionando el medio Agar Man Rougosa Sharper a una temperatura de 45°C, utilizando como indicador Azul de anilina.
- Incubar las placas dentro de una estufa a 37 °C cara arriba durante 48 horas, en condiciones de anaerobiosis.
- Contar la cantidad de bacterias ácido lácticas presente en esa placa. Las colonias de las bacterias ácido lácticas se presentan teñidas de color azul,

4.7 Análisis Estadístico. (23)

A cada uno de los resultados obtenidos de los parámetros acidez total y pH, se les realizó el análisis de varianza multifactorial (ANOVA), basándose en la comparación de los factores de varianza en las muestras de los lotes de vino inoculados en estudio. Se estableció como hipótesis nula la igualdad de las medias en los resultados obtenidos en los dos lotes, y como hipótesis alterna que existe una diferencia significativa entre las medias. La hipótesis nula se rechaza al tener un valor de P menor de 0.05, y no se rechaza con un valor P mayor a 0.05, para un nivel de confianza de 95%. Los datos obtenidos en los análisis se tabularon en Microsoft Excel. Cabe mencionar que los parámetros de recuento de bacterias ácido lácticas, no se les realizó análisis estadístico; debido a que no fue posible aislar bacterias ácido lácticas en el recuento.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Elaboración del vino (Ver anexo N°11).

Se obtuvo 2 lotes de vino de 5 litros cada con tonalidad rosa clara, característico de un vino joven, con olor a fruta (uva), de sabor y aroma agradable. El vino obtenido se dividió por litro en cada uno de los lotes codificados (Lotes: X10⁴L1, X10⁴L2, X10⁶L1, X10⁶L2).

La elaboración de vino se efectuó en un tiempo aproximado de 25 días. Se llevó a cabo en el laboratorio de análisis bromatológico, a un rango de temperatura entre 22 +/- 2 °C y humedad relativa 45 +/-5%.

La relación agua/uva para la producción del vino fue de 1:1, es decir 5 litros de agua por 5 kilogramos de uva. Se colocó en total 5 litros de agua, junto con 5 kilogramos de uva para cada lote de vino, adicionalmente para completar el proceso, se agregó 2.5 kg de azúcar y levadura en una concentración de 1.5 g/L. Los recipientes para la producción de vino se dividieron en 5 Litros por cada recipiente.

5.2 Determinación de pH.

La determinación de pH se efectuó en el laboratorio de análisis Bromatológico de la Universidad de El Salvador, con la ayuda del potenciómetro METHORHM (632 pH Meter). La determinación de pH, se efectuó tanto para el vino inoculado con la bacteria probiótica *Lactobacillus casei* y sin inocular con este probiótico. En la tabla N°3, se presentan los valores de pH obtenidos:

Tabla N°2. Resultados de pH.

Lote	X10 ⁴ L1	X10 ⁴ L2	X10 ⁶ L1	X10 ⁶ L2
Valor de pH vino sin inocular				
Valor	3.89	3.88	3.87	3.88
Valor de pH vino inoculado				
Semana 1	3.76	3.74	3.58	3.50
Semana 2	3.73	3.72	3.53	3.49
Semana 3	3.72	3.70	3.53	3.48
Semana 4	3.71	3.70	3.51	3.47

Representación gráfica del resultado obtenido de pH:

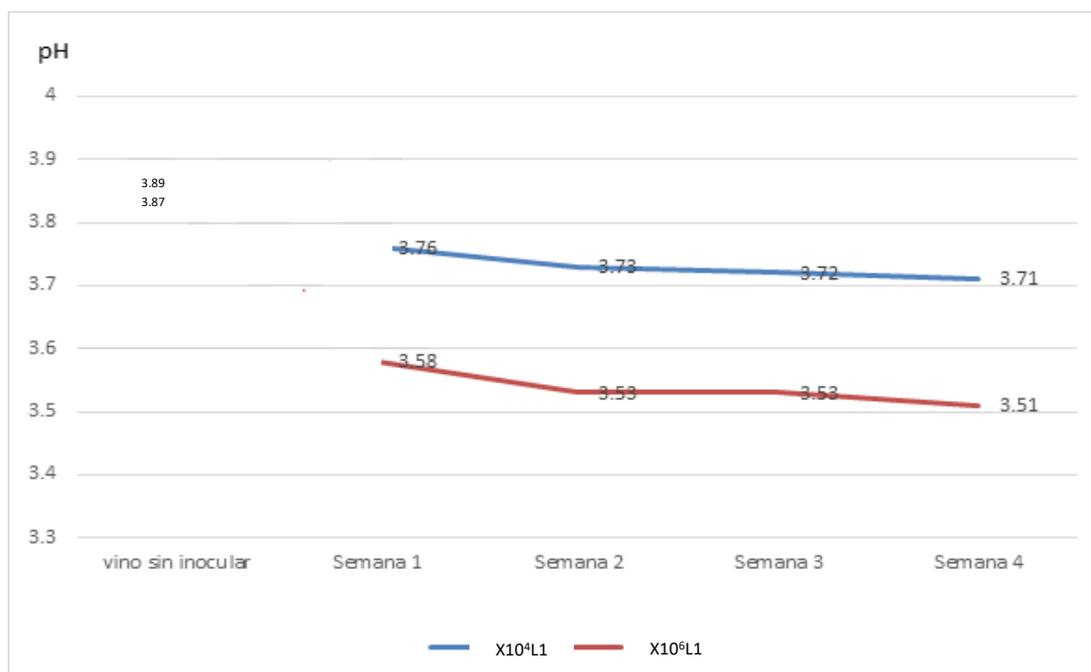


Figura N°4. Gráfico de resultados obtenidos de pH (Lote 1 [X10⁴] y Lote 1 [X10⁶])

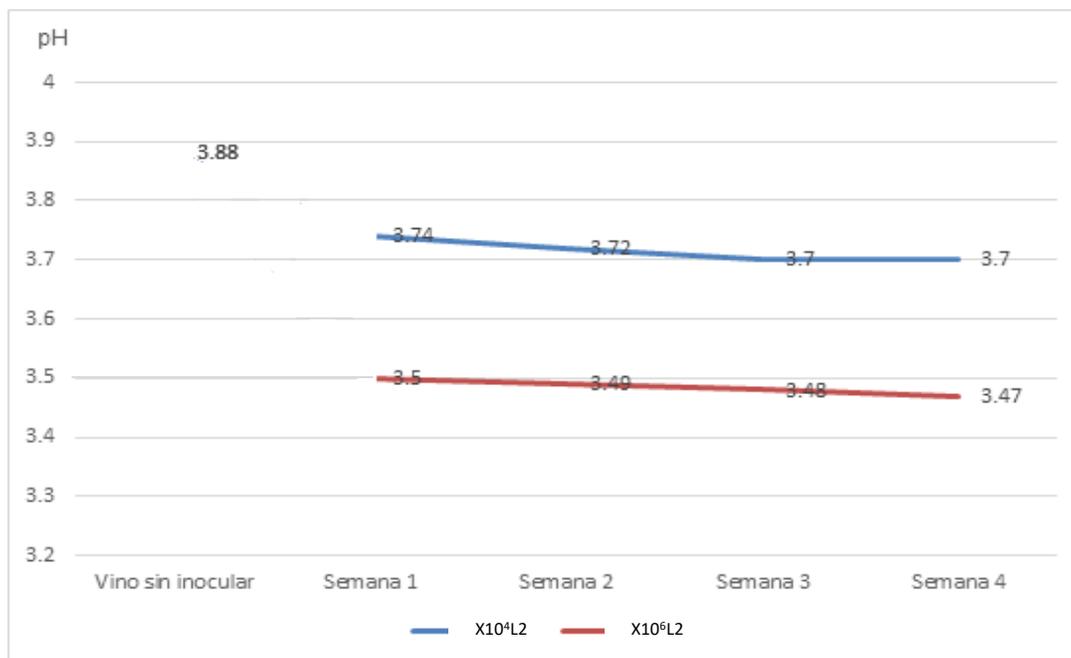


Figura N°5. Gráfico de resultados obtenidos de pH (Lote 2 [X10⁴] y Lote 2 [X10⁶])

En la figura N°4 y N°5, se puede observar los valores de pH, representado la concentración de: X10⁴L1 y X10⁶L1 y se representan los valores obtenidos de las concentraciones de: X10⁴L2 y X10⁶L2. En ambos casos ocurre que: a mayor concentración, el descenso de pH es mayor. El valor de pH pasado el tiempo de inoculación, sufre una tendencia a la baja con respecto al valor de pH inicial, en cada uno de los lotes.

La pérdida de la acidez fue mediada por *Lactobacillus casei*, aumentando la acidez volátil; lo cual se debe básicamente a la transformación del ácido cítrico en ácido acético por las bacterias ácido lácticas. (2)

Esta reducción del pH, se debe a que el ácido acético (4.76) es un ácido con un pka menor que el del ácido cítrico (6.40). (22)

Se aplicó el análisis estadístico para poder comprobar la existencia o no de diferencia significativa entre cada uno de los lotes una vez inoculados aplicando ANOVA, en donde se plantean las siguientes hipótesis.

Hipótesis nula: la igualdad de las medias en los resultados de los valores de pH obtenidos en los dos lotes en estudio, no presentan diferencia significativa.

Hipótesis alterna: las medias en los resultados de los valores de pH obtenidos en los dos lotes en estudio presentan diferencia significativa.

Nivel de confianza: 95%

Alfa: 0.05 (5%).

Tabla N°3. Resultados de pH aplicando ANOVA:

Orígenes de las variaciones	Suma de los cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor critico
Entre grupos	0.150695	3	0.05023167	3.07697805	0.05753008	3.23887152
Dentro de los grupos	0.2612	16	0.016325			
Total	0.411895	19				

El valor de P es mayor a 0.05, por lo que se acepta la hipótesis nula, aceptando entonces que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos de los valores de pH en el experimento.

5.3 Determinación de Acidez titulable.

La acidez titulable, se efectuó empleando una valoración ácido base. En la tabla N°4, se presentan los valores obtenidos de acidez titulable, de vino sin inocular e inocularado.

Tabla N°4. Resultados obtenidos de acidez titulable.

Lote	X10 ⁴ L1	X10 ⁴ L2	X10 ⁶ L1	X10 ⁶ L2
Valor de acidez titulable de vino sin inocular				
Valor de acidez	4.77 g/L	4.64 g/L	4.75 g/L	4.77 g/L
Valor de acidez titulable de vino inocularado				
Semana 1	5.31 g/L	5.31 g/L	5.86 g/L	5.86 g/L
Semana 2	5.31 g/L	5.31 g/L	5.86 g/L	5.86 g/L
Semana 3	5.31 g/L	5.31 g/L	5.86 g/L	5.86 g/L
Semana 4	5.31 g/L	5.34 g/L	5.86 g/L	5.99 g/L

Volúmenes gastados de titulante ver anexo N°12.

Representación gráfica de los resultados obtenidos de acidez titulable:

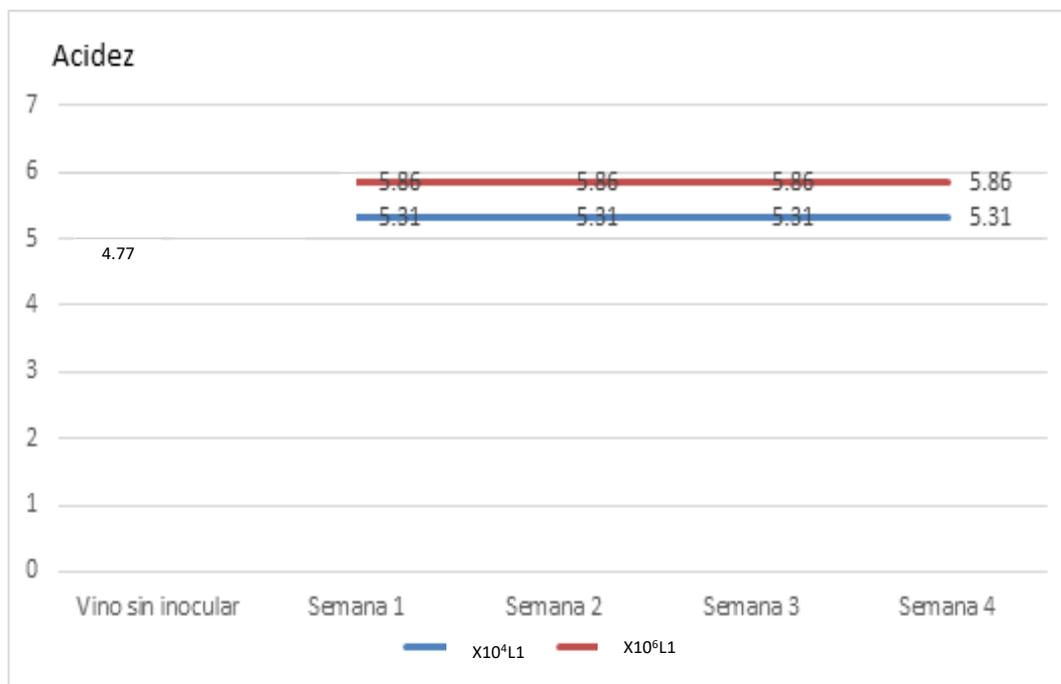


Figura N°6. Gráfico de resultados obtenidos de Acidez titulable (Lotes 1[X10⁴L1] y [X10⁶L1])

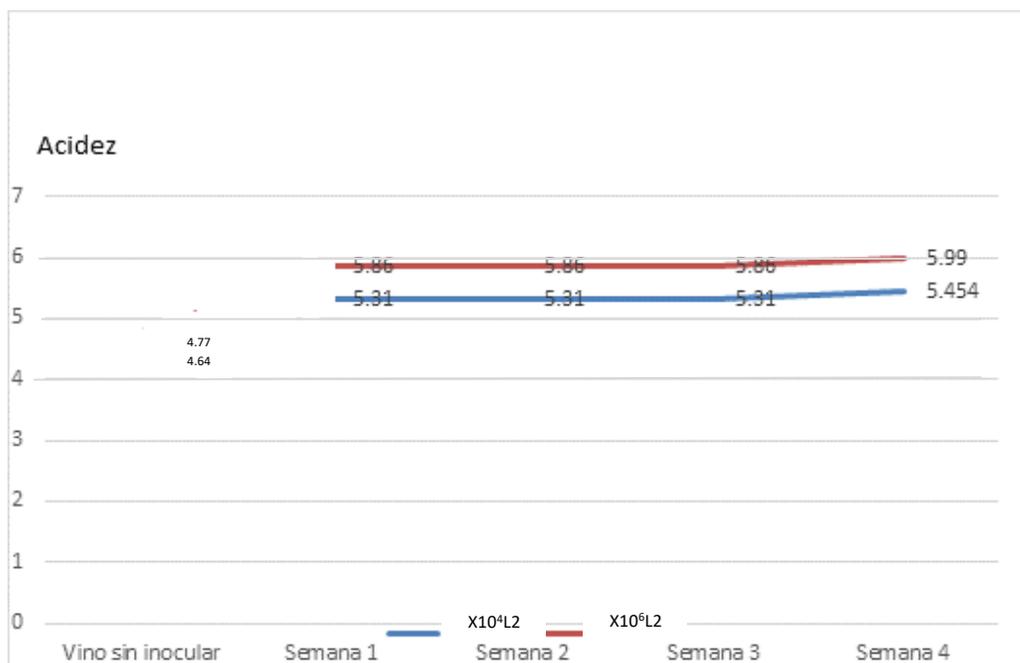


Figura N°7. Gráfico de resultados obtenidos de Acidez titulable (Lotes 2 [X10⁴L2] y [X10⁶L2])

En la figura N°6, se puede observar los valores de acidez titulable, representado la concentración de: $[X10^4L1]$ y $[X10^6L1]$; en la figura N°7, se representan los valores obtenidos de las concentraciones de: $[X10^4L2]$ y $[X10^6L2]$. Se puede observar que en ambos casos existe una tendencia hacia el alza del valor de acidez titulable.

El aumento de la acidez titulable podría deberse a la intervención de *Lactobacillus casei*, durante un corto periodo inferior a las 48 horas. En el cual presuntivamente pudo haber participado en la transformación de ácido málico a ácido láctico, lo cual genera un aumento de la acidez volátil. (2)

Se aplicó el análisis estadístico ANOVA para poder comprobar la existencia o no de diferencia significativa entre cada uno de los lotes una vez inoculados, planteando las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula: la igualdad de las medias en los valores de los resultados obtenidos de acidez titulable, en los dos lotes en estudio, no presentan diferencia significativa.

Hipótesis alterna: las medias en los valores de los resultados obtenidos de acidez titulable en los dos lotes en estudio presentan diferencia significativa.

Nivel de confianza: 95%.

Alfa: 0.05 (5%)

Tabla N°5. Resultados obtenidos de acidez titulable aplicando ANOVA.

Orígenes de las variaciones	Suma de los cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor critico
Entre grupos	1.065855	3	0.355285	2.18006382	0.13018852	3.23887152
Dentro de los grupos	2.60752	16	0.16297			
Total	3.673375	19				

El valor de P mayor a 0.05, por lo que se acepta la hipótesis nula, aceptando entonces que no existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos de los valores de acidez titulable obtenidos de los lotes en estudio.

Para la interpretación de datos se utilizó la fórmula:

$$\text{Gramos de ácido Tartárico/100 mL de vino} = \frac{\text{mL NaOH. N.0,075}}{5}$$

Ejemplo:

$$\text{Gramos de ácido Tartárico/100 mL de vino} = \frac{3.5 \text{ mL} \times 0.909\text{N} \times 0.075}{5} \times 100 *$$

Gramos de ácido Tartárico/L de vino=4.77 g/L

***100 es factor de conversión para expresar el resultado en g/L.**

Análisis del aumento de la acidez titulable:

5.4 Determinación de grados brix.

La determinación de grados brix, se efectuó en el laboratorio de análisis Bromatológico de La facultad de Química y Farmacia de La Universidad de El Salvador, utilizando el Brixómetro VEGGE ELM-46/07. En la tabla N°6, se detallan los resultados:

Tabla N°6. Resultados obtenidos de grados brix.

Grados brix				
Lotes de vino fabricados				
Lote	X10⁴L1	X10⁴L2	X10⁶L1	X10⁶L2
Vino sin inocular				
Valor	10.0	10.0	10.0	10.0
Vino inoculado				
Semana1	9.0	8.5	8.0	7.5
Semana 2	9.0	8.5	8.0	7.5
Semana 3	9.0	8.5	8.0	7.5
Semana 4	9.0	8.5	8.0	7.5

Representación gráfica de los resultados obtenidos de grados brix.

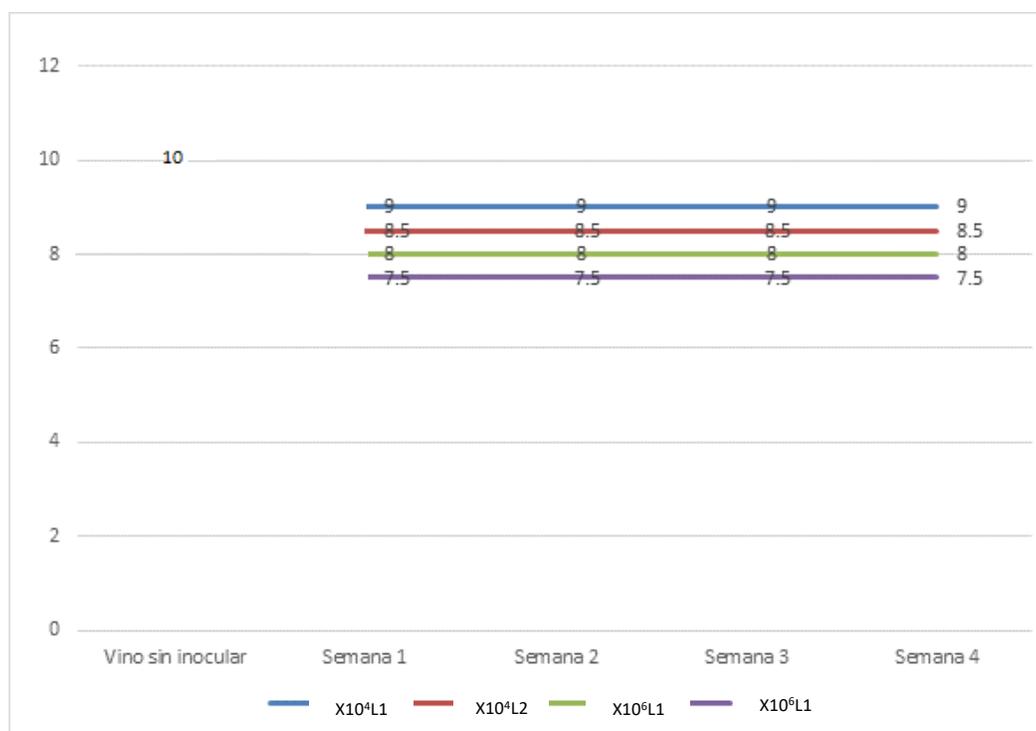


Figura N°8. Gráfico de resultados obtenidos de grados brix

En la figura N°8, se nota que al inocular el *Lactobacillus casei*, el valor de grados brix sufre una tendencia a la baja. Pero después de 48 horas hasta la semana 4, este valor se mantiene constante respectivamente en cada lote de concentración.

Este parámetro fisicoquímico, sufrió leves cambios con la inoculación de *Lactobacillus casei*, ya que, durante su corto periodo de supervivencia, la bacteria probiótica pudo haber metabolizado algunos azúcares disueltos presentes en la matriz.

5.5 Determinación de grado alcohólico.

La determinación de grado alcohólico se efectuó en el laboratorio de análisis Bromatológico de La Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El

Salvador, utilizando un destilador fraccionado y posteriormente obteniendo valores de peso específico, consultados en el apéndice C de la AOAC.

A continuación, en la tabla N°7, se detallan los valores de grado alcohólico obtenidos.

Tabla N°7. Resultados obtenidos de grado alcohólico:

Grado alcohólico				
Lotes de vino fabricados				
Lote	X10⁴L1	X10⁴L2	X10⁶L1	X10⁶L2
Vino sin inocular				
Valor	14.00°	14.05°	14.00°	14.05°
Vino inoculado				
Semana 1	14.05°	14.04°	14.05°	14.05°
Semana 2	14.05°	14.00°	14.04°	14.00°
Semana 3	14.04°	14.05°	14.00°	14.00°
Semana 4	14.05°	14.05°	14.05°	14.05°

En base a los resultados en la tabla de resultados N°7, se observa que el grado alcohólico, no se ve afectado con la inoculación del probiótico *Lactobacillus casei*; se logra mantener estable en el grado alcohólico aproximado de 14.0°, hasta la semana cuatro.

Aplicando la fórmula: $w = \frac{m_g - m_o}{m_1 - m_o}$

W= grado alcohólico.

m_g= masa del picnómetro + líquido a analizar.

m_o= Picnómetro vacío

m₁=masa del picnómetro + agua

Ejemplo de aplicación de la fórmula

$$w = \frac{52.9311g - 29.1045g}{53.3778g - 29.1045g}$$

$$w = \frac{23.8266g}{24.2733g}$$

$$w = 0.9816 = 14.00^{\circ*}$$

***Este valor de gravedad especifica se consultó en las tablas del apéndice "C" de la AOAC.**

Análisis de causa de los valores del grado alcohólico:

El grado alcohólico es un parámetro que no se puede controlar, ya que está íntimamente relacionado con cada genotipo de uva. Ya que la obtención del grado alcohólico se ve influenciado por el estado de madurez de la uva,

condiciones de cultivo (tipo de poda, riego, etc.), condiciones climatológicas y el área de producción en que se ha originado el cultivo ⁽¹⁰⁾.

La incorporación del probiótico no altera este parámetro fisicoquímico.

5.6 Determinación de anhídrido sulfuroso total.

La determinación, se efectuó en el laboratorio de análisis Bromatológico de La Facultad de Química y Farmacia de La Universidad de El Salvador, a través de una valoración Iodométrica. En la tabla N°8, se detallan los valores de anhídrido sulfuroso.

Tabla N°8. Resultados obtenidos de anhídrido sulfuroso:

Anhídrido sulfuroso total				
Lotes de vino fabricados				
Lote	X10⁴L1	X10⁴L2	X10⁶L1	X10⁶L2
Vino sin inocular				
Valor	51.2mg/L	51.2 mg/L	51.2 mg/L	51.2 mg/L
Vino inoculado				
Semana 1	51.2 mg/L	51.2 mg/L	51.2 mg/L	51.2 mg/L
Semana 2	51.2 mg/L	51.2 mg/L	51.2 mg/L	51.2 mg/L
Semana 3	51.2 mg/L	51.2 mg/L	51.2 mg/L	51.2 mg/L
Semana 4	51.2 mg/L	51.2 mg/L	51.2 mg/L	51.2 mg/L

Volúmenes gastados de titulante ver anexo N°13.

En base a los resultados en la tabla de resultados N°8, el valor del parámetro fisicoquímico de anhídrido sulfuroso se mantuvo constante durante todo el tiempo de análisis.

Los resultados analíticos obtenidos son precisos, pero no exactos, esto en base a la cantidad de anhídrido sulfuroso aplicada al vino; esto debido principalmente a que la sensibilidad del método no es la más adecuada.

Para la interpretación de datos se utilizó la fórmula:

Cálculos: mg/L de SO₂ Total = 0.8 mL x 64

Ejemplo

Cálculos: mg/L de SO₂ Total = 51.2 mg/L

5.8 Reconfirmación de bacterias ácido lácticas por gramo de producto liofilizado.

Se realizó la reconfirmación de bacterias ácido lácticas por gramo; esto para verificar que lo que especificaba el proveedor era la correcta, y al mismo tiempo corroborar la sensibilidad de la metodología Petrifilm.

Resultados obtenidos de la reconfirmación de bacteria ácido láctica por gramo de producto liofilizado.

Luego de realizar el recuento de bacterias ácido lácticas por gramo de producto liofilizado se obtuvieron los siguientes resultados presentados en la tabla N°9, los cuales se realizaron utilizando la metodología Petrifilm. Para el análisis se utilizó la dilución de 10^{-8} UFC/mL y se inoculó por duplicado, obteniendo un número de colonias por placa, las cuales se multiplicó por el factor de dilución y se obtuvo la

cantidad de bacterias ácido lácticas por gramo de liofilizado por cada placa, posteriormente se sacó la media de los resultados obteniendo un valor de 8.5×10^8 . A partir de ese valor se realizaron cálculos para conocer la cantidad necesaria a ser pesada para poder obtener una concentración de 10^4 UFC/mL.

Tabla N°9. Resultados de reconfirmación de bacterias ácido láctica por gramo de liofilizado.

Especificación de proveedor (2×10^{11} UFC/g de <i>Lactobacillus casei</i>)	Placa 1 10^{-8} UFC/mL de <i>Lactobacillus casei</i>	Placa 2 10^{-8} UFC/mL de <i>Lactobacillus casei</i>
Numero de bacterias ácido lácticas en cada placa	9	8
(UFC/g de <i>Lactobacillus casei</i>)	9.0×10^8	8.0×10^8
Promedio UFC/g de <i>Lactobacillus casei</i>)	8.5×10^8	

Se observa en la tabla N°9, que se recuperó *Lactobacillus casei* en el recuento, de cada una de las placas inoculadas, utilizando la metodología Petrifilm; pero no fue igual al valor especificado por el proveedor; esto puede ser causado por diferentes variables, entre estas la temperatura, humedad, presión que puede afectar en el crecimiento, por lo que con el valor obtenido, se realizó el cálculo para conocer la cantidad necesaria a agregar al vino para alcanzar la concentración requerida.

5.9 Inoculación del probiótico *Lactobacillus casei* a concentración de 10^4 UFC/mL y 10^6 UFC/ mL, utilizando la metodología Petrifilm en muestras de vino elaboradas en el laboratorio.

Se realizó la inoculación de las dos concentraciones de *Lactobacillus casei* 10^4 UFC/mL y 10^6 UFC/mL, por litro de vino (por duplicado), De cada lote de vino, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla N°10. Resultados de recuento de bacterias ácido lácticas en el vino inoculado con *Lactobacillus casei*, después de 48 horas.

Concentraciones	10^4 UFC/mL de <i>Lactobacillus casei</i>				10^6 UFC/mL de <i>Lactobacillus casei</i>			
	X 10^4 L1		X 10^4 L2		X 10^6 L1		X 10^6 L2	
Codificación del lote	Análisis				Análisis			
Numero de análisis.	1	2	1	2	1	2	1	2
Conteo de bacterias ácido lácticas.	<10 UFC/mL				<10 UFC/mL			

En la tabla N°10, se muestran los resultados obtenidos de la inoculación de bacteria ácido láctica sobre placa Petrifilm de los dos lotes inoculados a diferente concentración, los cuales se realizaron por duplicado por cada lote, aunque no

se pudo obtener resultados favorables ya que no se pudo recuperar bacterias ácido lácticas en ninguna placa.

Durante la primera inoculación en placa Petrifilm, se obtuvieron resultados menores a la dilución (no se obtuvo crecimiento de *Lactobacillus casei*), en cada una de las placas inoculadas, después de 48 horas ya que se manejó la hipótesis de verificar el recuento de *Lactobacillus casei* después de 48 horas incorporadas en el vino, por el hecho de esperar un periodo de adecuación de esta bacteria en esa matriz alimentaria; sin embargo, no fue posible recuperar la bacteria probiótica en el presente experimento.

Se notó que la concentración más adecuada a utilizar fue de 10^4 UFC/mL, debido a que fue la concentración que presentó menos cambio en la apariencia del vino, ya que la concentración 10^6 UFC/mL *Lactobacillus casei*, se convirtió en una suspensión blanca a la hora que se incorporó el probiótico liofilizado.

5.10 Inoculación de *Lactobacillus casei* a concentración de 10^4 UFC/mL, por litro de vino comerciales (MV7C1, MVC7C2 y MVX71).

Según los resultados obtenidos en el desarrollo experimental en el que no se logró recuperar de *Lactobacillus casei* en los lotes de muestra, se procedió a efectuar pruebas en muestras comerciales (MV7C1, MVC7C2) y una muestra adicional de vino elaborado, este como referencia para comparar resultados (MVX71), utilizando para esto, tanto la metodología tradicional, como la metodología Petrifilm. Esto con el fin de obtener los resultados más precisos y no dejar ninguna duda acerca de la metodología utilizada para cuantificar las bacterias ácido láctica, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla N°11. Resultados obtenidos del recuento microbiológico utilizando la metodología Tradicional.

Método	Tradicional								
Concentración	10 ⁴ UFC/mL <i>de Lactobacillus casei</i>								
Codificación del lote	MV7C1			MV7C2			MVX71		
	Análisis			Análisis			Análisis		
Número de análisis	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Carga Bacteriológica (UFC/mL)	<10 UFC/mL			<10 UFC/mL			<10 UFC/mL		

Tabla N°12. Resultados obtenidos del recuento microbiológico utilizando la metodología Petrifilm.

Método	Petrifilm								
Concentración	10 ⁴ UFC/mL de <i>Lactobacillus casei</i>								
Codificación del lote	MV7C1			MV7C2			MVX71		
	Análisis			Análisis			Análisis		
Número de análisis	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Carga Bacteriológica (UFC/mL)	<10 UFC/mL			<10 UFC/mL			<10 UFC/mL		

Tabla N°13. Resumen de resultados.

Muestra	MV7 C1	MV7 C2	MV X7
Nombre comercial	Vino Undurraga	Vino Santa Elena Varietal	Muestra de laboratorio
Descripción	Vino tonalidad roja, con aroma suave	Vino joven, tonalidad roja, con aroma intenso a fruta.	vino de tonalidad rosa clara, con olor a fruta (uva).
Procedencia	Chile	Chile	Estados unidos
Genotipo de uva	Carmenere	Cabernet Sauvignon	Red Globe
Grado alcohólico	13°	13°	14°
Cantidad recuperada de <i>Lactobacillus casei</i> utilizando.	<10UFC/mL		

En donde:

MV7 C1: Muestra comercial numero 1

MV7 C2: Muestra comercial numero 2

MV X7: Muestra de vino elaborada en el laboratorio

En la tabla N°13, se muestran los vinos utilizados durante esta parte experimental, en donde se describe el tipo de uva, la procedencia y el grado alcohólico de cada vino a la hora de la incorporación de la bacteria ácido-láctica. Esto con el objetivo de realizar una comparación del vino elaborado en el laboratorio, en comparación con muestras de vinos comerciales.

Se puede observar, que no fue posible recuperar *Lactobacillus casei*, tanto en muestras de vino comercial, como en la muestra de referencia elaborada a nivel de laboratorio, utilizando tanto con la metodología Petrifilm, como en la metodología tradicional con Agar MRS.

Por lo tanto, se realizó el siguiente análisis, empleando la metodología de las 5M, como procede:

5.11 Análisis de causa del no crecimiento de *Lactobacillus casei*:

Se recurrió a la fuente bibliográfica de análisis, empleando la metodología de las 5M ⁽¹⁸⁾, para determinar el factor determinante de la no supervivencia del probiótico en la matriz.

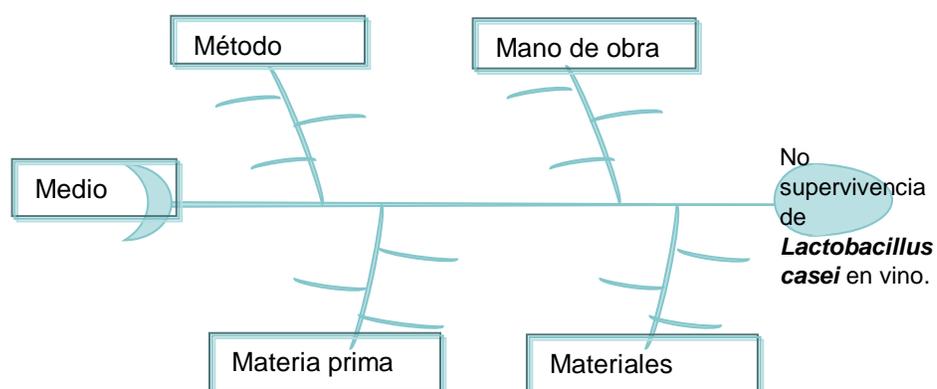


Figura N°9. Diagrama de Ishikawa (18).

Método: Se considera que el método es el adecuado, ya que tanto la metodología Petrifilm, como la metodología tradicional (AOAC), usando Agar

Man Rogosa Sharper (USP); están validados para el recuento de bacterias ácido lácticas.

Analista: la mano de obra de los analistas es adecuada; ya que se realizó el procedimiento según la técnica, con la supervisión del docente asesor.

Materia prima: se descarta que esta sea un factor de causa, ya que tanto al vino (que cumple con los parámetros fisicoquímicos), como la cepa probiótica utilizada (que esta cuenta con su respectivo certificado de calidad), no se consideran objeto de causa.

Es posible que la cepa utilizada en la cita bibliográfica no es la misma que se utilizó en este experimento.

No se utilizó un tipo de uva exclusiva para la elaboración de vino, sino que se empleó el tipo de uva red Globe que es uva de mesa.

Materiales: El tipo de material utilizado en la parte fisicoquímica y microbiológica, referido a cristalería y equipo fueron los adecuados.

Matriz alimentaria: Según Almudena Almueda, García-Ruiz⁽³⁾, el vino es una matriz alimentaria en el que puede sobrevivir bacterias ácido lácticas, sin embargo, la cepa liofilizada *Lactobacillus casei* que se utilizó en el experimento no resistió las condiciones inhóspitas de dicha matriz alimentaria.

5.12 No cumplimiento del objetivo de prueba de catación.

No fue posible realizar la prueba de catación, ya que como se planteó en el anteproyecto, el objeto era efectuar la prueba de catación utilizando la ficha técnica aprobada por la Organización de Vino y Viña (Ver anexo N°14) con el vino inoculado que cumpliera con la con la concentración mínima para considerarse como alimento probiótico la cual es de 10^6 UFC/mL del probiótico *Lactobacillus Casei*.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. La cepa probiótica de *Lactobacillus Casei*, no fue capaz de sobrevivir en una matriz como el vino, en la fase de producto terminado, tanto en muestras ensayadas a nivel de laboratorio y en muestras comerciales; debido presuntivamente a que este no es capaz de soportar el grado alcohólico de dicha matriz.
2. La cepa probiótica liofilizada *Lactobacillus Casei* no es idónea para incorporarla en una matriz como el vino, debido a que no es posible sobrevivir a estas condiciones inhóspitas para el probiótico.
3. En el vino elaborado, no fue posible aislar como mínimo una concentración de 10^6 UFC/mL del probiótico *Lactobacillus Casei*, ya que no fue posible recuperar la bacteria ácido láctica de la matriz alimentaria.
4. El empleo de la metodología Petrifilm para bacterias ácido lácticas, es un método en el que es posible efectuar el recuento de bacterias ácido lácticas, en diferentes matrices alimentarias; sin embargo, no fue posible recuperar *Lactobacillus casei*, en el vino elaborado a nivel de laboratorio, y muestras comerciales.
5. El grado alcohólico obtenido en el vino elaborado, es un parámetro fisicoquímico que está ligado con cada genotipo de uva.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Experimentar en futuras investigaciones la resistencia de otras bacterias probióticas en el vino; ya que queda demostrado que la cepa probiótica *liofilizada Lactobacillus Casei* 431 no cumple especificaciones necesarias para incorporarla en una matriz como el vino elaborado a pequeña escala.
2. Investigar previamente el genotipo de uva a utilizar, ya que de esta depende el grado alcohólico, y este varía ampliamente entre cada variedad de uva.
3. Utilizar probióticos micro encapsulados en ensayos previos, cuando se incorpora probióticos en este tipo de matrices.
4. Antes de realizar la inoculación en las matrices, estandarizar la cepa probiótica, ya que esta durante su almacenamiento podría tener una disminución en el número de bacterias.
5. Para obtener resultados más fiables, buscar alternativas diferentes del Método Ripper en la determinación de anhídrido sulfuroso.

BIBLIOGRAFIA

1. Albert Mas, G. B. (2013). Metabolismo nitrogenado de *Sacharomyces Cerevisae* durante la fermentación vínica. *Bioquímica del vino*, 9-13.
2. Alegre, J. M. (2009). El papel de los microorganismos en la elaboración de vino. *Ciencia y tecnología alimentaria*, 174-183.
3. Almudena García-Ruiz, D. G.-F.-A. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *El Sevier*, 220-225.
4. Apolinaria García C, P. H. (2009). Propiedades Probióticas de *Lactobacillus Spp* aislado de Bipsias de pacientes con y sin infección por *Helicobacter Pylori*. *Revista Médica de Chile*, 369-376.
5. Aranceta, J. Alimentos funcionales y salud en la etapa infantil y juvenil. (2010). Madrid, España: Editorial médica panamericana. (17 de febrero de 2017). Obtenida en: <http://books.google.com.ec/books?id=9O03337S6B0C&pg=PA37&dq=caracter%C3%ADsticas+de+los+alimentos+funcionales&hl=es&sa=X&ei=OYuLUsP1OubmsATa3IHIAw&ved=0CDEQ6AEwAQ#v=onepage&q=caracter%C3%ADsticas%20de%20los%20alimentos%20funcionales&f=false>. Association of Official Analytical Chemist. (1984). *Official Methods of Analysis*. Arlington.
6. Association of Official Analytical Chemist. (1984). *Official Methods of Analysis*, 14 th Edition. Arlington.

7. Bender, D. A. (2006). *Bender's Dictionary of Food and Food Technology*. Cambridge, England: CRCpress.
8. FAO/OMS. (2001). *Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico*. Córdoba, Argentina.
9. Guerrero Hidalgo, R. F. (2015). *Sulfuroso en la Elaboración de Vinos. Alternativas*. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, 1-23.
10. Gutiérrez, I. H. (2014). *Calidad Enológica de nuevos genotipos de uva identificados en el blanco de germoplasma de vid*. Castilla-la mancha, 1-21.
11. Jackson, R. (2008). *Fermentation*. *Wine Science*, 332-417.
12. Maydata, A. G. (2002). *Vino, polifenoles y protección a la salud*. *Revista Cuabana Aliment Nutr*, 134-141.
13. Maria Kechagia, Dimitrios Basoulis, Stavroula Konstantopoulou, Dimitra Dimitriadi, Konstantina Gyftopoulou, Nikoletta Skarmoutsou, and Eleni Maria Fakiri(2013). *Health Benefits of Probiotics: A Review*. Recuperado de: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/481651/>.
14. Minnesota Mining and Manufacturing Company. (25 de Marzo de 2017). multimedia.3m.com. Recuperado de <http://multimedia.3m.com/mws/media/>

1253343O/product-instructions-3m-petriefilm-lactic-acid-bacteria-count-plate.pdf

15. Navarro Fruits S.A.C. (24 de Marzo de 2017). Recuperado de Navarrofruits.com.pe:<http://navarrofruits.com.pe/wpcontent/uploads/2016/09/navarrofruits-ficha-tecnica-uva-red-globe.pdf>
16. NMX-V-012-1986. Bebidas Alcohólicas. Vinos. Especificaciones. (29 de Febrerode2017).RecuperadodeColpos.mx:<http://www.colpos.mx/bancode normas/nmexicanas/NMX-V-012-1986.PDF>.
17. Organización Internacional de la viña y el vino. (2016). Documento de revisión del análisis sensorial en vinos. OIV.INT, 1-30.
18. Pulido, H.G. (2010). Calidad total y productividad. México: Mc Graw Hill.
19. Salvador, O. E. (2013). Estudio de mercado. El mercado del vino en El Salvador 2013. San Salvador: ICEX España Exportación e Inversiones. Obtenido de:<http://www.icex.es/icex/es>.
20. Salmien, Y. K. (2009). Handbook of Probiotics and Prebiotics. Canada: Wiley.
21. Sánchez, K. S. (2013). Manual de prácticas de laboratorio de fermentación alimentaria. Casa abierta al tiempo, 1-122.
22. Skoog Douglas A, Holler James F- Crouch Stanley R (2007). Principles of instrumental analysis, 6th Edition. Published.
23. Triolla, M. (2004). Estadística (9º Edición). México: Pearson Educación.
24. Zapater, P. C. (2013). Estructura y composición de la uva y su contribución al vino. Bioquímica del vino, 5-8.

ANEXOS

Anexo N° 1

Esquema general de fabricación de vino.

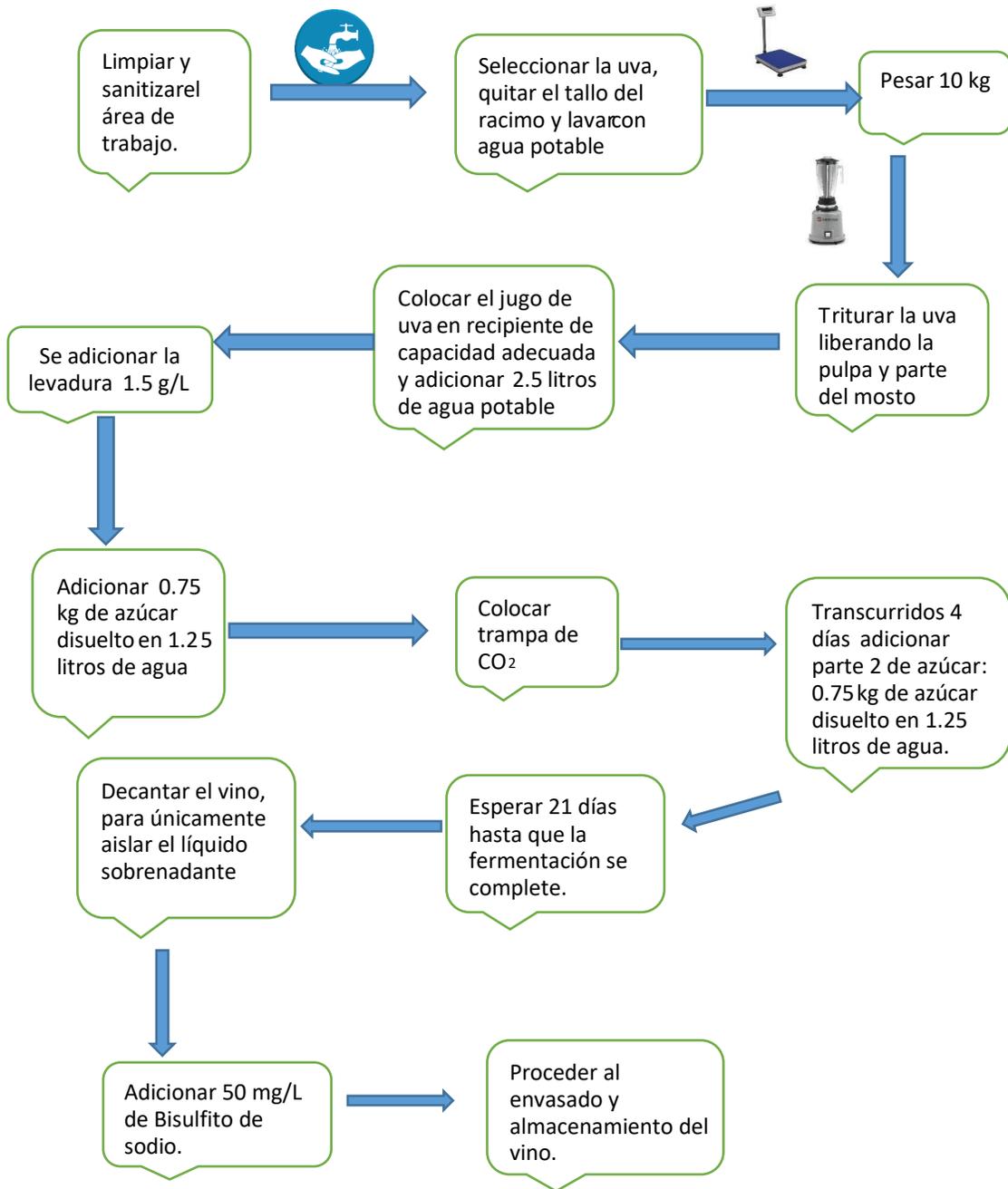


Figura N°1 Esquema general de elaboración de vino.

Anexo N°2

Materiales, equipos y cristalería para análisis fisicoquímico y microbiológico.

Materiales y equipos para análisis fisicoquímicos.

Equipo.

- 1 Brixómetro
- 1 pHmetro
- 1 Refractómetro de ATAGO
- 1 Balanza Analítica
- 1 Balanza Granataria

Materiales

- 1 Termómetro de 100 °C
- 1 Hot plate
- 1 Soporte trípode
- 1 Aro con nuez

- 2 Pinza universal sin nuez

- 1 Pinza nuez doble
- 1 Doble codo 29/32 200 mm

Cristalería

- 1 Matraz esférico fondo redondo 100 mL
- 1 Refrigerante 30 cm
- 1 Probeta de 100 mL
- 1 Probeta de 1,000 mL
- 1 Beaker de 100 mL
- 1 Beaker 30 mL
- 1 Recipiente de vidrio de 5 litros
- 1 Bureta de 50 mL
- 1 Bureta de 25 mL

*Nota: Los materiales han sido estipulados por análisis.

Materiales para análisis microbiológico.

Equipo.

- Estufa de incubación
- Cámara de refrigeración
- Cabina de flujo laminar
- Balanza Analítica
- Autoclave

Materiales.

- Dispensor (para placas Petri film)
- 4 Placas para bacterias ácido lácticas.
- Gradillas

Cristalería.

- 4 Pipetas volumétricas de vidrio de 1.0 mL
- 4 Pipetas Mohr de 1 mL
- 1 Recipientes de vidrio de capacidad de 1 litro.
- 12 Tubos de ensayo

*Nota: Los materiales han sido estipulados por análisis.

Anexo N°3.

**Certificado de Análisis de la cepa liofilizada utilizada de
*Lactobacillus casei.***

CHR HANSEN

Improving food & health

L.casei 43 1

Certificate of Analysis

Form:	Free e-dried DVS
Material No:	703059
Batch no:	3247839
Date of Manufacture:	08.2016
Best Before Date:	08.2018

Performance	Result	Specification
Active Cells Cells/g	1.8E+12	$\geq 2E+11$
Total cell count cfu/g	$\geq 2E+11$	$\geq 2E+11$
pH 24h, 37 °C, 0.005% Inoculation	4.9	$\geq 4,8$
pH 48h, 37 °C, 0.005% Inoculation	4.0	$\leq 4,2$

Contaminants are tested and controlled in a relevant combination of samples from the environment, process or products. The set-up is based on HACCP principles as stated in the ISO 27205 IIDF.149:2010 to guarantee that the product fulfills the following specifications

Purity	Specification
Coagulase-positive staphylococci cfu/g	<10
Non lactic acid bacteria cfu/g	<500
Enterobacteriaceae cfu/g	<10
Yeasts and moulds cfu/g	< 10
Listeria monocytogenes	Absent in 25 g
Salmonella spp.	Absent in 25 g

Anexo N°4.

Esquema para el recuento de bacterias ácido lácticas por gramo.

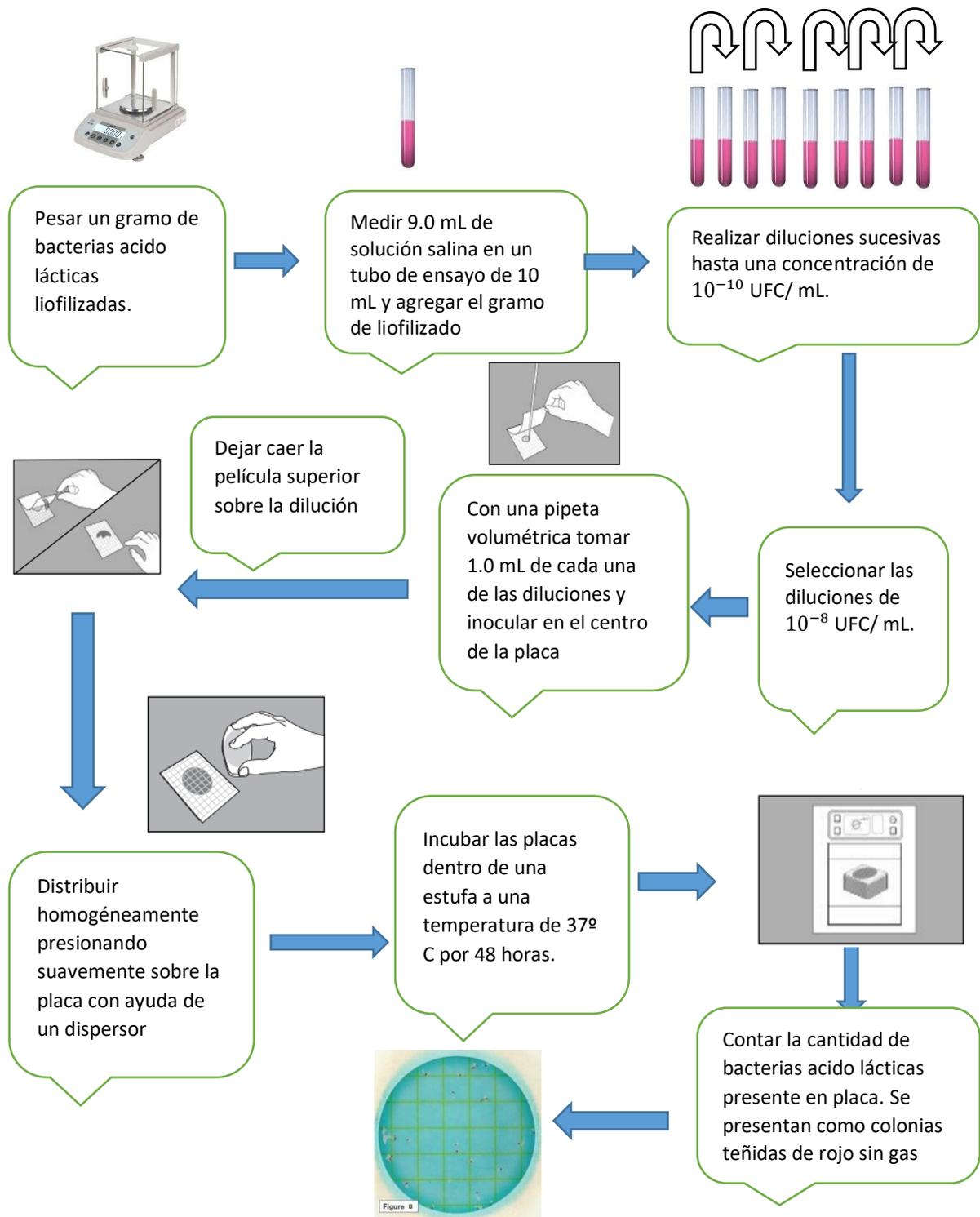


Figura N°2. Esquema para el recuento de bacterias por gramo.

Anexo N°5.

Cálculos para la inoculación de *Lactobacillus casei*.

Concentración de 10^4 UFC/mL.

$$\begin{array}{l} 10^4 \text{ UFC} \text{ ----- } 1 \text{ mL} \\ X \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \\ \mathbf{X = 1 \times 10^7 \text{ UFC}} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 8.5 \times 10^8 \text{ UFC} \text{ ----- } 1 \text{ g} \\ 1 \times 10^7 \text{ UFC} \text{ ----- } X \\ \mathbf{X = 0.01176 \text{ g} = 11.76 \text{ mg.}} \end{array}$$

Concentración de 10^6 UFC/mL.

$$\begin{array}{l} 10^6 \text{ UFC} \text{ ----- } 1 \text{ mL} \\ X \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \\ \mathbf{X = 1 \times 10^9 \text{ UFC}} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 8.5 \times 10^8 \text{ UFC} \text{ ----- } 1 \text{ g} \\ 1 \times 10^9 \text{ UFC} \text{ ----- } X \\ \mathbf{X = 1.176 \text{ g} = 1,176 \text{ mg.}} \end{array}$$

Anexo N°6.

Esquemas de Inoculación de *Lactobacillus casei*.

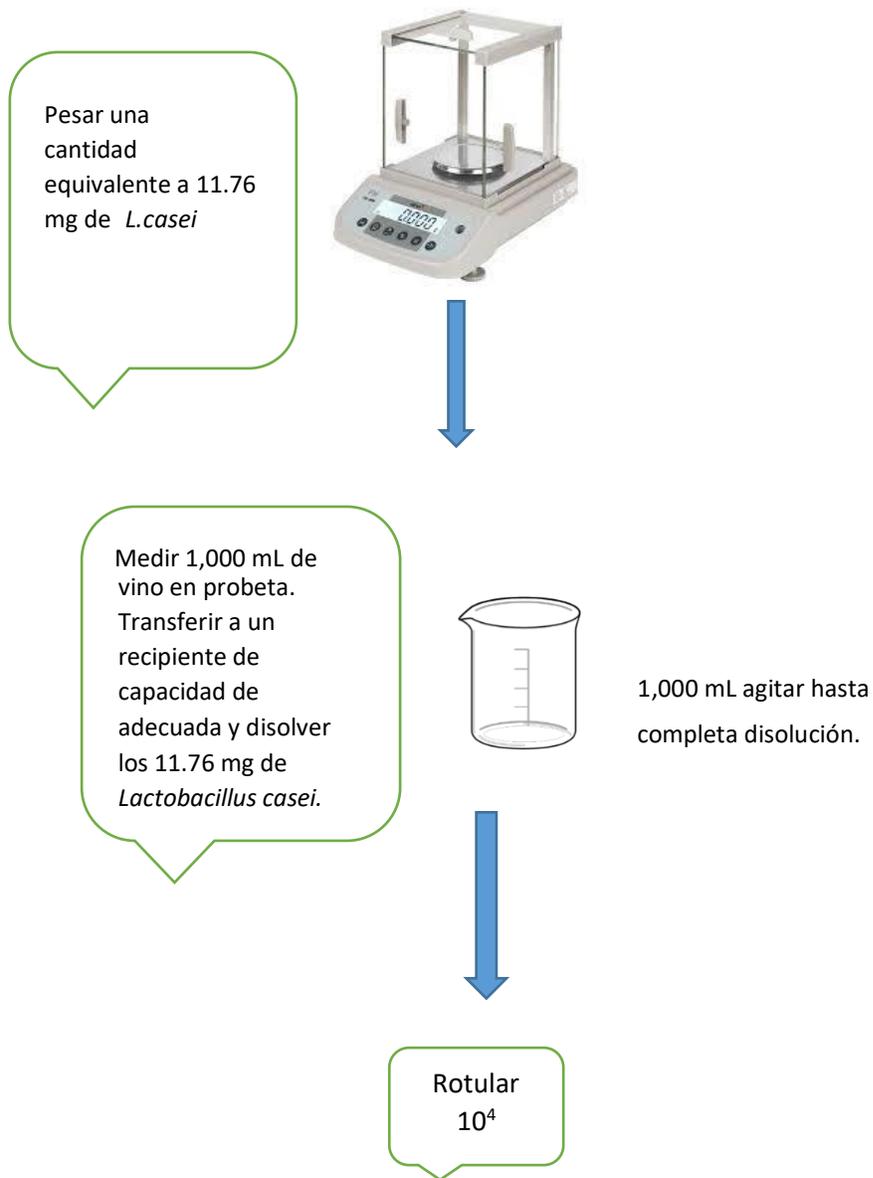


Figura N°3. Inoculación de *Lactobacillus casei* a concentración de 10^4 UFC/mL por litro de vino.

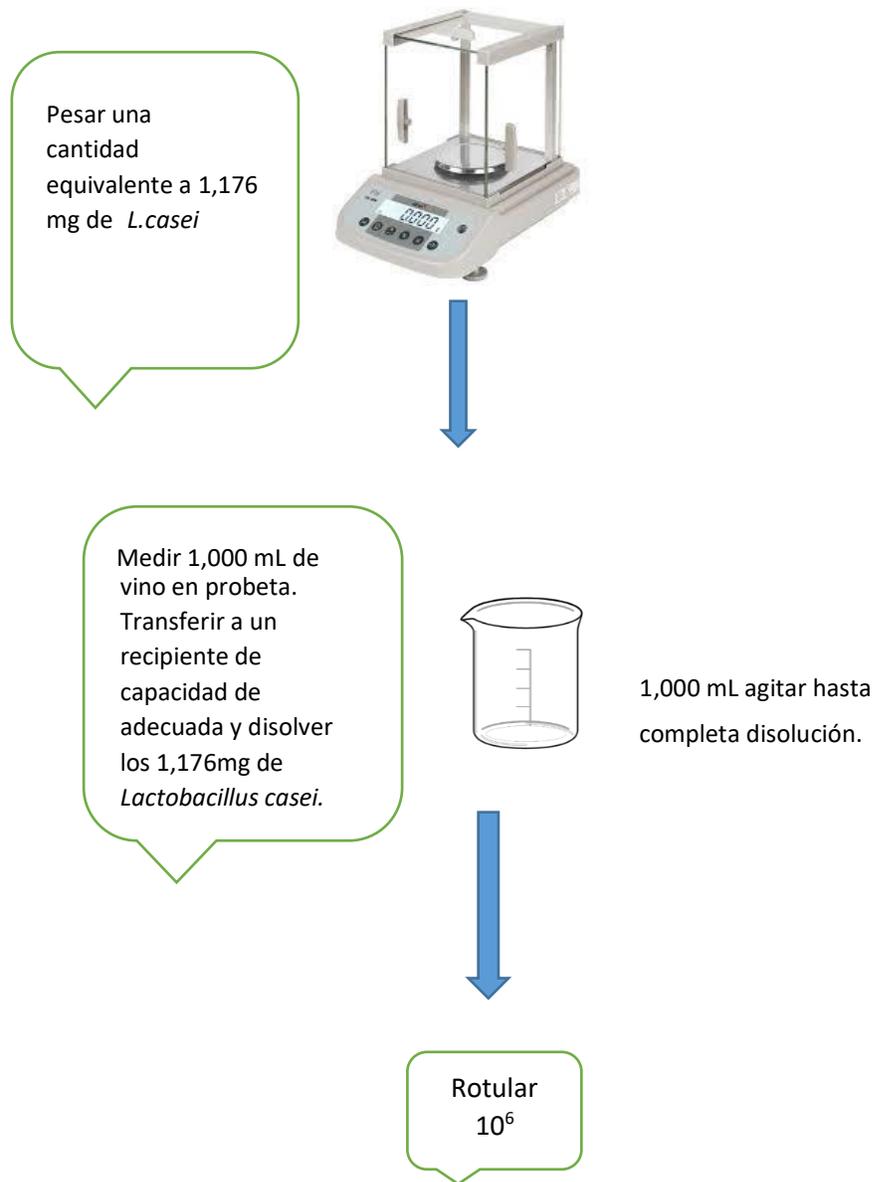


Figura N° 4. Inoculación de *Lactobacillus casei* a concentración de 10^6 UFC/mL por litro de vino.

Anexo N°7

Esquemas de trabajo de análisis fisicoquímico.

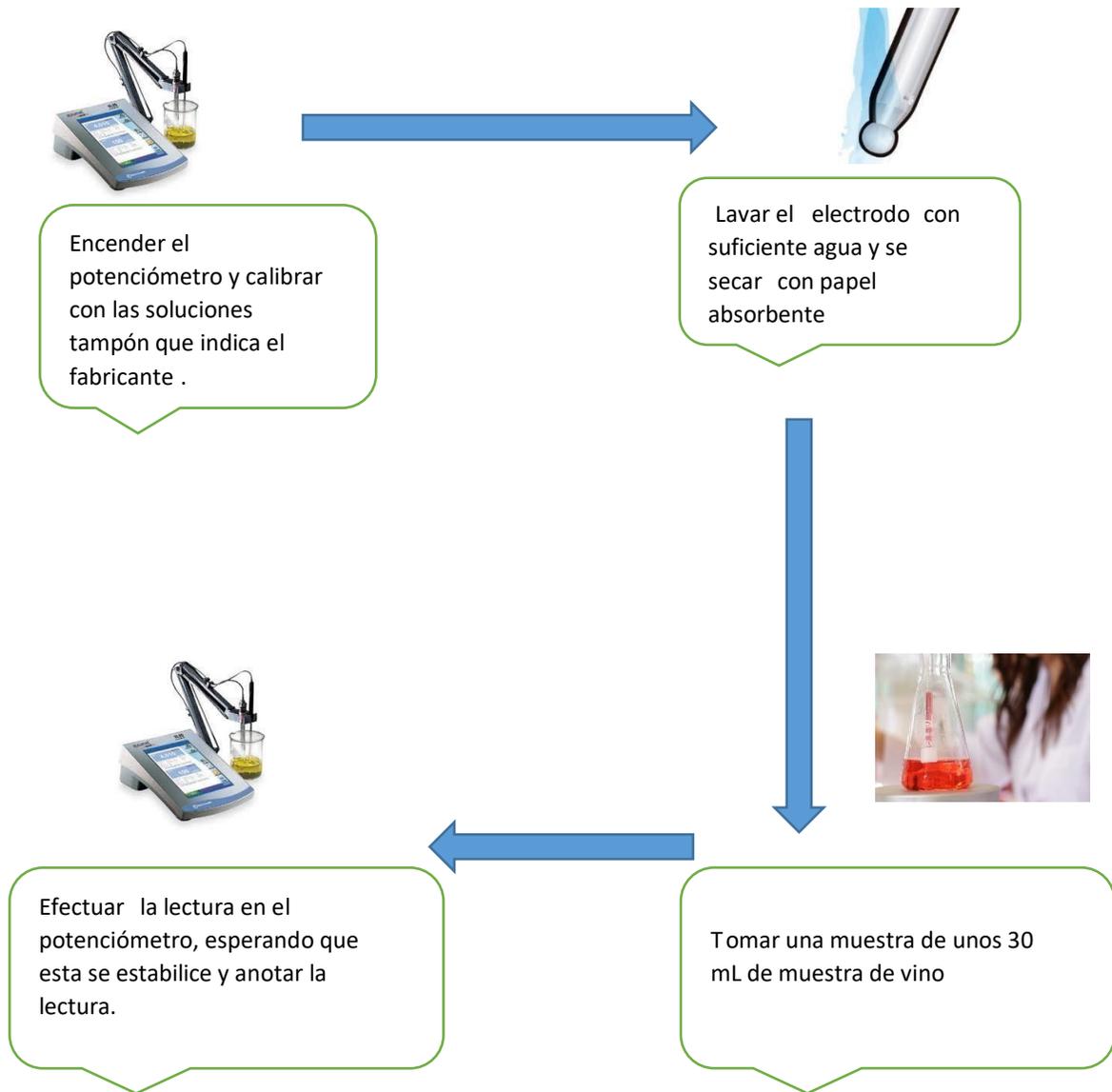


Figura N°5 Esquema de Medición de pH.

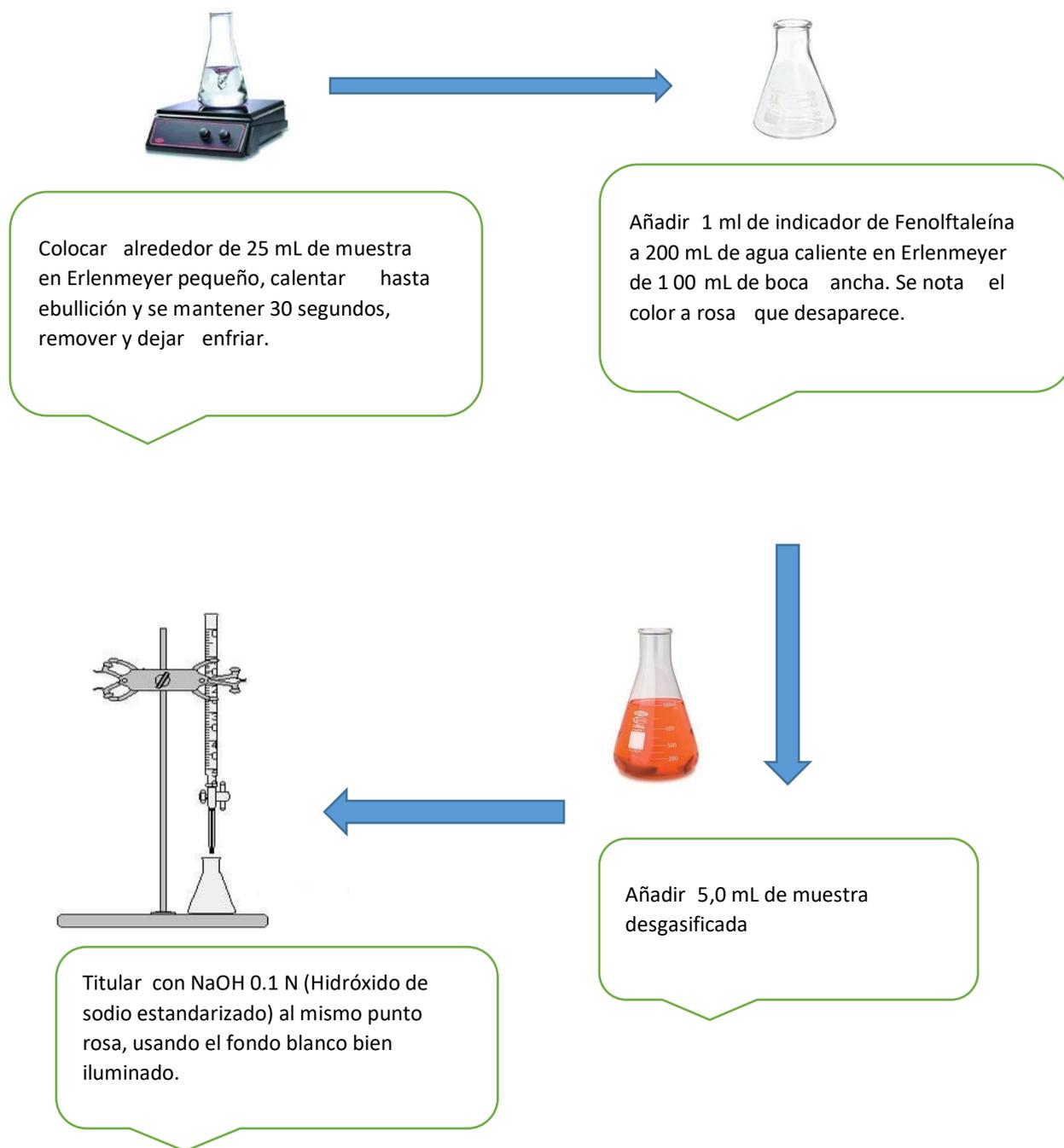
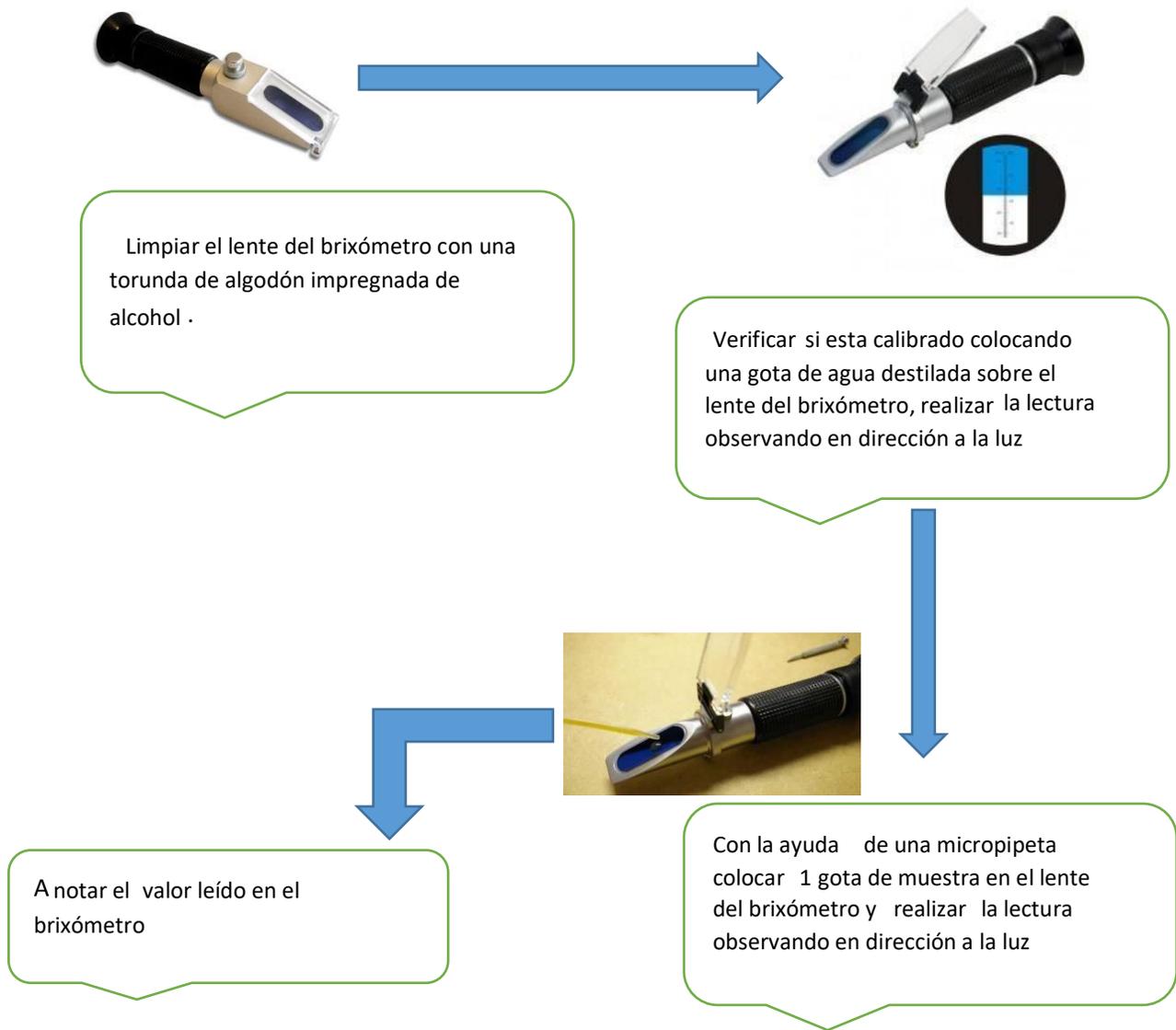


Figura N°6. Esquema de trabajo de acidez titulable.



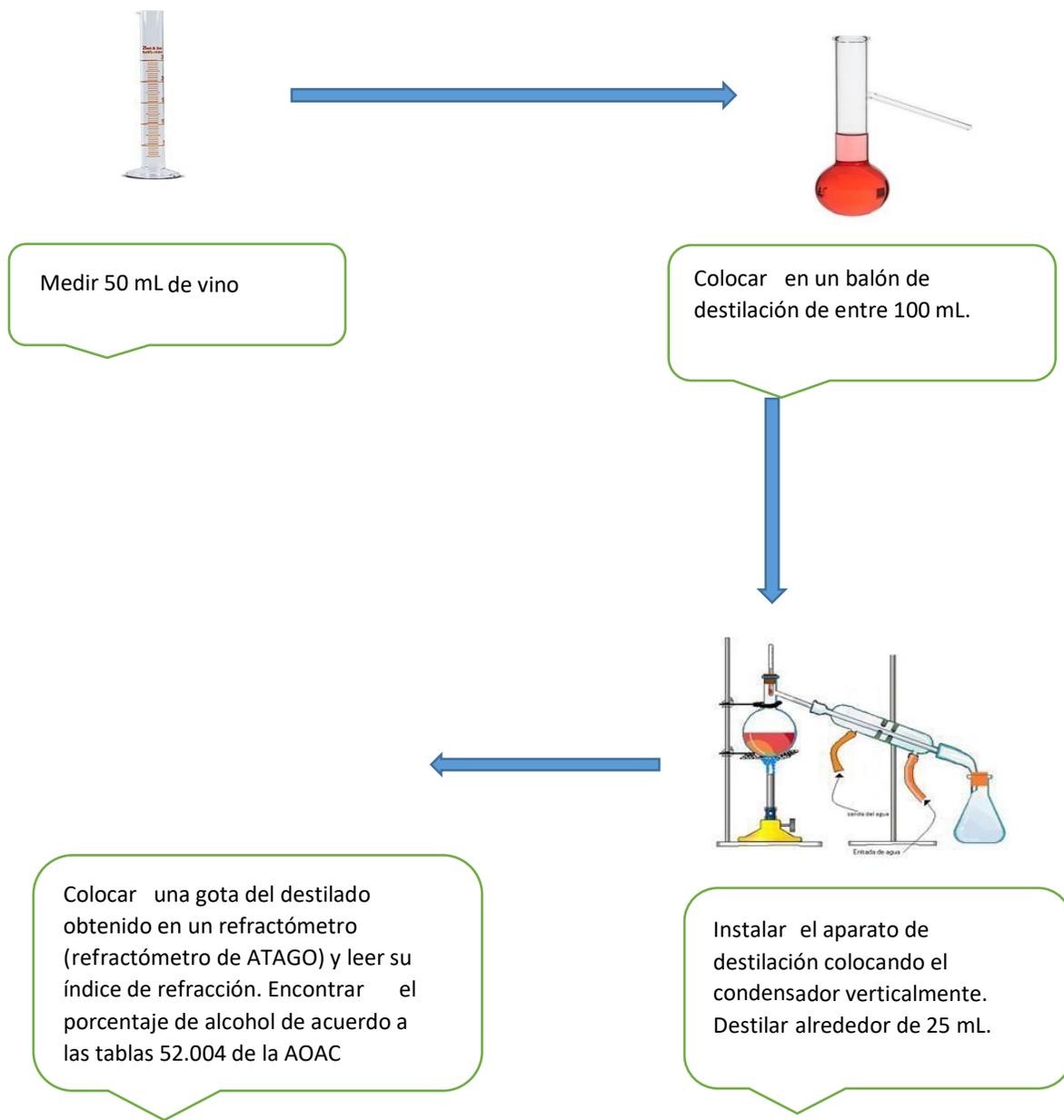
Limpiar el lente del brixómetro con una torunda de algodón impregnada de alcohol .

Verificar si esta calibrado colocando una gota de agua destilada sobre el lente del brixómetro, realizar la lectura observando en dirección a la luz

Con la ayuda de una micropipeta colocar 1 gota de muestra en el lente del brixómetro y realizar la lectura observando en dirección a la luz

A notar el valor leído en el brixómetro

Figura N°7. Esquema de trabajo de grados Brix.



Figuro N° 8 Esquema de trabajo de grado alcohólico.

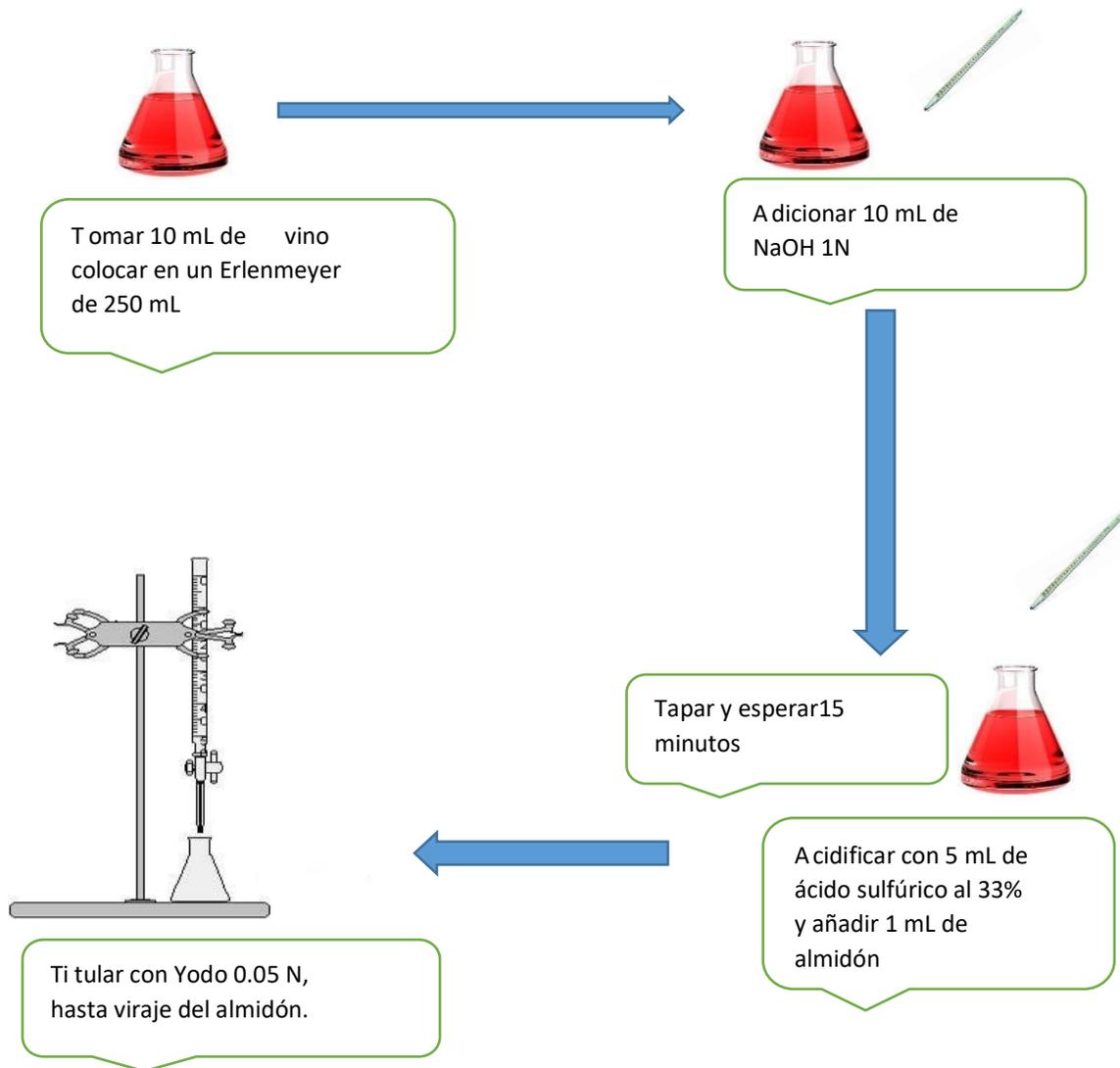


Figura N°9. Determinación de anhídrido sulfuroso total.

Anexo N° 8.
Preparación de reactivos.

Reactivos para la determinación de la acidez total

Preparación de hidróxido de sodio 0.1 N estandarizado: Se pesa un cantidad equivalente a 4 g de perlas de hidróxido de sodio y se disuelve en 200 mL de agua desionizada y libre de dióxido de carbono, se traslada la disolución a un balón volumétrico de 1000 mL y se lleva a aforo con agua desionizada libre de dióxido de carbono, se traslada a un frasco de plástico de polietileno y estandarizar pesando 5 g de biftalato de potasio previamente secado a 120 °C por dos horas, se disuelve en 75 mL de agua libre de dióxido de carbono. Se agregan 2 gotas de fenolftaleína TS, se titula con la solución de hidróxido de sodio hasta la producción de un color rosa permanente.

Se obtiene la Normalidad real por la fórmula:

$$N = \frac{\textit{g de Biftalato fde potasio}}{0.20422 \times \textit{mL de NaOH}}$$

Fenolftaleína Ts

Se pesa 1 gramo de fenolftaleína en 100 mL de alcohol.

Preparación de reactivos y soluciones para la determinación de anhídrido sulfuroso por el Método Ripper.

Reactivos para la determinación de Yodo 0.05 N:

Disolver aproximadamente 7 g de yodo en una solución de 18 g de yoduro de potasio en 100 mL de agua, adicionar 3 gotas de ácido clorhídrico, diluir con agua a 1000 mL, y estandarizar la solución como sigue:

Transferir 25 mL de la solución de yodo a un vaso de precipitado de 250 mL, diluir con agua aproximadamente a 100 mL, agregar 1 mL de ácido clorhídrico 1 N, agitar cuidadosamente, y titular con una solución con una solución de

tiosulfato de sodio 0.1 N VS hasta que la solución tome un color amarillo pálido. Agregar 2 mL de almidón TS y continuar titulado hasta desaparecer el color. Preservar en un frasco de vidrio color ámbar con tapón.

- Ácido sulfúrico 33%:

Agregar 33 mL de ácido sulfúrico concentrado en un vaso de precipitado de 100 mL en cámara extractora con 40 mL de agua, colocar en un baño de hielo para facilitar la solución, transfer a un balón volumétrico de 100 mL y llevar a volumen y homogenizar la solución.

- Hidróxido de sodio 1 N:

Disolver 40 g de perlas de hidróxido de sodio en 200 mL agua libre de dióxido de carbono sobre un baño de hielo, luego pasar a un balón volumétrico de 1000 mL usando agua libre de dióxido de carbono a temperatura ambiente y envasar en frasco de plástico.

- Solución de almidón 1%:

Mezclar 0.5 g de almidón soluble en 2 a 3 mL de agua adicionar la suspensión a 50 mL de agua caliente, bajo agitación. Continuar el calentamiento hasta obtener una solución clara. Filtrar en caso se presentase turbidez, después de algunos minutos de calentamiento. Dejar enfriar la solución resultante a temperatura ambiente.

Anexo N°9.
**Esquema para el recuento de bacterias ácido lácticas por
metodología Petrifilm.**

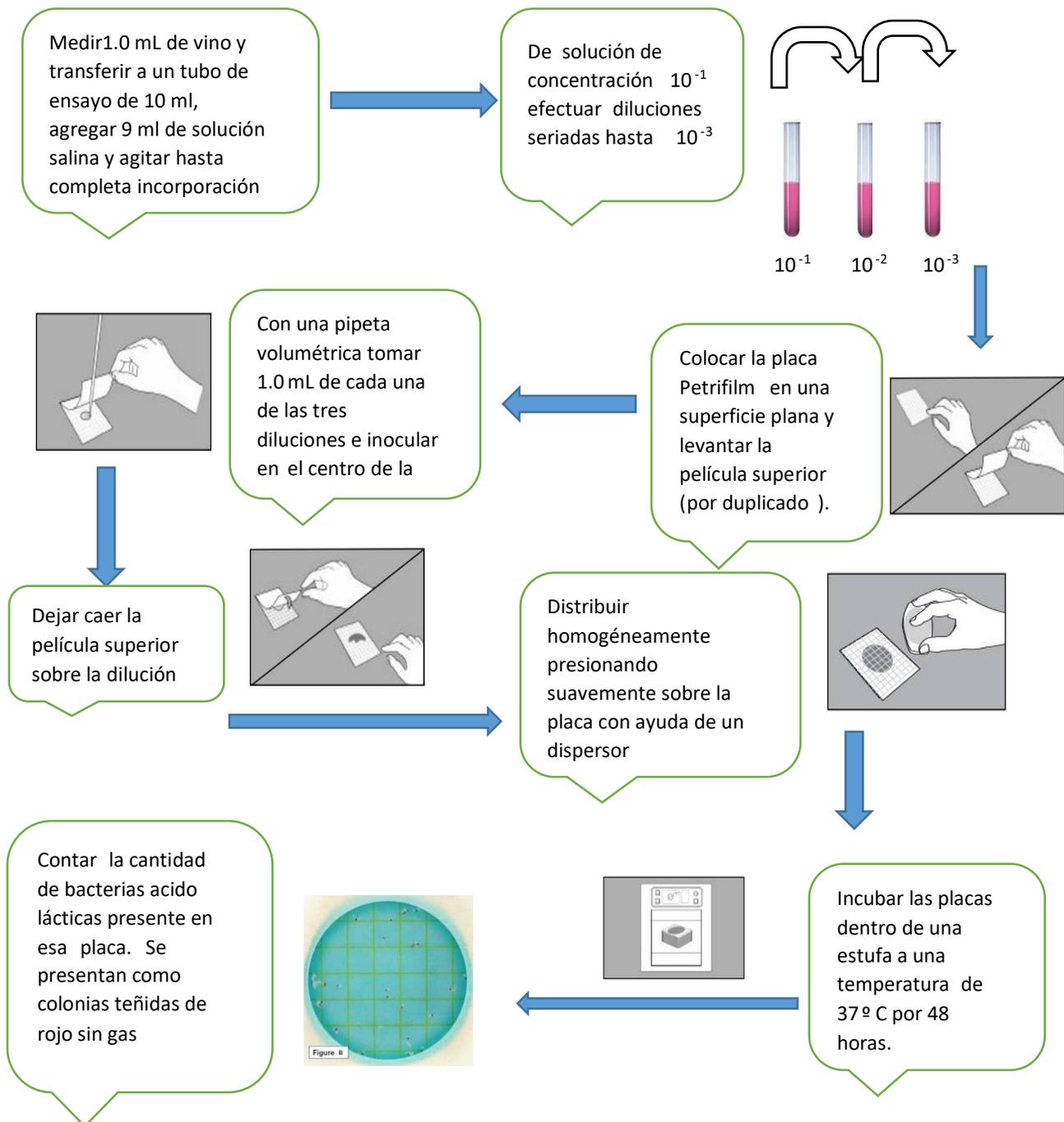


Figura N°10. Esquema para el conteo de bacterias ácido lácticas por metodología Petrifilm.

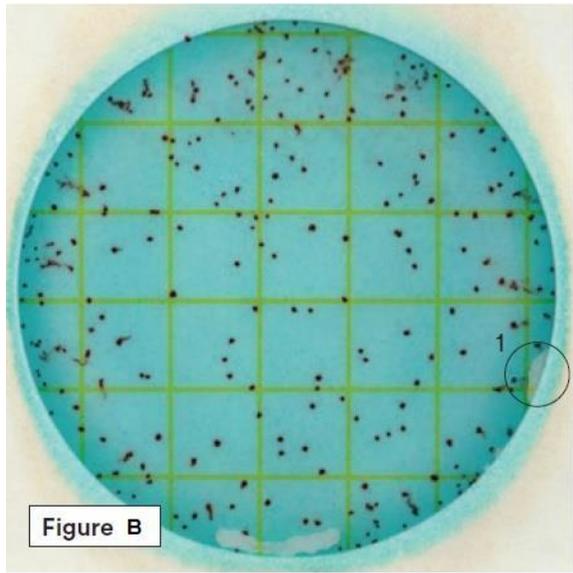
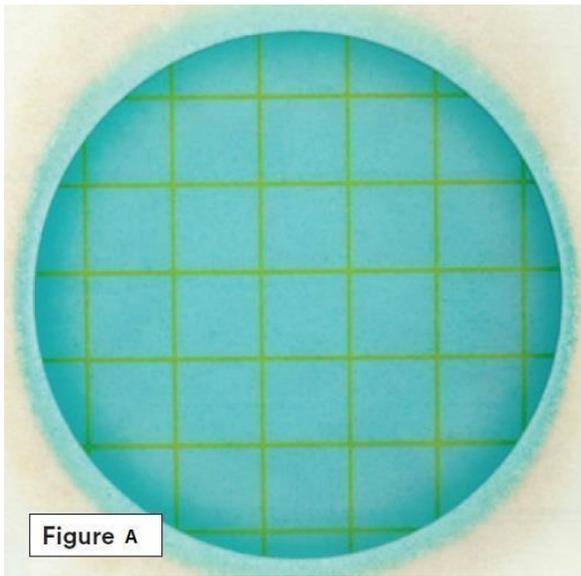


Figura N°11. Placas Petrifilm con y sin bacterias ácido lácticas.

Anexo N°10.

Esquema para la preparación de Agar MRS.

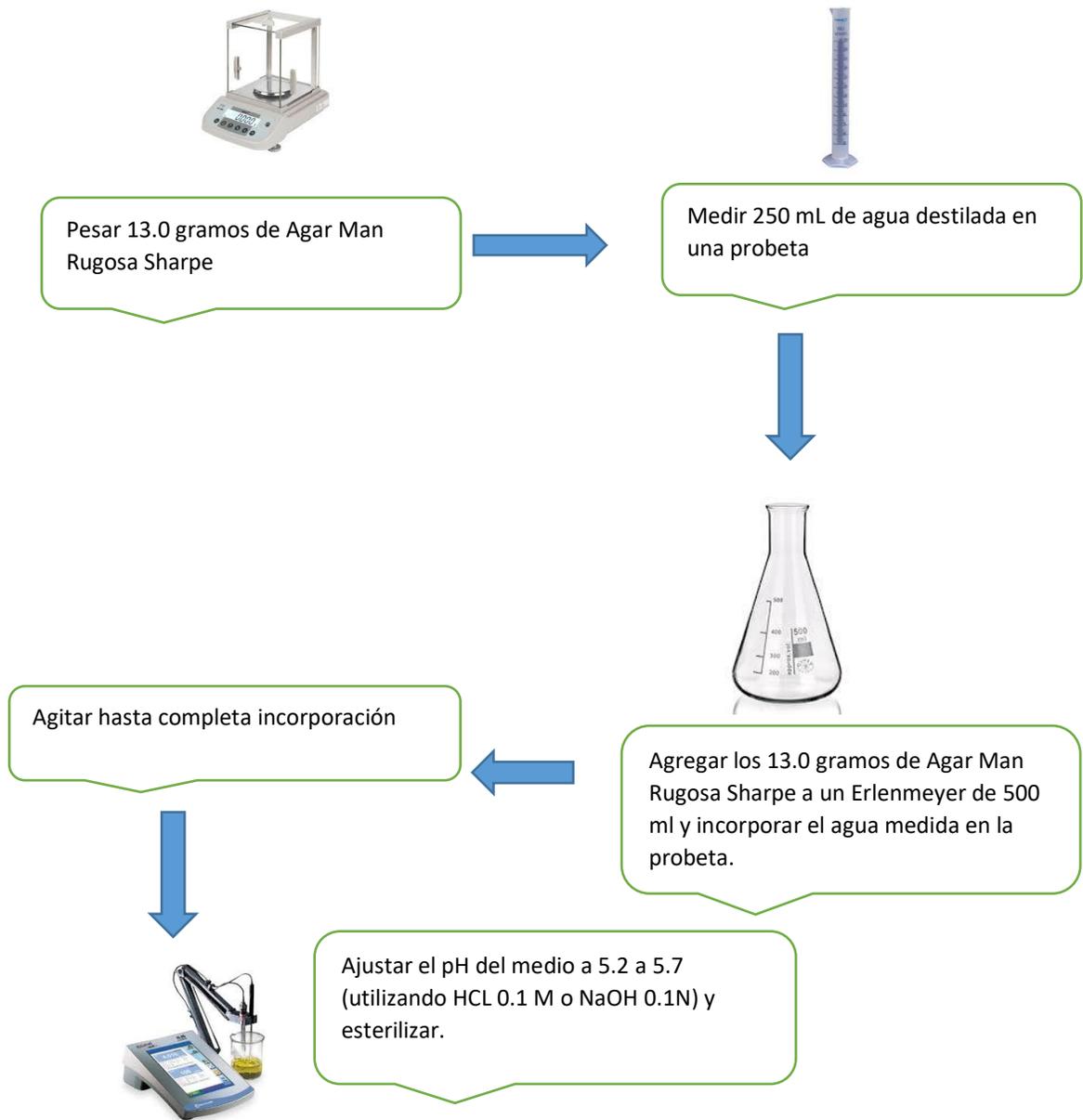


Figura N°12. Preparación de Agar Man Rogosa Sharpe.

Anexo N°11.
Elaboración del vino

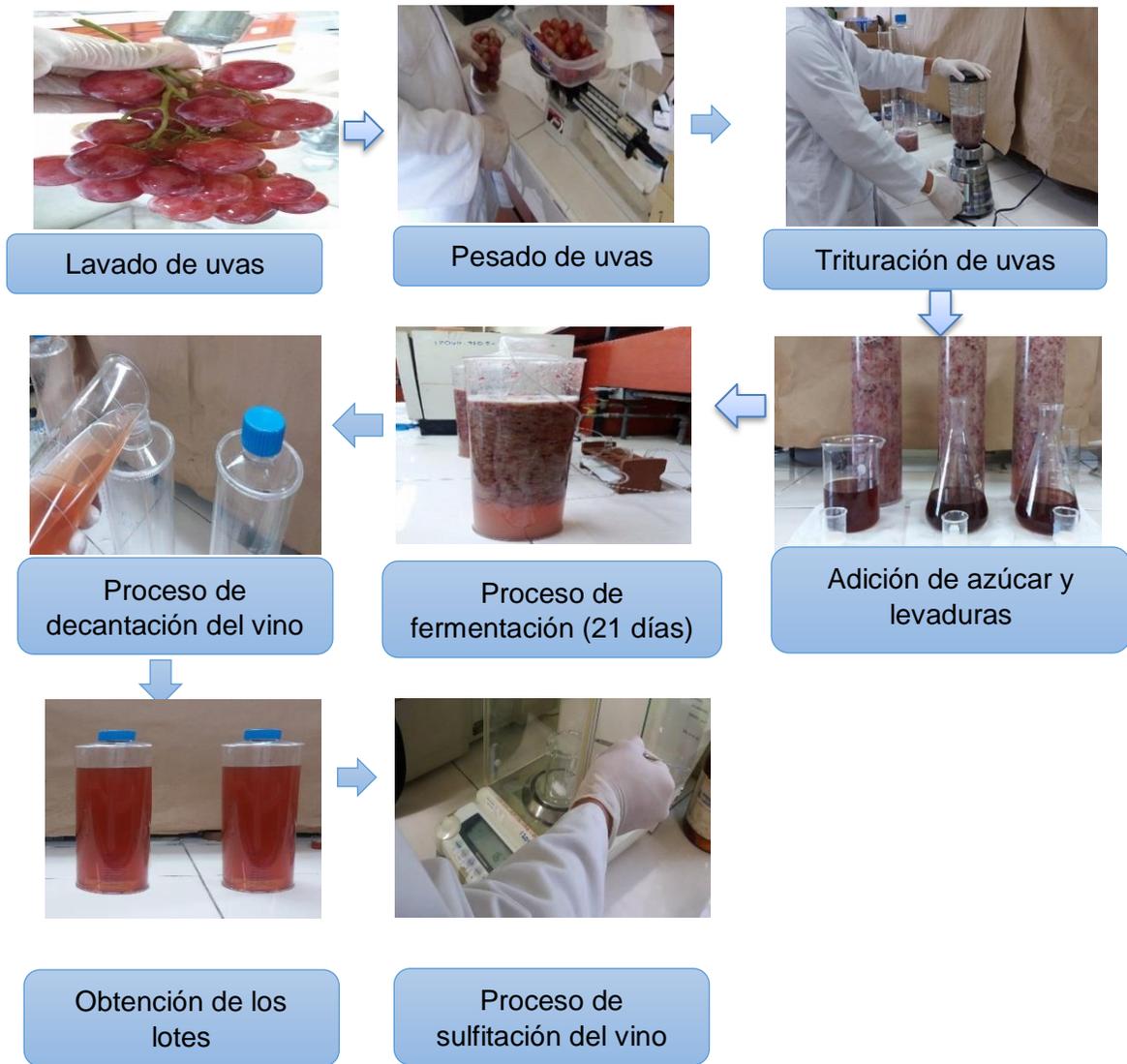


Figura N°13. Esquema del proceso de elaboración de vino.

Anexo N°12.

Volúmenes promedio gastados de NaOH, para la determinación de acidez total.

Lote	X10⁴L1	X10⁴L2	X10⁶L1	X10⁶L2
Volumen gastado de NaOH (sin inocular)				
Volumen gastado de NaOH	3.5 mL	3.4 mL	3.5 mL	3.5 mL
Volumen gastado de NaOH (inoculado)				
Semana 1	3.9 mL	3.9 mL	4.3 mL	4.3 mL
Semana 2	3.9 mL	3.9 mL	4.3 mL	4.3 mL
Semana 3	3.9 mL	3.9 mL	4.3 mL	4.3 mL
Semana 4	3.9 mL	4.0 mL	4.3 mL	4.4 mL

Anexo 13.

Volúmenes promedios gastados de I₂, para la determinación de anhídrido sulfuroso por el método Ripper.

Anhidro sulfuroso total				
Lotes de vino fabricados				
Lote	X10⁴L1	X10⁴L2	X10⁶L1	X10⁶L2
Volúmenes de I₂ (sin inocular)				
Volúmenes de I₂	0.8mL	0.8 mL	0.8 mL	0.8 mL
Volúmenes de I₂ (inoculado)				
Semana1	0.8mL	0.8mL	0.8mL	0.8 mL
Semana 2	0.8mL	0.8mL	0.8mL	0.8 mL
Semana 3	0.8mL	0.8mL	0.8mL	0.8 mL
Semana 4	0.8mL	0.8mL	0.8mL	0.8 mL

Anexo 14.
Ficha técnica de la OVI



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

TRABAJO DE GRADUACION: INCORPORACION DE UN
PROBIÓTICO EN EL PROCESO DE ELABORACION DE VINO
COMO PRODUCTO TERMINADO



Ficha técnica para análisis sensorial de vino según OVI

Código del vino: _____

Indicaciones: En el siguiente test se le presentaran muestras de vino de 30.0 mL. Marque con una "X" sobre cada opción donde usted considere conveniente en cada uno de los siguientes ítems:

Claridad

Excelente (5)	Muy Buena(4)	Buena(3)	Regular(2)	Malo (1)
---------------	--------------	----------	------------	----------

Apariencia

Excelente (5)	Muy Buena(4)	Buena(3)	Regular(2)	Malo (1)
---------------	--------------	----------	------------	----------

Finura/ Persistencia

Excelente (5)	Muy Buena(4)	Buena(3)	Regular(2)	Malo (1)
---------------	--------------	----------	------------	----------

Olor

Excelente (5)	Muy Buena(4)	Buena(3)	Regular(2)	Malo (1)
---------------	--------------	----------	------------	----------

Calidad del olor

Excelente (5)	Muy Buena(4)	Buena(3)	Regular(2)	Malo (1)
---------------	--------------	----------	------------	----------

sabor

Excelente (5)	Muy Buena(4)	Buena(3)	Regular(2)	Malo (1)
---------------	--------------	----------	------------	----------

Intensidad del sabor

Excelente (5)	Muy Buena(4)	Buena(3)	Regular(2)	Malo (1)
---------------	--------------	----------	------------	----------

Persistencia del sabor

Excelente (5)	Muy Buena(4)	Buena(3)	Regular(2)	Malo (1)
---------------	--------------	----------	------------	----------

Calidad del sabor

Excelente (5)	Muy Buena(4)	Buena(3)	Regular(2)	Malo (1)
---------------	--------------	----------	------------	----------

Comentarios: _____

***Fuente: OVI (Organización Internacional de Vino y Viña)**

Anexo N° 15.

Memoria de imágenes de la investigación



Figura N°14. Elaboración de vino



Figura N°15. Cabina de flujo laminar empleada en la inoculación.



Figura N°16. Brixómetro utilizado



Figura N°17. pH- Metro utilizado.



Figura N°18. Destilador fraccionado utilizado para el grado alcohólico.