

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EFECTO DE LA ADICIÓN DE MANOPROTEÍNAS COMERCIALES SOBRE LAS
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS Y SENSORIALES DE UN VINO
“CABERNET SAUVIGNON”**

CLAUDIO BENJAMÍN LILLO REYES

SANTIAGO – CHILE
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EFECTO DE LA ADICIÓN DE MANOPROTEÍNAS COMERCIALES SOBRE LAS
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS Y SENSORIALES DE UN VINO
“CABERNET SAUVIGNON”**

**EFFECT OF ADDITION OF COMMERCIAL MANNOPROTEINS ON THE
PHYSICAL, CHEMICAL AND SENSORY CHARACTERISTICS “CABERNET
SAUVIGNON” WINE**

CLAUDIO BENJAMÍN LILLO REYES

SANTIAGO – CHILE
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EFECTO DE LA ADICIÓN DE MANOPROTEÍNAS COMERCIALES SOBRE LAS
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS Y SENSORIALES DE UN VINO
“CABERNET SAUVIGNON”**

**Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Agrónomo**

CLAUDIO BENJAMÍN LILLO REYES

| | Calificaciones |
|---|-----------------------|
| PROFESORES GUÍAS | |
| Sr. Álvaro Peña N. Ingeniero Agrónomo, Enólogo, Dr. | 6,0 |
| Sr. Elías Obreque S. Ingeniero Agrónomo, Dr. | 6,0 |
| PROFESORES EVALUADORES | |
| Sr. Eduardo Loyola M. Ingeniero Agrónomo, Enólogo, Dr. | 6,7 |
| Sr. Gabino Reginato M. Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc. | 5,0 |

**SANTIAGO – CHILE
2016**

AGRADECIMIENTOS

Estoy eternamente agradecido de mi familia, porque son aquellos que me han apoyado incondicionalmente en este camino de autoconocimiento y superación llamado vida.

A mis profesores guías, Álvaro Peña y Elías Obreque, quienes me han recibido y orientado en esta linda área de la agronomía que es la enología. Agradezco también a todas las personas del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, quienes me brindaron su apoyo cuando los necesité, de verdad muchas gracias.

A CONICYT, proyecto FONDECYT 1140882 por haber financiado este trabajo de investigación.

Doy gracias a mis amigos universitarios que son y han sido un pilar fundamental en mi desarrollo como profesional. A mis amigos deportistas que saben también todo el esfuerzo que he realizado para llevar a cabo mis metas y objetivos. A mis amigos de siempre que brindan su apoyo, cariño y energía para verme victorioso en todo lo que me propongo y que están ahí en los buenos y malos momentos.

Mis agradecimientos a todos los que han sido fuente de inspiración tanto en el ámbito académico, como en el deportivo. Este es un grupo grande de buenos humanos, de los cuales destaco en esta ocasión al profesor Álvaro Peña, que es un ejemplo de vocación, amor y lucha por su trabajo, convicciones e ideales.

Para finalizar gracias a todas las buenas y malas personas que han aportado en mi vida de una u otra forma. Las buenas tienen un espacio reservado en mi corazón, las malas han sido parte de mi aprendizaje.

“Gracias a la vida, que me ha dado tanto” (Violeta Parra, 1966).

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| SUMMARY | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| Polisacáridos presentes en el vino | 5 |
| Polisacáridos de la levadura | 5 |
| Manoproteínas | 6 |
| Relación de las manoproteínas en el vino | 7 |
| pH | 7 |
| Acidez de titulación | 8 |
| Azúcares reductores | 8 |
| Grado alcohólico | 8 |
| Fenoles totales | 8 |
| Taninos totales | 9 |
| Intensidad colorante y antocianos totales..... | 9 |
| Fase olfativa | 10 |
| Fase gustativa..... | 12 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 13 |
| Lugar de estudio | 13 |
| Materiales | 13 |
| Muestras de uvas y manoproteínas comerciales | 13 |
| Solventes y estándares | 13 |
| Equipamiento | 13 |
| Métodos | 14 |
| Tratamientos y diseño experimental | 14 |
| Procedimiento | 14 |
| Variables medidas | 15 |
| Análisis básicos | 15 |
| Análisis fenólicos | 15 |
| Análisis de polisacáridos | 16 |
| Análisis sensorial..... | 17 |
| Análisis estadístico | 17 |

| | |
|--|----|
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 18 |
| Análisis básicos | 18 |
| pH | 18 |
| Acidez de titulación | 18 |
| Azúcares reductores | 19 |
| Grado alcohólico | 19 |
| Análisis fenólicos | 20 |
| Fenoles totales | 20 |
| Taninos totales | 20 |
| Antocianos totales | 21 |
| Intensidad colorante | 21 |
| Análisis de polisacáridos | 22 |
| Fraccionamiento y concentración de polisacáridos | 22 |
| Análisis Sensorial | 23 |
| Fase visual y fase olfativa | 23 |
| Fase gustativa..... | 24 |
| CONCLUSIÓN | 25 |
| BIBLIOGRAFÍA | 26 |
| ANEXOS | 32 |

RESUMEN

La fermentación alcohólica en la elaboración del vino es un proceso complejo donde las levaduras transforman el azúcar proveniente del mosto en etanol y CO₂. Además, estos microorganismos liberan manoproteínas que son capaces de modificar las características químicas y sensoriales de los vinos y promover la estabilidad tartárica, proteica y aromática.

Actualmente, existen distintos productos comerciales a base de levaduras con elevada concentración de manoproteínas que se utilizan en la industria del vino, pero la evidencia científica que corrobora los efectos de este insumo enológico sobre la composición química y sensorial del vino, es limitada. Más aún, existen acotadas referencias respecto al momento de aplicación de éstos productos comerciales.

En este estudio se realizó una vinificación a partir de uvas de “Cabernet Sauvignon” provistas por Viñedos Villaseñor, en donde se aplicaron manoproteínas comerciales aportadas por la empresa Enartis. El estudio se constituyó por tres tratamientos con tres repeticiones cada uno: (T0, testigo), sin adición de manoproteínas; (T1) con adición de manoproteínas al comienzo de la fermentación alcohólica y (T2) adición de manoproteínas finalizada la fermentación alcohólica. La dosis aplicada fue de 150 mg/L.

Una vez finalizada la vinificación, se realizaron análisis básicos, fenólicos, de polisacáridos y un análisis sensorial, los cuales evidenciaron que la adición de manoproteínas comerciales, en un vino de “Cabernet Sauvignon”, genera un efecto significativo en las variables químicas de concentración de fenoles y taninos totales, en las fracciones de polisacáridos de diferente peso molecular y en la concentración total de los mismos. Por otra parte, se observó que las manoproteínas comerciales, independientemente del momento de adición (al inicio o después de la fermentación alcohólica), disminuyen la percepción de astringencia, amargor y acidez, aumentando la percepción de intensidad colorante y aromática, así como dulzor y cuerpo.

Palabras clave: polisacáridos, fermentación alcohólica, momento de aplicación.

SUMMARY

Alcoholic fermentation in winemaking is a complex process where yeast converts sugar from the grape juice into ethanol and CO₂. In addition, these microorganisms release mannoproteins which are capable of modifying the chemical and sensory characteristics of the wines and promote tartaric, protein and aromatic stability.

Currently, there are various commercial products based on high concentration of yeast mannoproteins used in the wine industry, but scientific evidence corroborating the purposes of this enological input on the chemical and sensory composition of wine is limited. Moreover, there are limited references regarding the application time of these commercial products.

In this study, a vinification was made from "Cabernet Sauvignon" grapes, provided by Villasenor Vineyards, where commercial mannoproteins provided by the company Enartis were applied. The study was constituted by three treatments with three replicates each: (T0, control) without addition of mannoproteins; (T1) mannoproteins added at the beginning of alcoholic fermentation and (T2) adding mannoproteins, after alcoholic fermentation. The applied dose was (150 mg / L).

After the vinification, basic, phenolic polysaccharide analysis and sensory analysis were made, which showed that addition of commercial mannoproteins, in a wine "Cabernet Sauvignon" generates a significant effect on the chemical variables like total phenols and tannins concentration, polysaccharides of different molecular weight fractions and total concentration thereof. Moreover, it was noted that commercial mannoproteins, regardless of the time of addition (initially or after the alcoholic fermentation), decrease the perception of astringency, bitterness and sourness, increasing the perception of dye and aromatic intensity and sweetness and body.

Keywords: polysaccharides, alcoholic fermentation, application time.

INTRODUCCIÓN

La fermentación alcohólica es el proceso en el cual las levaduras transforman la glucosa y fructosa, provenientes del mosto, en etanol y CO₂ (Frohman y Mira de Orduña, 2013). Este proceso es realizado por levaduras del género *Saccharomyces spp.*, ya que han mostrado una alta adaptabilidad a concentraciones altas de etanol (Henderson et al., 2013).

Durante la fermentación alcohólica, las levaduras liberan compuestos polisacáridicos, como las manoproteínas, que modifican la composición química de los vinos (Henderson et al., 2013). Las manoproteínas son componentes mayoritarios (25-50%) de la pared celular de las levaduras *Saccharomyces* que, junto con otros polisacáridos, proporcionan estructura y rigidez a la célula. Químicamente, las manoproteínas son proteoglicanos que contienen un 5-20% de porción peptídica y un 80-95% de cadenas del azúcar manosa (López, 2010). Diversos estudios han demostrado que las manoproteínas contribuyen a la estabilidad tartárica (por bloqueo de las reacciones de cristalización, luego de la fermentación alcohólica), proteica y de la materia colorante. Así también, disminuyen las sensaciones de astringencia y amargor, dado su interacción con los taninos (durante la fermentación alcohólica) (Caridi, 2006). Cabe mencionar que las manoproteínas ayudan también a estabilizar la fracción aromática y retardan su percepción prolongando el posgusto. Por otra parte, contribuyen al desarrollo de las poblaciones de bacterias lácticas, que son esenciales para las variedades tintas en el proceso de fermentación maloláctica (López, 2010).

Diversas investigaciones han constatado que la liberación de manoproteínas depende de las condiciones ambientales a las que están sometidas las diversas cepas del género *Saccharomyces* (temperatura, nutrición con N, concentración de azúcares, agregación de otros suplementos, etc.), como también del momento de desarrollo en que se encuentren (Giovani et al., 2010.). Se ha mencionado que en ciertas cepas se liberan más manoproteínas durante la fase de crecimiento activo y, en otras, luego de la autólisis o momento de muerte celular de la levadura; esta liberación ocurre en ambos casos gracias a la acción de la enzima β -(1,3) glucanasa.

Durante la autólisis, se produce la degradación de la pared celular y la membrana citoplasmática de las células de levadura, fomentada principalmente por una fuerte actividad enzimática de β -(1,3) glucanasas localizadas en la pared. Esta actividad produce la liberación de moléculas de polisacáridos y oligosacáridos, entre las cuales se encuentran las manoproteínas de alto peso molecular, generalmente ligadas a glucanos propios de la pared celular [β -(1,3) y β -(1,6)-glucanos]. La hidrólisis enzimática durante estadios posteriores de la autólisis produce el enriquecimiento del vino en manoproteínas y peptidomananos, generados estos últimos a partir de las propias manoproteínas mediante actividades α -manosidasas y proteasas principalmente (López, 2010).

Como se ha señalado, las manoproteínas resultan de gran importancia en el proceso de elaboración del vino, modificando aspectos sensoriales y de estabilidad química y física del mismo. En este sentido, los niveles de manoproteínas presentes en el vino podrían modular las características sensoriales de “Cabernet Sauvignon” (Lattey et al., 2010), que se caracteriza por un alto contenido tánico y astringencia, presentando mayores niveles de taninos que otras variedades como “Carménère” (Obreque et al., 2010), lo cual es altamente relevante ya que corresponde a la variedad tinta más cultivada en Chile con 40.766 hectáreas (Wines of Chile, 2013).

Hoy en día, debido a las altas exigencias de la industria del vino y los distintos mercados consumidores, resulta fundamental el desarrollo de nuevas y específicas técnicas que ayuden a mejorar el proceso de elaboración del vino. La disponibilidad de formulaciones comerciales en polvo y líquidas de manoproteínas comerciales aportarían a la diversificación y/o aumento de las características sensoriales de los vinos (López, 2010). A pesar de esto, existe escasa información respecto al efecto del uso de manoproteínas comerciales durante y después del proceso de fermentación alcohólica, sobre las características químicas y sensoriales de los vinos. En este sentido, el conocimiento respecto al momento de aplicación de manoproteínas comerciales, durante la fermentación alcohólica o la guarda, podría generar diferencias que modificarían las propiedades organolépticas de los vinos.

Hipótesis

El efecto de un producto comercial con elevada concentración de manoproteínas, sobre la composición química y sensorial de un vino, está estrechamente ligada al momento de aplicación durante la vinificación.

Objetivo

Determinar el efecto de la adición de manoproteínas comerciales, durante y después del proceso de fermentación alcohólica sobre las propiedades físicas, químicas y sensoriales de un vino “Cabernet Sauvignon”.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Polisacáridos presentes en el vino

Los polisacáridos son carbohidratos complejos en los que se unen entre sí un gran número de azúcares simples a través de enlaces glicosídicos (McMurry, 2008). En el vino, los polisacáridos son originados por distintas fuentes. Algunos provienen de la degradación enzimática de las paredes celulares de las bayas de la uva durante su maduración; otros derivan de los tratamientos de vinificación, y otros se liberan de las paredes de las levaduras durante la fermentación alcohólica. Junto a los polifenoles y proteínas, los polisacáridos forman uno de los mayores grupos de macromoléculas en el vino y se pueden encontrar en concentraciones que varían entre 0,2-2 g/L (Pellerin y Cabanis, 1998).

Polisacáridos de la levadura

La pared celular de la levadura (segunda fuente de polisacáridos del vino) está constituida principalmente por polisacáridos en proporción de 58% β -glucanos, 40% manoproteínas y 2% de quitina (todos de carácter neutro); cantidades que pueden variar considerablemente en estructura y composición debido al estrés, condiciones del cultivo, edad y modificaciones genéticas (Fleet y Manners, 1977), además de la aireación, agitación, grado de clarificación del mosto y principalmente del tiempo de crianza sobre lías (Caridi, 2006).

La pared celular está compuesta por dos capas de polisacáridos. La primera de ellas denominada capa interna o pared celular interna; es una matriz transparente y amorfa constituida principalmente de β -(1,3) y β -(1,6)-glucanos, moléculas responsables de mantener la forma y rigidez de la célula y, por tanto, determinantes en la resistencia a los cambios osmóticos y mecánicos (Cid et al., 1995). La segunda, denominada capa externa o pared celular externa es la más importante en enología, por su alto contenido de manoproteínas (30-50% del peso seco), las cuales se encuentran entrelazadas por enlaces glucosídicos a los β -(1,6)-glucanos y unidos principalmente a los β -(1,3)-glucanos (Molina et al., 2000).

Manoproteínas

Las manoproteínas se encuentran ubicadas en la capa externa ancladas, a la capa interna de β -glucanos, o bien la atraviesan completamente. Estos compuestos son responsables de la porosidad de la pared, juegan un rol de filtro selectivo y protección contra los ataques químicos y enzimáticos de tipo glucanasa (Nguyen y Rogers., 1998; Zlotnik et al., 1984).

Complementando lo expuesto en el párrafo anterior, Verduyn et al. (1992) menciona que no existe separación neta entre las dos capas de polisacáridos.

Los polisacáridos parietales de las levaduras cedidos al vino (100-150 mg/L) se conocen con el nombre de manoproteínas. Estos compuestos están formados por una cadena peptídica lineal, llevando, por un lado, cadenas más cortas de una a cuatro moléculas de manosa unidas a la cadena peptídica por enlaces *O*-glicosil sobre la serina y treonina y, por otra parte, de un α -D-manano de alta masa molecular, con unas 150 a 250 unidades de manosa muy ramificadas (Hidalgo, 2003).

Las manoproteínas mayoritarias, que representan entre un 80-100% del total, contienen un 90% de manosa y un 10% de proteínas. Su masa molecular oscila entre 100.000 y 2.000.000 Da.

De acuerdo a lo señalado por Navascués (2010), las manoproteínas son componentes mayoritarios de la pared celular de las levaduras (25-50%) y junto a otros polisacáridos forman su estructura. Estos componentes son liberados durante la fase de crecimiento activo de las levaduras y posteriormente durante la autólisis.

La liberación de estos polisacáridos de las paredes de las células se produce por la acción de enzimas parietales β -(1,3)-glucanasas y β -(1,6)-glucanasas, con una importante actividad durante la fermentación alcohólica y un mantenimiento mucho más debilitado durante algunos meses después de la misma.

La autólisis de las levaduras, durante la conservación del vino sobre las lías, conduce a una liberación de las manoproteínas fijadas sobre el glucano de las paredes celulares (Hidalgo, 2003).

Los polisacáridos, en general, y las manoproteínas en particular, son moléculas que representan el 35% de los polisacáridos totales en el vino (Dubourdieu y Moine, 1997; Feuillat y Charpentier, 1998; Vidal et al., 2003). Son responsables de mejorar algunas de las características sensoriales del vino, como el aumento del volumen en boca, untuosidad y cuerpo, contribuyendo a la sensación de plenitud. Además, por efecto indirecto, disminuyen la astringencia debido a la formación del complejo polisacárido-taninos condensados (Escot et al., 2001; Gonçalves, y Heyraud, 2002; Vidal et al., 2003; Vidal et al., 2004a; Vidal et al., 2004b; Doco et al., 2007; Jouquand et al., 2008; Troszyńska et al., 2010).

Relación de las manoproteínas en el vino sobre las diversas variables físicas, químicas y sensoriales

Las manoproteínas parietales de levadura enológica se han asociado a diversas funciones, tales como: (a) adsorción de los compuestos fenólicos; (b) favorecimiento del crecimiento de bacterias malolácticas; (c) inhibición de la cristalización de la sal de tartrato; (d) prevención de la turbidez; (e) fortalecimiento de los componentes aromáticos; (f) enriquecimiento del vino durante la crianza sobre lías finas, y (g) floculación de levadura y autólisis en vinos espumosos. Se cree, también, que derivados de levaduras pueden promover beneficios químicos, sensoriales y, por lo tanto, en gran medida podrían mejorar las características del vino (Caridi, 2006).

A continuación, se describe la relación de las manoproteínas con diversas variables físicas, químicas y sensoriales del vino

pH

La evolución de la densidad de carga eléctrica en función del pH variará dependiendo si son polisacáridos pécticos o manoproteínas (Hidalgo, 2010). En el caso de las manoproteínas, la densidad de carga sufre muy poca variación en función del pH y es consecuencia de la ionización de los grupos fosfato de la porción polisacarídica, así como de los grupos carboxilo y amino de los aminoácidos de la porción proteica (Amory y Rouxhet, 1988; Bowen y Ventham, 1994). En este sentido, la carga neta de las manoproteínas resulta de la presencia de grupos fosfato y de las cadenas laterales de grupos amino y carboxilo (Vernhault et al., 1996). Por lo que, en el rango del pH del vino, las manoproteínas tienen cargas negativas y pueden establecer interacciones iónicas y electrostáticas con los componentes del vino, lo que deriva en la formación de complejos solubles e insolubles. Este proceso es dependiente en gran medida de su carga eléctrica neta y sus grupos funcionales (Caridi, 2006). Se ha mencionado que las manoproteínas contribuyen a la estabilidad, tanto tartárica, por bloqueo de las reacciones de cristalización, como proteica y de materia colorante, por interacción con taninos y proteínas del vino. Al interactuar con los compuestos fenólicos en los vinos tintos, disminuyen la astringencia y amargor de los taninos. También su presencia en vinos estabiliza la fracción aromática (López, 2010).

Como se menciona anteriormente, las manoproteínas generan cambios significativos en algunos componentes del vino e interactúan fuertemente con estos. En el caso del pH, las manoproteínas no generan cambios significativos en él, ni se generan interacciones fuertes con respecto a la carga neta.

Acidez de titulación

La precipitación de la sal de ácido tartárico en el curso de la elaboración del vino disminuye en gran medida la acidez (Lubbers et al., 1993). Afirmando lo anterior, es fundamental indicar que la precipitación del bitartrato de potasio conduce, por lo general, a una disminución en la acidez total del vino (De Rosa, 1998). Se señala que la precipitación de 1 g/L de bitartrato de potasio ocasiona una disminución de la acidez total del vino en 0,4 g/L. Con respecto a esto, se ha demostrado que las manoproteínas pueden inhibir eficazmente la cristalización de la sal de tartrato (Gerbaud et al., 1996; Moine-Ledoux et al., 1997; Moine-Ledoux y Dubourdiou ,2002). En un ensayo realizado con un vino tinto se observó que un tratamiento con Mannostab™ (manoproteínas comerciales), a dosis de 30 g/hL presentó una acidez total significativamente mayor que tratamientos testigos y tratamientos con ácido metatartárico (Fuentes, 2000).

Azúcares reductores

Los azúcares reductores corresponden al conjunto de azúcares con función cetónica o aldehídica que poseen una fuerte propiedad reductora (Zoecklein, 2000). En el caso del vino, los azúcares reductores están compuestos por cantidades diversas de hexosas (glucosa y fructosa) y pentosas (arabinosa) (Bordeu y Scarpa, 1998). Durante la fermentación alcohólica, las levaduras metabolizan estos azúcares, reduciéndolos a bajas concentraciones al término de éste proceso (2 g/L).

Grado alcohólico

El grado alcohólico corresponde a un parámetro de alta relevancia en la estabilidad microbiológica y de percepción sensorial de los vinos, puesto que participaría en la expresión aromática y la astringencia (Bordeu y Scarpa, 1998).

Fenoles totales

Los compuestos fenólicos del vino son de gran interés en enología ya que influyen en el color, sabor y estabilidad. Estos compuestos se pueden modificar al interactuar con las manoproteínas (Escot et al., 2001). Se ha demostrado que la influencia de las manoproteínas depende de la cepa de levadura utilizada, y que manoproteínas liberadas durante la propia fermentación son más reactivas que los liberados durante la autólisis de la levadura (Escot et al., 2001).

Taninos totales

Las manoproteínas de levadura se pueden combinar con los taninos en el vino (Escot et al., 2001). Esta combinación parece disminuir la astringencia, dando taninos más suaves e inhibir fuertemente su autoagregación (Riou et al., 2002). El resultado final será un vino con más cuerpo, mejor sensación en la boca y con un aumento de la resistencia contra la oxidación (Caridi, 2006).

Se ha postulado que las manoproteínas disminuyen la cantidad de proantocianidinas libres capaces de interactuar con las proteínas de la saliva y también compensan la pérdida de lubricación, derivada de la interacción tanino-proteína a través de un aumento de la viscosidad causada por la presencia de estos polisacáridos (Pozo-Bayón et al., 2009). La interacción entre taninos y manoproteínas puede producir estructuras estables no reactivas con las proteínas de la saliva, produciendo una disminución de la astringencia (Guadalupe y Ayestarán, 2008).

Intensidad colorante y antocianos totales

Guadalupe et al. (2010), uso manoproteínas de origen comercial para evaluar el efecto en la estabilidad de color de vinos “Tempranillo”, agregadas al vino en la etapa prefermentativa, (73% de polisacáridos y 2% de proteínas; la manosa obtuvo (91%), seguida por la glucosa).

Las manoproteínas añadidas se mantuvieron solubles durante la etapa prefermentativa y no precipitaron, lo cual se puede explicar porque en esta etapa no se liberan los taninos aún, por ende, no se genera la interacción tanino-manoproteína (Feuillat y Charpentier, 1998). A pesar de esto, los resultados en cuanto a intensidad de color fueron bastante erráticos, con respecto a la teoría de las manoproteínas como coloides protectores. Sin embargo, se debe considerar que la composición química y física de las manoproteínas difieren dependiendo del tipo y origen de levadura y/o preparado comercial usado en el proceso de vinificación.

Diversos autores, han debatido acerca del rol de las manoproteínas como moléculas ligantes de compuestos fenólicos (como los antocianos), planteando que se produce una mayor estabilidad de color en el vino (Escot et al., 2001). En relación a esto, se señala que las moléculas coloidales, de antocianos y copigmentos, adsorben a las manoproteínas para cubrir su superficie, evitando la degradación y precipitación de los pigmentos poliméricos (Feuillat y Charpentier, 1998) (Figura 1).

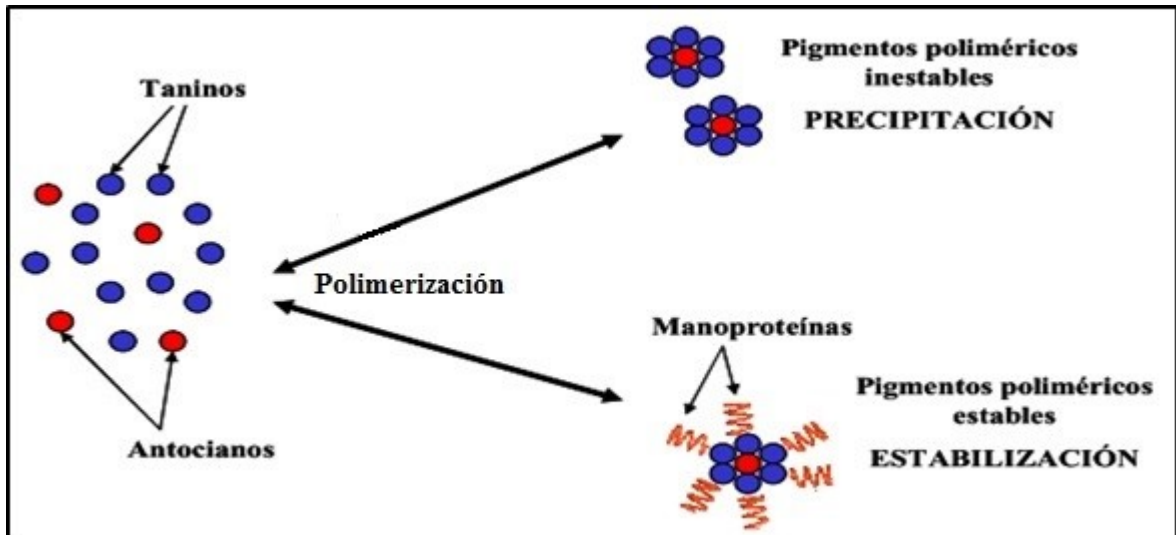


Figura 1. Efecto manoproteínas en estabilidad materia colorante (Del Barrio-Galán, 2012).

Contrariamente de los numerosos estudios acerca de la influencia de las manoproteínas en la mejora de color, ninguno ha logrado determinar hasta el momento este beneficio. No obstante a lo anterior, algunos de estos estudios sí han demostrado un efecto benéfico en la estabilidad colorante en vinos tintos. En este sentido, Palomero et al. (2007) demostraron cómo las manoproteínas derivadas de la pared celular de las levaduras ejercen un efecto protector sobre la degradación de los antocianos monoméricos y sobre la variación a formas no coloreadas de estos compuestos fenólicos, en vinos añejados con lías. Demostraron, además, que la coloración azul-roja, de la cual estas moléculas son responsables, perdura más en el tiempo ante la presencia de las manoproteínas.

Por otro lado, Fuentes (2000) realizó un trabajo donde el vino blanco con un tratamiento de manoproteínas presentó el mayor grado de oxidación o pardeamiento, siendo significativamente diferente al vino del tratamiento testigo. Por otra parte, en el vino tinto el tratamiento con manoproteínas generó un color menos intenso, pero no así el matiz del color, el cual no evidenció diferencias significativas (Fuentes, 2000).

Fase olfativa

La estabilización del aroma depende de la hidrofobicidad de los compuestos de aroma, y el componente proteico de las manoproteínas es importante para la estabilización general de aroma (Lubbers et al., 1994). Las interacciones entre las manoproteínas y compuestos aromáticos pueden conducir a modificaciones de la volatilidad y la intensidad aromática de los vinos; en este caso, las manoproteínas son libres de interactuar y fortalecer los componentes aromáticos existentes (Caridi, 2006).

Respecto a la fase olfativa, Juega et al. (2012) estudiaron la influencia de las manoproteínas en la mejora de aroma en vinos blancos “Albariño”, fermentados por 30 días con tres cepas distintas de levaduras. Las cepas fueron seleccionadas por su alta capacidad de liberar manoproteínas, para lo cual fueron previamente evaluadas en laboratorio. La variedad de uva elegida, a su vez, se explica por ser materia prima de vinos altamente aromáticos. La mayoría de los compuestos encontrados en el vino final correspondieron a alcoholes superiores, encontrándose diferencias significativas en función de la cepa utilizada. Las variaciones fueron en rangos de 12,5 mg/L a los 115 mg/L, considerando el umbral de los 300 mg/L, como el límite en el que estos compuestos (manoproteínas) afectan negativamente la calidad aromática de los vinos. En resumen, el estudio determinó que los vinos con mayor cantidad de manoproteínas en la porción coloidal fueron, a su vez, los que demostraron mayor capacidad de retención de compuestos aromáticos, como el geraniol. Además, se destacó también la capacidad de retención de terpenos y norisoprenoides, componentes aromáticos asociados con la frescura y frutuosidad de “Albariño”.

Por otro lado, un estudio evaluó las interacciones entre los compuestos aromáticos y todo el aislado de manoproteína de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, concluyó que estas relaciones dependen directamente de la concentración en que se encuentren estas macromoléculas en el vino. De las dos cepas de levadura estudiadas se encontraron diferencias en cuanto a la fuerza de interacción con los compuestos que generan aroma, debido a que las manoproteínas de cada cepa retuvieron en distinta medida estos compuestos. Esta retención estaba dada por la composición estructural de las macromoléculas, la cual era distinta y resultó difícil determinar la interacción con los aromas, ya que, tanto la parte glucosídica como la peptídica, pueden generar por sí, relaciones con los compuestos aromáticos (Chalier et al., 2007). Por ende, si se busca modificar algún compuesto aromático en el vino, dependerá del tipo de manoproteína que se utilice.

Por su parte, Chalier et al. (2007) también encontraron evidencia de la interacción entre manoproteínas secretadas por las levaduras (a concentraciones normales en el vino 150 mg/L) y diferentes compuestos aromáticos. Los autores observaron que las manoproteínas pueden ayudar a reducir la volatilidad de los compuestos aromáticos en más de un 80%. Aparte de esto, concluyeron que tanto la porción glucosídica como la porción peptídica de las manoproteínas, están relacionadas al fenómeno de retención de aromas. Más recientemente, Comuzzo et al. (2011) encontraron que la retención de aromas por parte de la fracción coloidal rica en manoproteínas es un fenómeno complejo que depende de una serie de variables (pH, cepa de levadura, temperatura, interacciones con otros complejos del sistema coloidal, entre otros). Estos autores sugieren que este fenómeno puede tener implicaciones prácticas en la calidad aromática de los vinos, porque estos compuestos inicialmente retenidos por las manoproteínas, pueden ser liberados y percibidos a nivel retronasal al momento de la cata a temperatura ambiente, lo que según Del Barrio-Galán (2012), podría traducirse en una percepción aromática más duradera en el tiempo.

Fase gustativa

En general, los estudios indican que la astringencia se trata de una sensación táctil gustativa, producida principalmente por la interacción entre los polifenoles del vino (principalmente flavanoles), con las proteínas de la saliva (Gawel, 1998).

En relación al efecto de las manoproteínas sobre la percepción de astringencia, diversos autores (Zamora, 2003; Riou et al., 2002) han postulado que los taninos, en ausencia de interacciones con manoproteínas, presentan una gran reactividad con las proteínas de la saliva. Por lo tanto, las manoproteínas contribuyen a la disminución de la astringencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó en los laboratorios de Química Enológica, Laboratorio de Análisis Cromatográfico y de Capacidad Antioxidante y Laboratorio de Análisis Sensorial, así como en la Planta Piloto, ubicados en el Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Materiales

Muestras de uvas y manoproteínas comerciales

La muestra de un producto a base de levaduras con elevada concentración de manoproteínas (Enartis Pro-Blanco), fue provista por Enartis (Santiago, Chile); la ficha técnica se presenta en el Anexo 1. Las bayas de “Cabernet Sauvignon” usadas en este estudio para la elaboración de vinos fueron provistas por Viñedos Villaseñor, Valle de Lontué (35° 09’ 00” latitud Sur; 71° 21’ 00” longitud Oeste; Región del Maule), de la cosecha 2014.

Solventes y estándares

La fracción de polisacáridos presentes en las muestras de vinos se cuantificaron utilizando una curva de calibración a partir de dextranos y pectinas (*Leuconostoc mesenteroides*) obtenidos de Analytical Fluka, 21424-100 MG (Sigma-Aldrich Corporation; Saint Louis, Missouri, EE.UU.). Todos los solventes usados [formiato de Amonio y HCl en etanol frío (96% v/v)], se adquirieron en Merck S.A. (Santiago, Chile). Los estándares para análisis de compuestos fenólicos se adquirieron en Sigma Aldrich (EE.UU.).

Equipamiento

Para el fraccionamiento de polisacáridos según peso molecular se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Agilent 1260 Infinity Serie; Alemania), equipado con una bomba cuaternaria G1311B, dos detectores de índice de refracción G1362A y G1315D, dos columnas en serie Shodex SB-803 HQ y SB-804 HQ (Japón) y un computador. Para la extracción de polisacáridos de las muestras de vinos, se ocupó una centrífuga Heraeus Labofuge 400 (Alemania) y un rotavapor Büchi B-491 (Suiza). Los análisis fenólicos (Fenoles totales, taninos totales, antocianos totales e intensidad colorante) se realizaron mediante espectrofotometría, utilizando el equipo espectrofotómetro UV-VIS Pharmaspec, modelo UV-1700 (Shimadzu, Kyoto, Japón).

Métodos

Tratamientos y diseño experimental

Se estableció un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA), a excepción del análisis sensorial, en el cual se implantó un diseño en bloques completos aleatorizados (DBCA) (12 bloques constituidos por los evaluadores). El estudio se constituyó por tres tratamientos: (T0, testigo), sin adición de manoproteínas comerciales; (T1) con adición de manoproteínas comerciales al comienzo de la fermentación alcohólica y (T2) adición de manoproteínas comerciales finalizada la fermentación alcohólica. Cada tratamiento constó de 3 repeticiones, es decir, 9 depósitos con vino en total. La unidad experimental correspondió al vino contenido en los depósitos plásticos de 25 L. A su vez, de cada depósito se obtuvo una muestra, es decir, 9 muestras en total, las cuales fueron embotelladas. La unidad muestral correspondió al vino contenido en las botellas de vidrio de 750 mL.

Procedimiento

Las uvas fueron cosechadas con 25° Brix, luego se transportaron en gamelas de 20 kg de capacidad a la Planta Piloto de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Luego, se despalillaron y molieron, comenzando un proceso de vinificación.

Al inicio del proceso de vinificación se hizo una maceración en frío (10°C) con adición de anhídrido sulfuroso a partir de una solución de metabisulfito de potasio al 10%. A continuación, se efectuó un análisis de acidez de titulación, el cual determinó la corrección del mosto con 20g de ácido tartárico por depósito. El mosto se mantuvo entre 18 y 28 °C, se inoculó levadura previamente hidratada en dosis de 30 g/hL y se realizaron 3 remontajes diarios en los depósitos de plástico de 25 L de uso alimentario, de acuerdo a lo descrito por Pszczółkowski y Ceppi de Lecco (2012).

Por otro lado, Pszczółkowski y Ceppi de Lecco (2012) han determinado que la fermentación alcohólica se dará por terminada cuando la densidad alcance entre 993 y 995 g/L, manteniéndose esta condición por dos días consecutivos, lo cual se cumplió a cabalidad. Una vez terminada la fermentación, se aplicó anhídrido sulfuroso en dosis de 6 g/hL.

Las manoproteínas comerciales se prepararon y aplicaron al inicio de la fermentación alcohólica y después de esta en el descube (T1 y T2 respectivamente) de acuerdo a la ficha técnica del producto, utilizando una dosis de acuerdo a la recomendación de la empresa (150 mg/L) en un volumen de agua igual a 10 veces su peso (Enartis, 2013).

Una vez terminado el proceso de vinificación se embotelló el vino y se mantuvo en esta condición durante dos meses, para luego realizar los análisis correspondientes a este estudio (Pszczółkowski y Ceppi de Lecco, 2012).

Variables medidas

Análisis básicos

pH. Se midió mediante potenciometría utilizando 200 mL de muestra (Bordeau y Scarpa, 1998).

Acidez de titulación. Se midió mediante la titulación con una base fuerte y con la presencia de un indicador ácido-base (azul de Bromotimol) (García, 1990).

Azúcares reductores. Se determinó mediante la reacción entre el vino y la solución de Fehling Causse-Bonnans (García, 1990).

Grado alcohólico. Se midió mediante el método densimétrico (Bordeau y Scarpa, 1998).

Análisis fenólicos

Fenoles totales. Medición de tipo espectrofotométrica a una absorbancia de 280 nm (García, 1990).

Taninos totales. Se determinaron por medio de la utilización de metilcelulosa (Mercurio et al., 2007).

Antocianos totales. La determinación de antocianos totales se realizó por decoloración con bisulfito (García, 1990), midiéndose a una absorbancia de 520 nm.

Intensidad colorante. Por medición de absorbancia a 420+520+620 nm (García, 1990).

Análisis de polisacáridos

Fraccionamiento y concentración de polisacáridos según peso molecular. Para determinar si habían diferencias en las fracciones de polisacáridos presentes en las muestras de los diversos tratamientos se utilizó el método propuesto por Ayestarán et al. (2004), con modificaciones de acuerdo a las condiciones del laboratorio de Análisis Cromatográfico, detalladas a continuación. Para la identificación de los polisacáridos, se centrifugaron 25 mL de muestra (1.370 g, 30 min), para posteriormente tomar 10 mL y concentrarlos en un rotavapor (35 °C). La fracción insoluble obtenida (alrededor de 2 mL) se precipitó con 10 mL de solución 0,3 M HCl en etanol refrigerado al 96% v/v, refrigerándose por 24 horas. Luego se procedió a centrifugar las muestras (1.370 g, 25 min). El precipitado obtenido se lavó con 1 mL de etanol ácido refrigerado (96% v/v) con porciones de 0,3mL, aproximadamente, eliminando toda solución sobrenadante. Finalmente, los residuos se secaron en estufa a 50 °C por 1 hora.

La fracción obtenida fue reconstituida con 1 mL de fase móvil de formiato de amonio 30 mM, filtrándola por medio de membranas de 0,22 µm.

Las fracciones de mezclas de polisacáridos según el peso molecular se detectaron con cromatografía líquida de alta eficacia, donde el flujo y volumen de inyección fue de 0,6 mL/min y 100 µL, respectivamente. Para la cuantificación de dichas fracciones se utilizó una curva de calibración a partir de estándares de dextranos y pectinas.

Análisis sensorial

Las evaluaciones se realizaron utilizando cabinas individuales, equipadas con un computador, “mouse”, escupidero, botón de llamada e iluminación con luz blanca. Estas evaluaciones se llevaron a cabo por un panel entrenado de 12 evaluadores pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, los cuales analizaron las muestras de los tratamientos en una sesión (Noble et al., 1991). Dichas muestras fueron situadas en forma aleatorizada dentro de cada cabina, en copas transparentes, conteniendo 15 mL de vino a temperatura ambiente (Robichaud y Noble, 1990). La pauta utilizada para este análisis está compuesta por una escala (línea horizontal) de 0 cm a 15 cm, siendo 0 cm la menor intensidad del parámetro y 15 cm la mayor intensidad respectivamente (Lawless y Heymann, 2010; Muñoz, 2013). Con esta pauta se evaluaron los siguientes parámetros, intensidad colorante en la fase visual; intensidad aromática y aroma a frutos rojos en la fase olfativa, y dulzor, cuerpo, astringencia, amargor, acidez y persistencia en la fase gustativa.

En cada parámetro los evaluadores constaron de un tiempo total de 90 segundos para analizar las muestras y, en el caso de la fase gustativa, se otorgó un período de descanso de 40 segundos, entre evaluación de muestras, para así relubricar la cavidad bucal y evitar la saturación del panel, según lo planteado por Noble et al. (1991).

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANDEVA), utilizando la prueba de rango múltiple de Tukey con un nivel de significancia del 5%. El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el software Infostat (Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis básicos

Cuadro 1. Resumen estadístico de los análisis básicos, realizados a los distintos tratamientos.

| Tratamiento | pH | Acidez de titulación | Azúcares reductores | Grado Alcohólico |
|-------------|---------------|-------------------------|---------------------|------------------|
| | | g eq. ácido tartárico/L | g eq. glucosa/L | g etanol/L |
| T0 | 3,07 ± 0,12 a | 4,51 ± 0,03 a | 1,56 ± 0,24 a | 14,87 ± 0,15 a |
| T1 | 3,13 ± 0,15 a | 4,53 ± 0,05 a | 1,63 ± 0,11 a | 15,32 ± 0,26 a |
| T2 | 3,17 ± 0,06 a | 4,52 ± 0,02 a | 1,65 ± 0,05 a | 15,27 ± 0,06 a |

*Medias con una letra común en sentido vertical no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. (*eq. = equivalentes).

pH

Coincidentemente con esto, el Cuadro 1 muestra que el momento de aplicación de las manoproteínas comerciales no influyó sobre el pH, lo cual es compatible con el trabajo de Fuentes (2000). En este estudio los vinos tintos tratados con manoproteínas no presentaron diferencias de pH, inclusive estos fueron idénticos entre los distintos tratamientos, no así con los vinos blancos tratados con estos polisacáridos, ya que estos presentaron pH mayores en comparación con otros tratamientos.

Acidez de titulación

En el Cuadro 1 se comprueba que no hay diferencias estadísticamente significativas de la acidez entre tratamientos. Con respecto a esto, Fuentes (2000) determinó que las dosis de Mannostab™ a agregar en vinos Chardonnay y Carménère corresponden a 25 y 30 g/hL, respectivamente, estas dosis son las mínimas que inhiben la formación y precipitación de cristales de bitartrato de potasio. Lo que podría explicar que no existiera la diferenciación esperada de acidez en el presente trabajo, ya que las dosis que se emplearon fueron de 15 g/hL.

Azúcares reductores

En este estudio, se observó que los vinos presentaron concentración bajo los 2 g/L de glucosa, lo que representaría la finalización de la fermentación alcohólica. Sin embargo, las concentraciones de azúcares reductores fueron similares entre los vinos, no observándose diferencias significativas entre los tratamientos. A pesar que se ha indicado que la adición de manoproteínas podría provocar un aumento en el nivel de azúcares reductores, debido a que el grupo aldehído de la manosa reacciona con el licor de Fehling (Fuentes, 2000), los resultados de este estudio demuestran que la adición de estos productos comerciales no afectaría la concentración de la materia reductora, coincidiendo con lo reportado por Fuentes (2000), quien analizó vinos tintos y blancos sometidos a distintos tratamientos con manoproteínas comerciales, los cuales no presentaron una influencia significativa sobre el contenido de azúcares reductores.

Grado alcohólico

Los vinos del estudio enriquecidos con manoproteínas presentaron similares contenidos de alcohol con respecto a los vinos control, lo que implicaría que el uso de estos productos no afectaría (Cuadro 1).

Esto concuerda con lo planteado por Fuentes (2000), quien obtuvo que tanto los vinos blancos como en los vinos tintos tratados con manoproteínas no presentaron diferencias significativas en comparación con sus testigos. Por su parte, Del Barrio-Galán et al. (2012) estudiaron distintos preparados comerciales derivados de levaduras (manoproteínas), donde detectaron que los parámetros enológicos pH, grado alcohólico, acidez total y contenido de ácido tartárico no mostraron diferencias significativas en los vinos.

Análisis fenólicos

Cuadro 2. Resumen estadístico de los análisis fenólicos, realizados a los distintos tratamientos.

| Tratamiento | Fenoles totales | Taninos totales | Antocianos totales | Intensidad colorante |
|-------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| | mg eq. ácido gálico/L | g eq. (-)-epicatequina/L | mg eq. malvidina -3- glucósido/L | Abs 420nm + 520nm + 620nm |
| T0 | 1572,33 ± 19,14 a | 2,11 ± 0,04 a | 448,78 ± 138,93 a | 19,19 ± 2,90 a |
| T1 | 1429,33 ± 25,97 b | 2,55 ± 0,34 ab | 457,06 ± 39,70 a | 20,23 ± 0,55 a |
| T2 | 1455,67 ± 8,62 b | 2,82 ± 0,26 b | 465,34 ± 23,56 a | 19,96 ± 1,31 a |

*Medias con una letra común en sentido vertical no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. (*eq. = equivalentes).

Fenoles totales

Se aprecia que existe variación estadísticamente significativa de los fenoles totales entre los tratamientos con aplicación del producto comercial (T1 y T2) y el testigo (T0), lo cual concuerda con lo planteado por Vasserot et al. (1997), quien menciona que las manoproteínas son capaces de combinarse con compuestos fenólicos, disminuyendo así el índice de polifenoles totales; este mecanismo bien puede ser exclusivamente físico, lo cual implica que el establecimiento de interacciones débiles y reversibles principalmente esté entre antocianos y paredes de levadura por adsorción (Vasserot et al., 1997) (Cuadro 2).

Taninos totales

En el Cuadro 2 se muestra una mayor concentración de taninos totales en los tratamientos con aplicación de manoproteínas comerciales, a pesar de que las manoproteínas se pueden combinar con los taninos en el vino (Escot et al., 2001) y que esta combinación da una concentración menor de tanino y una proporción mucho más baja de taninos libres, limitando la concentración de tanino elágico (Chatonnet et al., 1992). El hecho de que el método de determinación de taninos totales utilice metilcelulosa, un polisacárido, podría generar una mayor efectividad en la determinación de los taninos, no dejando taninos sin precipitar en el caso de los tratamientos T1 y T2, ya que al estar unidos los taninos a manoproteínas, formarían complejos más precipitables. Lo que explicaría por la mayor eficiencia del método, los mayores valores de taninos observados en dichos tratamientos respecto al testigo.

Por otra parte, (Cuadro 2) se puede observar que existe una variación entre el tratamiento T1 y el T2. En este último se encontraron los mayores niveles de taninos totales, lo que hace pensar que el momento de aplicación sí podría influir en esta variable. En este sentido, se podría decir que, si aplicamos las manoproteínas comerciales después de la fermentación alcohólica, la cantidad de taninos totales podría disminuir más que si aplicamos al inicio de la fermentación alcohólica.

A pesar de esto, no se puede dar por certero este planteamiento, ya que los datos estadísticos indican que no hay diferencias significativas. Pero, por otro lado, sí nos podrían dar un indicio sobre el comportamiento de las manoproteínas comerciales según su momento de aplicación.

Antocianos totales

Si bien no hubo diferencia estadísticamente significativa, según la prueba de Tukey, al comparar con el tratamiento testigo, se apreció que los tratamientos T1 y T2 poseen mayores concentraciones de antocianos y, a la vez, concentraciones menos dispersas entre repeticiones respecto a la media. Esto podría estar relacionado con el posible efecto que generan las manoproteínas en cuanto a estabilidad de materia colorante, ya que la teoría señala que estos polisacáridos se ligan a los copigmentos (taninos) de los antocianos, generando moléculas más estables (Feuillat y Charpentier, 1998) (Cuadro 2).

Intensidad colorante

En relación a que aún no se plantea con certeza el efecto de las manoproteínas sobre la materia colorante, (Cuadro 2) en este estudio no se produjeron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en cuanto a la intensidad colorante, pero a pesar de esto, se aprecia una menor dispersión de los datos respecto a las medias, en los tratamientos con adición del producto comercial que, en el testigo, lo que se podría explicar por la aplicación de estos polisacáridos.

Análisis de polisacáridos

Cuadro 3. Resumen estadístico de fracciones y concentración de polisacáridos, de los distintos tratamientos.

| Tratamiento | F1 (Polisacáridos neutros) | F2 (Polisacáridos ácidos) | F3 (Oligosacáridos) | Concentración total de polisacáridos |
|-------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------|---|
| | mg/L | mg/L | mg/L | mg/L |
| T0 | 555,67 ± 39,80 a | 134,33 ± 46,31 a | 191,67 ± 111,17 a | 881,67 ± 184,28 a |
| T1 | 768,67 ± 51,43 b | 668,67 ± 133,49 b | 627,67 ± 141,16 b | 2065,00 ± 324,90 b |
| T2 | 708,33 ± 42,48 b | 521,67 ± 225,62 b | 495,00 ± 102,10 b | 1725,00 ± 349,27 b |

*Medias con una letra común en sentido vertical no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. (*F1, F2 y F3 = fracciones).

Fraccionamiento y concentración de polisacáridos

En el Cuadro 3 del análisis de fraccionamientos de polisacáridos, se aprecia que existe una mayor cantidad de polisacáridos neutros en los tratamientos T1 y T2, en comparación a los testigos. A su vez, presentan mayor proporción que los polisacáridos ácidos y oligosacáridos. También se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las fracciones entre T1 y T2 en comparación con T0, lo cual se explica por la adición de manoproteínas comerciales en estos tratamientos. En esta línea Del Barrio-Galán et al. (2012), estudiaron la composición monosacáridica de distintos preparados comerciales derivados de levaduras, encontrando proporciones de manoproteínas bastante similares en las distintas muestras, del orden del 41-43%. No obstante, al igual que en este estudio (Cuadro 3), se produjeron diferencias importantes en relación a la proporción entre los polisacáridos de alto y bajo peso molecular, encontrando cantidades significativamente más altas de polisacáridos neutros (alto peso molecular) en los vinos tratados con preparados que en los vinos control, encontrándose una correlación positiva entre el contenido de manosa y el contenido de polisacáridos neutros.

Por otra parte, en el presente estudio se puede distinguir una diferencia entre las concentraciones totales de polisacáridos, donde el tratamiento testigo presentó una concentración menor con respecto a los otros dos tratamientos (T1 y T2), pero entre T1 y T2 no hubo diferencia significativa. Entonces, la aplicación de manoproteínas comerciales generó un efecto sobre la concentración de polisacáridos del vino, no obstante, el momento de aplicación en este sentido carece de relevancia, ya que no se apreció ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos donde se agregaron estos polisacáridos.

Análisis Sensorial

Fase visual y fase olfativa

Cuadro 5. Resumen estadístico de la fase visual y olfativa, de los distintos tratamientos.

| Tratamiento | Intensidad colorante | Intensidad aromática | Aroma a frutos rojos |
|-------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 0-15 cm | 0-15 cm | 0-15 cm |
| T0 | 8,69 a | 8,69 a | 6,75 a |
| T1 | 9,56 b | 9,50 b | 7,28 a |
| T2 | 10,03 b | 9,97 b | 7,42 a |

*Medias con una letra común en sentido vertical no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%.

Fase Visual

La intensidad colorante en el análisis sensorial mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos; los tratamientos con aplicación de manoproteínas comerciales poseen una mayor intensidad, que el tratamiento testigo, lo que coincide con la posible estabilidad de materia colorante provocada por la acción de manoproteínas. En relación a lo planteado, Escot et al. (2001) indican que las manoproteínas de levadura se pueden combinar con los antocianos en el vino; esta combinación parece aumentar la estabilidad del color. En base a esto, la teoría señala que las manoproteínas son adsorbidas por las moléculas coloidales de antocianos y copigmentos, cubriendo la superficie de estos coloides y además evitando su degradación y precipitación (Feuillat y Charpentier, 1998).

Fase olfativa

En este estudio se produjeron diferencias estadísticamente significativas entre los vinos con aplicación de manoproteínas comerciales y el tratamiento testigo con respecto a la intensidad aromática, lo cual se explica por la retención de los compuestos aromáticos gracias a la acción de las manoproteínas y la posible volatilidad de los mismos compuestos en los vinos sin aplicación de estos polisacáridos. Además, la mayor intensidad aromática en los tratamientos

T1 y T2, se puede relacionar a la liberación tardía de los compuestos aromáticos (provocada por las manoproteínas), percibiéndose a nivel retronasal (Chalier et al., 2007) (Cuadro 5).

Fase gustativa

Cuadro 6. Resumen estadístico de la fase gustativa, de los distintos tratamientos.

| Tratamiento | Dulzor | Cuerpo | Astringencia | Amargor | Acidez | Persistencia |
|-------------|---------|---------|--------------|---------|----------|--------------|
| | 0-15 cm | 0-15 cm | 0-15 cm | 0-15 cm | 0-15 cm | 0-15 cm |
| T0 | 2,00 a | 8,14 a | 9,78 a | 6,64 a | 9,69 a | 8,72 a |
| T1 | 5,36 b | 9,64 b | 3,75 b | 2,08 b | 9,22 a b | 9,19 a |
| T2 | 4,97 b | 9,61 b | 3,78 b | 2,11 b | 8,67 b | 9,36 a |

*Medias con una letra común en sentido vertical no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%.

Fase gustativa

A pesar de que en este estudio las dosis de manoproteínas comerciales fueron bajas (150 mg/L) en relación a otros estudios, como el de Fuentes (2000), donde se aplicaron 300mg/L, el efecto producido a nivel sensorial sí fue importante, (Cuadro 6) observándose diferencias estadísticamente significativas de percepción en la mayoría de los parámetros como dulzor, cuerpo y acidez, destacándose las diferencias en la astringencia y amargor, lo que, a su vez, corrobora el resultado de los estudios que plantean la fuerte interacción de las manoproteínas y los taninos, produciendo, así, vinos más suaves y menos amargos. Por otra parte, el parámetro de persistencia no se afectó por la aplicación del producto comercial, ya que, no se produjeron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Complementando lo mencionado en el párrafo anterior, la presencia de estos compuestos (manoproteínas) a las concentraciones del vino (50 mg/L), se agruparían con los taninos formando macroestructuras estables, que, al no poder reaccionar con las proteínas de la saliva, no generarían la sensación de astringencia (Zamora, 2003; Riou et al., 2002). De la misma manera, se ha observado que los vinos tratados con manoproteínas presentarían una mayor redondez sensorial, percepción asociada a una baja astringencia (Guadalupe et al., 2007).

CONCLUSIÓN

La adición de manoproteínas comerciales al inicio o después de la fermentación alcohólica tiene efecto significativo en algunas variables químicas de un vino de “Cabernet Sauvignon”, principalmente en la concentración de fenoles y taninos totales, en las fracciones de polisacáridos de diferente peso molecular y en la concentración total de estos mismos.

En relación al análisis sensorial, se observa que las manoproteínas comerciales, independientemente del momento de adición, disminuyen la percepción de astringencia, amargor y acidez, aumentando la percepción de intensidad colorante y aromática, así como dulzor y cuerpo, en un vino de “Cabernet Sauvignon”.

Finalmente, según los resultados de este estudio, es posible concluir que el efecto de un producto comercial a base de manoproteínas sobre la composición química y sensorial de un vino, no está estrechamente ligada al momento de aplicación durante la vinificación.

BIBLIOGRAFÍA

Amory, D. E., P. G. Rouxhet, and J.P. Dufour. 1988. Flocculence of brewery yeasts and their surface properties: chemical composition, electrostatic charge and hydrophobicity. *Journal of the Institute of Brewing*, 94(2): 79-84.

Ayestarán, B.; Z. Guadalupe and D. León. 2004, June. Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 513(1):29-39.

Bordeu, E. y J. Scarpa. 1998. Análisis químico del vino. Santiago de Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile. 253p.

Bowen, W. R. and T. J. Ventham. 1994. Aspects of yeast flocculation, size distribution and zeta potential. *Journal of the Institute of Brewing*, 100(3): 167-172.

Caridi, A. 2006, May. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89(3-4): 417-422.

Cid, V. J., A. Durán., F. Del Rey., M.P. Zinder., C. Nombela and M. Sánchez. 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 59: 345-386.

Chalier, P., B. Angot., D. Delteil., T. Doco and Z. Gunata. 2007. Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chemistry*, 100: 22-30.

Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J. N.; Pons, M.; 1992: The origin of ethylphenols in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 165-178.

Comuzzo P., L. Tat, D. Fenzy, L. Brotto, F. Battistuta and R. Zironi. 2011. Interactions between yeast autolysates and volatile compounds in wine and model solution. *Food Chemistry*, 127: 473-480.

De Rosa, T. 1998. Tecnología de los vinos blancos. Barcelona, España: Ediciones Mundi-Prensa. 528p.

Del Barrio-Galán, R. 2012. Crianza sobre lías y uso de preparados comerciales derivados de levadura en la calidad de vinos blancos y tintos. Tesis doctoral. Salamanca, España: Universidad de Salamanca. 353p.

Doco, T., P. Williams and V. Cheynier. 2007. Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16): 6643-6649.

Dubourdieu, D. and V. Moine. 1997. Role of yeast mannoproteins in tartrate stability of wines. *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques*, 85: 17.

Enartis. 2013. Polisacáridos de levadura y de uva. [En línea]. Santiago, Chile. Recuperado en: <http://www.enartis.com/schede/tecniche/PROBlancoSTrev0_2013_es.pdf>. Consultado el: 20 de octubre de 2014.

Escot, S., M. Feuillat., L. Dulau and C. Charpentier. 2001. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(3): 153-159.

Feuillat, M. and C. Charpentier. 1998. Yeast's mannoproteins: a new possible oenological adjuvant. *Bulletin-Office International de la Vigne et du Vin*, 71(813,814): 944-967.

Fleet, G. H. and D.J. Manners. 1977. The enzymic degradation of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Genetic Microbiological*, 98: 315-327.

Frohman, C.A. and R. Mira de Orduña. 2013, August. Cellular viability and kinetics of osmotic stress associated metabolites of *Saccharomyces cerevisiae* during traditional batch and fed-batch alcoholic fermentations at constant sugar concentrations. *Food Research International*, 53(1): 551-555.

Fuentes, L. 2000. Estabilización tartárica de vinos mediante el uso de manoproteínas: comparación con otros métodos. Tesis Ingeniero Agrónomo, Mención Enología y Vitivinicultura. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 63h.

García, J. 1990. Técnicas analíticas para vinos. Barcelona, España: GAB. 300p.

Gawel, R. 1998. Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4: 74-95.

Gerbaud V., Gabas N., Laguerie C., Blouin J., Vidal S., Moutounet M. and Pellerin P. 1996. Effect of wine polysaccharides on the nucleation of potassium hydrogen tartrate in model solutions. *Chemical Engineering Research & Design*, 74: 782 -790.

Giovani, G.; V. Canuti and I. Rosi. 2010, February. Effect of yeast strain and fermentation conditions on the release of cell wall polysaccharides. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3): 303-307.

Gonçalves, F. and A. Heyraud. 2002. Characterization of white wine mannoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21): 6097-6101.

Guadalupe, Z.; Palacios, A. and B. Ayestarán. 2007. Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4854-4862.

Guadalupe, Z. and B. Ayestarán. 2008. Effect of commercial mannoprotein addition on polysaccharide, polyphenolic, and color composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9022-9029.

Guadalupe, Z., L. Martinez and B. Ayestarán. 2010. Yeast mannoproteins in red winemaking: Effect on polysaccharide, polyphenolic, and color composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61 (2): 191-200.

Henderson, C.; W. Zeno; L. Lerno; M. Longo and D. Block. 2013, September. Fermentation temperature modulates phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol levels in the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*, 79(17): 5345-5356.

Hidalgo, J. 2003. Tratado de Enología. Volumen 1. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa. 1423p.

Hidalgo, J. 2010. Tratado de Enología. 2^{da} edición. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa. 1823p.

Jouquand, C., Y. Aguni., C. Malhiac and M. Grisel. 2008. Influence of chemical composition of polysaccharides on aroma retention. *Food Hydrocolloids*, 22(6): 1097-1104.

Lathey, K.A.; B.R. Bramley and I.L. Francis. 2010, February. Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Australian Journal of Grape Wine Research*, 16(1): 189–202.

Lawless, H. T. and H. Heymann. 2010. Sensory evaluation of food: principles and practices. New York, USA.: Springer. 596p.

López, E. 2010, enero. El papel de las manoproteínas. [En línea]. España. Recuperado en: <[http://www.agrovin.com/agrv/pdf/documentacion/articulos/manoproteínas_elaboracion_vinos_calidad.pdf](http://www.agrovin.com/agrv/pdf/documentacion/articulos/manoproteinas_elaboracion_vinos_calidad.pdf)>. Consultado el: 1 de octubre de 2013.

Lubbers, S., B. Leger., C. Charpentier and M. Feuillat. 1993. Inhibitory effect of yeast wall extracts on the potassium hydrogen tartrate precipitation in an ethanolic solution. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 27: 13-22.

Lubbers, S., C. Charpentier., M. Feuillat and A. Voilley. 1994. Influence of yeast cell walls on the behavior of aroma compounds in a model wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 29-33.

McMurry, J. 2008. Química Orgánica. 7^{ma} ed. Santa Fe, México: Cepage Learning Editores. 1002p.

Mercurio, M.; R. Damberg; M. Herderich and P. Smith. 2007, May. High throughput analysis of red wine and grape phenolics adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12): 4651–4657.

Moine-Ledoux, V., A. Perrin, I. Paladin and D. Dubourdieu. 1997. First result of tartaric stabilization by adding mannoproteins (Mannostab (R)). *Journal International des Sciences de la Vigne et du vin*, 3 (1): 23-31.

Moine-Ledoux, V. and D. Dubourdieu. 2002. Role of yeast mannoproteins with regard to tartaric stabilization of wines. *Bulletin- Office International de la Vigne et du Vin*, 75 (857,858): 471-482.

Molina, M., C. Gil, J. Pla., J. Arroyo and C. Nombela. 2000. Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microscopy research and Technique*, 51: 601-612.

Muñoz, C. 2013. Influencia de goma arábica y carboximetilcelulosa en la interacción tanino-proteína y su eventual efecto en la astringencia. Tesis Ingeniero Agrónomo, Mención Enología y Vitivinicultura. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.76h.

Navascués. E. 2010. El papel de las manoproteínas en la elaboración de vinos de calidad. *Enología VinoTeQ*, 47: 21-23.

Nguyen, T., G. and P.Rogers. 1998. Composition of the cell walls of several yeast species. *Application Microbiological Biotechnology*, 50: 206-212.

Noble A.C.; N.L. Matysiak and S. Bonnans. 1991, November. Factors affecting the time-intensity parameters of sweetness. *Food Technology*, 45(11): 121–126.

Obreque Slier, E.; A. Peña Neira; R. López Solís; F. Zamora Marín; J.M. Da Silva and O. Laureano. 2010, February. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6): 3591–3599.

Palomero, F., A. Morata., S. Benito., M.C. González and J. A. Suárez-Lepe. 2007. Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and on wine monomeric anthocyanin content. *Food Chemistry*, 105: 838-846.

Pellerin, P. and J. C. Cabanis, 1998. Los glúcidos. (pp. 66-96). En: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. 2^{da} ed. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa. 805p.

Pozo-Bayón, M., I. Andújar-Ortiz and M., V. Moreno-Arribas. 2009. Preparados enológicos comerciales a base de levaduras secas inactivas: modo de acción y principales aplicaciones durante la vinificación. *ACE: Revista de enología*, 110: 2.

Pszczółkowski P. y C. Ceppi de Lecco. 2012. *Manual de Vinificación: guía práctica para la elaboración de vinos*. Santiago, Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile. 122p.

Riou, V., A. Vernhet., T. Doco and M. Moutounet. 2002. Aggregation of grape seed tannins in model wine effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 16.

Robichaud A.C. and A. Noble. 1990. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53(3): 343-353.

Troszyńska, A., O. Narolewska., S. Robredo., I. Estrella., T. Hernández., G. Lamparski and Amarowicz. 2010. The effect of polysaccharides on the astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference*, 21(5): 463-469.

Vasserot, Y., Caillet, S. and Maujean, A. 1997. Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 433-437.

Verduyn, C., E. Postma., W. Scheffers and J. Van Dijken. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeast: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*, 8: 501-517.

Vernhaut, A., P. Pellerin, C. Prieur, J. Osmianski and M. Moutounet. 1996. Charge properties of some grape and wine polysaccharide and polyphenolic fractions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(1): 25-30.

Vidal, S., P. Williams., T. Doco., M. Moutounet and P. Pellerin. 2003. The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54(4): 439-447.

Vidal, S., P. Courcoux., L. Francis., M. Kwiatkowski., R. Gawel., P. Williams., E. Waters and V. Cheynier. 2004a. Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, 15(3): 209-217.

Vidal, S., L. Francis., P. Williams., M. Kwiatkowski., R. Gawel., V. Cheynier and E. Waters. 2004b. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry*, 85(4): 519-525.

Wines of Chile. 2013. Variedades de uvas. [En línea]. Santiago, Chile. Recuperado en: <<http://www.winesofchile.org/espanol/variedades-de-uvas/>>. Consultado el: 20 de septiembre de 2013.

Zamora, F. 2003. Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. AMV Ediciones. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa. 224p.

Zoecklein, B., K. Fugelsang., B. Gump y F. Nury. 2000. Análisis y producción de vino. Zaragoza, España: Editorial Acrivia S.A. 613p.

Zlotnik, H., M.P. Fernández., B. Browsers and E. Cabib. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* manoproteins from an external cell wall layer that determines wall porosity. *Journal of Bacteriology*, 159:1018-1026.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica Enartis Pro-Blanco

Enartis Pro-Blanco es un producto formado a partir de cortezas de levaduras con elevado contenido de manoproteínas (que se solubilizan inmediatamente) y aminoácidos sulfurados de actividad antioxidante. Es una formulación en polvo, color blanco crema, que funciona como coadyuvante de fermentación, usado generalmente en vinos blancos o rosados. Se obtiene a partir de un tratamiento térmico de inactivación de una cepa de levadura. La modalidad con la que se realiza el tratamiento térmico permite disponer de un elevado porcentaje de manoproteínas libres, capaces de ejercer inmediatamente sus efectos estabilizantes sobre los compuestos presentes en el mosto (Enartis, 2013).

Enartis Pro-Blanco genera, en cuanto a la estructura, un aumento de las sensaciones de suavidad y volumen, gracias al aporte de elevadas cantidades de manoproteínas y polisacáridos, las que, a su vez, ayudan a reducir la sensación de amargor (Enartis, 2013).

Dosis

En vinos tempranos (vinos que se venden 4 meses después de la cosecha), se recomienda para vinos blancos, utilizar dosis de 10 gramos por hectolitro y en vinos rosados 10 a 15 gramos por hectolitros (Enartis, 2013).

Modo de empleo

Se recomienda añadir el producto Enartis Pro Blanco al comienzo de la fermentación alcohólica, al momento de rellenar el depósito, procurando haber disuelto las dosis establecidas en un volumen de agua igual a 10 veces su peso de forma homogénea, antes de agregar al mosto desfogado en el llenado de tanque. Además, se sugiere homogeneizar con un remontado (Enartis, 2013).