

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EFECTO DEL MACERADO Y PRENSADO SOBRE EL CONTENIDO DE
PROTEÍNAS PATOGENICAS E INESTABILIDAD PROTEICA DE JUGO DE
UVA Y VINO CV. SAUVIGNON BLANC. IMPACTO SOBRE LA DOSIS DE
BENTONITA USADA EN EL VINO**

ENRIQUE ESTEBAN SILVA MORENO

Santiago, Chile
2011

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EFECTO DEL MACERADO Y PRENSADO SOBRE EL CONTENIDO DE
PROTEÍNAS PATOGENICAS E INESTABILIDAD PROTEICA DE JUGO DE
UVA Y VINO CV. SAUVIGNON BLANC. IMPACTO SOBRE LA DOSIS DE
BENTONITA USADA EN EL VINO**

**EFFECT OF THE MACERATED AND PRESSING ON THE PATHOGENIC
PROTEIN CONTENT AND PROTEIN INSTABILITY OF GRAPE JUICE AND
WINE CV. SAUVIGNON BLANC. IMPACT ON THE DOSE OF BENTONITE
USED IN WINE.**

ENRIQUE ESTEBAN SILVA MORENO

Santiago, Chile
2011

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EFEECTO DEL MACERADO Y PRENSADO SOBRE EL CONTENIDO DE
PROTEÍNAS PATOGENICAS E INESTABILIDAD PROTEICA DE JUGO DE
UVA Y VINO CV. SAUVIGNON BLANC. IMPACTO SOBRE LA DOSIS DE
BENTONITA USADA EN EL VINO**

Memoria para optar al Título Profesional
de Ingeniero Agrónomo
Mención: Enología y Vitivinicultura

ENRIQUE ESTEBAN SILVA MORENO

	Calificaciones
Profesor Guía Sr. Álvaro Peña N. Ingeniero Agrónomo-Enólogo, Dr.	6,6
Profesores Evaluadores Sr. Eduardo Loyola M. Ingeniero Agrónomo-Enólogo, Dr.	6,7
Sra. María Loreto Prat D. Ingeniero Agrónomo, Mg.	6,5
Colaborador Sr. Fernando Salazar N. Ingeniero en Alimentos, Dr.	

Santiago, Chile
2011

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a todas aquellas personas que hicieron posible mi educación universitaria, principalmente a mi madre que me apoyó y me levantó siempre que sentía que ya no podía más, también agradecer a mi padre, su compañía y ayuda en toda mi carrera y especialmente a mi hermana Jannina, a quien he sentido cada vez mas cerca de mí y quizás sin su ayuda y esfuerzo nunca hubiese podido llegar a donde he llegado, a mi cuñado Iván por las largas horas que me dedicó a lo largo de mi carrera y que hicieron posible también mis logros.

Como no nombrar a la mujer que estuvo a mi lado en todo momento, a Constanza (Cony) un gran agradecimiento por todo tu amor, por confiar siempre en mí y por motivarme en todo momento.

También quisiera agradecer a las personas de la Universidad de Chile que me formaron y fueron una parte importante en mi camino a la titulación, especialmente a Rosita del laboratorio de microbiología quien me ayudó y ofreció su lugar de trabajo como si fuera mi casa. Además un agradecimiento especial a los profesores del Departamento de Agroindustria y Enología Dr. Álvaro Peña y el Dr. Eduardo Loyola, quienes fueron unos profesores increíbles en mi mención.

Gracias también a mi profesor colaborador el Dr. Fernando Salazar quien siempre me apoyó y motivó para seguir adelante con mi memoria, además de ofrecerme su amistad y respeto.

Agradezco también a mis compañeros y amigos (Nacho, Lucas, Wedo, Vato, Flamy, Dani, Myri Y Milla), quienes hicieron de mi carrera universitaria, una gran experiencia.

Finalmente dedico esta memoria a todos quienes creyeron en mí.

Gracias.

INDICE

RESUMEN	1
Palabras claves	1
“ABSTRACT”	2
Keywords	2
ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO	3
INTRODUCCIÓN	4
MATERIALES Y MÉTODO	8
Lugar de trabajo	8
Materiales	8
Metodología	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
Ensayo de maceración.....	15
Ensayo de prensado.....	20
Ensayo con bentonita	38
Discusión y análisis de los resultados	39
CONCLUSIÓN	44
BIBLIOGRAFIA	45

RESUMEN

La formación de turbidez y/o depósitos en vinos blancos embotellados, es uno de los principales problemas que aqueja la industria del vino. Se cree que el principal factor responsable de esto, sería la presencia de proteínas térmicamente inestables, llamadas también proteínas patogénicas. Para estudiar este problema, se evaluó el efecto que tienen sobre la abundancia de proteínas patogénicas del mosto de uva, distintos tratamientos de maceración y prensado a distintos tiempos y etapas respectivamente. Adicionalmente se evaluó la cantidad de bentonita necesaria para estabilizar un vino procedente de uva macerada y prensada, y uva solo prensada. La cantidad de proteínas patogénicas obtenidas después de los tratamientos de maceración fueron mayores a las encontradas en las muestras testigos, donde se observó que a mayor tiempo de maceración hubo una mayor cantidad de proteínas patogénicas. Esta tendencia se correlaciona con un aumento en la inestabilidad proteica de los mostos. El caso de los tratamientos de prensados (tres y seis etapas), no se observó una correlación entre la abundancia de proteínas patogénicas e inestabilidad proteica de los mostos. Finalmente, la cantidad de proteínas patogénicas encontradas en un vino elaborado a partir de uva macerada y prensada, fue mayor que las encontradas en un vino elaborado con uvas solo prensadas. De esta manera fue necesaria una adición de bentonita mayor en el vino con ambos tratamientos (20% mayor al vino con uva solo prensada).

Palabras claves: vino blanco, inestabilidad proteica, bentonita, proteínas patogénicas.

“ABSTRACT”**Effect of the macerated and pressing on the pathogenic protein content and protein instability of grape juice and wine cv. Sauvignon blanc. Impact on the dose of bentonite used in wine.**

The formation of turbidity and/or deposits in bottled white wines is one of the main problems facing the wine industry. It is believed that the main factor responsible for this, is the presence of thermally unstable proteins, also called pathogenic proteins. To study this problem, were evaluated the effects on protein abundance of grape-pathogenic, different maceration and pressing treatments at different times and stages respectively. Additionally, were evaluated the amount of bentonite required to stabilize a wine from macerated and pressed grape and grape just pressed. The number of pathogenic proteins obtained after maceration treatments were higher than those found in standard samples, where it was observed that the longer the maceration was a higher number of pathogenic proteins. This trend correlates with increased protein instability musts. The case of pressed treatments (three and six stages), there was a correlation between protein abundance and protein instability pathogenic musts. Finally, the number of pathogenic proteins found in a wine made from grapes macerated and pressed, was higher than those found in wine grapes pressed only. Thus it took a further addition of bentonite in wine with both treatments (20% higher than the wine pressed from grapes only).

Keywords: white wine, protein instability, bentonite, pathogenesis-related-proteins

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

1. μL : Microlitro
2. μm : Micrómetro
3. ΔNTU : Variación de unidad Nefelométricas de Turbidez
4. Ac: Ácido
5. BSA: Albúmina de suero de bovino
6. ChitA: Quitinasa A
7. ChitB: Quitinasa B
8. Cv: Cultivar
9. g: Gramos
10. ha: Hectárea
11. Kda: Kilodalton
12. Kg: Kilogramos
13. L: Litros
14. Mg: Miligramos
15. Min: Minutos
16. mL: Milímetros
17. n.d.: No determinado
18. NTU: Unidad Nefelométrica de Turbidez
19. pI: Punto isoeléctrico
20. RP-HPLC: Cromatografía líquida de fase reversa
21. SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
22. v/s: Versus
23. v/v: volumen/volumen
24. VVTL1: *Vitis vinifera* taumatina 1
25. VVTL2: *Vitis vinifera* taumatina 2
26. VVTL3: *Vitis vinifera* taumatina 3

INTRODUCCIÓN

Las variedades de uva blanca usadas para hacer vino en Chile corresponden al 24% (28,468 ha) del total de viñas plantadas en el país (116,793 ha). Las variedades de mayor importancia en orden decrecientes son Sauvignon blanc, Chardonnay y Moscatel de Alejandría, siendo esta última de uso frecuente en la elaboración de Pisco (Salazar, 2009). En este último tiempo, se ha puesto bastante atención en los problemas que presentan los vinos blancos, tanto a nivel nacional como internacional, sobre todo debido al problema de turbidez que éstos presentan.

En la vinificación de un vino blanco, se debe limitar al máximo el intercambio entre el mosto y las partes sólidas de la vendimia (Flanzy, 2003), pero algunas veces, se debe favorecer dicho intercambio, con el fin de obtener resultados positivos en el vino a elaborar. Una de las formas en las cuales se puede favorecer dicho contacto, es sometiendo la uva a una maceración prefermentativa, tratamiento que consiste en llenar una cuba o prensa con mosto de uva, dejando reposar durante un tiempo determinado, y a una temperatura adecuada (8-10° C). Este tratamiento se emplea de forma mayoritaria en la elaboración de vinos tintos. En el caso de la elaboración de vinos blancos, el objetivo de esta técnica es extraer una mayor cantidad de sustancias aromáticas contenidas en el hollejo de la uva, sin que el mosto adquiera otros compuestos menos deseables (como taninos), logrando de este modo vinos de una mayor potencia olfativa, siempre que la variedad de uva utilizada sea de tipo aromático o muy aromático (Hidalgo, 2002).

Luego de la maceración prefermentativa, la cual se puede o no realizar, viene el prensado, una etapa de gran importancia para el futuro vino blanco, en donde las partes sólidas de la vendimia, serán separadas del jugo. El prensado de las uvas blancas ocurre antes del proceso de fermentación, para evitar que taninos de la piel y semillas de la uva, y otros compuestos aromáticos de carácter herbáceo pasen al mosto y finalmente afecten la calidad organoléptica del vino. Por esta misma razón, el proceso de prensado en variedades blancas debe ser muy suave, empleando de preferencia prensas neumáticas de presión controlada. El uso de prensados excesivos en los mostos blancos ocasiona una destrucción excesiva de la piel y semillas entregando sabores desagradables al futuro vino. Una vez que el mosto es separado de las partes sólidas, se encuentra en condiciones de empezar su proceso de fermentación (Mc Kay, 2007).

Luego de los procesos de desfangado, fermentación, descube y trasiegos, vienen dos procesos de bastante importancia tecnológica: clarificación y estabilización. El vino puede ser considerado como un medio hidroalcohólico, donde determinadas sustancias se encuentran en forma de solución verdadera y otras bajo la forma de dispersión coloidal, de tal forma que su grado de limpidez queda condicionado por su composición y por una posible insolubilización de determinadas sustancias, así como también por los posibles desarrollos microbianos que se pudieran producir en el vino, jugando entonces los

fenómenos coloidales un importante papel en la estabilidad o inestabilidad de la turbidez y por lo tanto en el aspecto visual que presenta el vino (Hidalgo, 2002).

La limpidez es uno de los principales factores de calidad visual que el consumidor exige al momento de aceptar un vino, ante la creencia de que un signo de turbidez signifique algún tipo de alteración. No obstante, la presencia de sustancias insolubles o en suspensión no deberían afectar en absoluto al resto de las cualidades organolépticas de los vinos (Hidalgo, 2002). La medida de la claridad está relacionada con la turbidez, que corresponde al fenómeno óptico conocido como efecto Tyndall, causada por la presencia de partículas en suspensión que desvían la luz de su ruta normal (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Las proteínas solubles, polisacáridos y compuestos fenólicos constituyen los principales componentes macromoleculares del jugo de uva y vino blanco. Las proteínas más importantes de los vinos derivan principalmente de la pulpa, semilla y piel de la uva, y otras como manoproteínas son adquiridas durante la fermentación producto de la lisis de las levaduras. Las proteínas se encuentran presentes en los vinos en bajas concentraciones (15-230 mg/L), y no contribuyen significativamente al valor nutritivo de éstos. Sin embargo, asumen una gran importancia tecnológica y económica, ya que afectan en gran medida la claridad y estabilidad del vino (Ferreira *et al.*, 2002). Según Brissonnet y Maujean (1993), citado por Ferreira *et al.* (2002), las proteínas son especialmente importantes para la formación y estabilidad de la espuma de los vinos espumosos.

Recientes estudios han logrado determinar que las proteínas responsables de la formación de turbidez en vinos blancos son inestables por tiempos largos pero estables por cortos o medianos tiempos, además de ser resistentes a pHs bajos y proteólisis enzimática, bajo condiciones normales de elaboración de vino blanco (Salazar *et al.*, 2009).

En las turbideces proteicas se observa la presencia de un turbio poco denso pudiendo formar depósitos de aspecto traslúcido o blanquecino. Esta turbidez es un problema que se presenta de manera importante en la elaboración de vinos blancos (y rosados ligeros), la cual aparece generalmente después de un período de tiempo bastante prolongado en botella, favorecido por el calor, el frío y su alternancia (Blouin y Peynaud, 2004). Según Koch (1959), citado por Mesquita, *et al.* (2001), los principales factores que afectan la estabilidad en los vinos blancos, además de las proteínas y su naturaleza, son las diferencias entre pH del vino y su punto isoeléctrico, el pH del vino en sí, y la presencia de compuestos tales como polifenoles e iones metálicos.

La mayor cantidad de proteínas solubles presentes en el jugo de uva y vinos son inestables térmicamente y causan problemas de turbidez en vinos blancos. Estas proteínas son identificadas actualmente como proteínas PRs (del inglés “*Pathogenesis-related proteins*”), debido a que están relacionadas con la presencia de patógenos (Salazar *et al.*, 2009), lo que quiere decir que están inducidas por la presencia de patógenos en la planta, tales como bacterias, hongos y virus, siendo las más importantes del tipo taumatina y quitinasas. Estas proteínas son termosensibles y tienen un peso molecular comprendido entre 12.000 y 30.000 Dalton aproximadamente, con un pI entre 4,1 y 5,8 (Flanzy, 2003).

El modo de acción en el caso de las quitinasas es relativamente simple, es decir éstas rompen los polímeros de la pared celular de quitina *in situ*, lo que resulta en un debilitamiento de la pared celular fúngica (Jach *et al.*, 1995).

Las proteínas del tipo taumatina por lo general no están presentes en las plantas sanas, ya que son proteínas que podrían introducirse exclusivamente en respuesta a lesiones o al ataque de patógenos como *Uncinula necator*, *Phomopsis viticola* (Monteiro *et al.*, 2003). Aunque la función específica de las proteínas del tipo taumatina en muchas plantas no se conoce, éstas están involucradas en la resistencia sistémica adquirida y en respuesta al estrés biótico, provocando la inhibición de crecimiento de hifas y la reducción de la germinación de las esporas, probablemente por un mecanismo de permeabilización de la membrana y/o por la interacción con receptores de patógenos (Thompson *et al.*, 2007).

Con respecto a los problemas que causan la presencia de proteínas patogénicas en los vinos blancos, es que se usan diferentes formas para reducir su nivel en el vino, aunque todavía se esté investigando la manera más adecuada para eliminarlas. Sin embargo, es importante saber que no todas las proteínas presentes en el vino son indeseables, ya que muchas de ellas dan cuerpo y volumen al vino y fijan sus aromas. En los cavas y vinos espumosos por ejemplo, contribuyen a la estabilización de la espuma (Salazar, 2008).

En la actualidad, la bentonita es el producto más usado en la industria del vino, como método de clarificación, para eliminar las proteínas que son una fuente potencial de turbidez en los vinos blancos (Ferreira *et al.*, 2004). Las proteínas del vino están cargadas positivamente al pH del vino, y por lo tanto pueden ser cambiados con la bentonita, que lleva una carga neta negativa (Blade y Boulton, 1988; Ferreira *et al.*, 2000).

Además, del uso de la bentonita en la industria del vino, existen otros métodos alternativos para la eliminación de las proteínas tales como la ultrafiltración (Hsu *et al.*, 1987), tratamientos con óxido de zirconio (Salazar *et al.*, 2006), la pasteurización flash (Francis *et al.*, 1994; Pocock *et al.*, 2003) y el uso de otros materiales adsorbentes como resinas (Sarmiento *et al.*, 2000) y óxidos metálicos (Pashova *et al.*, 2004a; Pashova *et al.*, 2004b; Salazar *et al.*, 2007), los cuales pueden también ser efectivos, pero su uso está todavía a nivel semi-industrial, y por lo tanto la bentonita sigue siendo la única solución práctica comercialmente aceptable, para evitar la turbidez proteica en los vinos blancos (Waters *et al.*, 2005).

También se sabe que la degradación enzimática de las proteínas del vino en pequeños péptidos y/o sus aminoácidos ha sido sugerida como una alternativa al uso de la bentonita. De hecho, a temperaturas mayores a 35 °C, mostos y vinos tratados con enzimas proteolíticas comerciales muestran reducción en la cantidad de proteínas (Tattersall *et al.*, 2001).

Lamentablemente, bajo condiciones normales de vinificación y de almacenamiento, las proteínas que forman la turbidez presentes en los mostos de uva y en los vinos, son conocidas por ser altamente resistente al ataque proteolítico (Waters *et al.*, 1999).

Según Weiss (2001), citado por Salazar *et al.* (2006 y 2009), se puede decir que aunque la bentonita sea altamente usada en la industria enológica, la estabilización proteica de vinos blancos mediante este método es un proceso discontinuo, laborioso (requiere mucha mano de obra) y que toma un tiempo considerable durante su preparación. Por otro lado, pese a que la bentonita tiene un gran poder de hidratación, su poder de sedimentación es muy bajo, por eso son necesarios largos tiempos de procesos. Además, el uso de bentonita genera un gran impacto ambiental, debido a que ésta no puede ser regenerada después de su uso, además es sabido que reduce significativamente las propiedades organolépticas del vino, cuando su uso no es controlado, afectando principalmente el aroma y las propiedades espumantes de vinos efervescentes. Además, existe una gran pérdida de volumen de vino como lías (entre un 5 a 10%), producto de la pobre capacidad de sedimentación de la bentonita (Høj *et al.*, 2000).

Objetivo principal

Determinar el efecto de los procesos de macerado y prensado sobre el contenido de proteínas patogénicas e inestabilidad proteica de jugo de uva (*Vitis vinifera* L.) y vino cv. Sauvignon blanc y su influencia en la cantidad de bentonita necesaria para estabilizar el vino.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de un proceso de macerado sobre el contenido de proteínas patogénicas y la inestabilidad proteica de jugos de uva cv. Sauvignon blanc.
2. Determinar el efecto de diferentes tipos de prensado (de tres y seis etapas) sobre el contenido de proteínas patogénicas y la inestabilidad proteica de jugos de uva cv. Sauvignon blanc.
3. Determinar el contenido de proteínas patogénicas, la inestabilidad proteica y la dosis de bentonita adecuada para estabilizar un vino cv. Sauvignon blanc proveniente de un mosto macerado y/o prensado.

MATERIALES Y MÉTODO

Lugar de trabajo

Los análisis fueron realizados en los laboratorios de Química Enológica y de Cromatografía del Departamento de Agroindustria y Enología, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Materiales

El estudio se llevó a cabo con muestras de uvas, jugos y vinos de la variedad Sauvignon blanc, las cuales fueron facilitadas por las viñas Veramonte, Casas del Bosque y Errázuriz de la localidad de Casablanca, vendimia 2009, y por la viña Santa Carolina de la localidad de Colchagua, vendimia 2010.

En el caso de las muestras prensadas en la viña Casas del Bosque se usó una prensa marca Vaslin Bucher (Epernay, Francia) tipo XPERT 150, cuya presión máxima es de 2,2 bares y que como peso máximo soporta 4,550 kg de uva, con un ciclo de prensado de 180 min.

En el caso de la uva prensada en la viña Veramonte se usó una prensa marca Vaslin Bucher (Epernay, Francia) tipo XPERT 150, cuya presión máxima es de 2,0 bares y como peso máximo soporta 22,000 kg de uva, con un ciclo de prensado de 120 min.

En el caso de las muestras de uva (testigos), éstas fueron transformadas en jugo mediante presión manual de las bayas, en donde se utilizó una tela fina de nylon como tamiz, para así evitar el paso de partículas de mayor tamaño a la muestra a analizar.

Antes de analizar las muestras, éstas fueron centrifugadas (Centrífuga Eppendorf 5804 R, Alemania) y filtradas por una membrana de M.E.C. (Millipore, USA), con un tamaño de poro de 0,45 μm .

Metodología

Tratamientos y diseño experimental

Esta investigación constó de tres ensayos independientes entre sí; proceso de macerado en frío, proceso de prensado (tres y seis etapas) y estabilización proteica de vinos blancos mediante bentonita.

Considerando que el presente estudio es de carácter industrial y debido a que solo se trabajó con muestra y contramuestra, este estudio no contó con un diseño experimental, por lo que se consideró un duplicado para cada tratamiento, utilizando solo estadística descriptiva.

Procedimiento

Proceso de macerado: En este ensayo se realizaron dos tratamientos de maceración en frío para uvas del cv. Sauvignon blanc, clon 1. El primero realizado con uvas del valle de Casablanca y el otro con uvas del valle de Colchagua, pertenecientes a la viña Errázuriz y Santa Carolina, respectivamente. El jugo macerado fue comparado con el jugo de uva sin macerar, proveniente de la misma cosecha. En el primer tratamiento el proceso de macerado se realizó por un período de 6 horas, y en el segundo la maceración fue de 4 horas. Ambas maceraciones fueron desarrolladas en la prensa, con una temperatura promedio de maceración de 10° C.

Los testigos se obtienen de una muestra sin macerar, la que corresponde a jugo de uva obtenido mediante presión manual a partir de racimos de uva tomados justo antes de la maceración, con el objeto de conocer el efecto de cada tratamiento de maceración en la concentración de proteínas patogénicas e inestabilidad proteica del jugo de uva obtenido.

Proceso de prensado: Este ensayo se dividió en dos subensayos, uno de un prensado de tres etapas (escurrido, gota y prensa) y otro de un prensado de seis etapas (escurrido, primer ciclo, mitad ciclo, final ciclo, incremento, etapa final). En ambos subensayos, la etapa de escurrido es aquella en donde se separa el orujo (o piel) por medio de la acción de la gravedad, no existiendo presión por parte de la prensa, mientras que las demás etapas se obtienen mediante la acción de la prensa a distintas presiones y/o tiempos (Mc Kay, 2007).

De cada etapa se tomaron dos muestra de jugo de aproximadamente 375 mL, al comienzo y al final de cada etapa. Para efecto de análisis, ambas muestras se mezclaron para conseguir una muestra representativa de cada etapa.

El subensayo de prensado de tres etapas comprende dos tratamientos (Cuadro 1 y 2), en el primero se utilizaron uvas del cultivar Sauvignon blanc, clon 107 y en el segundo uvas del cultivar Sauvignon blanc, clon 242. Ambas uvas fueron cultivadas en el valle de Casablanca y pertenecieron a la viña Casas del Bosque. En este caso también se tomaron dos muestras de jugo de aproximadamente 375 mL, al comienzo y al final de cada etapa. Para efecto de análisis, ambas muestras se mezclaron para conseguir una muestra representativa de cada etapa. También se tomó una muestra testigo de jugo de uva sin tratar, obtenida mediante prensado manual de racimos de uvas, los cuales fueron obtenidos justo antes de la etapa de molienda.

Cuadro 1. Prensado de 3 etapas para uvas del cv. Sauvignon blanc, clon 107.

Tratamientos	Etapas	Presión (bar)	Duración etapas
0 (testigo)	Sin prensado	-	-
1	Escurrido	0	25 minutos
2	Gota	0 – 0,6	60 minutos
3	Prensa	0,6 – 1,8	95 minutos

Cuadro 2. Prensado de 3 etapas para uvas del cv. Sauvignon blanc, del clon 242.

Tratamientos	Etapas	Presión (bar)	Duración etapas
0 (testigo)	Sin prensado	-	-
1	Escurrido	0	25 minutos
2	Gota	0 – 0,6	60 minutos
3	Prensa	0,6 – 1,8	95 minutos

El subensayo de prensado de seis etapas comprende cuatro tratamientos (se puede observar un ejemplo en los Cuadros 3 y 4), en los tres primeros se utilizó uvas del cultivar Sauvignon blanc, clon 1 (de distintos cuarteles), y en el cuarto uvas del cultivar Sauvignon blanc, clon 242. Todas estas uvas fueron cultivadas en el valle de Casablanca y pertenecieron a la viña Veramonte. En este caso también se tomaron dos muestras de jugo de aproximadamente 375 mL, al comienzo y al final de cada etapa. Para efecto de análisis ambas muestras se mezclaron para conseguir una muestra representativa de cada etapa. También se tomó una muestra testigo de jugo de uva sin tratar, obtenida mediante prensado manual de racimos de uvas, los cuales fueron obtenidos justo antes de la etapa de molienda.

Cuadro 3. Prensado de 6 etapas para uvas del cv. Sauvignon blanc, clon 1.

Tratamientos	Ciclos	Presión (bar)	Duración etapas
0 (testigo)	Sin prensado	-	-
1	Escurrido	0	20 minutos
2	Primer ciclo	0-0,2	15 minutos
3	Mitad ciclo	0,2	15 minutos
4	Final ciclo	0,2	10 minutos
5	Incremento	0,2-2	50 minutos
6	Etapas final	2	30 minutos

Cuadro 4. Prensado de 6 etapas para uvas del cv. Sauvignon blanc, clon 242

Tratamientos	Ciclos	Presión (bar)	Duración etapas
0 (testigo)	Sin prensado	-	-
1	Escurrido	0	20 minutos
2	Primer ciclo	0-0,2	20 minutos
3	Mitad ciclo	0,2	20 minutos
4	Final ciclo	0,2	40 minutos
5	Incremento	0,2-2	50 minutos
6	Etapas final	2	30 minutos

Proceso de estabilización proteica del vino mediante bentonita: En este ensayo se evaluaron las dosis de bentonita apropiadas para estabilizar proteicamente dos vinos blancos elaborados a partir de dos tipos de mostos (Cuadro 5), los cuales se detallan a continuación.

Cuadro 5. Estabilización proteica mediante bentonita para vino Sauvignon blanc, clon 1, obtenido a partir de uva macerada y/o prensada

Tratamientos	Muestra de vino	Dosis de bentonita necesaria
1	Vino obtenido a partir de uva macerada y prensada	X
2	Vino obtenido a partir de uva prensada sin maceración previa	Y

Este ensayo constó de dos tratamientos, en los cuales se utilizaron vinos del cv. Sauvignon blanc, clon 1, del valle de Leyda, provenientes de la viña Errázuriz. El primer tratamiento consistió en un vino obtenido a partir de uva macerada y prensada, y el segundo tratamiento correspondió a un vino obtenido a partir de uva prensada sin maceración previa.

Según Ribéreau-Gayon (1977), citado por Flanzy (2003), inicialmente se recomendaba una dosis de bentonita de 20 a 40 g/hL para prevenir la quiebra proteica, mientras que hoy en día las dosis a menudo necesarias son de 80 a 120 g/hL. A partir de esta información es que

se eligió un rango amplio de dosis de bentonita de entre 0 y 200 g/hL, definiendo dosis a usar con diferencias de entre 10 g/hL, que permitiera obtener vinos estables proteicamente (Δ NTU menor a 2), usando bentonita cálcica activada (Siha, Alemania).

Para la realización de los experimentos con bentonita, se usaron 250 mL de muestra, y para el experimento de estabilidad proteica, se utilizaron 15 mL de muestra para cada tubo de ensayo en triplicado.

En este caso se evaluó el contenido de proteínas patogénicas e inestabilidad proteica y su relación con la dosis a utilizar de bentonita para la estabilización de los vinos.

Finalmente (Cuadro 6), se muestra un resumen del procedimiento que se llevó a cabo, mostrando cada uno de los ensayos, subensayos y tratamientos, con el fin de dar a entender de mejor forma el trabajo realizado.

Cuadro 6. Distintos tipos de ensayos, con sus respectivos subensayos y tratamientos.

Ensayos	Subensayos	Tratamientos
Ensayo 1 (Maceración en frío)		Tratamiento 1
		Tratamiento 2
Ensayo 2 (Prensados)	Subensayo 1 (Prensado de 3 etapas)	Tratamiento 1
		Tratamiento 2
	Subensayo 2 (Prensado de 6 etapas)	Tratamiento 1
		Tratamiento 2
	Tratamiento 3	
	Tratamiento 4	
Ensayo 3 (Estabilización proteica)		Tratamiento 1
		Tratamiento 2

Variables a medir

Las variables a medir en estos tratamientos fueron las siguientes:

Sólidos solubles: Mediante refractómetro (Atago, Pocket Pal-1, Japón), fueron determinados los sólidos solubles de los jugos obtenidos a partir de los racimos y durante los procesos de macerado y prensado.

pH: Mediante un pH-metro (Hanna Instruments, H1221, Rumania), fue determinado el pH de los jugos obtenidos de los racimos y durante los procesos de macerado y prensado.

Estabilidad proteica: Entre 30 y 50 mL de jugo de uva o vino, fueron centrifugados (Centrífuga Eppendorf 5804 R, Alemania), por 1 hora a 7000 rpm a 4° C. Luego estas muestras se filtraron por una membrana de M.E.C. (Millipore, USA), con un tamaño de poro de 0,45 µm. Luego 10 mL de estas muestras fueron llevadas a un tubo de ensayo en duplicado. A continuación se midió la turbidez inicial con un turbidímetro (Merck, Turbiquant 1100 IR, Alemania), posteriormente las muestras se sometieron a un tratamiento térmico, el cual consiste en colocar la muestra de jugo o vino en un baño termoregurable a 80° C por 2 horas tal como describe Salazar *et al.* (2007). La turbidez del jugo de uva o vino se midió nuevamente una vez que se alcanzó la temperatura ambiente. Los jugos de uvas o vinos se consideraron estables si la diferencia de turbidez entre la muestra inicial y después del tratamiento térmico fue menor a 2 NTU.

Concentración de proteínas totales: Esto se llevó a cabo por un método colorimétrico (Bradford, 1976), el cual es de los más utilizados en la industria enológica, para medir el contenido total de las proteínas de un vino. El método consistió en mezclar una alícuota de la muestra a analizar con el reactivo BioRad Protein Assay 500-0001, adquirido en BioRad, Laboratories GmbH, Alemania. Posteriormente se esperó entre 5 minutos a 1 hora como máximo para la formación de color, y a continuación se determinó la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-1700, Japón). La recta de calibrado se preparó con una proteína pura, y en este trabajo se utilizó la proteína albúmina de suero de bovino (BSA) como patrón.

Proteínas patogénicas: Las proteínas patogénicas fueron determinadas mediante dos análisis, uno por medio de cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC) y el otro a través de SDS-PAGE (electroforesis de gel de poliacrilamida).

- **RP-HPLC:** Las proteínas del tipo taumatina y quitinasa fueron separadas y cuantificadas mediante cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC) de

acuerdo al método descrito por Peng *et al.* (1997). Las muestras de jugo de uva previamente filtradas (membranas de acetato de celulosa de 0,45 μm) fueron cargadas en una columna de fase reversa Waters XBridge TM BEH 300 (2,1 x 150 mm; tamaño de partícula de 3,5 μm) equilibrada en una mezcla de 17% de solvente A [80% (v/v) acetonitrilo, 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético] y 83% de solvente B [8% (v/v) acetonitrilo, 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético] a 35° C. El volumen de inyección empleado fue 20 μL y el flujo de 0,2 mL/min. Los picos fueron detectados a 220 nm y su identificación se llevó a cabo comparando los tiempos de retención con estudios previos (Waters *et al.*, 1998).

- **Electroforesis:** Este método fue desarrollado solo en un tratamiento de macerado, prensado de 3 etapas y prensado de 6 etapas, con el fin de confirmar que las proteínas que se estaban estudiando, eran las proteínas patogénicas, de acuerdo a su peso molecular. Para este método se extrajeron las proteínas mediante el protocolo de extracción con ácido tricloroacético (Schaffner y Weissman, 1973). Luego se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, (dodecil sulfato de sodio) como agente denaturante, en una cámara Marca bio-rad modelo mini-protean tetra cell, hecho en USA, de acuerdo con el método de Laemmli (1970), utilizando un gel concentrador al 4% y un gel de resolución al 13%. Una muestra de 6 μL fue cargada en un gel de 1 mm de espesor. Las proteínas fueron separadas bajo un voltaje constante de 175 V, durante 45 minutos. El marcador estándar de proteínas (Prestained protein molecular weight marker) se cargó en forma simultánea en cada posillo. Posteriormente se realizó una tinción con plata (Switzer *et al.*, 1979).

Polifenoles totales: Los polifenoles totales fueron determinados mediante el método de Singleton y Rossi 1965, mediante el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu, usando el ácido gálico como material de referencia. La absorbancia de las muestras fue medida en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-1700, Japón), mediante medición de absorbancia a 750 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de maceración

A continuación se muestran los resultados obtenidos en los dos tratamientos de maceración en frío con uva cv. Sauvignon blanc, provenientes de diferentes valles y facilitadas por diferentes viñas. Una de las principales diferencias entre ambos tratamientos es la diferencia que existe entre los tiempos de maceración prefermentativa a la que fueron sometidas.

Primer tratamiento de maceración en frío

Cuadro 7. Muestra macerada, uvas del cv. Sauvignon blanc, del Valle de Casablanca, Clon 1, Viña Errázuriz.

Muestra	Proteínas patogénicas (BSA, mg/L)				Total	Inestabilidad proteica (Δ TU)
	Taumatina		Quitinasa			
	VVTL1	VVTL2	ChitA	ChitB		
	+ VVTL3					
Jugo de racimo	41,9 (1,7)	15,0 (2,1)	22,4 (0,6)	n.d.	79,3 (1,0)	20 (1,0)
Jugo macerado	69,9 (0,5)	28,9 (1,8)	50,5 (0,0)	n.d.	149,3 (1,9)	58 (4,0)

n.d.: No determinado
 (): Desviación estándar
 VVTL1: *Vitis vinifera* taumatina 1
 VVTL2: *Vitis vinifera* taumatina 2
 VVTL3: *Vitis vinifera* taumatina 3
 ChitA: Quitinasa A
 ChitB: Quitinasa B

Cuadro 8. Muestra macerada, uvas del cv. Sauvignon blanc, del Valle de Casablanca, Clon 1, Viña Errázuriz.

Muestra	pH	°Brix	Proteínas totales Bradford (BSA,mg/L)	Polifenoles totales (Ác. gálico, mg/L)
Jugo de racimo	3,3 (0,0)	19,2 (0,1)	92,7 (0,2)	191,2 (7,6)
Jugo macerado	3,6 (0,1)	14,6 (0,1)	177,8 (1,9)	263,5 (0,1)

(): Desviación estándar

Proteínas patogénicas e Inestabilidad proteica: El contenido de proteínas patogénicas se incrementó en un 88,2% y la inestabilidad proteica en un 190%, con respecto a la muestra sin macerar.

A continuación en la Figura 1, se muestra el incremento de ambas variables. Más adelante se analizará una posible relación entre éstas.

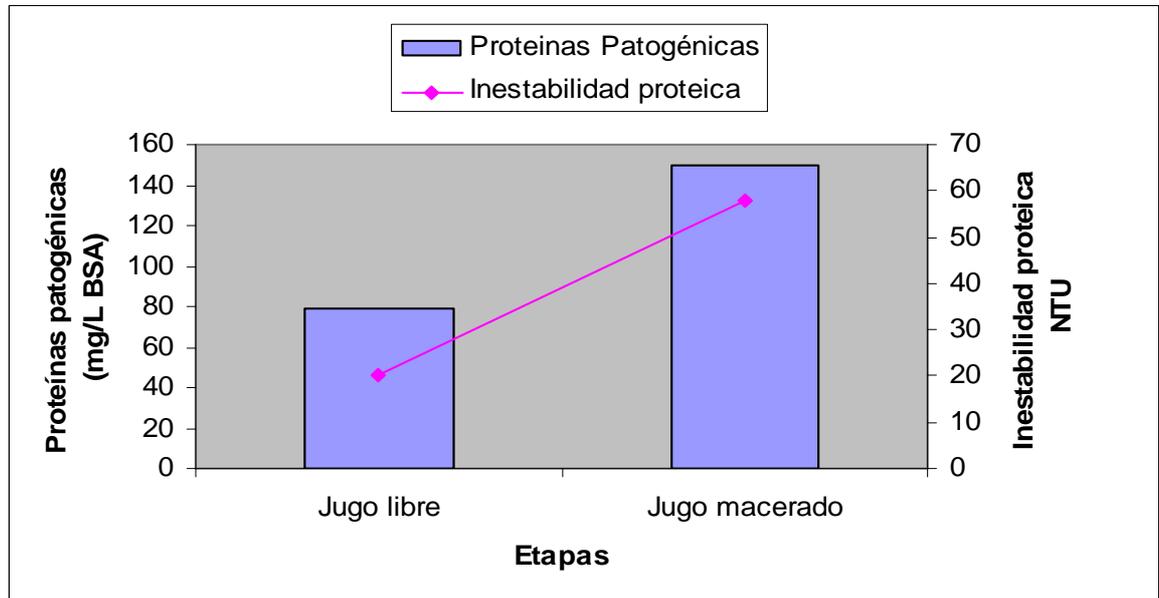


Figura 1. Contenido de proteínas patogénicas v/s inestabilidad proteica de muestra de uva cv. Sauvignon blanc, Clon 1, macerada.

Proteínas totales, polifenoles totales y pH de las muestras: Las proteínas totales aumentaron en un 191,8% y los polifenoles totales en un 37,8%, luego del macerado de las uvas. El pH del jugo macerado aumentó en 0,3 unidades, luego de macerada la uva.

Electroforesis de proteínas: La Figura 2, muestra la electroforesis realizada al presente tratamiento de maceración en frío. El número 1 representa a la muestra testigo (sin macerar), y el número 2 a la muestra macerada. En ella se puede ver que existe una gran concentración de proteínas en el rango de los 20 a 35 Kda. Según Flanzky (2003), las proteínas patogénicas tienen un peso molecular comprendido entre 12.000 y 30.000 Dalton aproximadamente, lo que nos corrobora, que las proteínas cuantificadas por HPLC-DAD, serían las quitinasas y tipo taumatinas.

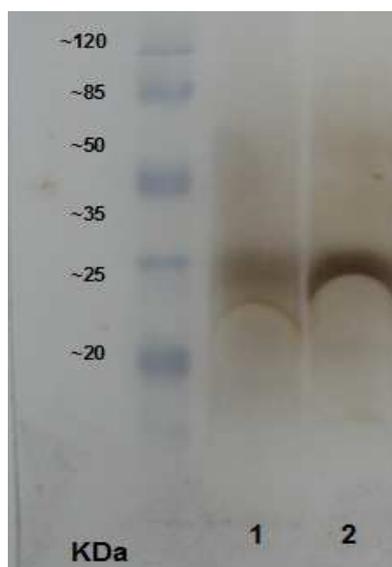


Figura 2. Electroforesis de proteínas mediante SDS-PAGE, (Marcador: Prestained protein molecular weight marker; 1: Muestra testigo; 2: Muestra macerada).

Segundo tratamiento de maceración en frío

Cuadro 9. Muestra macerada, uvas del cv. Sauvignon blanc, del Valle de Colchagua, Clon 1, Viña Santa Carolina.

Muestra	Proteínas patógenicas (BSA, mg/L)				Total	Inestabilidad proteica (Δ NTU)
	Taumatina		Quitinasa			
	VVTL1	VVTL2 + VVTL3	ChitA	ChitB		
Jugo de racimo	60,9 (0,4)	18,8 (0,4)	53,4 (2,9)	n.d.	133,1 (3,6)	54 (2,0)
Jugo macerado	74,7 (0,6)	32,2 (0,7)	85,0 (0,1)	n.d.	191,9 (1,3)	93 (1,5)

n.d.: No determinado
 (): Desviación estándar
 VVTL1: *Vitis vinifera* taumatina 1
 VVTL2: *Vitis vinifera* taumatina 2
 VVTL3: *Vitis vinifera* taumatina 3
 ChitA: Quitinasa A
 ChitB: Quitinasa B

Cuadro 10. Muestra macerada, uvas del cv. Sauvignon blanc, del Valle de Colchagua, Clon 1, Viña Santa Carolina.

Muestra	pH	°Brix	Proteínas totales Bradford (BSA, mg/L)	Polifenoles totales (Ác. gálico, mg/L)
Jugo de racimo	3,1 (0,0)	21,9 (0,4)	142,2 (0,5)	164,0 (0,4)
Jugo macerado	3,5 (0,0)	21,0 (0,0)	214,5 (3,7)	380,1 (4,5)

(): Desviación estándar

Proteínas patogénicas e inestabilidad proteica: El contenido de proteínas patogénicas se incrementó en un 44,1% y la inestabilidad proteica aumentó en un 72,2%, con respecto a la muestra sin macerar.

A continuación en la Figura 3 se muestra la realización de la cuantificación de proteínas patogénicas por la técnica de HPLC-DAD, contabilizando en un primer y segundo pico (VVTL1, VVTL2-VVTL3), las proteínas tipo taumatinas y en un tercer pico, las proteínas quitinasas A (CHITA). Gracias a las áreas medidas bajo los picos e introducidas en una curva de calibración, es que se obtuvieron los valores absolutos de estas proteínas mostradas en los cuadros presentados al comienzo de cada tratamiento. Este ejemplo de cuantificación de proteínas patogénicas se muestra solo en este tratamiento en específico, como ejemplo de las curvas encontradas para dicha cuantificación.

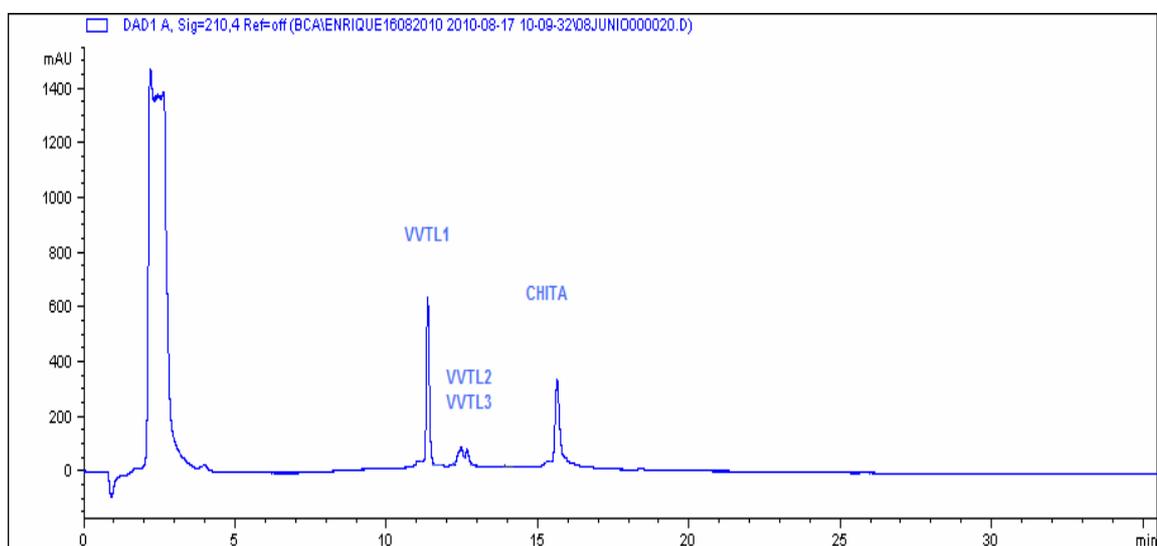


Figura 3. Cuantificación de proteínas patogénicas por HPLC-DAD.

A continuación en la Figura 4 se muestra el incremento de las dos variables antes mencionadas (proteínas patogénicas e inestabilidad proteica), con el fin de analizar posteriormente si existe una relación entre ellas.

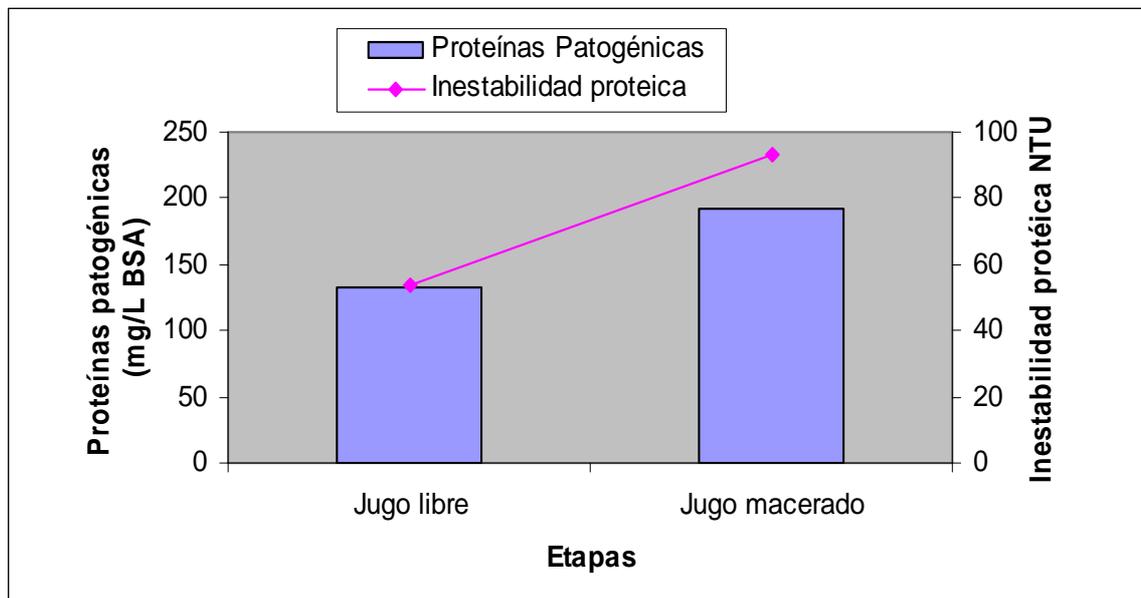


Figura 4. Contenido de proteínas patogénicas v/s inestabilidad proteica de muestra de uva cv. Sauvignon blanc, Clon 1, macerada.

Proteínas totales, polifenoles totales y pH de las muestras: Las proteínas totales aumentaron en un 50,8% y los polifenoles totales en un 131,7% con respecto a la muestra testigo. El pH aumentó en 0,4 unidades, luego de macerada la muestra.

Ensayo de prensado

Subensayo de prensado de 3 etapas

A continuación se muestran los resultados obtenidos en los dos tratamientos de prensado de 3 etapas (escurrido, gota y prensa), realizados a uvas del cv. Sauvignon blanc.

Primer tratamiento de un prensado de tres etapas

Cuadro 11. Muestra prensada, uvas del cv. Sauvignon blanc, del Valle de Casablanca Clon 107, Viña Casas del Bosque.

Muestras (3 etapas y testigo)	Proteínas patogénicas (BSA, mg/L)				Total	Inestabilidad proteica (Δ NTU)
	Taumatina		Quitinasa			
	VVTL1	VVTL2	ChitA	ChitB		
	+					
	VVTL3					
Testigo	23,0 (4,8)	14,5 (2,0)	12,3 (1,9)	n.d.	49,8 (1,1)	43 (2,2)
Escurrido	47,0 (1,8)	21,7 (1,0)	35,4 (1,2)	n.d.	104,1 (2,5)	37 (3,0)
Gota	39,6 (2,6)	21,8 (0,0)	37,1 (1,9)	n.d.	98,5 (4,6)	44 (1,0)
Prensa	23,6 (1,3)	14,6 (0,4)	20,4 (2,5)	n.d.	58,6 (1,5)	44 (0,5)

n.d.: No determinado
 (): Desviación estándar
 VVTL1: *Vitis vinifera* taumatina 1
 VVTL2: *Vitis vinifera* taumatina 2
 VVTL3: *Vitis vinifera* taumatina 3
 ChitA: Quitinasa A
 ChitB: Quitinasa B

Cuadro 12. Muestra prensada, uvas del cv. Sauvignon blanc, del Valle de Casablanca Clon 107, Viña Casas del Bosque.

Muestras (3 etapas y testigo)	pH	°Brix	Proteínas totales Bradford (BSA, mg/L)	Polifenoles totales (Ac. gálico, mg/L)
Testigo	3,28 (0,1)	19,1 (0,6)	95,6 (2,0)	168,3 (3,3)
Escurrido	3,3 (0,1)	21,2 (0,1)	118,3 (1,3)	292,4 (2,4)
Gota	3,4 (0,1)	20,3 (0,0)	105,8 (3,8)	325,4 (5,4)
Prensa	3,8 (0,1)	23,5 (0,1)	84,6 (1,0)	447,7 (5,0)

(): Desviación estándar

Proteínas patogénicas e inestabilidad proteica: La variación encontrada en ambas variables se muestra en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Diferencia porcentual de proteínas patogénica e inestabilidad proteica de cada una de las etapas del prensado, con respecto a las muestras testigos (49,8 mg/L y 43 Δ NTU, respectivamente).

	Escurrido	Gota	Prensa
Proteínas patogénicas	+109,0%	+97,1%	+17,6%
Inestabilidad proteica	-13,9%	+2,3%	+2,3%

En la Figura 5 se muestra la tendencia de las dos variables antes mencionadas, a medida que avanzan las etapas del prensado, con el fin de analizar más adelante si existe una relación directa entre ellas.

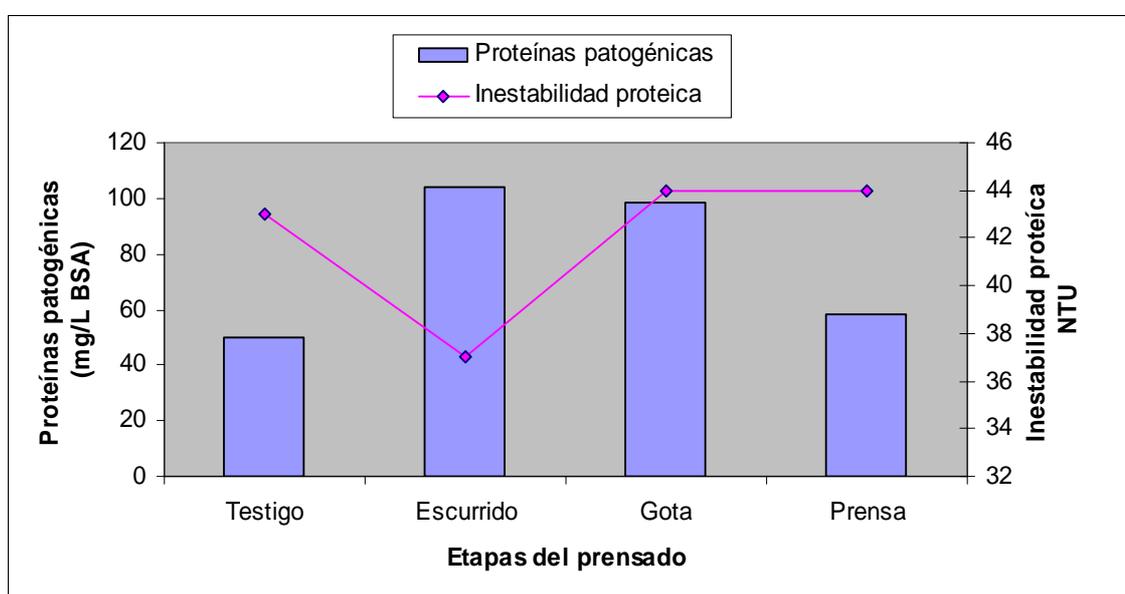


Figura 5. Contenido de proteínas patogénicas v/s inestabilidad proteica de muestra de uva cv. Sauvignon blanc, Clon 107, prensada con ciclo de prensado de tres etapas.

pH de las muestras: El pH de las muestras fue distinto en cada una de las etapas con respecto a la muestra testigo (3,28) de la siguiente forma:

Cuadro 14. Diferencia en unidades de pH, de la muestra testigo con respecto a las muestras de las etapas del prensado.

Muestra inicial	Etapas del prensado	Unidades
Testigo	Escurrido	+0,02
Testigo	Gota	+1,2
Testigo	Prensa	+5,2

Polifenoles totales y proteínas totales: Los polifenoles totales con respecto a la muestra testigo, aumentaron de forma progresiva a lo largo de las etapas del prensado, en cambio las proteínas totales aumentaron para luego disminuir en la última etapa.

A continuación en el Cuadro 15, se muestra la diferencia porcentual de las proteínas y polifenoles totales, con respecto a las muestras testigos (95,6 y 168,3 mg/L respectivamente).

Cuadro 15. Diferencia porcentual de proteínas y polifenoles totales de cada una de las etapas del prensado con respecto a la muestra testigo.

Muestra inicial	Etapas del prensado	Polifenoles totales	Proteínas totales
Testigo	Escurrido	+73,7%	+23,7%
Testigo	Gota	+93,3%	+10,6%
Testigo	Prensa	+166%	-11,5%

Electroforesis de proteínas: La Figura 6 muestra la electroforesis realizada a este primer tratamiento de prensado de 3 etapas. El número 1 representa a la muestra escurrido, el número 2 a la muestra gota, y el número 3 a la muestra prensa. En ella es posible apreciar que existe una marcada concentración de proteínas en el rango de los 20 a 35 Kda, las que según bibliografía, serían proteínas patogénicas.

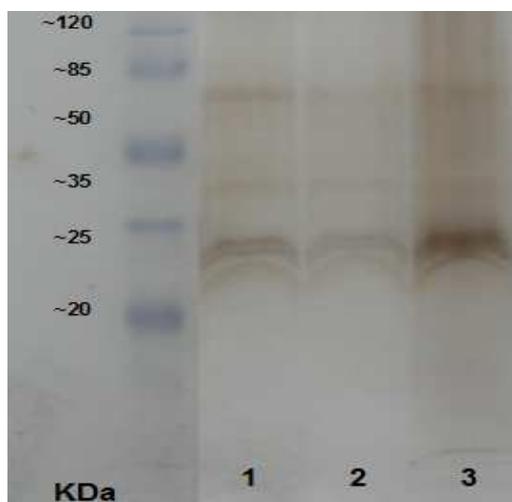


Figura 6. Electroforesis de proteínas mediante SDS-PAGE, (Marcador: Preestained protein molecular weight marker 1: muestra escurrido; 2: Muestra gota; 3: Muestra prensa).

Segundo tratamiento de un prensado de tres etapas

Cuadro 16. Muestra prensada, uvas cv. Sauvignon blanc, del Valle de Casablanca, Clon 242, Viña Casas del Bosque.

Muestras (3 etapas y testigo)	Proteínas patogénicas (BSA, mg/L)				Total	Inestabilidad proteica (Δ NTU)
	Taumatina		Quitinasa			
	VVTL1	VVTL2	ChitA	ChitB		
	+					
	VVTL3					
Testigo	17,3 (9,0)	6,6 (4,5)	7,4 (2,6)	n.d.	31,4 (16,2)	29 (21,8)
Escurrido	47,0 (1,5)	22,1 (0,4)	23,1 (4,3)	n.d.	92,2 (3,2)	26 (0,5)
Gota	40,9 (0,2)	21,3 (1,0)	26,8 (4,6)	n.d.	89,0 (3,8)	63 (0,5)
Prensa	23,0 (1,0)	13,2 (1,7)	13,1 (0,2)	n.d.	49,3 (0,9)	29 (0,5)

n.d.: No determinado
 (): Desviación estándar
 VVTL1: *Vitis vinifera* taumatina 1
 VVTL2: *Vitis vinifera* taumatina 2
 VVTL3: *Vitis vinifera* taumatina 3
 ChitA: Quitinasa A
 ChitB: Quitinasa B

Cuadro 17. Muestra prensada, uvas cv. Sauvignon blanc, del Valle de Casablanca, Clon 242, Viña Casas del Bosque.

Muestras (3 etapas y testigo)	pH	°Brix	Proteínas totales Bradford (BSA, mg/L)	Polifenoles totales (Ác. gálico, mg/L)
Testigo	3,3 (0,1)	23,0 (0,1)	64,9 (2,2)	200,4 (2,8)
Escurrido	3,2 (0,1)	21,8 (0,0)	111,2 (0,2)	312,3 (5,6)
Gota	3,3 (0,1)	20,4 (0,1)	100,7 (0,0)	392,2 (1,1)
Prensa	3,7 (0,1)	21,7 (0,2)	57,5 (0,4)	427,0 (0,1)

(): Desviación estándar

Proteínas patogénicas e inestabilidad proteica: A continuación se muestra la diferencia porcentual entre la muestra testigo y las etapas del prensado, con respecto al contenido de proteínas patogénicas e inestabilidad proteica.

Cuadro 18. Diferencia porcentual de proteínas patogénica e inestabilidad proteica de cada una de las etapas del prensado, con respecto a la muestra testigo (31,4 mg/L y 29 Δ NTU, respectivamente).

	Escurrido	Gota	Prensa
Proteínas patogénicas	+193,6%	+183,4%	+57,0%
Inestabilidad proteica	-10,3%	+117,2%	0,0%

En la Figura 7 se muestran las tendencias de las dos variables antes mencionadas en una misma figura, con el fin de analizar más adelante si existe una relación entre ellas.

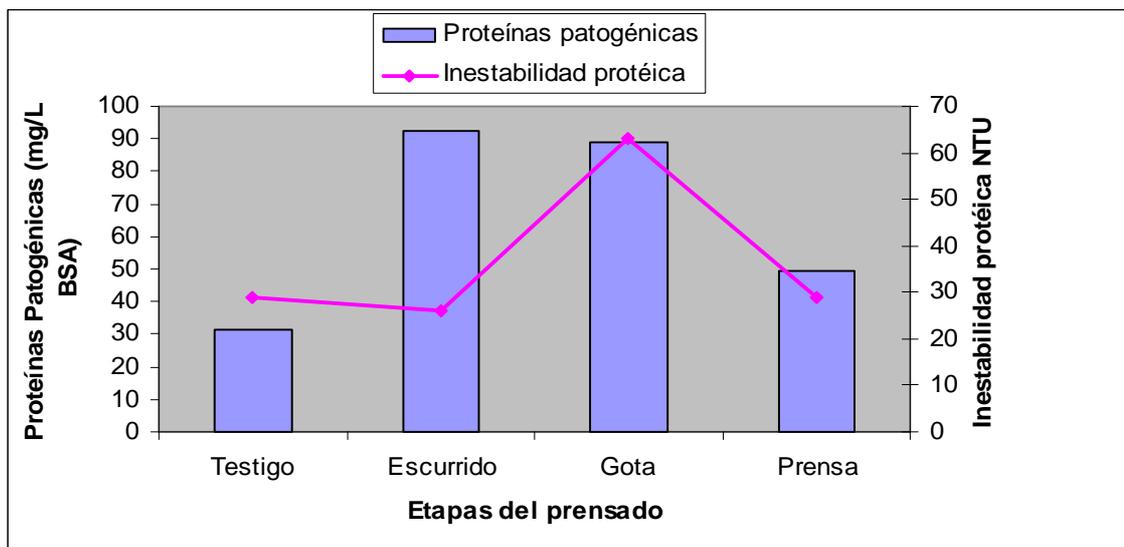


Figura 7. Contenido de proteínas patogénicas v/s inestabilidad proteica de muestra de uva cv. Sauvignon blanc, Clon 242, prensada con ciclo de prensado de tres etapas.

pH de las muestras: El pH de las muestras varió de la siguiente forma a lo largo del prensado:

Cuadro 19. Diferencia en unidades de pH, de la muestra testigo con respecto a las muestras de las etapas del prensado.

Muestra inicial	Etapas del prensado	Unidades
Testigo	Ecurrido	+0,1
Testigo	Gota	0
Testigo	Prensa	+0,4

Polifenoles y proteínas totales: Los polifenoles totales con respecto a la muestra testigo, aumentaron de forma progresiva a lo largo de las etapas del prensado, en cambio las proteínas totales aumentaron, para luego disminuir en la última etapa.

A continuación en el Cuadro 20, se muestra la diferencia porcentual de las proteínas y polifenoles totales, con respecto a las muestras testigo (64,9 y 200,4 mg/L respectivamente).

Cuadro 20. Diferencia porcentual de polifenoles y proteínas totales de cada una de las etapas del prensado con respecto a la muestra testigo.

Muestra inicial	Etapas del prensado	Polifenoles totales	Proteínas totales
Testigo	Escurrido	+55,8	+71,3%
Testigo	Gota	+95,7	+55,1%
Testigo	Prensa	+113,0	-11,4%

Subensayo de prensado de seis etapas

A continuación se muestran los resultados obtenidos en los cuatro tratamientos de un prensado de 6 etapas, realizados a muestras de uva cv. Sauvignon blanc.

Primer tratamiento de un prensado de seis etapas

Cuadro 21. Muestra prensada, uvas cv. Sauvignon blanc, del Valle de Casablanca, Clon 1, Viña Veramonte.

Muestras (6 etapas y testigo)	Proteínas patogénicas (BSA, mg/L)				Inestabilidad proteica (Δ NTU)	
	Taumatina		Quitinasa			Total
	VVTL1	VVTL2	ChitA	ChitB		
	+					
	VVTL3					
Testigo	17,1 (1,0)	12,6 (0,4)	13,5 (0,1)	n.d.	43,0 (1,5)	36 (0,4)
Escurrido	62,2 (6,3)	23,6 (0,7)	43,9 (1,0)	n.d.	129,7 (4,7)	52 (0,5)
Primer ciclo	41,8 (0,9)	18,0 (2,7)	23,9 (4,0)	n.d.	83,7 (7,6)	47 (1,0)
Mitad ciclo	54,5 (0,3)	28,0 (3,0)	38,3 (2,2)	n.d.	120,8 (0,5)	42 (1,0)
Final ciclo	55,7 (0,6)	25,0 (0,2)	46,1 (3,7)	n.d.	126,8 (2,9)	123 (9,0)
Incremento	33,8 (3,4)	17,0 (3,9)	16,6 (4,4)	n.d.	67,4 (2,9)	74 (1,5)
Etapas final	21,6 (0,2)	13,4 (1,8)	23,9 (1,2)	n.d.	58,9 (2,6)	75 (0,5)

n.d.: No determinado

(): Desviación estándar

VVTL1: *Vitis vinifera* taumatina 1VVTL2: *Vitis vinifera* taumatina 2VVTL3: *Vitis vinifera* taumatina 3

ChitA: Quitinasa A

ChitB: Quitinasa B

Cuadro 22. Muestra prensada, uvas cv. Sauvignon blanc, del Valle de Casablanca, Clon 1, Viña Veramonte.

Muestras (6 etapas y testigo)	pH	°Brix	Proteínas totales Bradford (BSA, mg/L)	Polifenoles totales (Ac. gálico, mg/L)
Testigo	3,12 (0,0)	22,9 (0,0)	8,3 (1,9)	121,3 (1,8)
Escurrido	3,13 (0,1)	18,0 (0,0)	188,0 (0,01)	150,5 (4,9)
Primer ciclo	3,23 (0,1)	15,4 (0,2)	129,0 (0,5)	134,2 (3,8)
Mitad ciclo	3,34 (0,1)	21,4 (0,1)	169,0 (7,6)	133,2 (2,2)
Final ciclo	3,52 (0,1)	22,5 (0,0)	144,1 (0,8)	102,7 (5,5)
Incremento	3,63 (0,1)	22,4 (0,1)	127,0 (2,2)	228,8 (5,4)
Etapas final	3,80 (0,0)	19,5 (0,0)	72,5 (0,5)	239,8 (4,3)

Proteínas patogénicas e inestabilidad proteica: En este tratamiento, el contenido de proteínas patogénicas y la inestabilidad proteica de cada una de las muestras varió con respecto a la muestra, donde se observa el siguiente comportamiento:

Cuadro 23. Diferencia porcentual de proteínas patogénica e inestabilidad proteica de cada una de las etapas del prensado, con respecto a la muestra testigo (43 mg/L y 36 Δ NTU, respectivamente).

	Escurrido	Primer ciclo	Mitad ciclo	Final ciclo	Incremento	Etapas final
Proteínas patogénicas	+201,6%	+94,6%	+180,9%	+194,8%	+56,7%	+36,9%
Inestabilidad proteica	+44,4%	+30,5%	+16,6%	+241,6%	+105,5%	+108,3%

En la Figura 8 se muestran las tendencias a aumentar o disminuir de las dos variables antes mencionadas, en un mismo gráfico, con el fin de analizar más adelante una posible relación entre ellas.

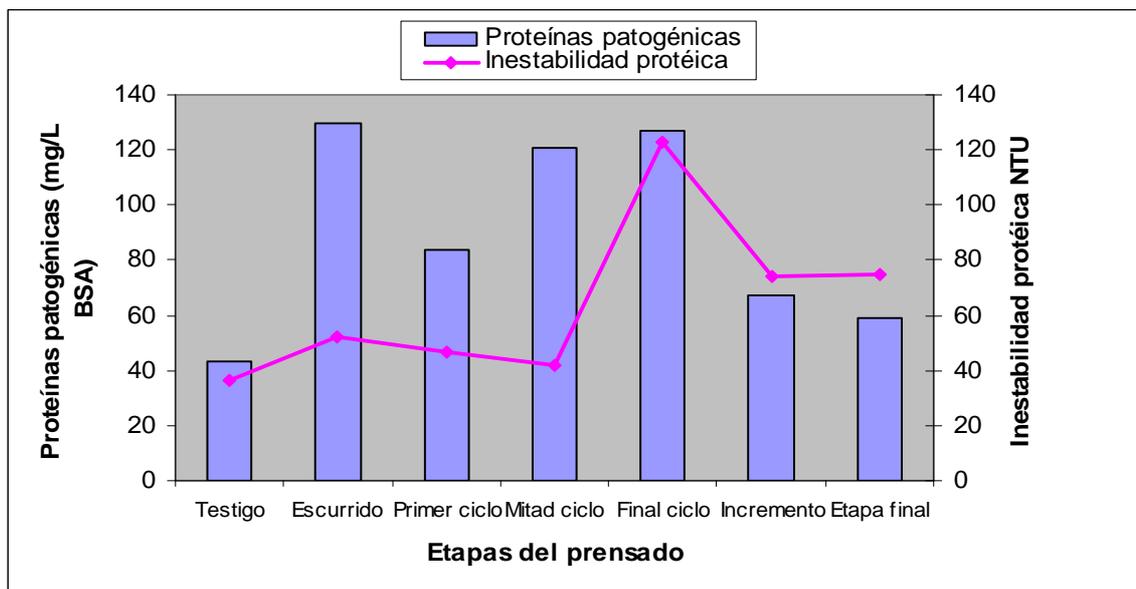


Figura 8. Contenido de proteínas patogénicas v/s inestabilidad proteica de muestra de uva cv. Sauvignon blanc, Clon 1, prensada con ciclo de prensado de seis etapas.

pH de las muestras: El pH de las muestras respecto al testigo (3,12) varió de la siguiente forma a lo largo del prensado, observándose un aumento gradual de éste:

Cuadro 24. Diferencia en unidades de pH, de la muestra testigo con respecto a las muestras de las etapas del prensado.

Muestra inicial	Etapas del prensado	Unidades
Testigo	Escurrido	+0,01
Testigo	Primer ciclo	+0,11
Testigo	Mitad ciclo	+0,22
Testigo	Final ciclo	+0,40
Testigo	Incremento	+0,51
Testigo	Etapa final	+0,78

Polifenoles y proteínas totales: Ambas variables no siguieron un patrón definido a medida que avanzaban las etapas del prensado, apreciándose aumentos y disminuciones con respecto a la muestra testigo.

A continuación en el Cuadro 25, se muestra la diferencia porcentual de las proteínas y polifenoles totales, con respecto a la muestra testigo (85,3 y 121,3 mg/L respectivamente).

Cuadro 25. Diferencia porcentual de polifenoles y proteínas totales, de cada una de las etapas del prensado con respecto a la muestra testigo.

Muestra inicial	Etapas del prensado	Polifenoles totales	Proteínas totales
Testigo	Escurrido	+24,0%	+120,3%
Testigo	Primer ciclo	+10,6%	+51,2%
Testigo	Mitad ciclo	+9,8%	+98,1%
Testigo	Final ciclo	-15,3%	+69,9%
Testigo	Incremento	+88,6%	+48,8%
Testigo	Etapas final	+97,6%	-15,0%

Electroforesis de proteínas: La Figura 9 muestra la electroforesis realizada a este primer tratamiento de un prensado de 6 etapas. Los números 1-2-3-4 y 5, representan a las etapas del prensado, respectivamente. Al igual que en los casos anteriores (macerado y prensado de 3 etapas), es posible apreciar que existe una concentración de proteínas mas concentrada en el rango de los 25 a 35 Kda, que gracias a bibliografía analizada, corresponderían a proteínas patogénicas.

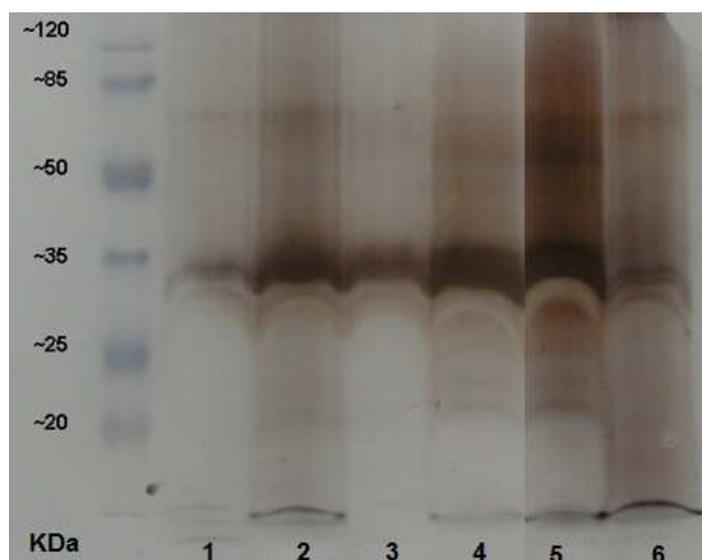


Figura 9. Electroforesis de proteínas mediante SDS-PAGE, (1: Muestra escurrido; 2: Muestra Primer ciclo; 3: Mitad ciclo; 4: Muestra Final ciclo; 5: Muestra Incremento; 6 Muestra Etapa final).

Segundo tratamiento de un prensado de seis etapas

Cuadro 26. Muestra prensada, uvas cv. Sauvignon blanc, del Valle de Casablanca, Clon 1, Viña Veramonte.

Muestras (6 etapas y testigo)	Proteínas patogénicas (BSA, mg/L)				Total	Inestabilidad proteica (Δ NTU)
	Taumatina		Quitinasa			
	VVTL1	VVTL2	ChitA	ChitB		
	+					
	VVTL3					
Testigo	17,1 (1,0)	12,6 (0,4)	13,5 (0,1)	n.d.	43,0 (1,5)	36 (0,4)
Escurrido	44,6 (3,2)	13,8 (1,8)	30,6 (0,0)	n.d.	89,0 (1,7)	39 (2,0)
Primer ciclo	26,1 (2,2)	14,4 (0,5)	22,4 (5,3)	n.d.	62,9 (7,1)	134 (2,0)
Mitad ciclo	29,5 (1,4)	15,3 (2,8)	18,5 (2,0)	n.d.	63,3 (2,1)	48 (1,5)
Final ciclo	15,7 (0,5)	12,3 (2,4)	23,1 (1,3)	n.d.	51,1 (4,8)	108 (4,5)
Incremento	6,0 (1,8)	8,5 (2,0)	14,1 (1,3)	n.d.	28,6 (5,2)	80 (0,5)
Etapas final	7,9 (0,2)	9,2 (1,0)	12,0 (5,5)	n.d.	29,1 (6,6)	72 (3,5)

n.d.: No determinado
 (): Desviación estándar
 VVTL1: *Vitis vinifera* taumatina 1
 VVTL2: *Vitis vinifera* taumatina 2
 VVTL3: *Vitis vinifera* taumatina 3
 ChitA: Quitinasa A
 ChitB: Quitinasa B

Cuadro 27. Muestra prensada, uvas cv. Sauvignon blanc, del Valle de Casablanca, Clon 1, Viña Veramonte.

Muestras (6 etapas y testigo)	pH	°Brix	Proteínas totales Bradford (BSA, mg/L)	Polifenoles totales (Ác. gálico, mg/L)
Testigo	3,12 (0,0)	22,9 (0,0)	8,7 (2,2)	175,4 (5,2)
Escurrido	3,24 (0,1)	19,9 (0,0)	111,1 (2,5)	338,4 (1,5)
Primer ciclo	3,27 (0,0)	20,9 (0,0)	95,3 (9,3)	130,5 (4,0)
Mitad ciclo	3,30 (0,0)	22,1 (0,0)	107,0 (2,5)	331,5 (8,5)
Final ciclo	3,49 (0,1)	21,2 (0,1)	109,7 (5,7)	191,8 (5,4)
Incremento	3,54 (0,0)	18,3 (0,0)	96,9 (0,3)	254,3 (3,7)
Etapas final	3,59 (0,1)	18,3 (0,0)	85,9 (4,4)	226,9 (5,5)

(): Desviación estándar

Proteínas patogénicas e inestabilidad proteica: El contenido de proteínas patogénicas e inestabilidad proteica de cada una de las muestras, varió con respecto a la muestra testigo de la siguiente forma:

Cuadro 28. Diferencia porcentual de proteínas patogénica e inestabilidad proteica de cada una de las etapas del prensado, con respecto a la muestra testigo (43 mg/L y 36 ΔNTU, respectivamente).

	Escurreido	Primer ciclo	Mitad ciclo	Final ciclo	Incremento	Etapa final
Proteínas patogénicas	+106,9%	+46,2%	+47,2%	+18,8%	-33,4%	-32,3%
Inestabilidad proteica	+8,3%	+272,2%	+33,3%	+200,0%	+122,2%	+100,0%

En la figura 10 se muestran las dos variables antes mencionadas, con el fin de analizar mas adelante una posible relación entre ellas.

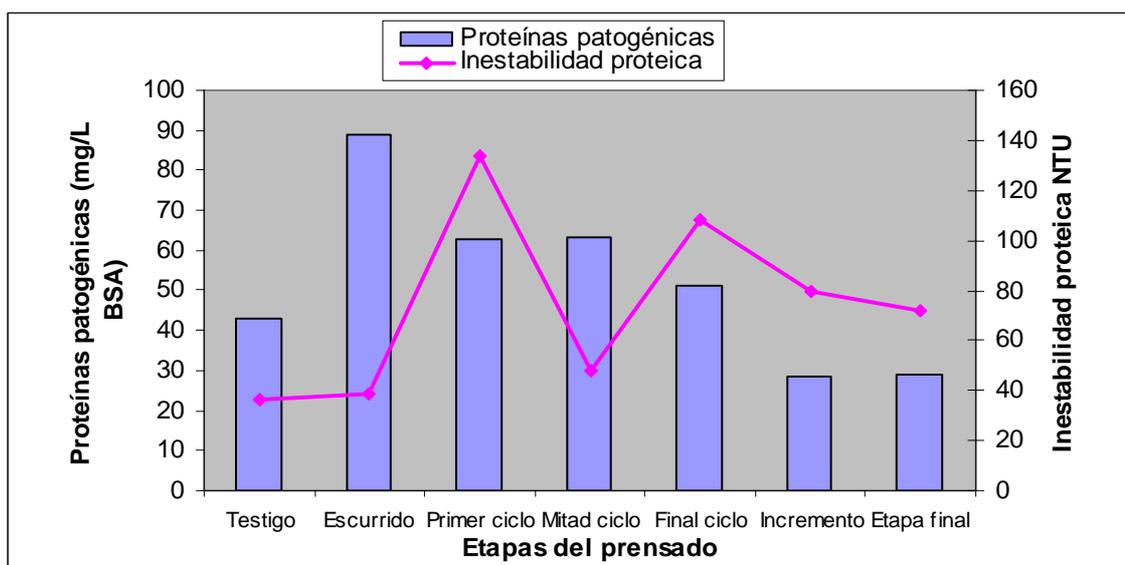


Figura 10. Contenido de proteínas patogénicas v/s inestabilidad proteica de muestra de uva cv. Sauvignon blanc, Clon 1, prensada con ciclo de prensado de seis etapas.

pH de las muestras: El pH de las muestras respecto al testigo (3,12) varió de la siguiente forma a lo largo del prensado:

Cuadro 29. Diferencia en unidades de pH, de la muestra testigo con respecto a las muestras de prensado.

Muestra inicial	Etapas del prensado	Unidades
Testigo	Ecurrido	+0,12
Testigo	Primer ciclo	+0,15
Testigo	Mitad ciclo	+0,21
Testigo	Final ciclo	+0,37
Testigo	Incremento	+0,42
Testigo	Etapa final	+0,47

Polifenoles y proteínas totales: La cantidad de polifenoles se comportó en forma desuniforme a lo largo de las etapas del prensado, observándose aumentos y disminuciones con respecto a la muestra testigo. Por otro lado la concentración de proteínas totales a lo largo del prensado nunca disminuyó con respecto a la muestra testigo.

A continuación en el Cuadro 30, se muestra la diferencia porcentual de las proteínas y polifenoles totales, con respecto a la muestra testigo (85,7 y 175,4 mg/L respectivamente).

Cuadro 30. Diferencia porcentual de polifenoles y proteínas totales de cada una de las etapas con respecto a la muestra testigo

Muestra inicial	Etapas del prensado	Polifenoles totales	Proteínas totales
Testigo	Ecurrido	+92,9%	+29,6%
Testigo	Primer ciclo	-25,5%	+11,2%
Testigo	Mitad ciclo	+88,9%	+24,8%
Testigo	Final ciclo	+9,3%	+28,0%
Testigo	Incremento	+44,9%	+13,0%
Testigo	Etapa final	+29,3%	+0,2%

Proteínas patogénicas e inestabilidad proteica: La concentración de proteínas patogénicas e inestabilidad proteica de cada una de las muestras varió con respecto a la muestra testigo de la siguiente forma:

Cuadro 33. Diferencia porcentual de proteínas patogénica e inestabilidad proteica de cada una de las etapas del prensado, con respecto a la muestra testigo (26,4 mg/L y 27 Δ NTU respectivamente).

	Escurrido	Primer ciclo	Mitad ciclo	Final ciclo	Incremento	Etapas final
Proteínas patogénicas	+197,3%	+251,1%	+292,0%	+86,7%	+180,3%	+177,2%
Inestabilidad proteica	+48,1%	+266,6%	+70,3%	- 3,7%	+181,4%	+211,1%

En la Figura 11 se muestran las dos variables antes mencionadas, con el fin de analizar más adelante una posible relación entre ellas.

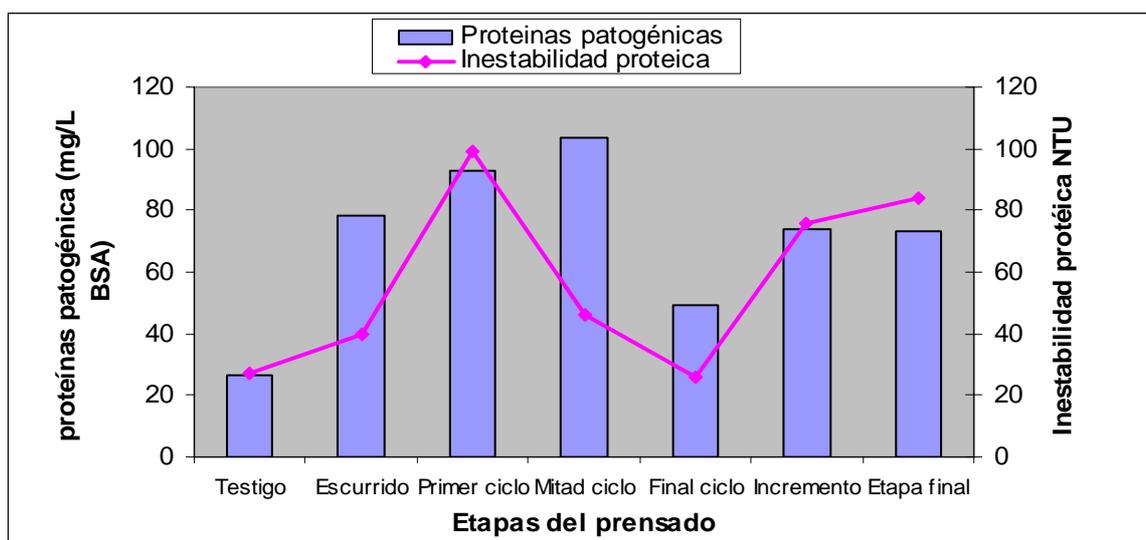


Figura 11. Contenido de proteínas patogénicas v/s inestabilidad proteica de muestra de uva cv. Sauvignon blanc, Clon 1, prensada con ciclo de prensado de seis etapas.

pH de las muestras: El pH de las muestras respecto al testigo (3,39) varió de la siguiente forma a lo largo del prensado:

Cuadro 34. Diferencia en unidades de pH, de la muestra testigo con respecto a las muestras de las etapas del prensado.

Muestra inicial	Etapas del prensado	Unidades
Testigo	Escurrido	+0,01
Testigo	Primer ciclo	+0,21
Testigo	Mitad ciclo	+0,36
Testigo	Final ciclo	+0,43
Testigo	Incremento	+0,67
Testigo	Etapas final	+0,76

Polifenoles y proteínas totales: La cantidad de polifenoles se comportó en forma desuniforme a lo largo de las etapas del prensado, observándose aumentos y disminuciones con respecto a la muestra testigo. Por otro lado la cantidad de proteínas totales a lo largo del prensado nunca disminuyó con respecto a la muestra testigo.

A continuación en el Cuadro 35, se muestra la diferencia porcentual de las proteínas y polifenoles totales, con respecto a la muestra testigo (70,3 y 167,2 mg/L respectivamente).

Cuadro 35. Diferencia porcentual de polifenoles y proteínas totales, de cada una de las etapas del prensado con respecto a la muestra testigo.

Muestra inicial	Etapas del prensado	Polifenoles totales	Proteínas totales
Testigo	Escurrido	+41,2%	+79,9%
Testigo	Primer ciclo	-10,6%	+90,0%
Testigo	Mitad ciclo	+33,9%	+105,6%
Testigo	Final ciclo	+31,5%	+29,1%
Testigo	Incremento	+8,8%	+68,9%
Testigo	Etapas final	+37,7%	+56,1%

Cuarto tratamiento de un prensado de seis etapas

Cuadro 36. Muestra prensada, uvas cv. Sauvignon blanc, del Valle de Casablanca, Clon 242, Viña Veramonte.

Muestras (6 etapas y testigo)	Proteínas patogénicas (BSA, mg/L)				Total	Inestabilidad proteica (Δ NTU)
	Taumatina		Quitinasa			
	VVTL1	VVTL2	ChitA	ChitB		
	+					
	VVTL3					
Testigos	46,6 (4,7)	20,3 (2,6)	30,2 (1,3)	n.d.	82,7 (23,2)	74 (16,7)
Escurrido	38,0 (3,4)	19,7 (0,8)	23,2 (2,5)	n.d.	80,9 (1,6)	79 (0,6)
Primer ciclo	51,0 (1,3)	23,3 (2,8)	27,6 (2,7)	n.d.	101,9 (1,2)	72 (0,9)
Mitad ciclo	52,0 (0,1)	21,8 (0,3)	37,8 (0,5)	n.d.	111,6 (1,0)	49 (0,4)
Final ciclo	52,9 (1,8)	25,3 (2,0)	44,5 (6,6)	n.d.	122,7 (10,5)	62 (0,3)
Incremento	38,7 (0,9)	21,2 (3,1)	27,7 (3,3)	n.d.	87,6 (0,7)	80 (0,8)
Etapa final	24,8 (1,6)	17,1 (5,2)	20,8 (7,0)	n.d.	62,7 (3,2)	80 (0,9)

n.d.: No determinado
(): Desviación estándar
VVTL1: *Vitis vinifera* taumatina 1
VVTL2: *Vitis vinifera* taumatina 2
VVTL3: *Vitis vinifera* taumatina 3
ChitA: Quitinasa A
ChitB: Quitinasa B

Cuadro 37. Muestra prensada, uvas cv. Sauvignon blanc, del Valle de Casablanca, Clon 242, Viña Veramonte.

Muestras (6 etapas y testigo)	pH	°Brix	Proteínas totales Bradford (BSA, mg/L)	Polifenoles totales (Ác. gálico, mg/L)
Testigos	3,15 (0,0)	17,5 (0,8)	96,4 (3,3)	101,2 (3,3)
Escurrido	3,24 (0,1)	17,9 (0,1)	104,4 (5,8)	104,8 (4,3)
Primer ciclo	3,23 (0,0)	18,7 (0,0)	116,2 (0,0)	267,7 (1,7)
Mitad ciclo	3,30 (0,1)	19,7 (0,0)	154,1 (1,1)	228,1 (4,4)
Final ciclo	3,35 (0,0)	21,0 (0,0)	167,1 (2,3)	157,4 (6,9)
Incremento	3,50 (0,0)	19,0 (0,0)	138,5 (1,5)	162,2 (4,1)
Etapa final	3,76 (0,1)	20,6 (0,1)	86,4 (2,7)	252,4 (2,7)

(): Desviación estándar

Proteínas patogénicas e inestabilidad proteica: El contenido de proteínas patogénicas e inestabilidad proteica de cada una de las muestras varió con respecto a la muestra testigo de la siguiente forma:

Cuadro 38. Diferencia porcentual de proteínas patogénica e inestabilidad proteica de cada una de las etapas del prensado, con respecto a la muestra testigo (82,7 mg/L y 73 Δ NTU respectivamente).

	Ecurrido	Primer ciclo	Mitad ciclo	Final ciclo	Incremento	Etapas final
Proteínas patogénicas	-2,2%	+23,2%	+35,3%	+48,3%	+5,9%	-24,1%
Inestabilidad proteica	+6,7%	-2,7%	-33,7%	-16,2%	+8,1%	+8,1%

La Figura 12 muestra las dos variables antes mencionadas, con el fin de analizar su posible relación más adelante.

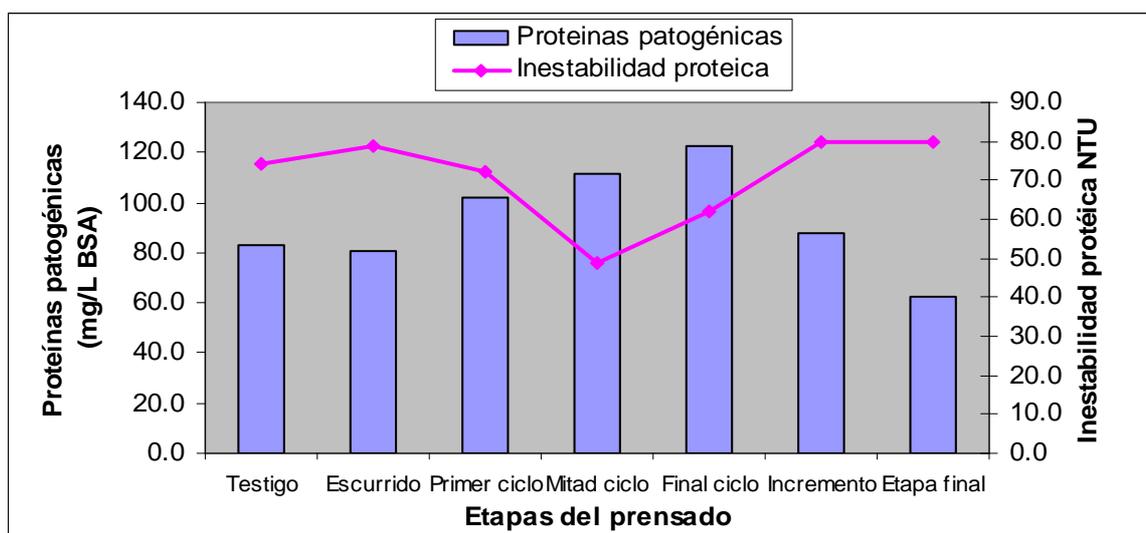


Figura 12. Contenido de proteínas patogénicas v/s inestabilidad proteica de muestra de uva cv. Sauvignon blanc, Clon 242, prensada con ciclo de prensado de seis etapas.

pH de las muestras: El pH de las muestras respecto al testigo (3,15), varió de la siguiente forma a lo largo del prensado:

Cuadro 39. Diferencia en unidades de pH, de la muestra testigo con respecto a las muestras de las etapas del prensado.

Muestra inicial	Etapas del prensado	Unidades
Testigo	Ecurrido	+0,09
Testigo	Primer ciclo	+0,08
Testigo	Mitad ciclo	+0,15
Testigo	Final ciclo	+0,20
Testigo	Incremento	+0,35
Testigo	Etapas final	+0,61

Polifenoles y proteínas totales: La cantidad de polifenoles totales se comportó en forma desuniforme a lo largo de las etapas del prensado, aunque no se encontraron valores menores a la muestra testigo. Por otro lado la cantidad de proteínas totales también se comportó en forma desuniforme, encontrándose aumentos y disminuciones con respecto a la muestra testigo.

A continuación en el Cuadro 40, se muestra la diferencia porcentual de las proteínas y polifenoles totales, con respecto a la muestra testigo (96,4 y 101,2 mg/L respectivamente).

Cuadro 40. Diferencia porcentual de polifenoles y proteínas totales de cada una de las etapas del prensado con respecto a la muestra testigo.

Muestra inicial	Etapas del prensado	Porcentajes con respecto a polifenoles totales	Porcentajes con respecto a proteínas totales
Testigo	Ecurrido	+3,5	+8,2%
Testigo	Primer ciclo	+164,5	+20,5%
Testigo	Mitad ciclo	+125,3	+59,8%
Testigo	Final ciclo	+55,5	+73,3%
Testigo	Incremento	+60,2	+43,6%
Testigo	Etapas final	+149,4	-10,3%

Ensayo con bentonita

A continuación se muestran los resultados obtenidos en los dos tratamientos de diferentes vinos, tratados con bentonita cálcica.

En este ensayo final se eligieron dos muestras de vino de la variedad Sauvignon blanc, clon 242, de la viña Errázuriz. Estos vinos son totalmente distintos, ya que en un caso la uva fue directamente prensada y luego fermentada, y en el otro, la uva fue macerada, luego prensada y fermentada. Luego con el vino terminado, sin clarificar ni filtrar se hicieron los siguientes análisis (Cuadro 41 y 42).

Cuadro 41. Muestra de vino, con uva macerada y prensada, cv. Sauvignon blanc, del Valle de Leyda, clon 1, Viña Errázuriz.

Muestra de vino	Dosis de bentonita (g/hL)	Turbidez (NTU)		Inestabilidad proteica (Δ NTU)	Proteínas patogénicas (BSA, mg/L)
		Antes de la aplicación	Después de la aplicación		
Sin definir	----	3,7 (0,0)	110,1 (5,7)	106,4 (5,7)	171,8
	30	0,5 (0,1)	59,7 (0,6)	59,2 (0,6)	
	40	0,8 (0,3)	46,6 (3,0)	45,8 (3,2)	
	50	0,7 (0,1)	33,8 (2,4)	33,1 (2,3)	
	60	1,2 (0,0)	21,8 (0,1)	20,6 (0,1)	
	80	0,7 (0,1)	7,3 (0,2)	6,6 (0,0)	13,6
	100	0,5 (0,0)	1,7 (0,1)	1,2 (0,1)	3,8
	120	0,5 (0,0)	0,8 (0,1)	0,3 (0,1)	n.d.
	140	0,8 (0,0)	1,3 (0,1)	0,5 (0,1)	
	160	0,6 (0,0)	0,8 (0,0)	0,2 (0,1)	

n.d.: no determinado (): Desviación estándar  : rango en donde la bentonita es efectiva

Cuadro 42. Muestra de vino, con uva sólo prensada, cv. Sauvignon blanc, del Valle de Leyda, Clon 1, Viña Errázuriz.

Muestra de vino	Dosis de bentonita (g/hL)	Turbidez (NTU)		Inestabilidad proteica (Δ NTU)	Proteínas patogénicas (BSA, mg/L)
		Antes de la aplicación	Después de la aplicación		
Sin definir	----	4,5 (0,2)	86,6 (0,2)	82,1 (0,1)	130
	30	0,8 (0,1)	40,3 (1,2)	39,5 (1,1)	
	40	0,6 (0,2)	31,6 (1,4)	31,0 (1,3)	
	50	0,6 (0,0)	25,1 (0,4)	24,5 (0,4)	
	60	0,9 (0,5)	12,4 (1,1)	11,4 (0,6)	7,5
	80	0,4 (0,0)	2,0 (0,1)	1,6 (0,1)	3,2
	100	0,5 (0,0)	1,3 (0,4)	0,8 (0,5)	n.d.
	120	0,4 (0,0)	0,9 (0,3)	0,5 (0,3)	
	140	0,5 (0,0)	0,9 (0,0)	0,4 (0,0)	
	160	0,8 (0,2)	0,9 (0,0)	0,1 (0,1)	

n.d.: no determinado (): Desviación estándar  : rango donde la bentonita es efectiva

Discusión y Análisis de los Resultados

A continuación, se discuten los resultados antes mostrados, en separado, para cada ensayo y subensayo existente, con el fin de analizar, inferir, y comparar con los resultados de otros autores.

Ensayo de maceración

En ambos tratamientos se ve claramente que el contenido de proteínas patogénicas, al igual que la inestabilidad proteica de las muestras, aumentó de gran manera, luego que las uvas fueron expuestas a una maceración en frío. De esto se puede inferir que el proceso de maceración en frío sí tiene un efecto sobre el aumento de proteínas patogénicas e inestabilidad proteica de los mostos.

Estos resultados se comparan con los obtenidos por Darías-Martín *et al.* (2004), el cual comparó dos tipos de prensados, uno con una maceración previa y otro sin maceración. Ellos encontraron que la turbidez del jugo libre (sin macerar), era menor que la del jugo macerado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente memoria, aunque cabe destacar que los resultados mostrados por los autores mencionados, fueron realizados con otra variedad de uva.

Los resultados obtenidos, permiten inferir, que existe una relación entre las dos variables antes mencionadas, ya que cada vez que las proteínas patogénicas aumentaron, su inestabilidad también lo hizo. A la vez esto también permite inferir que existe un paso de proteínas patogénicas al mosto desde las pieles de las uvas, gracias a esta maceración.

Cabe destacar que el macerado de seis horas aumentó en un 88,2 % su contenido de proteínas patogénicas y en un 190% su inestabilidad proteica, y el macerado de cuatro horas en un 44,2 % su contenido de proteínas patogénicas y en un 72,2 % su inestabilidad proteica, por lo que se puede apreciar que la cantidad de horas del macerado tiene una incidencia directa sobre el contenido de estas proteínas y su inestabilidad, entregando una información relevante al enólogo a la hora de decidir el tiempo de maceración como parte de la vinificación.

Subensayo de prensado de 3 etapas

En ambos tratamientos se puede apreciar que el contenido de proteínas patogénicas aumentó con respecto a la muestra testigo, encontrándose un pico de valor en la etapa de escurrido, (esto se puede deber a la maceración que sufren las uvas cosechadas mecánicamente en el recipiente de transporte y mientras se espera el llenado de la prensa antes de comenzar con el prensado), para luego descender en la etapa de prensa. Estos

resultados muestran que quizás el proceso de prensado produce una extracción rápida de proteínas patogénicas al comienzo de éste, debido a la maceración, y luego esta extracción va descendiendo a medida que avanza el prensado.

La inestabilidad proteica en ambos tratamientos disminuyó en la etapa de escurrido (aunque en el segundo tratamiento no fue tan notorio), para luego encontrar un pico de valor en la etapa de gota. En el primer tratamiento esta inestabilidad se mantuvo en la etapa de prensa, pero en el segundo tratamiento, ésta disminuyó notoriamente. Estos resultados muestran que la etapa de gota (normalmente destinada a vinos de primera calidad) podría llegar a ser la más inestable proteicamente. Según el estudio realizado por Darías-Martín *et al.* (2004), donde se midió la turbidez de uva cv. Listán blanco, en un prensado de 6 etapas, la curva encontrada mostró que el jugo libre tuvo una baja turbidez, luego aumentó en la primera fracción, para luego ir decreciendo. Si se observa la trayectoria de la curva, se podría decir que existe una similitud en el comportamiento de la turbidez, entre ambos prensados, con un pico al comienzo de éste y una disminución al término del prensado.

En las Figuras 5 y 7 se puede observar que no existe una relación directa de las proteínas patogénicas sobre la inestabilidad proteica de los mostos, ya que cuando se incrementó la concentración de proteínas, no necesariamente su inestabilidad proteica también lo hizo. Estos resultados encontrados, demuestran que deben existir otros factores, quizás no proteicos, los cuales intervienen y aportan, a aumentar o disminuir la inestabilidad proteica de las muestras.

Subensayo de prensado de 6 etapas

El contenido de proteínas patogénicas no siguió un patrón definido, pero se puede observar que en 3 de los 4 tratamientos el contenido de estas proteínas aumentó en la etapa de escurrido (al igual que en el prensado de 3 etapas), en comparación a la muestra testigo. Luego el contenido de proteínas patogénicas es bastante irregular en cada uno de los tratamientos realizados.

El comportamiento de la inestabilidad proteica de los 4 tratamientos fue diferente en cada uno, al compararlas entre ellos, sin seguir un patrón definido que pueda relacionar el proceso de prensado con la inestabilidad proteica de las muestras.

Según el estudio nombrado anteriormente de Darías-Martín *et al.* (2004), donde se comparó la turbidez del mosto, en 6 etapas de un prensado, se puede apreciar que los resultados encontrados no se correlacionan con los mostrados en el presente trabajo, ya que aunque en 3 de los 4 tratamientos vistos, la turbidez aumentó desde la muestra testigo a la de escurrido, la disminución de la turbidez; luego de esta etapa, no fue decreciendo, sino presentando aumentos y disminuciones a lo largo del final del prensado. Cabe también destacar que la variedad de uva usada en el trabajo de Darías-Martín *et al.* (2004) fue distinta a la usada en esta memoria.

Como anteriormente se había señalado (prensado de 3 etapas), los resultados son bastante confusos, ya que, no necesariamente cuando el contenido de proteínas patogénicas aumentó, la inestabilidad proteica también lo hizo. En algunos casos se pudo apreciar ese fenómeno, pero en otros no, por lo que no se puede inferir que el proceso de prensado tiene un efecto definido sobre estas variables.

Ensayo con bentonita

Como se puede ver en el Cuadro 41, el vino del cual la uva fue macerada y luego prensada, necesitó 100 g/hL de bentonita para poder dejar el vino estable con una inestabilidad proteica de 1,2 NTU. Por otro lado, el otro tratamiento, del cual la uva fue solo prensada y no macerada (Cuadro 42) se necesitó una dosis de 80 g/hL de bentonita para poder dejar el vino estable con una inestabilidad proteica de 1,6 NTU.

La cantidad de proteínas patogénicas cuantificadas en el primer tratamiento fue de 171,8 mg/L, un 24,3% mayor que en el segundo tratamiento (130 mg/L). Esto se debió principalmente al proceso de maceración que se produjo en el primer tratamiento, donde se piensa que el aumento de proteínas patogénicas se dio principalmente desde las pieles de la uva. Como se ve en estos resultados, la cuantificación de proteínas patogénicas de los vinos fueron bastante altas y parecidas, a las concentraciones de éstas en los mostos. Según Ferreira *et al.* (2002), la combinación de pH bajo y la actividad proteolítica, garantizan que sólo las proteínas resistentes a estas condiciones, tales como las proteínas patogénicas, sobrevivan al proceso de elaboración del vino.

La bentonita usada en el segundo tratamiento (80 g/hL) fue un 20% menor a la usada en el primero (100 g/hL). Lo que nos da a entender que uno de los principales problemas de éste aumento en la dosis de bentonita, se debe a la mayor concentración de proteínas patogénicas cuantificadas en el primer tratamiento.

Hoy en día es común que las uvas blancas se maceren, con el fin de extraer una mayor cantidad de compuestos aromáticos de la piel de las uvas, con el objeto de mejorar el perfil aromático de los vinos. No obstante, los resultados antes mostrados demuestran que el proceso de macerado aumenta el contenido de proteínas causantes de turbidez en vinos blancos, por lo que los aromas extraídos durante el macerado podrían ser perdidos al momento de la clarificación, donde se tendría que usar una mayor dosis de bentonita.

Otros estudios

Según Mesquita *et al.* (2004), la presencia de proteínas en el vino es sin duda un requisito previo para la formación de turbidez proteica y parece generalmente aceptado que cuanto mayor es el contenido total de proteínas del vino, mayor será su tendencia a volverse inestable. Por esta razón, es que el estudio de la turbidez proteica se centra fundamentalmente en las propias proteínas (Batista *et al.*, 2008).

Existen una serie de factores no proteicos, que fueron recientemente estudiados por Waters *et al.* (2005), propuestos como absolutamente necesarios para la formación de turbidez proteica en vinos sometidos a pruebas de calor (80° C). Entre ellos se encuentran el pH del vino, etanol, polisacáridos, iones metálicos y compuestos fenólicos. Ninguno de ellos ha sido analizado con suficiente profundidad para comprender su papel exacto en la formación de turbidez proteica en los vinos blancos.

A continuación se discutirán estos factores no proteicos, con los resultados expuestos en esta memoria.

pH

En ambos tratamientos de macerado el pH de las muestras aumentó con respecto a la muestra testigo, al igual que a lo largo de los prensados (3 y 6 etapas). Esto se debe a la presión a la que es expuesta la uva mientras se macera, y al prensado en si mismo, lo que logra que se libere mayor jugo cercano a la piel, la cual es rica en cationes como el potasio y sales, que elevan el pH (Darías-Martín *et al.*, 2004).

El efecto del pH en la apariencia turbia del vino blanco no han sido muy estudiado hasta la fecha, y gran parte de la obra publicada no ha involucrado directamente al vino como objeto de estudio (Waters *et al.*, 2005), aunque estudios reflejan que el efecto del pH sobre la estabilidad del vino y la solubilidad de las proteínas, estaría relacionado al punto isoeléctrico de éstas (Batista *et al.*, 2009).

Según Batista *et al.* (2008), cuanto menor sea la diferencia entre el pH del vino y el pI de las proteínas, menor es la carga neta transportada por las proteínas y menor es su estabilidad. En simples palabras y sabiendo que el punto isoeléctrico de las proteínas patogénicas esta en el rango de 4,1 y 5,8, podemos decir que mientras mas básico es el pH del vino, menos estables son sus proteínas, y mientras mas ácido es el vino más estables son éstas.

Gracias a los resultados obtenidos, se puede apreciar que esto sucede en ambos tratamientos del ensayo de maceración, pero no en los tratamientos de prensado (3 y 6 etapas), donde la inestabilidad proteica tendió a aumentar en algunos casos a medida que el pH aumentaba, pero en varias etapas ocurría lo contrario. Después de analizar estos resultados no queda muy claro si el pH interfiere o no en la estabilidad de las proteínas, ya que existieron resultados positivos y negativos al respecto de esto.

Relación compuestos fenólicos-proteínas

Gramshaw (1970), citado por Siebert *et al.* (1996), asoció la apariencia turbia del vino a la formación de una suspensión coloidal, debido a la interacción que existe entre los polifenoles y las proteínas.

Siebert *et al.* (2006), sugirieron que existe un mecanismo hidrofóbico en la interacción proteína-polifenol, en el cual las proteínas tienen un número fijo de sitios de unión fenólica. Muchos de estos sitios están expuestos cuando la proteína está desnaturalizada, tal como ocurre durante la exposición al calor. Inicialmente el complejo proteína-polifenol es soluble, pero cuando el complejo crece se vuelve más insoluble, formando turbidez.

En el ensayo de maceración y subensayo de prensado de 3 etapas, los polifenoles aumentaron, a medida que avanzaban los procesos. Estos resultados fueron parecidos a los obtenidos por Darías-Martín *et al.* (2004), lo que refleja que el futuro vino macerado, o el futuro vino producido con las etapas de prensa, serían los más perjudicados, desde el punto de vista de la interacción entre polifenoles y proteínas, gracias a que existiría una mayor concentración de estas dos variables. Por otro lado, en el subensayo de prensado de 6 etapas, la concentración de polifenoles fue bastante irregular, no encontrándose un patrón definido, ni una lógica deseada, que nos permitiera asociar estas dos variables a la turbidez de las muestras.

Según un trabajo realizado por Esteruelas *et al.* (2011), ellos llegaron a la conclusión de que los compuestos fenólicos, a pesar de que no son fáciles de identificar y cuantificar, están presentes en el precipitado natural de proteína, en una proporción no despreciable. Este hecho sugiere que los compuestos fenólicos son probablemente involucrados en el mecanismo de aparición de turbidez en los vinos blancos.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a las condiciones empleadas en este estudio y a los resultados encontrados, es posible concluir que:

- La maceración prefermentativa en frío realizada a uvas del cv. Sauvignon blanc, aumentó el contenido de proteínas patogénicas en el jugo, al mismo tiempo que también aumentó la inestabilidad proteica de éste.
- Los procesos de prensado realizados a uva cv. Sauvignon blanc, produjeron un efecto sobre el contenido de proteínas patogénicas e inestabilidad proteica del jugo de uva, distinto en cada uno de los tratamientos, sin seguir un patrón definido.
- Un vino cv. Sauvignon blanc elaborado a partir de uvas maceradas y prensadas, contiene una mayor concentración de proteínas patogénicas, y a la vez es más inestable proteicamente, por lo que necesita una mayor dosis de bentonita para lograr estabilizar proteicamente el vino, en comparación con un vino cv. Sauvignon blanc elaborado a partir de uvas solo prensadas.

BIBLIOGRAFIA

- Batista, L., S. Monteiro, V.B. Loureiro, A.R. Teixeira and R.B. Ferreira. 2009. The complexity of protein haze formation in wines. *Food Chem.* 112: 169-177.
- Blade, W.H., R. Boulton. 1988. Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 193–199.
- Blouin, J., E. Peynaud. 2004. *Enología practica*. 4º ed. Madrid, Mundi- Prensa libros. 231p.
- Bradford, M.M. 1976. A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Darias-Martín, J., D. Díaz-González and C. Díaz-Romero. 2003. Influence of two pressing processes on the quality of must in white wine production. *J. Food Eng.* 63: 335–340.
- Esteruelas, M., N. Kontoudakis, M. Gil, F.M. Fort, M.J. Canals and F. Zamora. 2011. Phenolic compounds present in natural haze protein of Sauvignon white wine. *Food Res. Int.* 44: 77-83.
- Ferreira, R.B., S. Monteiro, M.A. Piçarra-Pereira, M.C. Tanganho, V.B Loureiro and A.R. Teixeira. 2000. Characterization of the proteins from grapes and wines by immunological methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 22–28.
- Ferreira, R.B., M.A. Piçarra-Perreira, S. Monteiro, V.B. Loureira and A.R. Teixeira. 2002. The wine proteins. *Trends Food Sci. Technol.* 12 (7): 230-239.
- Ferreira, R.B., S. Monteiro, M. Pereira, and R. Teixeira. 2004. Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *J. Agric. Food Chem.* 22: 168-173.
- Flanzy C. 2003. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. 2º ed. Madrid, Mundi-prensa libros. 805p.
- Francis, I.L., M.A. Sefton and P.J. William. 1994. The sensory effects of pre – or post - fermentation thermal processing on Chardonnay and Semillon wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 243–251.
- Hidalgo, J., J. Togores. 2002. *La calidad del vino desde el viñedo*. Madrid, Mundi- Prensa libros. 1423p.

Høj, P.B., D.B. Tattersall, K. Adams, K.F. Pocock, Y. Hayasaka, R. Van Heeswijck and E. J. Waters. 2000. The 'haze proteins' of wine – a summary of properties, factors affecting their accumulation in grapes, and the amount of bentonite required for their removal from wine. Proceedings of ASEV 50th Anniversary Meeting, Seattle, Washington, USA (American Society of Enology and Viticulture: Davis, California). 149–154p.

Hsu, J.C., D.A. Heatherbell. 1987. Heat-unstable proteins in wine. I. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 11–16.

Jach, G., B. Gornhardt, J. Mundy, J. Logemann, E. Pinsdorf, R. Leah, J. Schell and C. Maas. 1995. Enhanced Quantitative Resistance Against Fungal Disease by Combinatorial Expression of Different Barley Antifungal Proteins in Transgenic Tobacco, *Plant J.* 8: 97–109.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Mac Kay Tepper, C. 2009. El prensado. Disponible en <http://www.cmackay.org/2009/05/11/el-prensado-parte-1/>. Leído el 2 de Noviembre de 2009.

Mesquita, P.R., M.A. Piçarra-Perreira, S. Monteiro, V.B. Loureira, A.R. Teixeira and T.B. Ferreira. 2001. Effect of wine composition on protein stability. *Am. J. Enol. Vitic.* 54 (4): 324-330.

Monteiro, S., M. Barakat, M.A. Piçarra-Pereira, A.R. Teixeira and R.B. Ferreira. 2003. Osmotin and Thaumatin from Grape: A Putative General Defense Mechanism Against Pathogenic Fungi: *Biochem. Cell Biol.* 93 (12): 1505- 1512.

Pashova, V., C. Güell and F. López. 2004a. White wine continuous protein stabilization by packed column. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1558–1563.

Pashova, V., C. Güell, E. Pueyo, M. López-Barajas, M.C. Polo and F. López. 2004b. White wine protein stabilization by a continuous process using a packed column. *Am. J. Enol. Vitic* 55: 195-198.

Peng, Z., K.F. Pocock, J.E. Waters, I.L. Francis, P.J. Williams. 1997. Taste properties of grape (*Vitis vinifera*) pathogenesis-related proteins isolated from wine. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4639–4643.

Pocock, K.F., P.B. Høj, K.S. Adams, M.J. Kwiatkowski and E.J. Waters. 2003. Combined heat and proteolytic enzyme treatment of white wines reduce haze forming protein content without detrimental effect. *Aust. J. Grape Wine Res.* 9: 56–63.

- Ribéreau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean and D. Dubourdieu. 2000. *Handbook of enology. Volume 2: The chemistry of wine stabilization and treatments*. Jon Wiley & Sons Inc., New York, USA. 451p.
- Salazar, F. N., I. Achaerandio, M.A. Labbé, C. Guell and F. Lopez. 2006. Comparative study of protein stabilization in white wine using zirconia and bentonite: Physicochemical and wine sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9955–9958.
- Salazar, F.N., J.P.F. Bruijn, L. Seminario, C. Güell and F. López. 2007. Improvement of wine crossflow microfiltration by a new hybrid process. *J. Food Eng.* 79: 1329-1336.
- Salazar, F.N. 2008. White wine continuous protein stabilization: industrial viability, PhD thesis, Universitat Rovira i Virgili. ISBN: 978-84-691-2703-2/DL.T.388-2008.
- Salazar, F.N. 2009. Turbidez en vinos blancos. *Revista para la industria de alimentos, Indualimentos.* 59: 88-90.
- Salazar, F.N., F. Zamora, J-M. Canals and F. López. 2009. Protein stabilization in sparkling base wine using zirconia and bentonite: influence on the foam parameter and protein fractions. *Journal international des Sciences de la Vigne et du Vin*, 43 (1), xxx-xxx, in press.
- Sarmiento, M.R., J.C. Oliveira, M. Slatner and R.B. Boulton. 2000. Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability tests. *Food Control* 11: 423–432.
- Schaffner, W., C. Weissmann. A rapid sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* 56: 502-514.
- Siebert, K.J., A. Carrasco and P. Lynn. 1996. Formation of protein – polyphenol haze in beverages. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1997-2005.
- Switzer, R.C. 3rd, C.R. Merrill and S. Shifrin. 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 98 (1): 231-237.
- Thompson C.E., C.L. Fernández, O.N. De Souza, F.M. Salzano, S.L. Bonatto and L.B. Freitas. 2007. Molecular Modeling of Pathogenesis-related Proteins of Family 5: *Cell Biol. Biophys.* 44 (3): 385-394.
- Waters, E.J., W. Wallace and P.J. Williams. 1992. Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1514-1519.
- Waters, E.J., P. Pellerin, and J.M. Brillouet. 1994. A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydr. Polym.* 23:185-191.

Waters, E.J., Y. Hayasaka, D.B. Tattersall, K.S. Adams and P.J. Williams. 1998. Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines. J. Agric. Food hem. 46: 4950–4957.

Waters, E.J.; G. Alexander, R. Muhlack, K.F. Pocock, C. Colby, B.K. O’Neill, P.B. Høj and P. Jones. 2005. Preventing protein haze in bottled white wine. Aust. J. Grape Wine Res. 11: 215–225.