

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO DEL USO DE LISOZIMA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS
QUÍMICAS, FÍSICAS Y SENSORIALES DE UN VINO CARMÉNÈRE
SOMETIDO A GUARDA CON USO DE MICROOXIGENACIÓN**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN ENOLOGÍA Y
VITIVINICULTURA

DANIELA ANDREA SALINAS DES CHANALET

DIRECTOR DE TESIS
ÁLVARO IVÁN PEÑA NEIRA

PROFESORES CONSEJEROS
ELÍAS OBREQUE SLIER
EDMUNDO ACEVEDO HINOJOSA

SANTIAGO – CHILE
2012

UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO**

**EFFECTO DEL USO DE LISOZIMA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS
QUÍMICAS, FÍSICAS Y SENSORIALES DE UN VINO CARMÉNÈRE
SOMETIDO A GUARDA CON USO DE MICROOXIGENACIÓN**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN ENOLOGÍA Y
VITIVINICULTURA

DANIELA ANDREA SALINAS DES CHANALET

	Calificaciones (Tesis de Título)	Calificaciones (Tesis de Grado)
Director de tesis		
Sr. Álvaro Peña Neira Dr. Ingeniero Agrónomo Enólogo	6,0	Aprobada
Profesores consejeros		
Sr. Elías Obreque Slier Dr. Ingeniero Agrónomo	6,0	Aprobada
Sr. Edmundo Acevedo Hinojosa Dr. Ingeniero Agrónomo	5,0	Aprobada

SANTIAGO – CHILE
2012

*El Chuico y la Damajuana
Después de muchos percances
Para acabar con los chismes
Deciden matrimoniarse*

*Subieron a una carreta,
Tirada por bueyes verdes
Uno se llamaba ¡Chicha!
Y el compañero ¡Aguardiente!*

*Como era pleno invierno
Y había llovido tanto
Tuvieron que atravesar
Un río de vino blanco.*

*Tan bien se sentía el Chuico
Juntito a su Damajuana
Que el sauce llorón reía
Y el cactus acariciaba.*

*En la puerta de la iglesia
Hallaron al señor cura
Que estaba rezando un credo
Con un rosario de uvas.*

*Como no invitaron más
Que gente de la familia
El padrino fue un barril
Y la madrina una pipa.*

*Cuando volvieron del pueblo
Salieron a recibirlos
Un odre de vino blanco
Y un fudre de vino tinto.*

*Todo estaba preparado
Y para empezar la gresca
Un vaso salió a bailar
Un vals con una botella.*

*La fiesta fue tan movida
Y tuvo tal duración
Que según cuenta un embudo
Duró hasta que se acabó.*

(El Chuico y la Damajuana, Nicanor Parra)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por dárme todo en esta vida, apoyarme en cada momento. A mi mamá por sus palabras de aliento y superación. A mi padre por su confianza en mi y su orgullo. Los amo.

A mi hermana por su incondicionalidad, su amor, su fuerza y su alegría.

Al amor de mi vida por su comprensión infinita, que sin ella esta tesis no existiría, su amor por montones y ayuda en cada segundo.

A mi abuela, mis tíos y mis primos por acogerme, apoyarme, soportarme y quererme.

A mi profesor guía Álvaro Peña N. por el tiempo dedicado, sus buenos consejos y enseñanzas.

Al Consorcio Surandino S.A., en nombre de su enólogo Sr. Oscar Salas S. por proporcionarme instalaciones, insumos y consejos en el montaje de este ensayo.

Finalmente, pero no menos importantes, a mis amigos, a los de siempre, a los de lejos, a los de cerca y a los que encontré en el camino.

Infinitas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
Palabras claves	2
ABSTRACT	3
Keywords	4
INTRODUCCIÓN	5
Hipótesis de trabajo	7
Objetivos	7
CAPITULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
Referencias bibliográficas	14
CAPITULO II: EFECTO DEL USO DE LISOZIMA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y SENSORIALES DE UN VINO CARMÉNÈRE SOMETIDO A GUARDA CON USO DE MICROOXIGENACIÓN	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Lugar de estudio	19
Materiales	19
Metodología	20
Determinaciones analíticas	21
Análisis básicos	21
Análisis polifenólicos	22
Análisis sensorial	23
Diseño experimental y análisis estadístico	23
RESULTADOS	24
Análisis básicos	24
Acidez titulable	24
pH	24
Azúcares reductores	24
Anhídrido sulfuroso libre y total	24
Acidez volátil	24
Análisis de la composición fenólica	25
Fenoles totales	25
Antocianos totales	25
Taninos totales	25
Índice de gelatina	25
Copigmentación	25
Intensidad colorante	25

Matiz	25
Coordenadas cromáticas CIEL *a*b*	26
Coordenadas esféricas	26
Fraccionamiento de flavanoles	26
Análisis sensorial	28
DISCUSIÓN	29
Análisis básicos	29
Acidez titulable	29
pH	29
Azúcares reductores	29
Anhídrido sulfuroso libre y total	30
Acidez volátil	30
Análisis de la composición fenólica	32
Fenoles totales	32
Antocianos totales	33
Taninos totales	34
Índice de gelatina	35
Copigmentación	36
Intensidad colorante	36
Matiz	37
Coordenadas cromáticas CIEL *a*b*	37
Coordenadas esféricas	39
Fraccionamiento de flavanoles	40
Evaluación sensorial	41
Fase visual	41
Fase olfativa	41
Fase gustativa	42
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXOS	50

ABREVIATURAS

cv	: Cultivar
EAG	: Equivalentes ácido gálico
mal-3-glu	: Malvidina- 3- glucósido
equiv. procianidina	: Equivalentes de procianidina
IC	: Intensidad Colorante
IG	: Índice de Gelatina
OIV	: Organización Internacional de la Viña y el Vino
FI	: Fracción uno (Monómeros)
FII	: Fracción dos (Oligómeros)
FIII	: Fracción tres (Polímeros)
kDa	: kiloDalton

RESUMEN

Esta investigación tuvo por objetivo establecer si el uso de lisozima afectaba las características químicas, físicas y sensoriales en un vino Carménère. Este vino en estudio contó con la aplicación de microoxigenación y guarda con duelas de roble americano como parte de su elaboración.

Se quiso establecer si al utilizar lisozima ésta aumentaba la estabilidad colorante y además la polimerización de taninos.

Las muestras de vino del cv. Carménère, provenientes de la Bodega Patacón del Consorcio Surandino, se almacenaron en cubas de acero inoxidable de 1000 litros. Se utilizó un testigo tratado con una dosis de anhídrido sulfuroso y otras dos muestras a las cuales se les aplicó dos dosis diferentes de lisozima (30 y 60 g/hL respectivamente) realizando análisis básicos como: acidez titulable, pH, acidez volátil, anhídrido sulfuroso libre y total y azúcares reductores; análisis de polifenoles tales como: fenoles totales, antocianos totales, taninos totales, índice de gelatina, fraccionamiento de taninos; y análisis de la fracción colorimétrica como: intensidad colorante, matiz, espacio Cielab y copigmentación.

Se observó que el vino tratado con la menor dosis de lisozima, efectivamente aumenta la estabilidad del color. Esto se demostró por la correlación positiva entre el análisis de intensidad colorante y el análisis de copigmentación ($r=0,62$; $p\text{-valor}<0,05$).

La aplicación de microoxigenación complementada con el uso de duelas de roble genera una disminución de antocianos totales, pero a su vez permite aumentar la estabilidad de éstos, ya que ayuda a incrementar el porcentaje de antocianos combinados a taninos. Esto se ve reflejado en el tratamiento 2, que fue el que presentó un mayor porcentaje de la fracción polimérica, es uno de los tratamientos en donde se utilizó una dosis de lisozima de 30 g/hL lo que llevaría a concluir que esta dosis sería la adecuada para su uso en bodega.

Por otra parte el uso de lisozima, que conlleva a una mayor formación de

estructuras de polímeros pigmentados, no afecta la calidad sensorial del vino tratado con éste producto respecto al tratamiento testigo (con adición de anhídrido sulfuroso).

Palabras claves:

Lisozima

Microoxigenación

Copigmentación

Intensidad colorante

Espectrofotometría

ABSTRACT

EFFECT OF LYSOZYME USE ON THE CHEMICAL, PHYSICAL AND SENSORY CHARACTERISTICS OF THE CARMÉNÈRE WINE UNDER AGING WITH USE OF MICROOXYGENATION

This research aimed to establish whether use of lysozyme affected the chemical, physical and sensory features in a Carménère wine. This wine had studied the application of microoxygenation and aging with American Oak staves as part of their elaboration.

It was intended establish whether using lysozyme increased colorant stability and also the tannins polymerization.

The wine samples of cv. Carménère from the Patacón Winery of Surandino Consortium were stored in stainless steel tanks of 1000 liters. It was used a control sample treated with a dose of sulfur dioxide and another two samples which were applied two different doses of lysozyme (30 and 60 g/hL respectively) making basics analyses such as: titratable acidity, pH, volatile acidity, free and total sulfur dioxide and residual sugars; phenolic analyses such as: total phenols, total anthocyanins, total tannins, gelatine index, tannin fractionation; and colorimetric fraction analyses such as: color intensity, hue, Cielab space and copigmentation.

It was observed that the wine treated with lower dose of lysozyme, in fact increases the color stability. This was demonstrated by the positive correlation between the color intensity and copigmentation analyses ($r= 0,62$; p -value $<0,05$).

The microoxygenation application complemented with the use of oak staves contributes to the decrease in total anthocyanins, but allows the stability of these because it helps to increase the percentage of anthocyanins combined with tannins. This has shown in treatment 2, which was the one who presented the highest polymeric fraction percentage, it is one of the treatments where it was used a 30 g/hL lysozyme dose, thereby leading to conclude that this dose would be appropriate for use in winery.

On the other hand the lysozyme use, which leads to increased formation of pigmented polymer structures, it doesn't affect the sensory quality of wine treated with this product than the control (with sulfur dioxide addition).

Key words:

Lysozyme

Microoxygenation

Copigmentation

Colorant Intensity

Spectrophotometry

INTRODUCCIÓN

Dentro de la industria vitivinícola y más específicamente dentro del trabajo en bodega existe la preocupación constante de innovar en el uso de insumos, para lograr menores costos de producción y la elaboración de vinos cada vez más comerciales, que al mismo tiempo sean vinos de alta calidad.

Debido a lo anterior es que se observa la necesidad de contar con insumos convenientes para el desarrollo de la evolución física y química del vino y su posterior comercialización, como es el caso de la lisozima, que ayuda a aminorar las dosis de anhídrido sulfuroso, retrasar la fermentación maloláctica y también a incidir positivamente en las características organolépticas de un vino terminado (Bartowsky *et al.*, 2004).

La razón de disminuir la dosis de anhídrido sulfuroso en el vino es que se piensa que al no estar este compuesto presente facilitaría el aumento de la intensidad colorante y la polimerización de taninos, debido a que estas combinaciones entre antocianos y taninos pueden ser directas o mediadas por un acetaldehído. El acetaldehído u etanal, se forma a partir de la oxidación del etanol presente en el vino, la presencia de etanal estabiliza el color, y modifica la astringencia y el amargor en el vino (Es-Safi *et al.*, 1999; Saucier *et al.*, 2004). El acetaldehído compite por el sitio de unión en la molécula de antociano con el anhídrido sulfuroso (Zamora, 2003).

Al no estar haciendo uso del anhídrido sulfuroso en la elaboración de los vinos, éstos quedan más desprotegidos desde un punto de vista de ataques microbiológicos. Por lo anterior es que se hace necesario el uso de lisozima, ya que ésta posee una actividad bactericida o bacteriostática frente a bacterias gram positivas como es descrito por Fleming en 1902 y pequeño efecto a las gram negativas (Delfini *et al.*, 2004), a través de la destrucción de peptidoglicano presente en este tipo de bacterias (Sharon *et al.*, 1966).

El mecanismo de acción de la lisozima como agente antibacteriano se encuentra en su actividad hidrolítica de cadenas de *N*-acetil-d-glucosamina o derivados de ésta (Lowe *et al.*, 1967), cortando la unión entre *N*-acetil-

muramico y N-acetil-glucosamina, como es en el caso del peptidoglicano presente las paredes celulares de las gram positivas (McKenzie y White, 1991).

La creciente necesidad de comercializar rápidamente las líneas de producción dentro de la bodega, es lo que ha llevado a buscar alternativas a la crianza del vino en barricas de roble, más sencillas y económicas (Zamora, 2003).

Las alternativas a la crianza del vino en barricas se centran en la necesidad de cubrir dos aspectos, la estabilización de la materia colorante y la suavización de la astringencia, como también el aporte al vino de aromas y taninos elágicos que complementen sensorialmente al vino (Zamora, 2003).

Por esta razón las técnicas alternativas a la crianza en barrica se pueden sintetizar en dos: la microoxigenación y la aromatización con fragmentos de madera de roble. Ambas técnicas son complementarias (Zamora, 2003).

Son escasos los estudios asociados al uso de lisozima y su efecto sobre las características físicas, químicas y sensoriales de los vinos.

Por lo antes expuesto es que se ha propuesto esta investigación que ampliará la comprensión del efecto de la lisozima combinada con el uso de duelas y microoxigenación en el proceso de vinificación dentro de la industria vitivinícola chilena.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El uso de lisozima aumenta la estabilidad del color y la polimerización de taninos en un vino Carménère sometido a microoxigenación y guarda con duelas de roble americano.

OBJETIVOS

Establecer el efecto del uso de lisozima sobre las características químicas, físicas y sensoriales en un vino Carménère con aplicación de microoxigenación y guarda con duelas de roble americano.

CAPITULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Son muchos los componentes que en conjunto determinan la calidad final de un vino, entre los cuales se encuentran azúcares, alcoholes, proteínas, ácidos orgánicos, sales minerales y compuestos fenólicos. Sin embargo, estos últimos son vistos como un parámetro por sobre los azúcares y ácidos, con el cual juzgar la calidad de uvas, mostos fermentados y vinos terminados (Harberston y Spayd, 2006), siendo constituyentes esenciales y responsables de importantes propiedades organolépticas, incluyendo sensaciones bucales y el color de vinos tintos (Seddon y Downey, 2008; Mercurio *et al.*, 2007; Preys *et al.*, 2005; Gawel, 1998). También son responsables del amargor y de la capacidad antioxidante (Canas *et al.*, 2008; Harberston y Spayd, 2006) y actúan como importantes reservorios de oxígeno y como sustratos para reacciones de pardeamiento (Li *et al.*, 2008; Zamora, 2003; Zoecklein *et al.*, 2000).

El grupo de compuestos fenólicos más importante en el vino corresponde a los flavonoides, que incluye 4 familias, destacando las correspondientes a los antocianos (moléculas responsables del color) y la familia de los taninos condensados o procianidinas (Monagas *et al.*, 2005; Zamora, 2003).

Los taninos condensados o procianidinas, son propios de la uva y son extraídos de las pieles y semillas durante la vinificación (Vidal *et al.*, 2004) y corresponden al grupo de los flavanoles, representando una compleja familia compuesta por las diferentes formas isoméricas de la catequina y sus polímeros (Gawel, 1998; Zamora, 2003). Los taninos hidrolizables, comprenden numerosos ésteres del ácido gálico (también conocidos como galotaninos) y ésteres del ácido elágico o elagitaninos (Herderich y Smith, 2005).

Los compuestos primarios responsables del color rojo son los antocianos, metabolitos secundarios de las plantas que se almacenan en el hollejo (epidermis) de las uvas tintas durante su maduración en forma de glucósidos. Estos compuestos, en el caso de *Vitis vinifera*, son malvidina, petunidina, delphinidina, peonidina, cianidina, estando todos glucosilados. De ellos, la malvidina –3– glucósido es la que se encuentra en mayor proporción en las uvas, por lo que es la principal responsable del color del vino tinto (Cacho, 2003).

En una disolución hidroalcohólica como el vino los antocianos se encuentran en diversas formas y su equilibrio depende del pH. A pH muy bajos sólo los cationes flavilio poseen color rojo, por lo que al pH del vino (3,2-4,0) la mayoría de los antocianos se encuentran en formas incoloras o débilmente coloreadas. El vino tinto tiene un pH comprendido entre 3 y 4 por lo que, según lo anterior, habría un equilibrio entre las sustancias rojas, las incoloras y las azules. Cuanto más ácido sea el vino tanto más intenso y predominante será el color rojo y cuanto menos, tanto más predominará el color azul. Según esto la mayoría de los vinos tintos deberían ser azules, cosa que, evidentemente no sucede (Cacho, 2003).

Básicamente hay dos fenómenos que modifican las reglas que este equilibrio establece. Por una parte, están las combinaciones entre antocianos y taninos y, por otro lado, el fenómeno de la copigmentación. Ambos fenómenos modifican la intensidad, la tonalidad y la estabilidad del color del vino (Zamora, 2003).

Como copigmentos pueden actuar sustancias muy distintas, tales como polisacáridos, ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos fenólicos y sobre todo flavanoles (Boulton, 2001). La unión antociano tanino puede ser directa o mediada por acetaldehído. El acetaldehído u etanal, se forma a partir de la oxidación del etanol presente en el vino, la presencia de etanal estabiliza el color, y modifica la astringencia y el amargor en el vino (Es-Safi *et al.*, 1999; Saucier *et al.*, 2004).

El acetaldehído compite por el sitio de unión en la molécula de antociano con el anhídrido sulfuroso, por lo que altas dosis de dicho compuesto pueden dificultar la estabilización del color, así como la polimerización de taninos (Zamora,

2003).

El SO₂ puede reaccionar con el acetaldehído, teniendo una capacidad muy baja de disociación, el anhídrido sulfuroso bloquea el sitio de unión de los antocianos y puede desestabilizar los pigmentos y decolorarlos (Hidalgo, 2003; Es-Safi *et al.*, 1999; Saucier *et al.*, 2004).

El anhídrido sulfuroso, es un gas producido por la combustión del azufre en el aire, siendo conocido desde tiempos muy antiguos, específicamente por su propiedad antiséptica, y utilizado por los romanos en la higienización de las bodegas y los envases vinarios. Las múltiples propiedades que presenta este compuesto en la conservación de los vinos, ha supuesto que todavía en la actualidad no exista ninguna otra sustancia o tratamiento alguno capaz de sustituirlo (Hidalgo, 2003).

En enología el anhídrido sulfuroso realiza varias funciones, entre las que se encuentran (además de su conocido efecto antiséptico y antioxidante) la extracción de sustancias desde las partes sólidas durante la maceración (en especial los antocianos), debido a que ejerce un poder necrosante sobre las células vegetales (Usseglio-Tomasset, 1998).

Debido a las características únicas del SO₂, se han debido buscar sustancias o compuestos para suplir por un lado su actividad antiséptica y por otro su propiedad antioxidante (Loyola¹, 2008).

Es por lo anteriormente expuesto que dentro de las bodegas se ha buscado alternativas al uso de anhídrido sulfuroso, para así disminuir las dosis de éste, confiriendo a los vinos la posibilidad de que ocurran reacciones favorables sobre la composición fenólica. Una alternativa posible sería el uso de lisozima.

Loyola ¹ E. Doctor Ingeniero Agrónomo Enólogo. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile (“Comunicación Personal”).

La lisozima es un polipéptido natural, extraído de la clara de huevo de gallina, formada por 129 aminoácidos con un peso molecular de 14,4 kDa (Amati, 1994; Gerbaux, 1997; Gao *et al.*, 2002). La lisozima está presente en distintos organismos como aves, mamíferos e incluso algunos fagos (Canfield y McMurry, 1967).

La lisozima posee una actividad bactericida o bacteriostática frente a bacterias gram positivas como fue descrito por Fleming en 1902 y pequeño efecto a las gram negativas (Delfini *et al.*, 2004), a través de la destrucción de peptidoglicano presente en este tipo de bacterias (Sharon *et al.*, 1966).

El mecanismo de acción de la lisozima como agente antibacteriano se encuentra en su actividad hidrolítica de cadenas de *N*-acetil-d-glucosamina o derivados de ésta (Lowe *et al.*, 1967), cortando la unión entre *N*-acetil-murámico y *N*-acetil-glucosamina, como es en el caso del peptidoglicano presente las paredes celulares de las bacterias gram positivas (McKenzie y White, 1991).

Esta enzima proporciona un método práctico para retrasar o inhibir el crecimiento de bacterias lácticas (entre ellas el más importante *Oenococcus oeni*), responsable del inicio de la fermentación maloláctica durante la vinificación de vinos tintos y blancos (Bartowsky *et al.*, 2004).

En lo que al vino respecta, su eficacia depende de la sensibilidad de las bacterias, que aumenta al aumentar el número de enlaces β - 1-4 entre el ácido acetil murámico y la *N*- acetil glusoamina; de la concentración usada de lisozima, el momento de su adición al vino y la composición química del vino (McKenzie y White, 1991). La actividad de lisozima es superior a pHs elevados (Suárez, 2004).

A diferencia del SO₂, la lisozima es más efectiva a pH más alto cuando el desarrollo de bacterias lácticas se ve favorecido (Green, 1994; Marchal, 2000; Gao *et al.*, 2002).

A modo de resumen, las principales aplicaciones de lisozima en enología son las siguientes: bloquear o impedir la fermentación maloláctica en vinos blancos, retrasar la fermentación maloláctica en vinos tintos y estabilizar microbiológicamente los vinos después de haber terminado la fermentación maloláctica (Bartowsky *et al.*, 2004).

La composición fenólica del vino, además de depender de la materia prima, puede estar asociada a su guarda con madera favoreciendo los intercambios gaseosos entre el vino y la atmósfera ambiente, permitiendo después la disolución de numerosos constituyentes sápidos y odorantes que participan en las características organolépticas del vino (Vivas, 2005).

El roble, ha sido utilizado históricamente para la elaboración de barricas. Es evidente que la crianza del vino en barricas de roble es un proceso oneroso desde el punto de vista económico y complicado bajo el punto de vista de la organización de la bodega. Por esta razón, únicamente un pequeño porcentaje del vino es destinado a este tipo de elaboración (Zamora, 2003).

Debido a lo anterior, siempre se han buscado alternativas a la crianza del vino en barricas de roble, que fuesen más sencillas y sobre todo más baratas. Básicamente las alternativas a la crianza del vino en barricas se centran en la necesidad de cubrir dos aspectos. En primer lugar es preciso lograr la estabilización de la materia colorante y la suavización de la astringencia, y en segundo lugar es necesario aportar al vino los aromas y los taninos elágicos que complementen sensorialmente al vino y le aporten suficiente complejidad. Por esta razón las técnicas alternativas a la crianza en barrica se pueden sintetizar en dos: la microoxigenación y la aromatización con fragmentos de madera de roble. Ambas técnicas son complementarias (Zamora, 2003).

La microoxigenación es una técnica que se fundamenta en aportar al vino pequeñas cantidades de oxígeno de forma continuada, a través de un microdifusor poroso, para reproducir e incluso acelerar el proceso de la estabilización de la materia colorante que tiene lugar durante la crianza del vino en barricas (Zamora, 2003).

Se observa que los antocianos totales disminuyen por efecto de la microoxigenación, pero sin embargo, su estabilidad se incrementa, ya que el porcentaje de antocianos combinados a los taninos aumenta. Por otra parte, el grado de polimerización de los taninos también se incrementa, lo que probablemente comporte la precipitación de la materia colorante inestable (Zamora, 2003).

La utilización de duelas de roble es una técnica ampliamente conocida, las cuales ejercen un efecto sobre el sabor del vino, ya que aportan compuestos fenólicos que sin duda pueden incidir sobre la astringencia, el cuerpo y el amargor del vino (Zamora, 2003).

Evidentemente el uso de duelas nunca alcanzará el grado de calidad y de complejidad que aporta una buena crianza en barricas. Sin embargo, su combinación con la microoxigenación puede dar lugar a vinos de muy buena calidad a un menor costo (Zamora, 2003).

La principal motivación de esta investigación fue comprobar si el uso de lisozima, como alternativa al anhídrido sulfuroso, para disminuir las dosis utilizadas de éste, confiere al vino la capacidad de reaccionar con respecto a su composición fenólica, lo que a su vez permite la estabilización del color y la suavización de la astringencia, ya que al estar el vino sometido a microoxigenación complementada con el uso de duelas de roble americano, se haría reproducible la guarda en barricas, lo que conlleva a mayores reacciones de copigmentación y polimerización de taninos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATI, A. 1994. Il Lisozima in Enologia peri I controllo della fermentazione malolattica. *Industria Bevande*, 23: 215-222.

BARTOWSKY, E.; P. J. COSTELLO, A.; VILLA, P. A.; HENSCHKE. 2004. The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. Vol. 10, N° 2:143-150.

BOULTON, R. 2001. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67-87.

CACHO, J. 2003. El vino y su composición y nuestros sentidos. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza (España). 47p.

CANAS, S.; V. CASANOVA y A. PEDRO BELCHIOR. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *Journal of Food Composition and Analysis*. Anal.21: 623-633.

CANFIELD, R.E. y S. MCMURRY. 1967. Purification and characterization of a lysozyme from goose egg white, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 26 (1967), pp. 38-42.

DELFINI, C.; M. CERSOSIMO y V. DEL PRETE. 2004. Resistance Screening Essay of Wine Lactic Acid Bacteria on Lysozyme: Efficacy of Lysozyme in Unclarified Grape Musts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 1861-1866.

ES-SAFI, N.; FULCRAND, H.; CHEYNIER, V. and MOUTOUNET M. 1999. Studies on the Acetaldehyde-Induced Condensation of (-)-Epicatechin and

Malvidin 3-O-Glucoside in a Model Solution System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (5), 2096-2102.

GAO, Y.C.; ZHANG, G.; KRENTZ, S.; DARIUS, S.; POWER, J. AND LAGARDE, G. 2002. Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8 (1): 76-83.

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

GERBAUX, V. 1997. Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *American Journal of Grape and Wine Research*, 48 (1): 49-53.

GREEN, J. 1994. The effects of wine components on the activity of lysozyme in a model wine system. *American Journal of Enology and Viticulture*. 45(3): 355.

HARBERSTON, J. y S. SPAYD. 2006. Measuring Phenolics in the Winery. *American Journal of Enology and Viticulture*. 57(3): 280-287.

HERDERICH, M. y P.A SMITH. 2005. Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *American Journal of Grape and Wine Research*. 11:205-214.

HIDALGO, J. 2003. *Tratado de Enología volumen 1*. Editorial Mundi-prensa. Madrid, España. 752 p.

LI, H.; A. GUO y H. WANG. 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*. 108: 1-13.

LOWE, G.; G. SHEPPARD; M. L. SINNOTT and A. WILLIAMS. 1967. Lisozima-catalizada hidrólisis de algunos b-aril-N-di acetylchitobiosides. *Biochemistry Journal*. (1967) 104 (893–899).

MARCHAL, R. 2000. Influence of lysozyme on Champagne base wine foaming properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50: 1420-1428.

MERCURIO, M.; R. DAMBERGS; M. HERDERICH and P. SMITH. 2007. 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 Agriculture and Food Chemistry*. 55(12): 4651-4657.

MCKENZIE, H. A., and F. H. WHITE. 1991. Lysozyme and α -lactalbumin: structure, function, and interrelationships. *Advances in Protein Chemistry*. 41:173–315.

MONAGAS, M.; B. BARTOLOMÉ y C. GÓMEZ-CORDOVÉS. 2005. Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45: 85-118.

PREYS, S.; G. MAZEROLLES; P. COURCOUX, A.; SAMSON, U.; FISCHER, M.; HANAFI, D.; BERTRAND and V. CHEYNER. 2005. Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta* 563: 126-136.

SAUCIER, C.; LOPES, P.; MIRABEL, M.; GUERRA, C. and GLORIES, Y. 2004. Tannin—Anthocyanin Interactions: Influence on Wine Color. *Red Wine Color*. 265-273.

SEDDON, T.J. and M.O, DOWNEY. 2008. Comparison of analytical methods for the determination of condensed tannins in grape and skin. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. Res.14:54-61.

SHARON, N.; T. OSAWA; HM FLORES y RW JEANLOZ. 1966. Isolation and study of the chemical structure of a disaccharide from *Micrococcus lysodeikticus* cell walls. *Journal of Biological Chemistry*. 241:223.

SUÁREZ, J.A. 2004. *Microbiología Enológica: Fundamentos de vinificación*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 716 p.

USSEGLIO-TOMASSET, L. 1998. *Química Enológica*. Ediciones Mundi-Prensa.

VIDAL, S.; F. LEIGH; A. NOBLE; M. KWIATKOWSKI; V. CHEYNIER and E. WATERS. 2004. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analysis Chimica Acta* 513:57-65.

VIVAS, N. 2005. *Manuel de Tonnellerie 2ème édition*. Ediciones Mundi-Prensa, España. 231 p.

ZAMORA, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 225 p.

ZOECKLEIN, B.; K. FUGELSANG; B. GUMP y F. NURY. 2000. *Análisis y producción de vino*. Editorial ACRIVIA, S.A., Zaragoza, España. 613 p.

CAPITULO II

EFFECTO DEL USO DE LISOZIMA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y SENSORIALES DE UN VINO CARMÉNÈRE SOMETIDO A GUARDA CON USO DE MICROOXIGENACIÓN.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

La totalidad de las mediciones analíticas y evaluaciones sensoriales se realizaron en las dependencias y laboratorios de Química Enológica, de Cromatografía, Microbiología Enológica y Análisis Sensorial de Alimentos del Departamento de Agroindustria y Enología pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Materiales

El estudio se realizó en la Bodega Patacón perteneciente al Consorcio Surandino S.A., de la vendimia 2009, del Valle del Maipo alto, con un vino base del cultivar Carménère calidad reserva.

Se utilizaron depósitos de acero inoxidable de 1000 litros, duelas de roble americano 35% de contacto en relación a barrica bordelesa Perryville (Estados Unidos), proveedor nacional Gomez Barris, microoxigenador Oenodev Visio6 (Oenodev, Francia) y lisozima OLIVEROGAR (Italia), distribuido por Enochile.

Las mediciones de compuestos fenólicos se realizaron con un espectrofotómetro UV-VIS de doble haz, modelo PharmaSpec UV-1700, marca Shimadzu®; rotavapor modelo R-210, marca Buchi®; pH-metro marca Hanna®, modelo ph-21, centrífuga marca Hareaus® y baño ultrasonido marca Branson®, modelo Branson 2510.

Para la realización del fraccionamiento de flavanoles se emplearon cartuchos Sep-Pak Plus tC18 (Waters, Irlanda).

Metodología

El vino de cultivar Carménère de la Vendimia 2009 se colocó en 6 depósitos de mil litros, llenos y tapados, los cuales fueron sometidos a un proceso de microoxigenación con una dosis de 30 mL/L/mes y uso de duelas de roble americano con un contacto de 35% en relación a una barrica bordelesa.

El tiempo de aplicación de la microoxigenación fue definido por el equipo enológico de la viña Terrandina en base a degustación.

Se aplicaron 2 dosis distintas de lisozima y un control con una dosis de anhídrido sulfuroso, los cuales se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos en estudio. Vino sometido a una dosis de 30 mL/L/mes de microoxigenación y guarda con duelas de roble americano.

Tratamiento	Lisozima	Anhídrido sulfuroso
T1	-----	30 ppm
T2	30 g/hL	-----
T3	60 g/hL	-----

Una vez montado el ensayo, se procedió a guardar en una bodega durante un período de 9 semanas, siendo la condición de temperatura 18° C y una humedad relativa de 30%. Dada la importancia del anhídrido sulfuroso en la dinámica de los procesos de copigmentación y polimerización, el vino base sin lisozima fue ajustado a 30 ppm de SO₂ libre.

Los muestreos se realizaron durante 9 semanas consecutivas, una vez por semana, tiempo necesario para evaluar la evolución en los parámetros químicos, físicos y sensoriales.

Determinaciones analíticas

Se realizaron las siguientes determinaciones a todas las muestras.

Análisis básicos

- **Acidez titulable:** mediante titulación con NaOH 0,1N (recopilado por Bordeu y Scarpa, 1998).
- **Acidez Volátil (Método de Blarez):** expresado como g/L de ácido acético, obtenidos por destilación y posterior titulación con NaOH 0,1N (recopilado por Bordeu y Scarpa, 1998).
- **pH:** concentración de iones hidrógeno mediante potenciometría (recopilado por Bordeu y Scarpa, 1998).
- **Azúcares Reductores:** expresado como g/L de glucosa, mediante reacciones de oxidación-reducción en presencia de Licor de Fehling (recopilado por Bordeu y Scarpa, 1998).
- **Anhídrido sulfuroso Libre (Método de Ripper):** expresado como mg/L de SO₂ libre, mediante reacciones de oxidación-reducción en presencia de yodo (recopilado por Bordeu y Scarpa, 1998).
- **Anhídrido sulfuroso Total (Método de Ripper doble):** expresado como mg/L de SO₂ total, mediante reacciones de oxidación-reducción en presencia de yodo, posterior a su hidrólisis en medio alcalino (recopilado por Bordeu y Scarpa, 1998).

Análisis de polifenoles

Las siguientes análisis se realizaron con un espectrofotómetro UV-VIS de doble haz, modelo PharmaSpec UV-1700, marca Shimadzu®.

- **Fenoles Totales:** mediante análisis espectrofotométrico a 280 nm (recopilado por García-Barceló, 1990).
- **Antocianos Totales:** mediante análisis espectrofotométrico a 520 nm (recopilado por García-Barceló, 1990).
- **Taninos Totales:** mediante análisis espectrofotométrico a 550 nm (Bate-Smith, 1981).
- **Índice de Gelatina** (expresado como porcentaje): mediante precipitación de flavanoles con gelatina (Glories, 1978).
- **Fraccionamiento de Taninos:** mediante separación en columnas y posterior reacción con vainillina en medio ácido (Sun *et al.*, 1998).
- **Intensidad Colorante:** mediante análisis espectrofotométrico a 420 nm, 520 nm y 620 nm (Glories, 1978).
- **Matiz:** mediante Índice de Sudaud ($M = A_{420}/A_{520}$) (Glories, 1978).
- **Espacio Ciel*a*b*:** mediante análisis espectrofotométrico a 450 nm, 520 nm, 570 nm y 630 nm (Zamora, 2003).
- **Copigmentación:** mediante análisis espectrofotométrico a 520 nm (Boulton, 1996; Zamora, 2003b).

Análisis Sensorial

El análisis sensorial se realizó en tres sesiones, la primera al comienzo del ensayo, la segunda en el quinto y finalmente al noveno muestreo. Se dieron a degustar 15 mL de cada muestra a un panel entrenado de 12 evaluadores, los cuales realizaron un análisis de calidad utilizando la pauta presentada en el Anexo 1.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con 3 tratamientos, 2 tratamientos correspondientes a 2 dosis distintas de lisozima, 30 g/L y 60 g/L respectivamente y un tratamiento correspondiente a 30 ppm de anhídrido sulfuroso, con 2 repeticiones por tratamiento dado el carácter semiindustrial del estudio. La unidad experimental de este ensayo fue el vino contenido en depósitos de acero inoxidable de 1000 litros.

Los datos obtenidos de los distintos tratamientos realizados se analizaron mediante un Análisis de Varianza (ANDEVA) al 5% de confianza, al encontrarse diferencias significativas se realizó la prueba de Rango Múltiple de Tukey. Este análisis estadístico se llevó a cabo con el software Minitab® versión 16 para Windows, mientras que los gráficos se realizaron en Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Estados Unidos).

RESULTADOS

Los resultados presentados a continuación, son productos del promedio de los datos recolectados durante 9 semanas, una vez por semana.

Análisis Básicos

Cuadro 2. Determinación de acidez total, pH y azúcares reductores para los tratamientos 1, 2 y 3.

Tratamiento	Acidez total (g H ₂ SO ₄ L ⁻¹)		pH		Azúcares reductores (g glucosa L ⁻¹)	
	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS
T1	4,90 ^a	0,46	3,52 ^a	0,03	2,25 ^a	0,24
T2	4,79 ^a	0,23	3,53 ^a	0,04	2,34 ^a	0,34
T3	4,87 ^a	0,19	3,52 ^a	0,02	2,29 ^a	0,15

Letras minúsculas distintas sobre la misma columna, indican diferencias estadísticamente significativas al 5% (según prueba de Tukey). Prom: promedio; DS: desviación estándar.

Cuadro 3. Determinación de anhídrido sulfuroso libre, total y acidez volátil para los tratamientos 1, 2 y 3.

Tratamiento	Anhídrido sulfuroso libre (mg L ⁻¹)		Anhídrido sulfuroso total (mg L-1)		Acidez volátil (g L ⁻¹)	
	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS
T1	23,50 ^a	0,36	156,72 ^a	0,06	1,10 ^a	0,26
T2	0,50 ^b	0,22	1,20 ^b	0,02	1,19 ^a	0,49
T3	0,75 ^b	0,09	2,05 ^b	0,11	1,28 ^a	0,38

Letras minúsculas distintas sobre la misma columna, indican diferencias estadísticamente significativas al 5% (según prueba de Tukey). Prom: promedio; DS: desviación estándar.

Análisis de la composición fenólica

Cuadro 4. Determinación de fenoles totales, antocianos totales, taninos totales e índice de gelatina para los tratamientos 1, 2 y 3.

Tratamiento	Fenoles totales (g EAG L ⁻¹)		Antocianos totales (mg L ⁻¹ de malvidina)		Taninos totales (g L ⁻¹ de procianidina)		Índice de gelatina (%)	
	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS
T1	1,43a	0,12	442,28a	40,73	2,06a	0,32	54,51a	2,96
T2	1,33a	0,03	296,49b	24,58	1,81a	0,19	41,05b	1,36
T3	1,30a	0,04	305,36b	24,16	1,76a	0,15	34,78c	3,92

Letras minúsculas distintas sobre la misma columna, indican diferencias estadísticamente significativas al 5% (según prueba de Tukey). Prom: promedio; DS: desviación estándar.

Análisis de copigmentación, intensidad colorante y matiz

Cuadro 5. Determinación de copigmentación, intensidad colorante y matiz para los tratamientos 1, 2 y 3.

Tratamiento	Copigmentación (%)		Intensidad Colorante (ua)		Matiz (A ₄₂₀ /A ₅₂₀)	
	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS
T1	14,21a	2,82	1,91a	0,16	0,57a	0,01
T2	16,84b	2,72	1,97a	0,10	0,57a	0,01
T3	17,60b	2,72	1,98a	0,14	0,57a	0,02

Letras minúsculas distintas sobre la misma columna, indican diferencias estadísticamente significativas al 5% (según prueba de Tukey). Prom: promedio; DS: desviación estándar.

Coordenadas cromáticas CIEL*a*b

Cuadro 6. Coordenadas cromáticas CIEL*a*b para los tratamientos 1, 2 y 3.

Tratamiento	L*		a*		b*		H*		S*	
	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS
T1	42,94 a	0,81	49,10 a	0,97	24,78 a	0,95	26,77 a	0,81	1,34 a	0,90
T2	39,63 a	0,10	48,48 a	0,92	24,49 a	0,89	26,57 a	0,90	1,42 a	0,81
T3	42,57 a	0,47	45,53 a	0,94	26,47 a	0,20	29,42 a	0,75	1,23 a	0,98

Letras minúsculas distintas sobre la misma columna, indican diferencias estadísticamente significativas al 5% (según prueba de Tukey). Prom: promedio; DS: desviación estándar.

Fraccionamiento de flavanoles

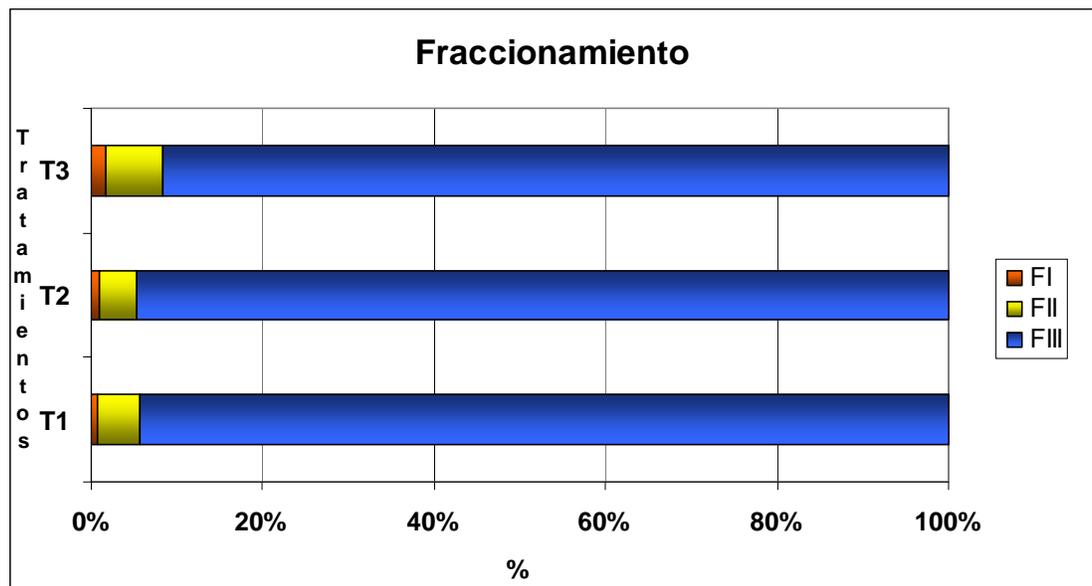


Figura 1. Porcentaje de las fracciones de monómeros (FI), oligómeros (FII) y polímeros (FIII) de flavan-3-oles para los tratamientos 1, 2 y 3.

En el tratamiento 1, se pudo observar que la fracción monomérica obtuvo un porcentaje promedio de 0,79% con una concentración promedio de 0,03 g/L. La fracción oligomérica mostró un porcentaje promedio de 4,96 con una

concentración de 0,19 g/L. La fracción polimérica mostró un porcentaje de 94,26% con una concentración de 3,60 g/L.

En el tratamiento 2, se observó que la fracción monomérica obtuvo un porcentaje promedio de 0,88%, con una concentración promedio de 0,04 g/L. La fracción oligomérica mostró un porcentaje promedio de 4,49%, con una concentración de 0,20 g/L. La fracción polimérica mostró un porcentaje de 94,58% con una concentración de 4,11 g/L.

En el tratamiento 3, se observó que la fracción monomérica obtuvo un porcentaje promedio de 1,76%, con una concentración promedio de 0,05 g/L. La fracción oligomérica mostró un porcentaje promedio de 6,64%, con una concentración de 0,17 g/L. La fracción polimérica mostró un porcentaje de 91,61% con una concentración de 2,40 g/L.

Cuadro 7. Determinación de fracciones monomérica, oligomérica y polimérica para los tratamientos 1, 2 y 3.

Tratamiento	Monómeros (g L ⁻¹)		Oligómeros (g L ⁻¹)		Polímeros (g L ⁻¹)	
	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS
T1	0,03 a	11,97	0,19 ab	68,33	3,60 a	200,45
T2	0,04 ab	4,68	0,20 a	150,21	4,11 a	376,98
T3	0,05 b	4,31	0,17 b	45,32	2,40 b	331,67

Letras minúsculas distintas sobre la misma columna, indican diferencias estadísticamente significativas al 5% (según prueba de Tukey). Prom: promedio; DS: desviación estándar.

Análisis sensorial

Cuadro 8. Puntaje promedio de los parámetros evaluados para los tratamientos 1, 2 y 3.

	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
VISTA			
Intensidad colorante	9,57a	10,65a	10,48a
OLFATO			
Aroma a oxidación	7,08a	6,50a	8,50a
Aroma a fruta	4,53a	5,15a	4,41a
Aroma a callampas secas	2,99a	2,87a	2,86a
Aroma espárragos	1,88a	1,80a	1,62a
PALADAR			
Sabores metálicos	3,90a	3,68a	4,10a
Astringencia	6,53a	7,07a	6,10a
Amargor	5,33a	5,22a	5,16a
Persistencia	7,65a	7,70a	7,47a

Letras minúsculas iguales sobre fila, indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

Análisis básicos

Acidez titulable

Como se observa en el Cuadro 2, los resultados obtenidos mostraron que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, lo que coincide con lo observado por Bartowsky *et al.* (2004) donde se encontraron resultados similares (4,8-5,0 g H₂SO₄ L⁻¹) para valores de acidez total en vinos de los cultivares Cabernet sauvignon y Syrah tratados con lisozima, en comparación a un testigo tratado con anhídrido sulfuroso.

pH

Como se observa en el Cuadro 2, los valores de pH de los distintos tratamientos se encuentran dentro del rango normal, ya que de acuerdo a Zamora (2003a), el rango de pH encontrados en vinos tintos va desde 3,5 hasta 4,1.

Los valores de pH en este ensayo no presentan diferencias significativas entre los distintos tratamientos y son similares a los observados por Bartowsky *et al.* (2004) y Sonni *et al.* (2009) en vinos Cabernet Sauvignon y Syrah (valores entre 3,46-3,48, respectivamente), tratados con lisozima y comparados con un tratamiento con anhídrido sulfuroso.

Azúcares reductores

Como se observa en el Cuadro 2, el promedio de azúcares reductores para los tres tratamientos sobrepasó levemente el valor considerado como estándar para vinos que han terminado su proceso de fermentación y que se pueden considerar “secos” según la legislación chilena (2 g glucosa/L) (Servicio

Agrícola y Ganadero, 2009 y Rizzon y Miele, 2002).

Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con lisozima respecto al control, lo que coincide con lo descrito por Bartowsky *et al.* (2004) en vinos tratados con el mismo producto, pero a su vez difiere con lo encontrado por Delfini *et al.* (2004) los cuales observaron valores entre 13-25 g/L de glucosa, para vinos tratados con lisozima versus su testigo.

Anhídrido sulfuroso libre y total

Como se observa en el Cuadro 3, el valor para SO₂ libre en el tratamiento 1 se mantuvo dentro del rango propuesto para esta investigación (20-30 ppm), mientras que para los tratamientos 2 y 3 los cuales sustituían la dosis de sulfuroso por una de lisozima, se observa cierto nivel de este compuesto (0,50 y 0,75 respectivamente), probablemente debido a que este gas también puede ser producido por cualquier cepa de levadura (Reed, 1990; Suárez-Lepe, 1990).

Existen diferencias significativas entre el tratamiento 1 y los tratamientos 2 y 3, esto claramente debido a que el tratamiento 1 fue el control donde se aplicó el anhídrido sulfuroso propuesto para este ensayo.

Acidez volátil

La medición de acidez volátil fue realizada por el Laboratorio perteneciente a la Viña Patacón del Consorcio Surandino.

El aumento de la acidez volátil tendría su origen con gran probabilidad a que la adición de oxígeno (debido a la microoxigenación) produjo un desarrollo de bacterias acéticas, ya que estas condiciones oxidativas permiten el rápido crecimiento de éstos organismos aerobios (Costello, 1993).

Como se observa en el Cuadro 3 los niveles de acidez volátil sobrepasaron el umbral de percepción sensorial de 0,7 g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). A pesar del nivel de acidez volátil el equipo de enólogos encargado de la

elaboración de los vinos en la Viña Patacón no observó un carácter picado o “toque” acético en los vinos de los distintos tratamientos. Esto indicaría que una alta acidez volátil no necesariamente es sinónimo de defecto, ya que en ciertas condiciones puede proporcionar complejidad y evolución a los vinos, amplificando la acidez y la estructura en boca (Hidalgo, 2001).

A pesar de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, los valores más elevados fueron para los tratamientos en los que se aplicó lisozima (1,19 y 1,28 g/L para el T2 y T3 respectivamente). Esto podría ser atribuido a que la lisozima no es activa sobre bacterias gram negativas como *Acetobacter*, debido a la membrana externa protectora que estas poseen (Green, 1994; Marchal, 2000).

Análisis de la composición fenólica

Fenoles totales

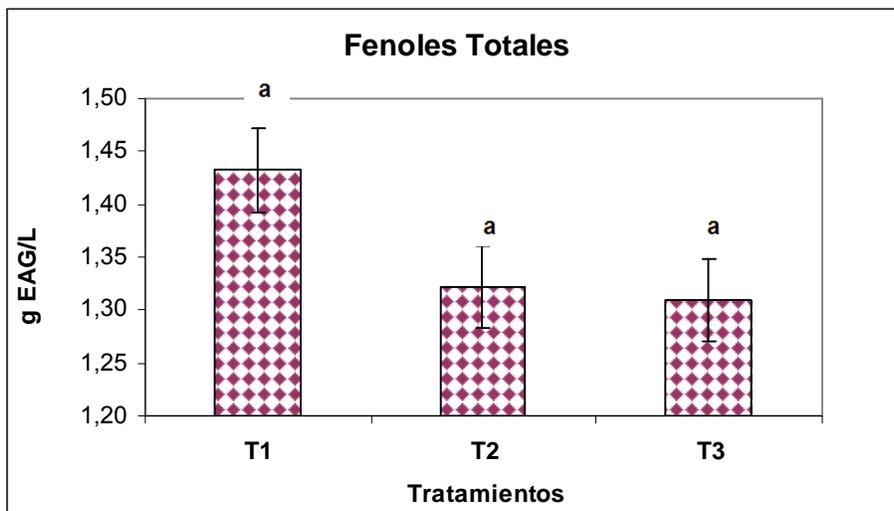


Figura 2. Contenido de fenoles totales para los tratamientos 1, 2 y 3.

Como se observa en el Cuadro 4 y Figura 2 no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Estos datos difieren de los resultados expuestos por autores como Preisler (2007), el cual encontró concentraciones promedio del orden de 1,78 g EAG/L para vinos de la variedad Carménère (Vendimia, 2007). Pero a su vez coinciden con los resultados encontrado por Novoa (2001) el cual observó valores que oscilaban entre 0,94 g EAG/L y 1,39 g EAG/L para vinos pertenecientes al cultivar Carménère y realizados con uvas de la misma región vitivinícola que el vino utilizado en este ensayo.

De acuerdo a esto, los distintos tratamientos aplicados, se encontrarían dentro del rango normal de concentraciones, donde el T1 es el que muestra una mayor concentración de fenoles totales, coincidiendo con los valores de antocianos y taninos totales, en donde también se observa mayor valor para éste tratamiento.

Antocianos totales

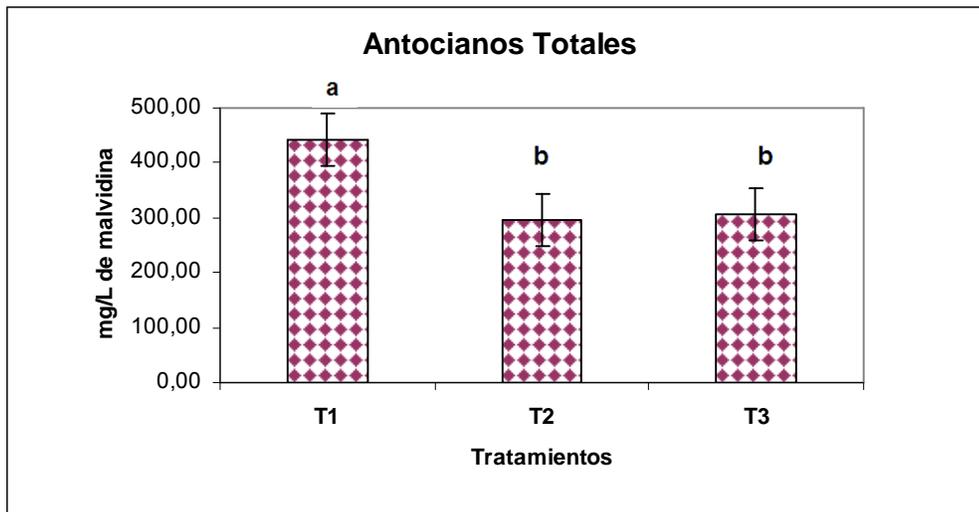


Figura 3. Contenido de antocianos totales para los tratamientos 1, 2 y 3.

Las concentraciones normales esperadas de encontrar en un vino tinto se ordenan en un rango que va desde los 200 hasta los 1.200 mg/L de malvidina (Zamora, 2003a).

De acuerdo a esto, el vino con los distintos tratamientos aplicados, se encuentra dentro del rango normal de concentraciones, donde el T2 y T3 se acercan más al límite inferior, y difieren significativamente con T1 que presenta una mayor concentración antocianica (Cuadro 4 y Figura 3). Esto podría deberse principalmente al hecho, de que al estar presente el anhídrido sulfuroso en el tratamiento 1, éste compite directamente por el sitio de unión entre antocianos, con el etanal u oxígeno, a diferencia del tratamiento 2 y 3 los cuales al no estar presente el compuesto esta unión que debiese producirse entre antocianos u antocianos y taninos condensados, es posible, lo que conlleva a la formación de estructuras denominadas polímeros pigmentados (Zamora, 2003). Esto se ve reflejado en mejoras sensoriales como el aumento de estabilidad del color, suavización de la astringencia y disminución del amargor (Saénz-López *et al.*, 2004).

Taninos totales

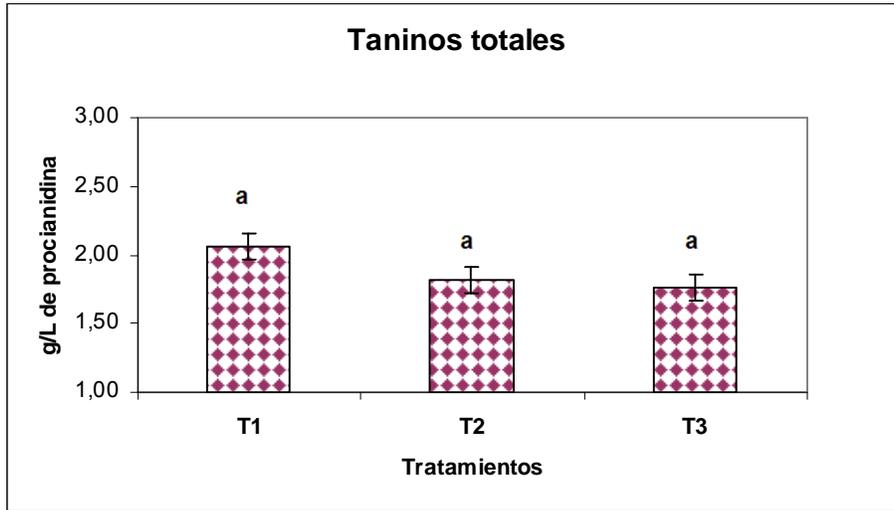


Figura 4. Contenido de taninos totales para los tratamientos 1, 2 y 3.

Los valores de taninos totales eran de esperarse ya que el contenido de fenoles totales también fue mayor para el tratamiento 1, seguido del tratamiento 2 y 3 y además como se observa en el Cuadro 4 y la Figura 4 no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Las concentraciones de taninos totales observadas en este ensayo presenta valores coincidentes con los encontrados en el mismo cultivar por Castro (2009), Nova (2001) y Salgado (2003). Además el rango frecuente de concentraciones de taninos está entre 1 y 5 g equiv. procianidina/L, siendo valores ideales para crianza en barricas los mayores a 3 g equiv. procianidina/L (Zamora, 2003).

Índice de gelatina

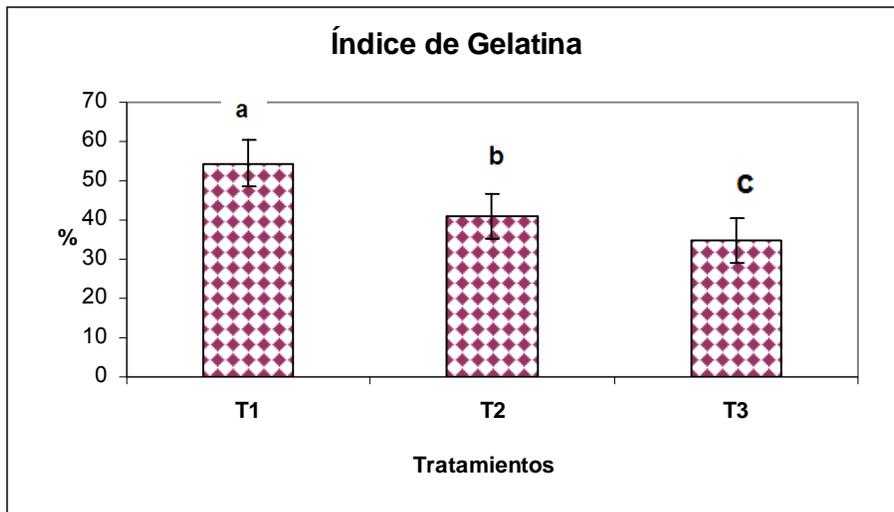


Figura 5. Índice de gelatina para los tratamientos 1, 2 y 3.

Se observó en el Cuadro 4 que los tres tratamientos difieren estadísticamente, esto podría deberse a que en los tratamientos donde está presente la lisozima, los taninos disueltos en el medio tienden a unirse a la fracción proteica de ésta y no a precipitar junto a la gelatina, resultando por lo tanto en un menor valor de este índice (Usseglio-Tomasset, 1998; Llaudy *et al.*, 2004).

Zamora (2003) indica que dicho índice suele estar comprendido entre un 25% y 80% y que vinos con valores superiores al 60% son indicadores de vinos con taninos muy astringentes. Por otro lado, el mismo autor señala que valores inferiores al 35% son indicadores de vinos faltos de cuerpo y estructura. Valores comprendidos entre el 40 y 60% son indicadores de adecuada astringencia.

De acuerdo a lo anterior los 3 tratamientos estarían dentro de lo que Cao-Thanh (2002) definió como un vino de cierta reactividad, o de un vino considerado como conveniente, como fue definido por Zamora (2003).

Según la clasificación expuesta anteriormente sólo el tratamiento 3 se definiría dentro de lo que se conoce como un vino de inadecuada o baja astringencia lo que se traduce en una falta de cuerpo. Esto podría deberse a que se trata de la mayor dosis empleada de lisozima (60 g/hL) y que al estar presente en mayor

magnitud conlleva a una menor disponibilidad y reactividad de taninos libres lo que es consecuente con la concentración de taninos totales presentes en este tratamiento (1,76 g/L de procianidina).

Análisis de copigmentación, intensidad colorante y matiz

Copigmentación

Como se observa en el Cuadro 5, el porcentaje debido a copigmentación es menor para el tratamiento 1, mientras que para el tratamiento 2 y 3 este valor aumenta; esto era de esperarse ya que al observar el Cuadro 3 muestra que el valor de anhídrido sulfuroso combinado para el tratamiento 1 (adición de sulfuroso) es mayor que los otros 2 tratamientos (adición de 2 dosis diferentes de lisozima) debido a que se puede esperar mayor combinación antociano-sulfuroso y tanino-sulfuroso, al existir mayores concentraciones de este gas en el medio (Brouillard y Dangles, 1994; Levengood, 1996; Zamora, 2003).

Los resultados de copigmentación, se ven reforzados con un análisis de correlación lineal, donde se muestra que a mayor valor de copigmentación, el nivel de anhídrido sulfuroso combinado es menor ($r = -0,50$; p -valor $< 0,05$); esto podría deberse a que en el caso del tratamiento 1, donde el SO_2 es añadido intencionalmente, al estar presente impediría la unión entre antocianos y taninos, o no permitiría el fenómeno de copigmentación.

Intensidad colorante

El efecto de la copigmentación afectaría de manera positiva el color, aumentando la intensidad de éste, además que este factor (copigmentación) influye de manera efectiva la estabilidad de la materia. Debido a esto, la materia colorante se estabilizaría de mayor forma en los tratamientos con mayor aporte al color por el fenómeno de la copigmentación. Estos 2 índices (intensidad colorante y copigmentación) se correlacionaron de manera positiva para los tres tratamientos ($r = 0,62$; p -valor $< 0,05$), los valores de intensidad

colorante no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos lo que era de esperarse ya que esto se relaciona directamente con los resultados de copigmentación (Jilbert, 2005).

Matiz

Estos valores de matiz son coincidentes con los presentados por Bartowsky *et al.* (2004) (0,5-0,75 A_{420}/A_{520}) ya que estos autores tampoco encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin adición de lisozima.

Coordenadas cromáticas CIEL *a*b*

El método CIEL*a*b* es usado para caracterizar vinos blancos, rosados y tintos, siendo además el mejor sistema que se adapta a la apreciación de los catadores (Ortega *et al.*, 1995).

En el Cuadro 9 se presentan los promedios para relacionar el color de los vinos con los parámetros CIEL*a*b* (Ortega *et al.*, 1995).

Cuadro 9. Relación entre promedios de parámetros CIEL*a*b* y tipos de color en vinos tintos.

Color	L*	a*	b*
Rojo violáceo	8	30	15
Rojo púrpura	19	50	34
Rojo granate	34	50	34
Rojo cereza	29	54	43
Rojo rubí	42	54	43
Rojo teja	43	50	48
Rojo castaño	37	51	53
Marrón	más de 40	más de 51	más de 62

Fuente Ortega *et al.*, 1995.

Según la escala de Ortega *et al.* (1995), los vinos estarían dentro de la categoría marrón. Cabe destacar, que este parámetro es un indicador de la luminosidad y no cromático.

El valor L* se encuentra en una relación inversa con el parámetro de Intensidad Colorante (IC), ésto debido a que por lo general a altos niveles de IC los vinos son más oscuros y por lo tanto presentan un valor menor de L* (Almela *et al.*, 1995). Lo que se comprueba, ya que el T1 es el que presenta el menor valor de IC (1,91) y el mayor valor de L* (Cuadro 5 y 6).

Al comparar los índices a* y b* dados por Ortega *et al.* (1995), con los resultados obtenidos, los vinos analizados se encuentran dentro de los promedio de rojo violáceo, lo que indica que es un vino joven, pero con potencial de guarda.

En el parámetro a*, que indica la cantidad de rojo, la relación es positiva ya que el T1 es el con la mayor concentración de antocianos totales, esto debido probablemente a un efecto hiperocrómico producto del fenómeno de copigmentación, lo cual podría estar relacionado con la naturaleza de los copigmentos presentes en el vino.

El índice b^* , que representa el contenido de amarillo en los vinos, es también un indicador del paso del tiempo, ya que en vinos más envejecidos el valor de b^* tiende a aumentar hasta valores similares a los de a^* (Iñiguez, 2000).

Coordenadas esféricas

Cuadro 10. Relación entre valores promedio de parámetros CIEL a^*b^* y tipos de color en vinos tintos.

Color	H*	S*
Rojo violáceo	13-30	>3,0
Rojo púrpura	30-36	>2,4
Rojo granate	30-35	<2,4
Rojo cereza	34-40	>2,0
Rojo rubí	35-40	<2,0
Rojo teja	40-45	>1,0
Rojo castaño	44-50	>1,5
Marrón	>50	>2,0

Fuente Ortega *et al.*, 1995.

En el Cuadro 10, se presentan los promedios estandarizados dados por Ortega *et al.*, (1995), para relacionar el color de los vinos con las cifras obtenidas de los cálculos para determinar las coordenadas cromáticas.

Como se aprecia en el Cuadro 6, los valores promedio para los 3 tratamientos se encuentran dentro de la escala definida por Ortega *et al.* (1995), en el rango de rojo violáceo, lo que coincide con lo observado para los parámetros a^* y b^* .

Por otra parte, el parámetro S^* es un indicador de saturación o pureza, el cual está relacionado con la intensidad del color de los vinos (Fernández *et al.*, 1997).

Con respecto a S^* , ninguno de los tratamientos que se aprecian en el Cuadro 6 clasifica en los promedios dados por Ortega *et al.*, (1995), debido al alto valor obtenido de luminosidad L^* .

A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros CIEL*a*b entre los tratamientos, sí se observó una relación positiva entre intensidad de color, antocianos totales y espacio CIEL*a*b.

Fraccionamiento de flavanoles

En la Figura 1, se puede observar los porcentajes de participación de las fracciones monoméricas, oligoméricas y poliméricas de flavan-3-oles de los tres tratamientos analizados. Se observó durante el estudio que la fracción de polímeros (FIII) fue la que presentó una mayor proporción, seguida de la fracción oligomérica (FII), para finalmente observar la fracción monomérica (FI) que fue la con menor participación lo que es coincidente con lo descrito por Sun (1998), Monagas *et al.* (2003) y Fontoin (2008).

Zamora (2003) señala que los flavanoles monoméricos tienen una tendencia clara a polimerizar y formar estructuras cada vez más complejas, conforme avanza el proceso de vinificación y por sobre todo frente a un aumento en la edad del vino. De acuerdo a lo comprobado por esta investigación se afirma lo dicho anteriormente, es decir, que para cada tratamiento, la concentración de monómeros se ve disminuida y la concentración de oligómeros y polímeros aumenta a medida que avanza al tiempo, además el tratamiento 2, que es el que presenta un mayor porcentaje de la fracción polimérica, es uno de los tratamientos en donde fue utilizada una dosis de lisozima en reemplazo del anhídrido sulfuroso, lo que afirmaría la hipótesis de mayor polimerización de taninos en ausencia del gas.

Evaluación sensorial

Los vinos almacenados en botellas, fueron evaluados por un panel entrenado de 12 personas, mediante un test de calidad organoléptica. Se evaluaron 9 descriptores, utilizando una pauta no estructurada de escala continua de rango 0-15 cm, la cual fue definida por un panel especializado de enólogos. Cada degustador evaluó la muestra y la contramuestra para cada uno de los tratamientos en estudio.

Fase visual

Como se observa en el Cuadro 8, en el parámetro intensidad colorante la diferencia no fue significativa entre los tratamientos.

En esta fase sólo se determinó la intensidad de color por la estabilización que produce la microoxigenación (Zoecklein *et al.*, 2001), no se consideraron parámetros como brillo y limpidez debido a que los vinos utilizados no pasaron por el proceso de filtración y además la lisozima contribuye a incrementar la turbidez de los vinos sólo con la adición de 1 g/L (Pitotti *et al.*, 1991).

Fase olfativa

Como se observa en el Cuadro 8 la diferencia no fue significativa entre los tratamientos.

Se puede interpretar que el resultado obtenido por el descriptor “etanal” no es óptimo, debido a la mediana intensidad con que fue percibido. Según Lemaire (1995), la técnica de microoxigenación sintetiza etanal durante su proceso y un exceso de este compuesto es considerado como un defecto.

Fase gustativa

Como se observa en el Cuadro 8 las diferencias no fueron significativas entre los tratamientos para ninguno de los parámetros evaluados, lo que coincide con ensayos desarrollados por Bartowsky *et al.* (2004) realizados en vinos Cabernet sauvignon y Syrah tratados con y sin lisozima.

Los promedios para los tres tratamientos del descriptor de astringencia se considera de “levemente bajo” a “moderado”, lo que concuerda con lo descrito por Vidal *et al.* (2003), ya que en este caso el envejecimiento del vino fue dado por el uso de duelas complementado con la técnica de microoxigenación.

La astringencia, puede ser estimada por el índice de gelatina que revela el porcentaje de taninos condensados reactivos con proteínas (Zamora, 2003). En este caso se destaca el tratamiento 2 (7,07 de astringencia) que muestra el mayor valor de astringencia, si bien no es significativo, concuerda con el análisis químico (Cuadro 4) ya que mostró el segundo valor decreciente de índice de gelatina (41,05%).

Noble (1994), señala que, de manera general, los compuestos fenólicos son responsables en gran medida del amargor, lo que concuerda con lo obtenido en este ensayo donde el segundo mayor promedio de amargor es de 5,22 y el valor de fenoles totales es de 1,32 g de ácido gálico/L el que también sería el segundo mayor promedio de este análisis.

Los promedios obtenidos para los tres tratamientos se consideran dentro del rango “bajo” a “levemente bajo” para amargor, lo cual puede tener una explicación en su baja concentración de monómeros y oligómeros de flavan-3-oles (2,18 g/L para el T1, 2,45 g/L para el T2 y 2,63 g/L para el T3) (Vidal *et al.*, 2003).

El vino de acuerdo a los resultados obtenidos puede ser considerado correcto del punto de vista de sus propiedades organolépticas, afirmando con esto que el uso de lisozima no afectó los parámetros evaluados.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos para los distintos tratamientos evaluados en este ensayo, es posible concluir lo siguiente:

Se corrobora la hipótesis establecida en este ensayo ya que el uso de lisozima aumenta la estabilidad del color. Esto fue demostrado por la correlación positiva entre el análisis de intensidad colorante y el análisis de porcentaje debido a la copigmentación ($r= 0,62$; $p\text{-valor}<0,05$). Además cabe destacar que el tratamiento testigo el cual se mantuvo a una concentración de 20-30 ppm de anhídrido sulfuroso presenta un mayor nivel de antocianos libres, ya que al estar presente este gas compite directamente por el sitio de unión entre antocianos, lo que no se observó en los tratamientos 2 y 3, ya que al ser reemplazado el anhídrido sulfuroso por dosis de lisozima se produce la formación de polímeros pigmentados.

Se concluye que la aplicación de microoxigenación complementada con el uso de duelas de roble genera una disminución de antocianos totales, pero a su vez permite aumentar la estabilidad de éstos, ya que ayuda a incrementar el porcentaje de antocianos combinados a taninos. Esto se ve reflejado en que para cada tratamiento, la concentración de flavan-3-oles monómeros disminuyó, mientras que la concentración de oligómeros y polímeros aumentó a medida que avanzó al tiempo.

Por su parte, se afirma que el uso de lisozima (para ambas dosis), que conlleva a una mayor formación de estructuras de polímeros pigmentados, no afecta la percepción sensorial del vino respecto al tratamiento testigo (manejo tradicional con uso de anhídrido sulfuroso).

BIBLIOGRAFÍA

ALMELA, L.; S. JAVALOY; J. A. FERNANDEZ-LOPEZ; J. M. LOPEZ-ROCA. 1995. Comparison between the tristimulus measurements Y_{xy} and $L^*a^*b^*$ to evaluate the colour of young red wines. Food Chemistry. 53: 321-327.

BARTOWSKY, E.; P. J. COSTELLO; A. VILLA; P. A. HENSCHKE. 2004. The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. Australian Journal of Grape and Wine Research. Res. Vol. 10, N° 2:143-150.

BATE-SMITH. 1981. Astringent tannins of the leaves of Germaine species. Phytochemistry. 20:211-216.

BORDEU, E.; J. SCARPA. 1998. Análisis químico del vino. Ediciones Universidad Católica de Chile. 253 p.

BROUILLARD, R. O. DANGLES. 1994. Anthocyanins molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging. Food Chemistry. 51, 365- 71p.

CAO-THANH, B. 2002. Manejo de la higiene durante el curso de las etapas de crianza y acondicionamiento de los vinos. Wine Internet Technical Journal. 7:1-5.

CASTRO, L. 2009. Evolución de la composición fenólica de bayas de *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet sauvignon y cv. Carménère durante la maduración. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago, Chile. 69 p.

COSTELLO, P. 1993. Inductions procedures for maloláctica fermentation. Australian and New Zealand Wine Industry Journal. p. 51-56.

DELFINI, C.; M. CERSOSIMO; V. DEL PRETE. 2004. Resistance Screening Essay of Wine Lactic Acid Bacteria on Lysozyme: Efficacy of Lysozyme in Unclarified Grape Musts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 1861-1866.

FERNÁNDEZ, J.; J. CARCELÉN; A. MARTÍNEZ. 1997. Características cromáticas de vinos rosados y tintos de la cosecha de 1996 en la región de Murcia. 11p In: III Congreso Nacional de Enólogos. Murcia, España, Marzo 1997.

FONTOIN, H.; SAUCIER, C.; TEISSEDRE, P. L. and GLORIES, Y. 2008. Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preferences*. 19: 286-291.

GARCÍA-BARCELÓ, J. 1990. Técnicas analíticas para vinos. Ediciones FAB. Barcelona, España. 1713 p.

GLORIES, Y. 1978. Recherches sur la matière colorantes des vins rouges. Thèse doctorat d'état. Université de Bordeaux II. France. 364 p.

GREEN, J. 1994. The effects of wine components on the activity of lysozyme in a model wine system. *American Journal of Enology and Viticulture*. 45(3): 355.

HIDALGO, J. 2003. Tratado de Enología volumen 1. Editorial Mundi-prensa. Madrid, España. 752 p.

IÑIGUEZ, M. 2000. Color y envejecimiento en vinos tintos de Rioja. ACE revista de Enología, (Nº 2 Julio). Disponible en: http://www.acenologia.com/ciencia51_2.htm.

JILBERT, R., J. A. KENNEDY y M. A. DAESCHEL. 2005. Lysozyme interaction with anthocyanin and pigmented polymer fractions from Pinot Noir wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 56: 303A-303A.

LEMAIRE, T. 1995. La micro-oxygénation des vins. Rapport présenté en vue de l'obtention du Diplôme National d' Oenologie. Ecole Nationale Supérieure d' Oenologie Montpellier. 146 p.

LEVENGGOOD, J. 1996. A Survey of Copigmentation in Cabernet sauvignon. Thesis Dept. of Food Science, University of California at Davis. Estados Unidos. 46 p.

LLAUDY, M., R. CANALS, J. CANALS, N. ROZES, L. AROLA y F. ZAMORA. 2004. New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 742-746.

MARCHAL, R. 2000. Influence of lysozyme on Champagne base wine foaming properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50: 1420-1428.

MONAGAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B.; LAUREANO, O. and DA SILVA, R. 2003. Monomeric, oligomeric and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 6475-6481.

NOBLE, A.C. 1994. Bitterness in wine. *Physiology & Behavior* 56 (6): 1251-1255.

NOVOA, D. 2001. Caracterización de la composición fenólica de la uva y el vino cv. Carménère proveniente de dos regiones vitícolas de Chile. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago, Chile. 93 p.

ORTEGA, A.; M. GARCIA; J. HIDALGO; P. TIENDA; P. NAVARRO y J. SERRANO. 1995. Contribución al estudio del color de los vinos españoles. *Vitivinicultura* 1993: 11-12, 1994: 3-6 España.

PITOTTI, A; R. ZIRONI; A. DAL BO; O. BOSCHELLE. 1991. Assay of lysozyme by its lytic action on *Leuconostoc oenos*: a suitable substrate at acidic pH. *Journal of Food Biochemistry*. 15: 393-403.

PREISLER, P. 2007. Efecto de la eliminación parcial de semillas sobre las características químicas, físicas y sensoriales de vinos tintos. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 37 p.

REED, G. and REHM, H.-J. 1990. *Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 Volumes*. Ediciones Verlag Chemie, Weinheim, Alemania. Volume 5. 60 p.

RIBEREAU-GAYON, P., GLORIES, A. MAUJEAU y D. DUBORDIEU. 1998. *Traité d' Oenologie. Chimie du Vin, Stabilisation et Traitements*. Editorial Dunod. Paris, Francia. 214-224p.

RIZZON, L. Y A. MIELE. 2002. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*., Campinas, 22 (2): 192-198.

SAÉNZ-LÓPEZ, R., P. FERNÁNDEZ-ZURBANO Y M.T. TENA. 2004. Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography*. 1052:191-197.

SALGADO, R. 2003. Caracterización de la composición fenólica de vinos del cv. Carménère provenientes de cinco valles de Chile. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 72 p.

SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG). 2009. Ley 18.455: Fija normas sobre producción, elaboración y comercialización de alcoholes etílicos, bebidas alcohólicas y vinagres. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile. 77 p. Disponible en: www.sag.gob.cl.

SONNI, F.; M.J. CEJUDO; F. CHINNICI; N. NATALI and C. RIPONI. 2009. Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 89: 688-696.

SUÁREZ-LEPE J.A. e IÑIGO-LEAL B. 1990. *Microbiología Enológica: Fundamentos de vinificación*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 539 p.

SUN, B.; L. CONCEIÇÃO; J. M. RICARDO-DA-SILVA y L. SPRANGER. 1998. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 106: 536-544.

USSEGLIO-TOMASSET, L. 1998. *Química Enológica*. Ediciones Mundi-Prensa.

VIDAL, S; FRANCIS, L.; GUYOT, S.; MARNET, N.; KWIATKOWSKI, M.; GAWEL, R.; CHEYNIER, V. and WATERS, E. 2003. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of Science of the Food and Agriculture*. 83: 564-573.

ZAMORA, F. 2003a. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. AMV. Ediciones, Madrid, España. 224p.

ZAMORA, F. 2003b. *La copigmentación; un factor determinante del color del vino tinto*. Unidad de Enología del Centro de Referencia en Tecnología (CeRTA). Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Facultad de Enología de Tarragona, Universidad Rovira i Virgili (España). 8p.

ZOECKLEIN, B.; K. FUGELSANG; B. GUMP y F. NURY. 2001. Análisis y producción de vino. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, España. 613p.

ANEXOS

ANEXO 1

Intensidad colorante

0 _____ 15

Sin color _____ Extremadamente intenso

Aroma a oxidación (etanal)

0 _____ 15

Sin etanal _____ Etanal Extremadamente intenso

Aroma a fruta

0 _____ 15

Sin aroma _____ Extremadamente aromático

Aroma a callampas secas

0 _____ 15

Sin aroma _____ Extremadamente aromático

Aroma a espárragos

0 _____ 15

Sin aroma _____ Extremadamente aromático

Astringencia

0 _____ 15

Sin astringencia _____ Extremadamente astringente

Amargor

0 _____ 15

Sin amargor _____ Extremadamente amargo

Persistencia

0 _____ 15

Sin persistencia _____ Extremadamente persistente

Sabores metálicos

0 _____ 15

Sin sabor _____ Extremadamente metálico

ANEXO 2

Protocolo de Copigmentación

1. Preparación de la solución buffer:

- 24 mL de etanol puro
- 176 mL de agua destilada
- 0,5 g de bitartrato de potasio
- Ajustar el pH de esta solución al pH del vino en análisis agregando HCl o NaOH, dependiendo de la situación.

2. Agregar 2 mL de vino en un vaso precipitado y 20 μ L de acetaldehído al 10 % (SOLUCIÓN 1).

3. Esperar 45 minutos.

4. Leer SOLUCIÓN 1 a 520 nm (cubeta 1mm).

5. Diluir SOLUCIÓN 1 1:20 (1 mL de solución 1 y 20 mL de solución buffer) (cubeta 10 mm).

6. Leer a 520 nm.