

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**CARACTERIZACIÓN DE GELATINAS DE USO ENOLÓGICO PRESENTES
EN EL MERCADO MEDIANTE ANÁLISIS QUÍMICOS Y
ELECTROFORETICOS**

MATÍAS ALONSO ZAMORANO CARBONELL

SANTIAGO - CHILE
2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**CARACTERIZACIÓN DE GELATINAS DE USO ENOLÓGICO PRESENTES
EN EL MERCADO MEDIANTE ANÁLISIS QUÍMICOS Y
ELECTROFORETICOS**

**CHARACTERIZATION OF OENOLOGICAL GELATINS AVAILABLE ON
THE MARKET BY ELECTROPHORETIC AND CHEMICAL ANALYSIS**

MATÍAS ALONSO ZAMORANO CARBONELL

SANTIAGO - CHILE
2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**CARACTERIZACIÓN DE GELATINAS DE USO ENOLÓGICO PRESENTES
EN EL MERCADO MEDIANTE ANÁLISIS QUÍMICOS Y
ELECTROFORETICOS**

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

MATÍAS ALONSO ZAMORANO CARBONELL

Profesores guías	Calificaciones
Sr. Álvaro Peña Neira Ingeniero Agrónomo-Enólogo, Dr.	6,3
Sr. Remigio López Solís Bioquímico, Dr.	5,0
Profesores Evaluadores	
Sr. Eduardo Loyola Madariaga Ingeniero Agrónomo-Enólogo, Dr.	6,8
Sr. Jaime Araya Clericus Ingeniero Agrónomo, MS PhD.	6,5
Profesor colaborador	
Sr. Italo Chiffelle Gómez Bioquímico, Dr.	

SANTIAGO – CHILE
2010

A mis padres Andrea y Jaime
A mi hermana Carolina
A mi novia Luisa

ÍNDICE

RESUMEN	1
Palabras claves	1
ABSTRACT	2
Key words	2
INTRODUCCIÓN	3
Objetivos	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Lugar de trabajo	7
Materiales	7
Metodología	9
Caracterización de las gelatinas enológicas	9
Estudio del rendimiento de clarificación	10
Diseño experimental	11
Análisis estadístico	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
Información del proveedor	13
Caracterización física y química	14
Detección de proteínas	16
Electroforesis SDS-PAGE	17
– Gelatinas Líquidas	18
– Gelatinas Sólidas	20
Estudio del rendimiento de clarificación	22
Ensayo I	23
– Caracterización de la solución hidroalcohólica empleada	24
– Efecto del clarificante sobre los fenoles totales	25
– Efecto del clarificante sobre los taninos totales	26
– Efecto del clarificante sobre la intensidad colorante	27
Ensayo II	28
– Caracterización de un vino tinto cv. Cabernet Sauvignon	29
– Efecto del clarificante sobre los fenoles totales	29
– Efecto del clarificante sobre los taninos totales	30
– Efecto del clarificante sobre los antocianos totales	32
– Efecto del clarificante sobre la intensidad colorante	33
CONCLUSIONES	35
LITERATURA CITADA	36
APÉNDICES	42
ANEXO	52

RESUMEN

Esta memoria tuvo por objetivos la caracterización química y física de 14 gelatinas de uso enológico presentes en el mercado nacional y el estudio del comportamiento de la composición fenólica global de una solución hidroalcohólica de concentración conocida y de un vino tinto del cv. Cabernet Sauvignon frente a la clarificación con tres dosis diferentes de cada gelatina.

Inicialmente, las gelatinas fueron caracterizadas mediante parámetros físicos y químicos como pH, contenido de proteína total, densidad y detección de proteínas en matrices de celulosa. Todas las muestras presentaron densidades similares, mientras que sus pH fueron consecuentes con sus procesos de elaboración. Las gelatinas que presentaron mayores concentraciones proteicas además de una mayor difusión y reactividad al colorante sobre la matriz de celulosa, fueron las muestras de formulación sólida.

Luego de comprobar la presencia de proteínas en las muestras analizadas, se realizaron electroforesis SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes, para determinar la composición proteica de cada gelatina. Como estándar de peso molecular se utilizaron las proteínas presentes en la saliva humana. Para las gelatinas líquidas se utilizaron geles con una concentración de 12% de acrilamida, presentando una dispersión no uniforme del material con la presencia de una única banda proteica a los 55 kDa en tres de las seis gelatinas. En el caso de las muestras de formulación sólida, se utilizaron geles con una concentración de 10% de acrilamida. A diferencia del caso anterior, éstas sí presentaron bandas proteicas, sin embargo debido a su gran tamaño, migraron sólo en una fracción del gel, impidiendo determinar sus pesos moleculares exactos.

A continuación, se realizaron pruebas de clarificación estableciendo como unidades experimentales de cada ensayo una solución hidroalcohólica de composición conocida y un vino tinto del cv. Cabernet Sauvignon. Se utilizaron dosis de gelatina de 5, 10 y 15 g/hL correspondientes a cada tratamiento. Luego de 48 horas de clarificación, se determinaron parámetros espectrofotométricos para conocer el comportamiento de la fracción polifenólica global frente a la acción clarificadora de cada gelatina. Los resultados obtenidos en ambos ensayos, mostraron una mayor extracción y remoción de compuestos por parte de las gelatinas sólidas, especialmente de taninos totales.

PALABRAS CLAVE

Clarificación, Agentes Clarificantes, Gelatinas Enológicas, Electroforesis SDS-PAGE, Compuestos fenólicos.

ABSTRACT

The objective of this research was the chemical and physical characterization of 14 oenological gelatins that are available in the national market and the study of the behavior of the phenolic compounds of a hydroalcoholic solution of known concentration and a red wine from the cv. Cabernet Sauvignon after clarification by means of three different doses of each gelatin under study.

Initially, the gelatins were characterized through several physical and chemical parameters, such as pH, total protein content, density and protein detection on cellulose matrices. All samples showed similar densities, while their pHs were consistent with their manufacture. With respect to protein concentration and detection in matrices of cellulose, the solid gelatins in solution had higher concentrations and a higher dye diffusion and reactivity on the cellulose matrix compared with the liquid gelatins.

After verifying the presence of proteins in samples, was carried out a SDS-PAGE electrophoresis performed in denaturing conditions in order to determine the protein composition of each gelatin. As standard of molecular weight were used the proteins present in the human saliva. For liquid gelatins, were used gels with a concentration of 12% acrylamide, showing an irregular dispersity of the material with the presence of the only protein band of 55 kDa only in three of the six gelatins. In the case of samples of solid formulation, were used gels with a concentration of 10% acrylamide. Unlike the previous case, the solid samples showed bands corresponding to proteins, but they couldn't be separated correctly, which didn't allow us to know their exact molecular weights.

Next, were carried out clarification tests, establishing as experimental units for each trial, a hydroalcoholic solution of known composition and a red wine of cv. Cabernet Sauvignon. For each gelatin were used three doses of 5, 10 and 15 g / hL corresponding to each treatment. After 48 hours of clarification, were determined spectrophotometric parameters in order to know the global polyphenolic fraction behavior *versus* the clarifying action of the various gelatins. The results of both trials showed a higher extraction and removal of phenolic compounds using solid gelatins, the total tannins being the most affected compounds.

KEY WORDS

Clarification, fining agents, oenological gelatin, SDS-PAGE electrophoresis, phenolic compounds.

INTRODUCCIÓN

En la elaboración del vino, existen una serie de factores que influyen directamente en la calidad final del producto, teniendo vital importancia los manejos realizados en terreno, que buscan la obtención de una materia prima de óptima calidad, y los procesos realizados en bodega, enfocados a controlar los factores que podrían alterar el normal funcionamiento de la vinificación.

Terminada la fermentación, una de las precauciones que se debe tener antes del embotellado de un vino es asegurar su estabilidad frente a posibles enturbiamientos y precipitaciones. Es por esta razón que se realizan una serie de tratamientos de clarificación, con el objetivo de lograr su estabilización y limpidez (Zamora, 2003), sobre todo cuando se realizan procesos a nivel industrial, donde la clarificación espontánea es larga e insuficiente debido a que la densidad de las partículas en suspensión son cercanas a la del vino (Marchal *et al.*, 2002).

Con el nombre de clarificación se define cualquier operación que conduzca a la obtención de un líquido limpio (Peynaud, 1989; Molina, 1994). Este procedimiento busca conseguir la limpieza, estabilización y mejora de las características organolépticas de los vinos, puede ser de manera espontánea o por la adición de agentes clarificantes capaces de flocular y sedimentar, arrastrando las partículas que contiene en suspensión (Flanzy, 2000; Hidalgo, 2003).

Dentro de los tipos de clarificación está el encolado, proceso que consiste en la adición de un agente clarificante proteico capaz de producir inicialmente un fuerte enturbiamiento de origen coloidal para luego flocular y sedimentar eliminando por arrastre el exceso de algún componente natural contrario a la estabilidad (Noguera, 1974, citado por Fleischmann, 2001). Este tratamiento enológico produce la precipitación no solo de partículas sólidas, sales tartáricas o sustancias de origen coloidal como proteínas, polisacáridos o compuestos fenólicos, sino también de levaduras y bacterias, por lo que la clarificación ayuda a la obtención de la estabilidad física, química y también microbiológica del vino (Peynaud, 1989; Molina, 1994). Este procedimiento también incide sobre las propiedades organolépticas del vino, aspectos como la astringencia, el aroma, el color, el cuerpo y la persistencia pueden verse afectados (Zamora, 2003).

El mecanismo de acción de los agentes clarificantes en el encolado puede ser explicado por la interacción existente entre partículas de diferente carga eléctrica, por la formación de enlaces y/o absorción o adsorción. En el caso de la interacción eléctrica, las partículas de carga opuesta a la del agente clarificante se combinan con él, formando partículas de mayor tamaño que por su mayor densidad precipitan de la solución (Zoecklein *et al.*, 2001).

Las proteínas presentes en algunos tipos de agentes clarificantes, son partículas hidrofílicas de carga eléctrica positiva, presentando gran afinidad por los polifenoles del vino (hidrofóbicos, de carga negativa). Al unirse polifenoles y proteínas se forma un

complejo hidrófobo negativo normalmente insoluble, que debido a su densidad finalmente precipita (Delanoe *et al.*, 1988). Así, dos coloides de signo contrario al estar en contacto se neutralizan y floculan. Una molécula de tanino (electronegativa) y una gelatina (electropositiva) formarían un precipitado con pérdida de agua y pérdida de carga eléctrica (Flanzy, 2000).

Los compuestos fenólicos o polifenoles revisten gran importancia en la enología debido al papel que juegan directa o indirectamente sobre la calidad de los vinos. En efecto, son el origen del color, gusto, aroma, amargor y astringencia de los vinos (Cheyner *et al.*, 2000).

Estos compuestos procedentes del metabolismo secundario de los vegetales presentan dos grandes grupos. Los compuestos fenólicos No Flavonoides, caracterizados por poseer un anillo bencénico, que mediante distintas sustituciones da origen a diversas estructuras, destacando ácidos benzoicos y cinámicos. Por otro lado, están los compuestos fenólicos Flavonoides, formados por dos anillos bencénicos unidos por una cadena de tres átomos de carbono (Peña, 1998). Aquí destacan los flavonoles, responsables del color amarillo en hollejos de uva blanca y por ende del color de los vinos blancos; los antocianos, encargados de otorgar la característica pigmentación roja-azulada de los hollejos de uva tinta y de los vinos producidos a partir de ellas, y los flavanoles, compuestos por diferentes formas isoméricas de la catequina y sus polímeros, responsables de características sensoriales como el amargor o la astringencia (Zamora, 2003).

La selectividad de los agentes clarificantes proteicos hacia los compuestos fenólicos se basa, en parte, en la fuerza de enlace (número posible de enlaces) entre ellos. Las proteínas del clarificante se unen preferentemente a los fenoles más grandes, que presentan más hidroxilos disponibles y por lo tanto, mayor número de lugares posibles de unión (Zoecklein *et al.*, 2001). Cabe destacar que el término polifenoles, engloba a antocianos, flavonoles, flavanoles, ácidos fenólicos, etc. que interactúan con las proteínas formando el complejo negativo e insoluble (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1980). Sin embargo, la reacción de las proteínas en la clarificación por encolado, se produce principalmente con los taninos (Delanoe *et al.*, 1988).

Los agentes clarificantes se pueden agrupar de diferentes formas, una de ellas, es agruparlos según su naturaleza general en proteínas, minerales, polisacáridos y polímeros sintéticos (Zoecklein *et al.*, 2001). Otra forma de agruparlos se basa en los orígenes del producto, pudiendo ser orgánico, inorgánico y sintético (Molina, 1994). Dentro de la gran variedad de agentes clarificantes utilizados para el encolado destacan las gelatinas, constituidas principalmente por proteínas y/o polímeros de origen animal. Son obtenidas (**Figura 2**, anexo I) a partir de la hidrólisis parcial del colágeno proveniente de la piel, tendones y huesos presentes en residuos animales (Molina, 1994). Sus principales componentes proteicos son la glicina, prolina, hidroxiprolina y ácido glutámico. La gran diversidad de gelatinas existentes está dada principalmente por la intensidad de la hidrólisis y la naturaleza de ésta, pudiendo ser química o enzimática (Zoecklein *et al.*, 2001). Del volumen total de gelatina producido mundialmente, solo una pequeña parte de ellas (1-5%) es destinada a la elaboración de vinos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). La gelatina destinada a la clarificación de los vinos debe ser poco

coloreada y de olor neutro (Peynaud, 1989).

Paetzold y Glories, (1990) definieron diferentes categorías de gelatinas en función a sus características físicas, existiendo las gelatinas sólidas solubles en agua, provenientes de una hidrólisis enzimática, y las gelatinas líquidas, las cuales provienen de hidrólisis química, enzimática o de una combinación entre ambas. Según Peynaud (1989) las propiedades más importantes de una gelatina son la capacidad de floculación, velocidad de sedimentación, capacidad de clarificación y volumen de borras. Todas dependerán directamente de la intensidad de la hidrólisis en su elaboración.

Según Vivas *et al.*, (2000) la floculación y sedimentación de una gelatina está determinada por medidas físicas: fuerza de gelificación expresada en unidades bloom, viscosidad expresada en centipoise (cP), masa molecular expresada en Dalton (Da) y la carga de una gelatina, directamente proporcional a la carga de sus moléculas constituyentes. Una gelatina con número bloom elevado es más efectiva en la remoción de moléculas más grandes (Ough, 1992). Por otro lado, las gelatinas con número bloom bajo presentan un óptimo clarificador más amplio y un depósito de borras más compacto además de producir una intensa disminución del contenido de polifenoles de un vino (Troost, 1985).

Diversos son los objetivos del empleo de gelatinas en Enología. Según Ribéreau-Gayon *et al.*, (2006), en vinos blancos suelen utilizarse como agentes clarificantes del vino terminado o del mosto previo a la fermentación, esto último con el objetivo de disminuir la carga polifenólica, generando mayor estabilidad frente a futuras oxidaciones o precipitaciones en el vino. También favorecerán a procesos posteriores en la bodega como la filtración (Delanoe *et al.*, 1988). En el caso de los vinos tintos, además de su efecto clarificador, el uso apunta a mejorar las características organolépticas del vino, suavizando ciertos taninos amargos o astringentes, otorgando también estabilidad microbiológica y de la materia colorante (Ureta *et al.*, 1981; Flanzy, 2000). Por otra parte, según Castellari *et al.*, (1997) los tratamientos con gelatina producen una pequeña disminución (2-5%) en los valores del *trans* y *cis*-resveratrol de vinos comerciales.

La adición de gelatina se puede realizar en conjunto con otro tipo de productos como bentonitas, taninos enológicos o sol de sílice favoreciendo el mecanismo de clarificación (Rankine, 1995). Las dosis recomendadas para las gelatinas van a depender de las características y el tipo de vino a tratar, siendo recomendadas dosis teóricas de 8 a 15 g/hL para vinos tintos, mientras que para vinos blancos dosis de 3 a 5 g/hL (Vogt *et al.*, 1984; Molina, 2000). Por su parte, Vivas *et al.*, (2000) señalan que las dosis variarán de 1,5 a 15 g/L dependiendo del tipo de vino.

Para conocer la constitución proteica de las diversas gelatinas, poder diferenciarlas y caracterizarlas con mayor exactitud, existen técnicas de laboratorio como la electroforesis (Lagune-Ammirati, 1998a). Esta técnica permite separar moléculas biológicas, dependiendo de su masa o carga, bajo la influencia de un campo eléctrico (García-Perez, 2000).

Según Vivas *et al.*, (2000) la masa molecular de una gelatina (determinada por su

composición proteica) será importante debido a que determinará su funcionamiento. Para conocer con exactitud la masa molecular, existen diferentes técnicas electroforéticas siendo la del tipo SDS-PAGE un excelente método debido a proveer un buen medio de soporte para las separaciones moleculares, favorecido por su transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con gran variedad de compuestos químicos (Lomonte, 2007). Por otra parte, la alta resolución de esta técnica permite comparar con gran facilidad la constitución de dos gelatinas al establecer un fraccionamiento detallado y preciso de su constitución proteica (Lagune-Ammirati, 1998b).

Hoy en día, existe una gran variedad de gelatinas de uso enológico, teniendo diferentes efectos sobre el vino tratado según sea la composición química del clarificante y las características físicas y químicas del vino en cuestión. Los diferentes tipos de gelatinas existentes (sólidas y líquidas) presentan también dosificaciones y efectos distintos. Importante también son las sustanciales diferencias existentes entre los precios de cada uno de estos productos, dependiendo de su marca, origen, tipo y forma de elaboración. Por otro lado, la apertura de nuevos mercados exige un mayor control en los procesos productivos e insumos utilizados en la elaboración del vino, para así cumplir con las exigencias y normas establecidas por los países de destino.

Por estos motivos resulta de vital importancia para la industria vitivinícola conocer en profundidad y caracterizar cada uno de estos productos, con la finalidad de establecer parámetros reales respecto a su composición y por consiguiente, el efecto que tendrán sobre el vino, favoreciendo así al criterio de elección de este insumo según sean las necesidades.

En base a lo anterior, el presente trabajo tiene por objetivos:

- Caracterizar las gelatinas de uso enológico presentes en el mercado nacional mediante parámetros físicos, químicos y electroforéticos.
- Medir y comparar los rendimientos de clarificación de cada gelatina y el efecto de tres dosis diferentes sobre la composición fenólica global de una solución hidroalcohólica y un vino tinto cv. Cabernet Sauvignon.

MATERIALES Y METODOS

Lugar de trabajo

Los análisis fueron realizados en los laboratorios del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile y en el laboratorio de Biología Supramolecular, Programa de Biología Celular y Molecular ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Materiales

Gelatinas enológicas

Para la realización del estudio se utilizaron 14 gelatinas de uso enológico, 6 de ellas correspondientes a gelatinas líquidas y las 8 restantes, a gelatinas sólidas solubles en agua. Los productos se obtuvieron a través de viñas y empresas proveedoras de insumos enológicos presentes en el mercado nacional. Los tipos y marcas de cada una de las gelatinas estudiadas se presentan a continuación en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Información y rotulación de las gelatinas utilizadas en el estudio.

Rotulación Gelatina	Nombre Comercial	Proveedor
GL ₁	Gelarom	Partner S.A.
GL ₂	Gecoll Supra	Partner S.A.
GL ₃	Gelaffort	Partner S.A.
GL ₄	Oliver gel 45	Viña San Pedro
GL ₅	Hydroclar 30	Viña San Pedro
GL ₆	Gelatine de russie superieure	Vínicas
GS ₇	Natur'fine	Vínicas
GS ₈	Gelafish (del año)	Viña Concha y Toro
GS ₉	Gelatina extra n°1	Partner S.A.
GS ₁₀	Gelatine superieure soluble a chaud	Vínicas
GS ₁₁	Junca gelatin	Viña Concha y Toro
GS ₁₂	Gecoll Diamante	Viña San Pedro
GS ₁₃	Geliclár	Vínicas
GS ₁₄	Gelafish (almacenada dos años)	Viña Concha y Toro

GL - gelatina líquida y GS - gelatina sólida.

Electroforesis SDS-PAGE

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, utilizando una cámara vertical SE 600 y una fuente de poder HSI-PS1500, ambos Hoefer Scientific Instruments. Para la formulación del gel, los reactivos utilizados fueron: acrilamida (concentración %T), bis-acrilamida (concentración %C), Tris (hidroximetil amino metano), SDS (dodecilsulfato sódico), TEMED (N.N.N'.N'-tetrametil-etano-1,2-diamina) y persulfato de amonio, todos ellos adquiridos en Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EEUU. Como estándar de peso molecular se utilizaron las proteínas presentes en un perfil polipeptídico normal de saliva humana. Para la tinción de los geles de poliacrilamida se utilizó el colorante Coomassie Blue R-250, obtenido en Sigma Chemical Company.

Caracterización físico-química de las gelatinas

En los análisis realizados para la caracterización físico-química de las gelatinas fueron utilizados un potenciómetro Jenway 3510, una balanza analítica modelo Mettler® H31AR y una centrifuga Sorvall® MC-12V Du Pont. Para la detección de proteínas sobre matrices de celulosa fueron utilizados papel Whatman 1 (matrices laminares de celulosa) provenientes de Whatman Ltd., Maidstone, Inglaterra. Se utilizó el mismo colorante usado para teñir los geles de la electroforesis. Para la cuantificación proteica de las muestras se utilizó un espectrofotómetro modelo UV-1700 Pharma Spec®, Shimadzu. Todos los reactivos y estándares utilizados fueron obtenidos en Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EEUU.

Clarificación

El estudio de los rendimientos de clarificación y el efecto de diferentes dosis de gelatina fue realizada en tubos de clarificación de 200 mL. Se utilizó un vino cv. Cabernet Sauvignon elaborado de manera artesanal en las dependencias de la Facultad de Agronomía (Departamento de Agroindustria y Enología) y una solución hidroalcohólica de composición conocida, preparada con agua destilada, alcohol etílico 13% v/v, ácido tartárico 3 g/L y taninos de uso enológico (condensados e hidrolizables) 4 g/L. Todos estos materiales fueron obtenidos en el laboratorio de Enología del Departamento de Agroindustria y Enología. Para los análisis espectrofotométricos, se utilizó un equipo Rayleigh, modelo UV-1600. Otros solventes y reactivos de grado técnico fueron adquiridos en Oxiquim-Chile.

Metodologías

Caracterización de las gelatinas enológicas

Las 14 gelatinas fueron caracterizadas por electroforesis en geles laminares de poliacrilamida-SDS (Laemmli, 1970). Para la obtención de los perfiles electroforéticos de las gelatinas de formulación sólida, se prepararon soluciones frescas de gelatinas de concentración 10 mg/mL con agua destilada a 40° C y agitación constante por 25 minutos (Ramírez, 2009). En el caso de las gelatinas Natur'fine y Geliclar (GS₇ y GS₁₃ respectivamente) la preparación fue realizada con agua destilada a temperatura ambiente (20°C) como lo indican sus respectivas fichas técnicas. Por otro lado, para la obtención de los perfiles electroforéticos a partir de las gelatinas de formulación líquida, se utilizaron directamente (sin diluir) las muestras comerciales entregadas por el proveedor. Para ambas formulaciones de gelatinas y previo a la electroforesis, las muestras fueron precipitadas con etanol (100µL gelatina + 100µL etanol) y centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos para luego extraer los pellets formados eliminando el sobrenadante. Posteriormente los pellets fueron suspendidos en 60µL de agua y 40µL de buffer de nuestra, posteriormente las muestras fueron llevadas a bañomaría a 95°C por 5 minutos (Ramírez, 2009). Finalmente, para su fraccionamiento electroforético, fueron depositados 20µL por muestra en el gel.

Para la elaboración de los geles electroforéticos, se utilizaron diferentes concentraciones de acrilamida/bisacrilamida en la preparación del gel de separación, dependiendo de la formulación de la gelatina (diferente tamaño molecular). Según Lamote (2007), la concentración de acrilamida del gel es inversamente proporcional al tamaño de los poros, así mientras mayor sea la concentración monomérica del gel menor será el tamaño del poro, por lo que para estructuras con pesos moleculares (PM) pequeños, se utilizan geles con mayores concentraciones de acrilamida/bisacrilamida. Por otro lado, la movilidad de las moléculas está restringida por el tamaño del poro, el cual disminuye en función del incremento de las concentraciones de acrilamida. La relación entre acrilamida y bisacrilamida determina la elasticidad, densidad y resistencia mecánica del gel hacia las moléculas analizadas. De este modo, para las gelatinas de formulación sólida, se consideró un gel con una concentración de acrilamida del 10%, mientras que para las gelatinas de formulación líquida, el gel utilizado tuvo una concentración de 12%. Como estándares de peso molecular se utilizó el perfil de proteínas presente en la saliva humana, siendo esta última preparada bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas.

Para llevar a cabo las pruebas de detección de proteínas en matrices de celulosa se preparó la misma solución utilizada anteriormente en el caso de las gelatinas de formulación sólida. Para las gelatinas líquidas, se consideró como solución patrón a las muestras sin diluir provenientes del proveedor. En base a cada una de las soluciones patrón, se realizaron diluciones seriadas para ambas formulaciones de gelatina, utilizando agua destilada como agente de dilución. Luego de homogenizar el contenido de los tubos de ensayo, se tomaron 15 µL de cada tubo para posteriormente sembrarlos

sobre una matriz de celulosa Whatman N°1. Las proteínas sembradas, fueron fijadas con calor (bajo una lámpara por 5 minutos y con un baño de etanol durante 3 minutos, seguido de agitación constante en una solución etanol-agua destilada 80% v/v por 5 minutos. A continuación, las matrices de celulosa fueron teñidas con una solución de Coomassie blue 0,25% p/v por 20 minutos, para finalmente pasar por 3 lavados consecutivos de 3 minutos cada uno con ácido acético 7% v/v (López *et al.*, 1986).

Posteriormente se realizaron mediciones de pH (Bordeau y Scarpa, 2000) y densidad por método del picnómetro (Lau *et al.*, 1997). A continuación, se midió el contenido de proteínas de las gelatinas usando las mismas soluciones iniciales elaboradas para la obtención de los perfiles electroforéticos. Se analizaron tres métodos diferentes utilizando como estándar en todos los casos, Seroalbumina bovina. El primero de los métodos analizados fue el propuesto por Lowry *et al.*, (1951), que mide el contenido total proteico mediante la formación de enlaces peptídicos entre las proteínas de las gelatinas en contacto con el reactivo de Folin-Ciocalteu, para finalmente medir la solución resultante a 500nm. El segundo método fue propuesto por Branhall *et al.*, (1969) adaptado por Durham y López-Solís (1979) que mide la cantidad del colorante Coomassie blue unido estequiométricamente a las muestras de proteínas fijadas sobre una matriz de celulosa, el cual es extraído mediante una solución de metanol 66%-amoníaco 0.25% y leído espectrofotométricamente a 600nm. El tercer método realizado fue la espectroabsorbancia a 280nm, parámetro relacionado con el número de anillos aromáticos presentes en la muestra de proteína. Finalmente, y sólo en el caso de las gelatinas de formulación líquida, se midió el contenido de nitrógeno total mediante el método de Kjeldhal (Sepúlveda, 2008).

Estudio del rendimiento de clarificación: Efecto de tres tratamientos con gelatinas enológicas sobre la composición fenólica global de una solución hidroalcohólica conocida y de un vino tinto Cabernet Sauvignon.

Para el estudio del rendimiento de clarificación y el efecto de tres tratamientos diferentes con gelatina enológica (dosis mínima 5 g/L, media 10 g/L y máxima 15 g/L) sobre la composición fenólica global de dos soluciones conocidas, el trabajo fue dividido en dos ensayos independientes entre sí, con un diseño experimental completamente al azar. El primer ensayo correspondió al efecto de cada dosis sobre la composición fenólica global de una solución hidroalcohólica de formulación: agua destilada, alcohol etílico 13% v/v, tanino enológico marca Tan'con® 4 g/L y ácido tartárico 3 g/L. El segundo ensayo correspondió al efecto de estas tres distintas dosificaciones sobre la composición fenólica global de un vino cv. Cabernet Sauvignon elaborado mediante vinificación artesanal.

Se consideró como unidad experimental 150 mL de solución hidroalcohólica y de vino respectivamente. El diseño experimental, número de muestras, tratamientos y número de repeticiones de cada ensayo se explican en la **Figura 2**.

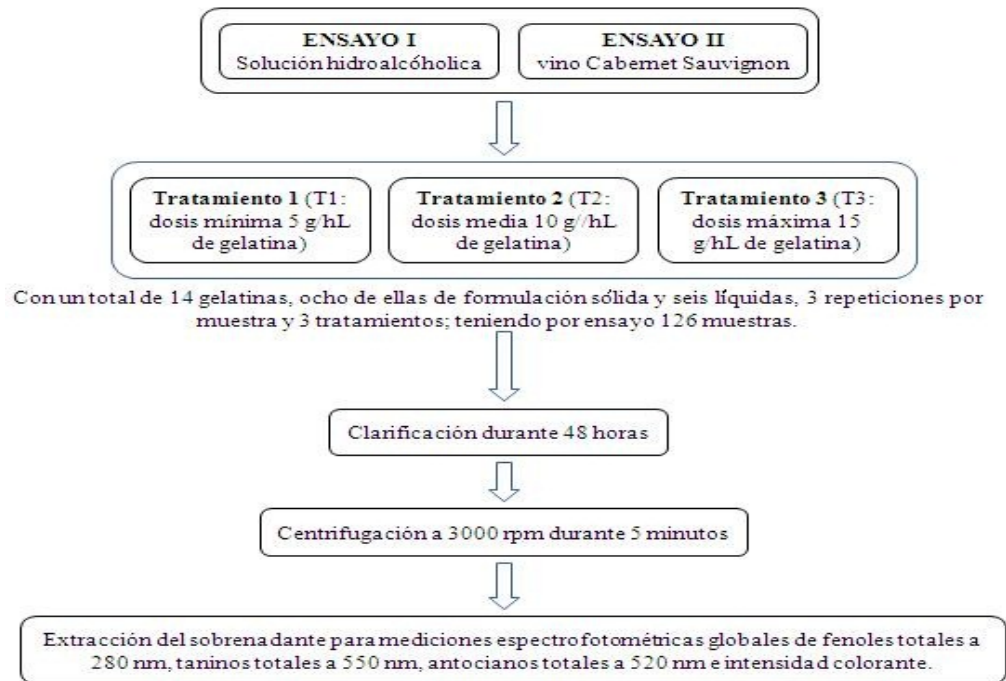


Figura 1. Ensayo I y II: Efecto de tres tratamientos de clarificación con gelatina sobre la composición fenólica global de una solución hidroalcohólica de concentración conocida y de un vino tinto cv. Cabernet Sauvignon.

Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera: Las de formulación sólida fueron disueltas (10 mg/mL) en agua destilada, mientras que las de formulación líquida fueron aplicadas directamente o diluidas en agua según indique la ficha técnica respectiva. La preparación de las muestras y repeticiones para ambos ensayos fue la misma. Se tomaron 150 mL de solución hidroalcohólica (o vino, según sea el caso) adicionando la respectiva dosificación según el tratamiento. Las dosis experimentales utilizadas, equivalentes a las dosis teóricas antes mencionadas y según el volumen de solución utilizado, fueron de 7,5, 15 y 22,5 mg de gelatina, correspondiendo a la dosificación mínima, media y máxima respectivamente. Cada ensayo y sus respectivos tratamientos tuvieron un tiempo de clarificación de 48 horas a 20° C de temperatura, luego centrifugación por 5 minutos a 3000 rpm (Ramírez, 2009).

El sobrenadante obtenido de cada muestra fue caracterizado por análisis espectrofotométricos de fenoles totales (García Barceló, 1990), taninos totales (Bate-Smith, 1981), antocianos totales (García Barceló, 1990) e intensidad colorante (Glories, 1978). Para el caso del ensayo I, no se consideró la medición de antocianos totales.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del análisis espectrofotométrico en la cuantificación de la fracción polifenólica global de ambos ensayos, fueron analizados y comparados mediante análisis de varianza (ANDEVA) utilizando para esto Minitab 15® Statistical Software. De observarse diferencias significativas entre las muestras, se realizaron pruebas de rango múltiple de Tukey a un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las gelatinas enológicas

Información del proveedor

Las 14 gelatinas enológicas en estudio son presentadas en el **Cuadro 2**, seis de formulación líquida (de GL₁ a GL₆) y ocho de formulación sólida (de GS₇ a GS₁₄), todas ellas obtenidas en el mercado nacional. Además se presenta parte de la información técnica entregada por los proveedores. Las gelatinas de ambas formulaciones presentan un origen similar, proveniente de la hidrólisis del colágeno presente en la materia prima utilizada para su fabricación, siendo los residuos de porcino, el origen más común. Los residuos bovinos ampliamente utilizados en años anteriores hoy han sido desplazados por residuos de otros animales debido principalmente a las enfermedades desarrolladas como la encefalopatía espongiiforme bovina, razón por la cual existen en la actualidad, rigurosos principios de trazabilidad para las gelatinas destinadas a la elaboración de productos alimenticios con instituciones como GME (Gelatin Manufacturer of Europe) que regulan los procesos productivos (Vivas *et al.*, 2000). Destacan la muestra GS₇ elaborada a partir de las cortezas de levadura y las gelatinas GS₈ y GS₁₄ producidas a partir de piel de pescado. Por otra parte, en el caso de las gelatinas líquidas los métodos de aplicación son forma directa o disuelta en agua; en el caso de las gelatinas sólidas la preparación varía según la temperatura del agua utilizada para su dilución. La cantidad dosificada para ambos tipos de gelatina, dependerá directamente del vino a tratar, determinándose preferentemente mediante ensayos previos a la clarificación.

Cuadro 2. Información técnica de las gelatinas enológicas.

Clave	Formulación	Origen	Modo de preparación
GL ₁	Líquida	100% porcino	Disolver su peso en agua
GL ₂	Líquida	100% porcino	Disolver su peso en agua
GL ₃	Líquida	100% porcino	Disolver su peso en agua
GL ₄	Líquida	100% porcino	Lista para usar
GL ₅	Líquida	Residuo animal	Aplicación directa sobre el mosto o vino
GL ₆	Líquida	100% porcino	Aplicación directa o mezclado con agua
GS ₇	Sólida	Proteína de corteza de levaduras	Disolver 5 a 10 veces su peso en agua. Las dosis varían entre 5 – 30 g/hL
GS ₈ /GS ₁₄	Sólida	Piel de pescados	Disolver 1 kg en 5 L de agua fría y luego en agregar 4-5 veces más de agua caliente. Dosis recomendada entre 5- 15g/hL
GS ₉	Sólida	100% porcino	Disolución a razón de 50 g/hL de agua a 40° C. Dosis 5-12 g/hL
GS ₁₀	Sólida	Residuo animal	Solución al 10%, 100g en 1L de agua a 45° C + agitación constante
GS ₁₁	Sólida	Mezcla de residuos animal	Dilución en agua a 40° C. Dosis de 5-20 g/hL

Continúa

Cuadro 2. (Continuación)

Clave	Formulación	Origen	Modo de preparación
GS ₁₂	Sólida	Elaborada según cargas específicas	Disolución a razón de 50 g/hL de agua a 40° C. Dosis 5-12 g/hL
GS ₁₃	Sólida	100% porcino	Solución al 10%, 100g en 1L de agua a 45° C

Caracterización física y química

El estudio de las gelatinas enológicas comenzó con la medición de parámetros físicos y químicos. Para ello, las gelatinas de formulación sólida fueron preparadas a una concentración de 10 mg/mL, disueltas en agua destilada con temperatura adecuada según sea el caso, mientras que las gelatinas líquidas fueron utilizadas directamente, sin previa dilución. Los parámetros físicos analizados fueron pH y densidad, mientras que los parámetros químicos correspondieron a pruebas de detección de proteínas en matrices de celulosa y la determinación del contenido total de proteínas mediante los métodos de Lowry, Bramhall y espectroabsorbancia a 280nm. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Parámetros físicos y químicos de las gelatinas enológicas.

Gelatinas Líquidas	Densidad (g/L)	pH	Lowry (mg/ml)	Bramhall (mg/ml)	Absorbancia 280nm
GL ₁	1,027	3,6	9,23	73,046	11,57
GL ₂	1,027	3,7	9,54	77,66	11,11
GL ₃	1,107	3,69	10,06	67,021	10,36
GL ₄	1,109	3,82	10,68	66,917	10,64
GL ₅	1,043	3,87	10,48	68,053	10,13
GL ₆	0,973	3,34	9,44	75,647	11,44
GS ₇	1,02	5,54	13,8	74,98	X
GS ₈	1,107	5,72	25,63	372,98	12,79
GS ₉	1,137	5,66	33,92	671,34	15,93
GS ₁₀	1,067	5,28	30,5	666,33	14,58
GS ₁₁	1,087	5,45	31,44	606,26	15,35
GS ₁₂	1,073	5,65	32,99	691,36	14,56
GS ₁₃	1,07	5,12	15,35	97,75	11,23
GS ₁₄	1,103	5,80	24,38	368,94	12,33

La densidad de las gelatinas, cuantificada a través del método del picnómetro, fue en todos los casos cercana a 1 (considerando que las muestras sólidas están en solución) destacando GL₆, por ser la muestra que presenta el valor más bajo de todas las gelatinas analizadas, y GS₉, por ser la muestra con la mayor densidad.

El pH es una expresión numérica para cuantificar la concentración del ion H⁺ de una solución. Los resultados obtenidos para este parámetro concuerdan con los obtenidos por Ramírez (2009) para las diferentes formulaciones de gelatinas. Se puede observar que las gelatinas sólidas presentaron valores de pH entre 5,1 - 5,8 mientras que las líquidas presentaron valores inferiores que variaron entre 3,3 - 3,9. Las gelatinas sólidas presentaron valores de pH bastante más elevados que los encontrados en un vino,

pudiendo generar alteraciones indeseables al momento de clarificar con estos productos. Riberau-Gayon *et al.*, (2006) mencionan la importancia del pH del clarificante utilizado debido a que podrían modificar irreversiblemente el pH del vino y acarrear así, por ejemplo, problemas microbiológicos o inestabilidad. Las diferencias de pH entre ambas formulaciones de gelatinas enológicas se deberían a los diferentes procesos de fabricación. Las gelatinas pueden ser catalogadas como tipo A o B según el tratamiento que reciban las materias primas durante su elaboración. Las de tipo A corresponden a gelatinas sometidas a hidrólisis (químicas o mixtas) en medios ácidos, mientras que las tipo B son sometidas a hidrólisis enzimática en medios más alcalinos, lo que determinará el pH final de los productos (Hornsey, 2007). La adición de compuestos químicos que favorecerá la hidrólisis en la elaboración de las gelatinas líquidas, generará, además de una disminución del pH, gelatinas con pesos moleculares inferiores y un poder de gelificación menor (Zoecklein *et al.*, 2001). Otro factor que influirá en el pH más bajo de las gelatinas líquidas es la presencia de compuestos sulfurosos (SO₂) adicionados en su elaboración, los que aportan acción antiséptica al producto, otorgándole estabilidad frente a posibles problemas microbiológicos. Según Vogt *et al.*, (1984) existen en el mercado gelatinas líquidas hidrolizadas en medios mixtos (químicos y enzimáticos) que luego se estabilizan con SO₂, compuesto que además actúa de forma positiva en la clarificación.

Con respecto a los resultados obtenidos en la cuantificación de las proteínas totales de cada muestra, destaca las diferencias entre ambas formulaciones de gelatinas, siendo inferior el contenido proteico de las gelatinas líquidas, independiente del método analizado. Sin embargo cada método cuantifica de distinta manera este parámetro, lo que impide la comparación entre ellos. Por un lado, el método de Lowry, cuantifica el contenido proteico mediante la formación inicial de un complejo entre las proteínas de la muestra y el ion Cu⁺² utilizado, que se reducirá al entrar en contacto con el reactivo de Folin-Ciocalteu; destacan GL₁ y GS₉, por presentar el menor y el mayor contenido de proteínas, respectivamente. El método de Bramhall cuantifica la reactividad y afinidad de las moléculas presentes en la muestra con el colorante Coomassie blue; su desventaja es que no sólo las proteínas manifiestan afinidad con este colorante por lo que la cuantificación es inexacta; destacan GL₄ y GS₉ por presentar el menor y el mayor contenido respectivamente. Por último, el método de espectroabsorbancia a 280 nm cuantifica los anillos aromáticos presentes; destacan GL₅ y GS₉ por presentar el menor y mayor valor respectivamente.

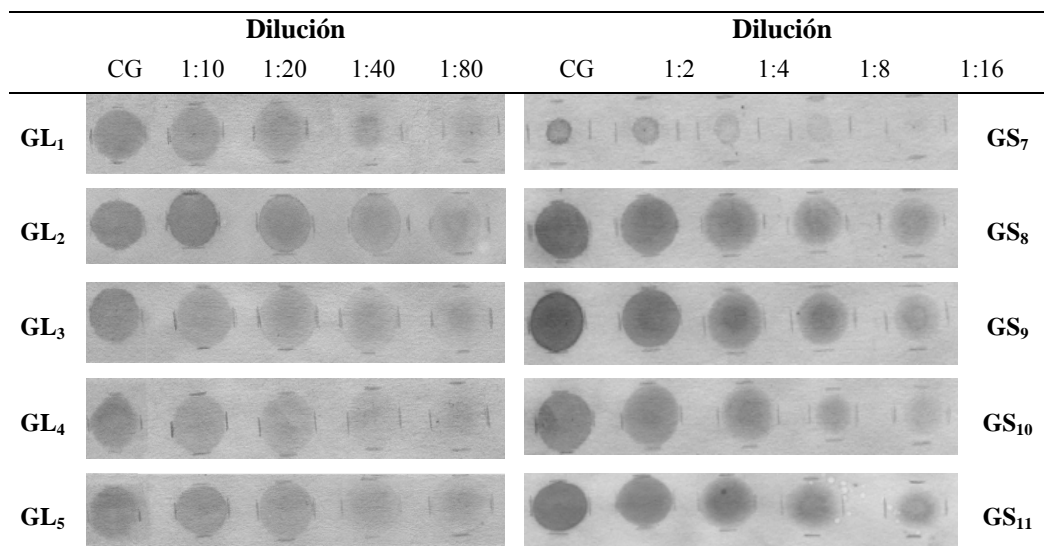
La hidrólisis a la que se somete una gelatina líquida en su elaboración es más intensa, debido a la presencia de ácidos que catalizan el proceso, resultando gelatinas con PM inferiores, constituidas principalmente por polímeros proteicos más pequeños, los que además son posteriormente diluidos en soluciones viscosas y agua, disminuyendo aun más el contenido proteico existente. Lagune (1994), citado por Ramírez (2009) clasifica a las gelatinas enológicas en tres grupos: gelatinas no solubles en frío, gelatinas solubles en frío y gelatinas líquidas, describiendo sólo para el primer grupo la presencia de proteínas, mientras que para los otros, solo se refiere a la presencia de un contenido peptídico de origen proteico.

Dentro del grupo de gelatinas sólidas destaca GS₇, ya que para dos de los tres métodos analizados es la muestra que presenta la concentración proteica más baja. Esto se

explica por el origen de la muestra, siendo (cortezas de levaduras). Importante es mencionar que a esta muestra no se realizó la medición a 280nm debido a que en solución resulta un líquido turbio que arroja lecturas espectrofotométricas inexactas. También es importante destacar a GS₈ y GS₁₄, muestras con fabricante y origen en común, pero con diferentes años de elaboración y tiempo de almacenamiento. Sus contenidos proteicos similares, indican que no hubo una disminución significativa de las proteínas por efecto del tiempo o del almacenamiento. Según Lagune-Ammirati (1997) la elaboración de las gelatinas, puede enfocarse a modificar sus condiciones específicas, identificar una constitución proteica deseada y controlar el proceso para asegurar la regularidad de su producción en el tiempo, pudiendo orientar el producto hacia la mejora de características específicas.

Detección de proteínas en matrices de celulosa

Las pruebas de detección de proteínas en matrices de celulosa se basaron en el método establecido por López *et al.*, (2007). Para llevar a cabo el estudio, se preparó una solución patrón de 10 mg/mL por cada gelatina sólida, mientras que las líquidas fueron utilizadas directamente. Se realizaron diluciones de 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 v/v en el caso de las gelatinas de formulación sólida y de 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 v/v para las líquidas, utilizando agua destilada como agente de dilución; en ambos casos se utilizó como control (CG) a cada muestra sin diluir. Posteriormente las muestras fueron precipitadas y centrifugadas al igual que en la electroforesis, depositando 15µL de cada suspensión en el papel de celulosa, fijando la muestra mediante calor bajo una lámpara por 5 minutos y un lavado con etanol al 80% v/v, luego fueron teñidos por 20 minutos con Coomassie blue (colorante con afinidad proteica). La presencia de proteínas está determinada por la coloración azul de intensidad variable y directamente proporcional a la concentración de proteínas. Para finalizar, cada matriz recibió 3 lavados consecutivos con ácido acético al 7% v/v. Los resultados obtenidos son presentados a continuación en la **Figura 3**.



(Continúa)

Figura 3. (Continuación)

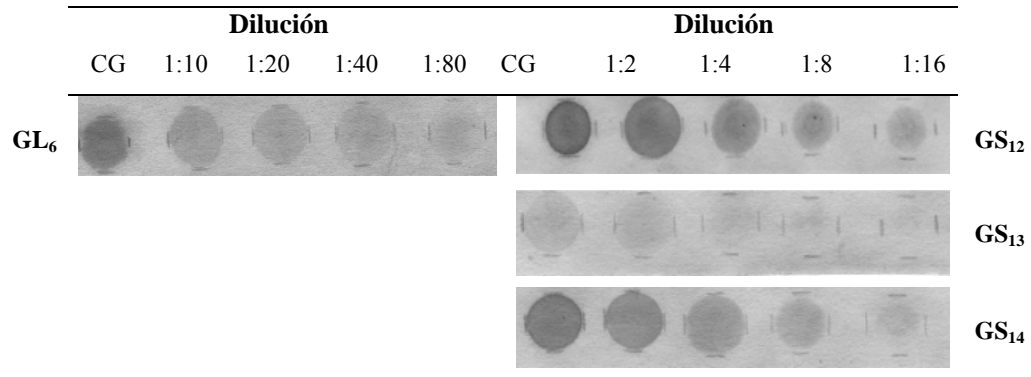


Figura 3. Detección de proteínas en matrices de celulosa.

En la **Figura 3** se puede observar una difusión homogénea y radial de las muestras fijadas al papel de celulosa. Para cada muestra se aprecia claramente una progresiva disminución en la intensidad del color de las superficies teñidas a medida que las muestras están más diluidas.

Con respecto a las gelatinas de formulación líquida, éstas presentan un comportamiento similar en cuanto a la intensidad de tinción y su difusión en la matriz de celulosa, destacando GL₂ por ser la muestra con mayor intensidad de tinción. Por otra parte, las gelatinas de formulación sólida en solución, en su mayoría presentan una mayor intensidad del color en la superficie teñida en comparación a las de formulación líquida resultados concordantes con los datos obtenidos en la cuantificación de proteínas mediante los métodos de Lowry *et al.*, (1951) y Bramhall *et al.*, (1969), que indican un mayor contenido proteico por parte de las gelatinas sólidas.

Dentro del grupo de gelatinas sólidas destacan GS₇ y GS₁₃, la primera por presentar una evidente baja difusión, pudiendo estar asociado al origen de ésta (paredes de levaduras), mientras la segunda destaca por presentar una casi nula afinidad al colorante utilizado. También es importante destacar a GS₈ y GS₁₄, ambas con origen y fabricación común pero con distintos años de elaboración y almacenamiento. Aún así, no presentan notorias diferencias frente al comportamiento con el colorante, lo que sumado a sus concentraciones proteicas similares medidas anteriormente, descartarían pérdidas o desnaturalizaciones de sus proteínas por efecto del tiempo o un mal almacenamiento. Por último, GS₉ destaca por ser la muestra que presenta la mayor reactividad frente a la tinción, resultados que concuerdan a los anteriores debido a ser la gelatina con los contenidos proteicos más elevados (**Cuadro 3**).

Electroforesis SDS-PAGE

Las 14 gelatinas enológicas fueron sometidas a una electroforesis en geles laminares de poli(acrilamida)-SDS y comparadas de acuerdo a su composición proteica. Para ello se llevó a cabo un análisis visual de los geles, utilizando como estándar de peso molecular (EPM) las proteínas presentes en la saliva humana. La concentración proteica de esta

última, es de aproximadamente 300 mg por 100 mL (mayoritariamente proteínas glicosiladas). En el caso del EPM observado en las **Figuras 4 y 5**, destacan proteínas tales como albumina (60-66 kDa), amilasa (55 kDa), lisozima (17 kDa) y proteínas ricas en prolina (PRP) ácidas (15 kDa) y básicas (90 kDa). Según Hu *et al.*, (2005) y Helmerhorst y Oppenheim, (2007), en la saliva humana también es posible encontrar proteínas no glicosiladas, tales como cisteínas (15 kDa) o histidinas (5 kDa).

Diversos factores influirían en el funcionamiento de la electroforesis, tales como temperatura de polimerización del gel, pH de las muestras, porosidad del gel, (determinada por las concentraciones de acrilamida (%T) y bis-acrilamida (%C) o la gradiente eléctrica generada por la fuente de poder. En el caso de los perfiles electroforéticos de ambos tipos de gelatinas (**Figuras 4 y 5**) observamos un normal funcionamiento de este procedimiento, manifestado por la presencia y normal distribución de las proteínas salivales en el primer carril de ambos geles.

Gelatinas líquidas

Para la obtención de los perfiles electroforéticos de estas gelatinas, se utilizaron geles laminares de concentración 12% en archilamida. Según Bollag *et al.*, (1996) esta concentración permite detectar proteínas con pesos moleculares entre 15 y 60 kDa.

Para el estudio electroforético, las gelatinas enológicas fueron previamente preparadas. Se realizaron pruebas de precipitación de las gelatinas líquidas utilizando acetona y etanol, siendo este último, el seleccionado para tratar a todas las muestras. Cada precipitado, luego de ser separado del sobrenadante, fue suspendido en 60 μ L de agua adicionando 40 μ L de buffer de muestra, hervidas durante 5 minutos a bañomaría. Finalmente fueron cargados 20 μ L de cada muestra en cada carril. El perfil electroforético de las gelatinas líquidas se muestra a continuación en la **Figura 4**.

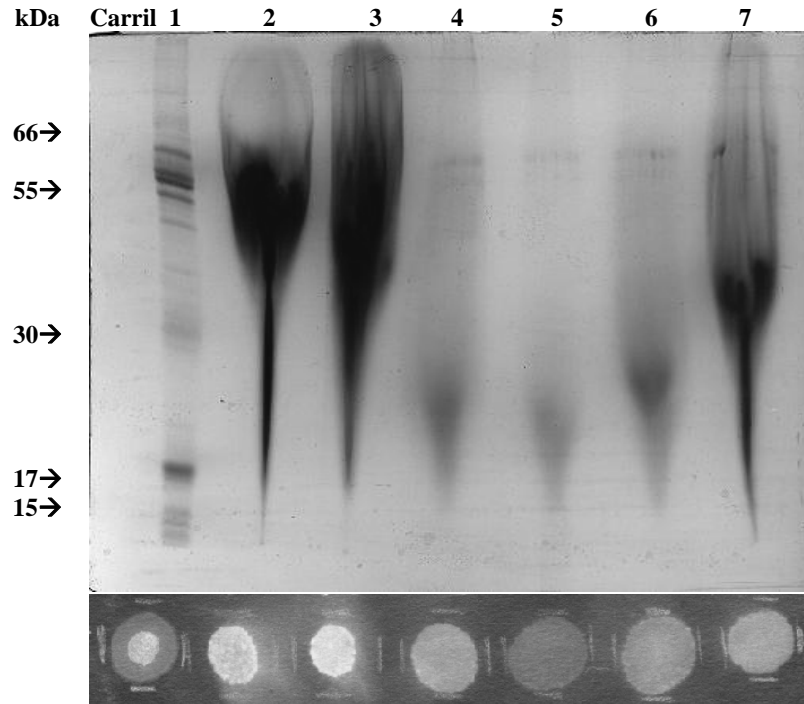


Figura 4. SDS-PAGE de las gelatinas líquidas (panel superior) y detección de proteínas sobre una matriz de celulosa de las muestras analizadas (panel inferior). Carril 1 – Saliva, carril 2 – GL₁, carril 3 – GL₂, carril 4 – GL₃, carril 5 – GL₄, carril 6 – GL₅ y carril 7 – GL₆. (En la membrana de celulosa, las muestras fueron depositadas sobre el papel en el mismo orden que en los carriles del gel).

En la **Figura 4** podemos observar los perfiles obtenidos de las gelatinas enológicas de formulación líquida. Destaca el similar comportamiento entre las muestras GL₁, GL₂ y GL₆, presentando una clara afinidad con el colorante utilizado, exhibiendo un material concentrado que difunde en una zona intermedia del carril pero con una nula presencia de bandas proteicas identificables. Por su parte, las muestras GL₃, GL₄ y GL₅ también presentan un comportamiento similar entre ellas, manifestando la presencia de un par de tenues bandas proteicas cercanas a los 55 kDa, y una acumulación de material afín al colorante entre los 15 y 30 kDa, donde no se diferencian bandas proteicas. La particular migración del material, observado en la imagen electroforética de las gelatinas líquidas, podría estar relacionada con la presencia de polímeros orgánicos y/o sintéticos afines al colorante pero con un bajo contenido de proteína. Por otro lado, Sims *et al.*, (1997) postulan que de la intensa hidrólisis del colágeno en el proceso de elaboración de estos productos, daría origen a gelatinas constituidas por cadenas polipeptídicas cortas, con un bajo contenido proteico, lo que en el estudio estaría corroborado por los resultados obtenidos en la cuantificación del contenido total de proteínas, señalado anteriormente.

Los resultados también concuerdan con lo propuesto por Cosme *et al.*, (2007), cuyos estudios señalan que las gelatinas enológicas líquidas, al ser sometidas a SDS-PAGE presentan una distribución al azar del material, que sería independiente de sus pesos moleculares.

Debido al comportamiento y distribución al azar del material presente en las gelatinas

líquidas, sumado a los bajos contenidos proteicos obtenidos en las mediciones anteriores, a las gelatinas líquidas se les midió el contenido de Nitrógeno total mediante el método de Kjeldhal (**Cuadro 18**, apéndice VI).

Las proteínas son compuestos nitrogenados estructurados a base de aminoácidos. El contenido de Nitrógeno de una proteína es en promedio 16% (Sepúlveda, 2008), por lo que conocido el contenido de nitrógeno se puede estimar el contenido de proteínas de una muestra sometida a este procedimiento. Los resultados obtenidos (**Cuadro 18**, apéndice VI) reafirman lo anterior, destacando el bajo contenido proteico de todas las muestras de esta formulación. GL₃ resultó ser la gelatina con el porcentaje proteico más elevado entre los productos analizados. Tampoco es descartable que el nitrógeno cuantificado por el método de Kjeldhal sea parte de componentes sintéticos presentes en el producto.

Gelatinas sólidas

Para la obtención de los perfiles electroforéticos a partir de las gelatinas de formulación sólida, se elaboraron inicialmente, distintos geles de separación con diferentes concentraciones de acrilamida/bisacrilamida, determinando como el gel con mejores resultados el de 10% de acrilamida. Según Lamote (2007) los geles de poro intermedio (10-12%) proveen una separación adecuada para proteínas de 20 a 90 kDa.

Las muestras sólidas fueron disueltas en agua en concentración de 10 mg/mL, precipitadas en etanol y centrifugadas posteriormente, concentrando así, su contenido proteico. El precipitado fue suspendido en agua (60 µL) y en buffer de muestra (40 µL) para luego ser hervidas a bañomaría durante 5 minutos. Finalmente fueron cargados 20 µL de cada muestra en cada carril.

El perfil electroforético de las gelatinas de formulación sólida y la detección proteica en matrices de celulosa se observa a continuación en la **Figura 5**.

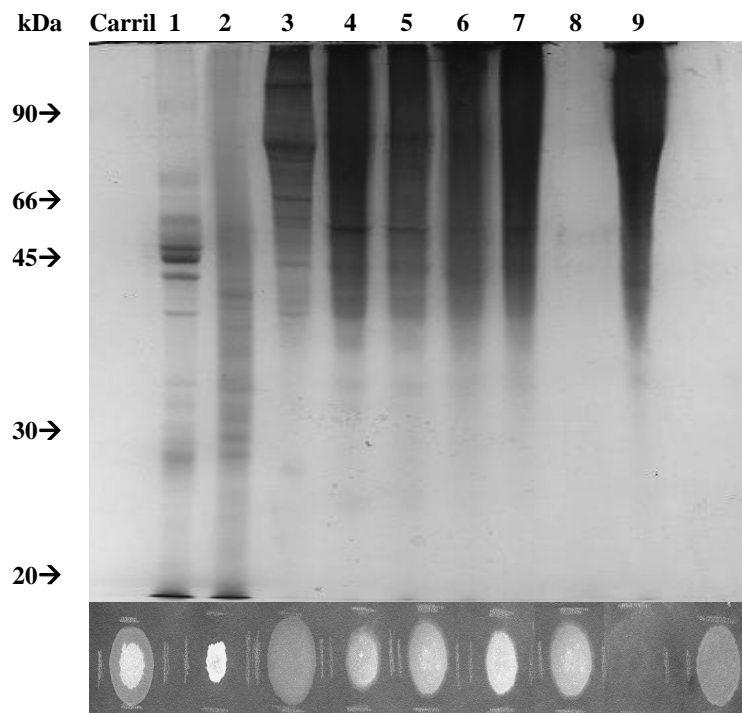


Figura 5. SDS-PAGE de las gelatinas sólidas (panel superior) y detección de proteínas sobre una matriz de celulosa de las muestras analizadas (panel inferior). Carril 1 – Saliva, carril 2 – GS₇, carril 3 – GS₈, carril 4 – GS₉, carril 5 – GS₁₀, carril 6 – GS₁₁, carril 7 – GS₁₂, carril 8 – GS₁₃, carril 9 – GS₁₄. (En la membrana de celulosa, las muestras fueron depositadas sobre el papel en el mismo orden que en los carriles del gel).

En la **Figura 5** Se puede observar una distribución completamente distinta al material observado en las gelatinas líquidas. Destaca la muestra GS₇ (carril 2) por presentar una distribución diferente en comparación al resto de las muestras de gelatinas sólidas, caracterizado por la presencia de bandas electroforéticas de menor PM, posiblemente debido a su origen distinto (pared celular de levaduras). Esta gelatina presenta un importante contenido de bandas de pesos moleculares entre 45 y 30 kDa y dentro del conjunto de gelatinas sólidas analizadas, fue la única que exhibió bandas que migraron, por su bajo peso molecular, hasta el final del carril.

La gelatina GS₁₃ (carril 8) presentó una ausencia tanto de tinción en la lámina de celulosa como de bandas electroforéticas en los gels. Resultados de este tipo fueron obtenidos antes por Paetzold y Glories (1990), quienes relacionaron este fenómeno a la hidrólisis de tipo enzimática a la que son sometidas las materias primas en los procesos de elaboración. De ser esto correcto, estas gelatinas debieran presentar un alto contenido de polipéptidos de bajo peso molecular, observación que no ocurre pues no se apreció material teñido por el colorante en el frente de migración. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ramírez, (2009) para la misma muestra y bajo las mismas condiciones electroforéticas. La cuantificación de proteínas para esta muestra empleando el método de Bramhall arrojó una concentración inferior en casi un 90% respecto del resto de las gelatinas sólidas, con la excepción de GS₇. Sin embargo en la cuantificación proteica basada en la medición de la absorbancia a 280 nm, la solución

de GS₁₃ presentó una señal similar al de las preparaciones de gelatinas líquidas, observación que indicaría la presencia de algún material orgánico el cual no sería afín al colorante selectivo de proteínas utilizado

Salvo las dos muestras antes comentadas (GS₇ y GS₁₃), el resto de las gelatinas sólidas presentaron una distribución similar del material proteico, concentrándose hacia la parte superior de cada carril, debido a los mayores PM de sus moléculas polipeptídicas. Glories (1978) también ha observado la presencia mayoritaria de proteínas de alto PM en aquellas gelatinas sólidas solubles en agua. Una comparación más detallada de este subconjunto de gelatinas sólidas, basada en su fraccionamiento electroforético, podría efectuarse mediante el empleo de geles de poliacrilamida menos concentrados.

Estudio del rendimiento de clarificación

El experimento fue dividido en dos ensayos independientes entre sí. En ambos casos fueron analizadas las variaciones sufridas por la fracción fenólica global de las soluciones utilizadas al ser sometidas a la clarificación mediante tres dosis distintas de gelatina. Se utilizó como referencia los parámetros descritos por Molina (1994) y Vivas *et al.*, (2000) quienes recomiendan dosis entre los 1,5 – 15 g/hL dependiendo del tipo de vino a tratar, estableciéndose así para ambos ensayos tres tratamientos con dosis de 7,5 mg para T₁, 15 mg para T₂ y 22,5 mg para T₃, en un volumen de 150 mL de solución. Cabe destacar que en el caso de las gelatinas líquidas, las dosis utilizadas están muy por sobre lo recomendado en las fichas técnicas de cada producto, esto con el objetivo de homogenizar el experimento y poder compararlas en igualdad de condiciones con las gelatinas de formulación sólida.

Así como una baja dosis de gelatina puede generar rendimientos de clarificación deficientes, una dosis mayor a la necesaria puede ser el inicio de graves inconvenientes para la estabilidad del vino; este fenómeno se conoce como sobre-encolado (Peynaud, 1989; Espinoza, 1995). Diferentes pruebas de laboratorio se realizaron para determinar las dosis de gelatina y los volúmenes de solución o vino utilizados. Ambos ensayos fueron montados en tubos de clarificación de 200 mL, utilizando 150 mL de cada unidad experimental (solución hidroalcohólica o vino) al que se le agregaron las diferentes dosis de gelatina.

En la **Figura 6** se puede apreciar el experimento para la muestra GS₉ seleccionada aleatoriamente. La primera imagen de la figura muestra el experimento recién montado (día 1) donde se manifiesta una marcada turbidez inicial generada por la interacción entre las proteínas del clarificante y los polifenoles presentes tanto en el vino como en la solución hidroalcohólica, mientras que la segunda imagen corresponde al experimento pasadas 48 horas de clarificación. Los volúmenes utilizados facilitaron la cuantificación fenólica global así como también la observación de parámetros descritos por Delano *et al.*, (1988), importantes al momento de elegir un producto a nivel industrial tales como el tiempo de formación de flóculos, la velocidad de sedimentación de éstos, grado de limpieza logrado y volumen de borras.



Figura 6. Experimento montado en tubos de clarificación con una solución hidroalcohólica (sh – ensayo I) y vino (v – ensayo II) para la muestra GS₉, correspondiendo t1, t2 y t3 a cada tratamiento.

Pasadas 48 horas de clarificación las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos para extraer el sobrenadante sin borras ni partículas en suspensión las que podrían alterar los resultados de las futuras mediciones. Posteriormente se analizó la concentración de compuestos fenólicos globales mediante espectrofotometría; en el caso del ensayo I, se cuantificaron la concentración global de fenoles totales, taninos totales y la suma de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm para determinar la intensidad colorante. Para el ensayo II, además de fenoles, taninos e intensidad colorante mencionadas anteriormente, fueron medidas las absorbancias a 520 nm para determinar el contenido de antocianos totales. Según Riberau-Gayon *et al.*, (2006), los compuestos fenólicos sufren transformaciones durante el proceso de vinificación, por lo que resulta importante conocer el comportamiento de este grupo de compuestos frente a la acción de estos insumos enológicos.

Ensayo I: Clarificación de una solución hidroalcohólica mediante tratamientos con gelatina enológica.

Según Ribéreau-Gayon *et al.*, (1980); Peynaud (1989); Delanoe *et al.*, (1988); Zoecklein *et al.*, (2001), la clarificación de vinos con productos de origen proteico se produce debido a la interacción entre las proteínas y/o polímeros presentes en los productos con los polifenoles del vino, principalmente con los taninos. Por otro lado, la clarificación de vinos con gelatinas, puede realizarse en conjunto con taninos de uso enológico que favorecerán al proceso, ayudando a la formación de floculos que posteriormente sedimentarán. Estos taninos son ampliamente utilizados en la industria, se clasifican como taninos hidrolizables, taninos condensados o mezcla de los anteriores (Obradovic, 2006).

En este ensayo se consideró como unidad experimental a una solución hidroalcohólica (SH) elaborada con agua destilada, etanol 13 % v/v, 3 g/L ácido tartárico y 4 g/L tanino enológico (proantocianídico e hidrolizable) marca Tan'cor®. Según Ramírez (2009) la

marca de tanino utilizada está constituida en más de un 90% por taninos proantocianídicos y un 10% de taninos hidrolizables.

Los taninos condensados o proantocianidinas, corresponden a compuestos fenólicos flavonoides del grupo de los flavanoles. Se localizan en las semillas y algo en los hollejos, mientras que los taninos hidrolizables son compuestos fenólicos no flavonoides, originarios de la madera, de roble u otros tipos (Peña-Neira, 1999). Los primeros son responsables del amargor y astringencia en el vino, del cuerpo y de la capacidad de mantener su color a lo largo del tiempo mientras que los segundos se caracterizan por participar organolépticamente de la astringencia, amargor y evolución del color en los vinos (Zamora, 2003). Debido al importante rol que tienen los compuestos fenólicos en la estructura química y física de los vinos, además de ser actores importantes en procesos enológicos como la clarificación por encolado y estabilización de vinos, es importante conocer el comportamiento y la variación de estos compuestos frente a diferentes dosis de gelatinas. Los complejos formados entre taninos y proteínas en la clarificación no son necesariamente de tipo insolubles, sino que también pueden mantenerse en solución, pudiendo generar problemas después del embotellado (Shahidi *et al.*, 1995).

Los resultados (promedios y desviaciones) obtenidos por cada tratamiento estudiado sobre la fracción fenólica de la solución hidroalcohólica, son presentados en los **Cuadros 10, 11 y 12** en los apéndices III y IV.

Caracterización de la solución hidroalcohólica (SH) empleada

Previo a la realización del ensayo, la solución hidroalcohólica (SH) del tanino Tan'cor (ver Materiales y Métodos) fue caracterizada mediante distintos parámetros. Para esto fue necesario realizar una dilución previa de la SH (1:20). El pH fue medido directamente sobre la solución sin diluir. El contenido global de fenoles, taninos, intensidad colorante y pH de la SH se presentan a continuación en el **Cuadro 4**.

Cuadro 4. Contenido global de polifenoles y pH de la solución hidroalcohólica (SH).

Fenoles (mg/L EAG)	Taninos (g/L procianidina)	Intensidad Colorante	pH
862,102	3,04	19,46	3,36

La composición fenólica global de la SH, está determinada en su totalidad por la composición del tanino utilizado, debido a que los otros constituyentes (ácido tartárico y etanol) no corresponden a polifenoles. El contenido de taninos observado en la solución hidroalcohólica fue similar al observado en los vinos tintos descritos por Huerta (2006) y Romero (2009). El contenido de fenoles totales resultó cercano a lo determinado en un vino blanco por Donoso (2001), mientras que la intensidad colorante presenta valores similares a los descritos por Romero (2009) para vinos tintos. Los valores de pH están dentro del rango habitual de los vinos comerciales, aunque las muestras tratadas con gelatina sólida manifestaron aumentos del pH hasta 0,4 puntos luego de la clarificación, mientras que con las líquidas los valores se mantuvieron estables.

Efecto del clarificante sobre el contenido de fenoles totales de la solución hidroalcohólica

Para Zamora (2003) la cuantificación de este grupo de compuestos da una idea global del contenido de compuestos fenólicos flavonoides (flavanoles, flavonoles, antocianos, etc.) y no flavonoides (ácidos fenólicos y taninos hidrolizables). La absorbancia a 280 nm es característica de los electrones deslocalizados de los ciclos benzoicos de los polifenoles, permitiendo hacer una cuantificación espectrofotométrica de estos compuestos (Vivas y Norier, 2003).

El comportamiento de los fenoles totales de la SH frente a los tres tratamientos con gelatinas, se observa a continuación en la **Figura 7**.

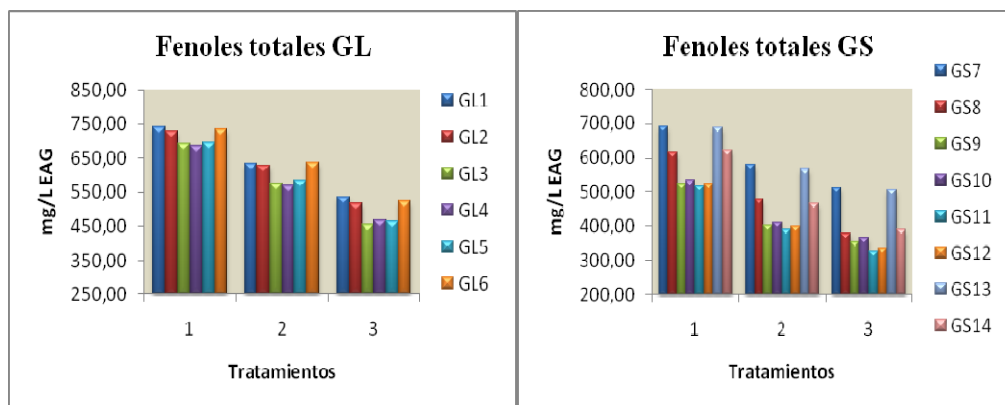


Figura 7. Efecto de tres tratamientos diferentes con gelatinas comerciales sobre el contenido de fenoles totales (mg/L EAG) de la SH luego de 48 horas de clarificación.

En los gráficos de la **Figura 7** es posible observar el comportamiento de los polifenoles totales expresados en mg/L EAG (equivalentes en ácido gálico) de la SH frente a tres diferentes dosis de cada gelatina enológica. Para el caso de las gelatinas de formulación líquida se puede apreciar una gradual disminución de la concentración de fenoles totales en función del aumento de la dosis. El comportamiento de estas gelatinas es relativamente similar para los tres tratamientos, agrupándose GL₁-GL₂-GL₆ y GL₃-GL₄-GL₅ no presentando diferencias estadísticas significativas entre ellas. Este comportamiento podría estar relacionado con los procesos similares de elaboración y las materias primas utilizadas. La muestra GL₃ fue la gelatina que más fenoles removió en todos los tratamientos.

Al observar el gráfico correspondiente a las gelatinas sólidas se aprecia un comportamiento estadísticamente similar entre las muestras GS₇ y GS₁₃, donde la remoción de fenoles totales es similar al de las gelatinas líquidas para todos los tratamientos. Las muestras GS₈ y GS₁₄ también presentan un comportamiento estadístico similar para los tres tratamientos, explicado por el mismo origen y fabricación, no obstante generan una extracción de fenoles intermedia dentro de todas las gelatinas sólidas. Por último, las muestras GS₉ GS₁₀ GS₁₁ y GS₁₂ que no presentan diferencias significativas entre ellas, son además las muestras que actúan de manera más intensa sobre la fracción fenólica de la SH. A excepción de GS₇ y GS₁₃, el resto de las gelatinas sólidas generan una mayor remoción de fenoles en comparación a las gelatinas

líquidas, Vivas *et al.*, (2000) postulan que las proteínas de un clarificante son las que interactúan con los fenoles del vino, por lo que a mayor contenido de proteínas de un clarificante mayor será la intensidad de la clarificación.

A diferencia de los 862,1 mg/L EAG iniciales de la SH, los valores finales obtenidos para T₂ y T₃ concuerdan con los rangos descritos por Frankel *et al.*, (1995) para un vino blanco, quienes señalan que el rango normal varía entre los 160 y 530 mg/L de EAG.

Efecto del clarificante sobre el contenido de taninos totales de la solución hidroalcohólica

Según Peña-Neira (2006), la base estructural de un tanino de uva la componen las proantocianidinas, subdivididas a su vez en procianidinas (catequina y epicatequina) y prodelphinidinas (galocatequina y epigalocatequina). La hidrólisis que sufren estos compuestos, en medio ácido y en presencia de oxígeno, genera la formación de antocianidinas que podrán ser cuantificadas mediante espectrofotometría. La naturaleza de estos compuestos presenta absorbancias dentro del rango de los 500-550 nm característicos del color rojo (Vivas y Norier, 2003).

El comportamiento de los taninos totales de la SH frente a los tres tratamientos con gelatinas, se observa a continuación en la **Figura 7**.

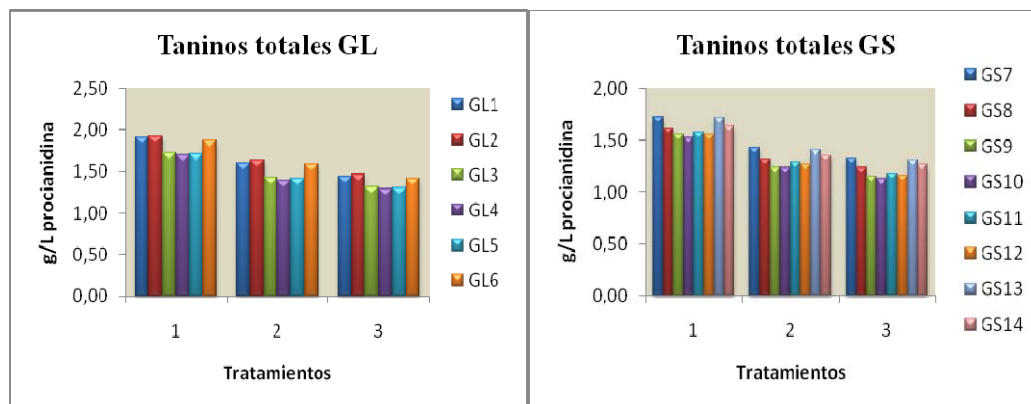


Figura 8. Efecto de tres tratamientos diferentes con gelatinas comerciales sobre el contenido de taninos totales (g/L procianidina) de la SH luego de 48 horas de clarificación.

La **Figura 8** muestra el comportamiento de los taninos totales de las SH frente a los distintos tratamientos con gelatina. El contenido inicial de 3,04 g/L de procianidina, se ve claramente afectado por todos los tratamientos, aunque para T₂ y T₃ la diferencia es bastante baja. Lo antes expuesto se explica ya que con la dosis de gelatina usada en T₂ se logra precipitar casi en su totalidad a los taninos de la SH. Según lo observado experimentalmente, los volúmenes de lías comparados entre tratamientos no presentaban mayores diferencias, no obstante la turbidez final de T₃ sería indicio de un sobreencolado. Las muestras que generaron mayor extracción de taninos fueron las sólidas, sin embargo GS₇ y GS₁₃ son las únicas muestras de este tipo que no presentan diferencias estadísticas significativas con algunas de las gelatinas líquidas. Al igual que

en la medición anterior, las muestras de ambas formulaciones tienden a agruparse según su similitud estadística, destacando dentro de las sólidas el grupo de GS₉ GS₁₀ GS₁₁ y GS₁₂ por ser las de mayor intensidad extractiva.

Los taninos son por definición moléculas capaces de producir combinaciones estables con proteínas u otros polímeros vegetales (Riberau-Gayon, 2006). La variación significativa en el contenido de taninos totales de la SH luego de la clarificación puede deberse a que los taninos presentes inicialmente no se encuentran estables o asociados a otras moléculas, de manera que en presencia de las proteínas de las gelatinas se combinan y sedimentan.

Efecto del clarificante sobre la intensidad colorante de la solución hidroalcohólica

La intensidad colorante corresponde a la suma de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm. La absorbancia a 420 nm corresponde a la fracción amarilla (característica de vinos blancos) generada principalmente por los flavonoles de pieles y semillas. La absorbancia a 520 nm corresponde al color rojo del vino tinto del cual son responsables los antocianos presentes en las pieles de las bayas. Por último, la absorbancia a 620 nm corresponde a la fracción azul presente en vinos jóvenes (Zamora, 2003).

De acuerdo a Sims *et al.*, (1995), citados por Fleischmann (2001), las gelatinas tienen un efecto insignificante sobre la intensidad de color. Zoecklein *et al.*, (2001) realizan la misma afirmación, agregando además que las gelatinas tienen un efecto más drástico sobre la reducción del color en vinos jóvenes, debido a la ausencia de compuestos fenólicos estabilizados. En cambio, Hidalgo (2001) menciona que este tipo de clarificantes proteicos sí tienen un efecto sobre la intensidad colorante de los vinos.

En la **Figura 9** se puede observar que existe una variación de la intensidad colorante frente a las diferentes dosis de gelatina, probablemente debido a que el color de la SH está determinado por los taninos enológicos utilizados en su preparación y a la interacción que existe entre éstos y las proteínas del clarificante. Se puede destacar que las gelatinas de formulación líquida no presentan diferencias estadísticas significativas, agrupándose de la misma forma que en los dos parámetros analizados anteriormente. Adicionalmente, las muestras sólidas GS₇ y GS₁₃ presentan un comportamiento estadísticamente similar a un grupo de gelatinas líquidas.

Por otro lado, entre las gelatinas sólidas, las muestras GS₉, GS₁₀, GS₁₁ y GS₁₂ son las que mayor variabilidad generan luego de la clarificación, no habiendo diferencias significativas entre ellas. Según Sims *et al.*, (1995) la variación de la intensidad colorante dependerá de la cantidad de clarificante utilizado, sufriendo mayores variaciones cuando las dosis de clarificante son mayores; esta afirmación concuerda con los resultados, aun cuando las diferencias entre cada tratamiento y para ambos tipos de gelatinas, no son mayormente significativos. Por otro lado, los resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Ramírez (2009) mediante el uso de una SH y concentraciones de gelatina similares.

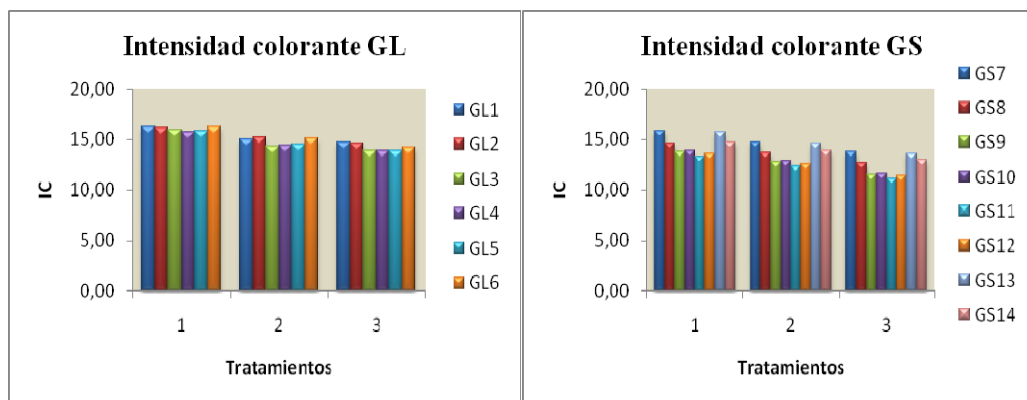


Figura 9. Efecto de tres tratamientos diferentes con gelatinas comerciales sobre la intensidad colorante de la SH luego de 48 horas de clarificación.

Ensayo II: Clarificación de un vino cv. Cabernet Sauvignon mediante tratamientos con gelatina enológica.

Para la realización de este ensayo se utilizó como unidad experimental vino tinto cultivar Cabernet Sauvignon elaborado de forma artesanal con uvas provenientes del valle del Maipo. En Chile esta variedad es la más cultivada entre las cepas tintas finas. Su adaptación a las condiciones naturales de Chile es notable, logrando elaborar vinos de alta calidad, tanto desde el punto de vista aromático como estructural. Son probablemente los vinos más aptos para ser envejecidos, debido principalmente a su alto contenido de taninos (Pszczółkowski, 1998).

Tal vez el factor más importante que determinará la calidad del vino es su concentración y composición fenólica. Estos compuestos son responsables de características tales como el color, la astringencia, el amargor o el cuerpo de un vino. Poseen importantes propiedades beneficiosas para la salud debido a su condición de moléculas antioxidantes (Peña-Neira, 2002). Según Riberau-Gayon *et al.*, (2006) los compuestos fenólicos tienen propiedades bactericidas y antioxidantes. Existe evidencia científica que demuestra que estos compuestos tienen propiedades anti-cancerígenas y ayudan a la protección contra enfermedades cardiovasculares (Dinnella *et al.*, 2009). La concentración y naturaleza de estos compuestos en el vino, depende entre otros, de la variedad, momento de cosecha, condiciones de suelo y zona geográfica (Peña, 1998).

La interacción entre las proteínas del agente clarificante y la composición fenólica de los vinos, genera cambios irreversibles luego de la clarificación (Zoecklein *et al.*, 2001). Las dosis de gelatina enológica utilizadas en la bodega, dependerán en gran medida, de la concentración de los polifenoles presentes y de las características que se desea obtener (en términos estructurales como organolépticos) en los vinos tratados con estos productos, motivo por el cual se recomiendan ensayos previos para determinar la dosis a utilizar. Los resultados estadísticos (promedios y desviaciones) obtenidos por cada tratamiento estudiado y su efecto sobre la composición fenólica del vino son presentados en los **Cuadros 13, 14 y 15** apéndices IV y V.

Caracterización del vino cv. Cabernet Sauvignon

El vino utilizado para la realización de este experimento fue caracterizado mediante la medición de los parámetros espectrofotométricos indicados. Se utilizó una dilución de vino de 1:50, mientras que el pH fue medido directamente. El Contenido global de polifenoles y el pH del vino son presentados en el **Cuadro 5**.

Cuadro 5. Contenido global de polifenoles y pH del vino Cabernet Sauvignon.

Fenoles (mg/L EAG)	Taninos (g/L procianidina)	Antocianos (mg/L malvidina)	Intensidad Colorante	pH
1955,54	2,05	1002,535	12,16	3,41

Para Frankel *et al.*, (1995) la concentración de fenoles totales en un vino tinto varía entre los 1,8 y 4,06 g/L EAG, teniendo un promedio de 2,57 g/L. Los valores obtenidos para este parámetro se encuentran dentro del rango señalado, aunque bajo el promedio. Por otra parte, la concentración de taninos totales presentó resultados inferiores a los observados por otros autores (Huerta, 2006; Ketter, 2008; Ponce, 2007; Romero 2009). La vinificación artesanal, donde existe una pobre extracción de compuestos desde las pieles y semillas de la uva, además de la baja calidad de esta última, serían explicaciones posibles para los bajos contenidos observados. El nivel de malvidina encontrado en el vino es similar con valores observados por otros autores para la misma variedad (Huerta, 2006; Ponce, 2007; Romero 2009). Con respecto a la intensidad colorante, los valores observados son similares a los encontrados por Morales (2001) y Ketter (2008). Luego de la clarificación, el pH del vino no se vio mayormente afectado, aunque las gelatinas sólidas produjeron pequeñas variaciones.

Efecto del clarificante sobre los fenoles totales del vino

Riberau-Gayon *et al.*, (2006) mencionan que los polifenoles sufren transformaciones durante la vinificación, sobre todo en vinos tintos, debido a procesos de oxidación, condensación, polimerización o precipitación. Cabe destacar que el nombre de polifenoles engloba a antocianos, flavonoles, flavanoles, ácidos fenólicos y otros. La medición espectrofotométrica a 280 nm entrega un contenido global de estos compuestos del vino (Zamora, 2003).

En la **Figura 10** se muestra el efecto de tres dosis diferentes de gelatina enológica sobre los polifenoles totales del vino tinto empleado. Se puede observar un descenso del contenido de polifenoles totales que fue proporcional al aumento de la dosis para T₁ y T₂. No se observó diferencias significativas entre T₂ y T₃, por lo que el aumento de la dosis, en términos reales, solo generaría alzas de los costos productivos por el uso excesivo de un determinado clarificante, además de posibles problemas de sobreencolado que podrían generar inestabilidad incluso aún después del embotellado. Las muestras sólidas GS₉, GS₁₀, GS₁₁ y GS₁₂ presentaron diferencias estadísticas entre los tres tratamientos. El comportamiento de las muestras fue similar al observado en el experimento con la SH. En el caso de las muestras líquidas éstas se agrupan estadísticamente entre GL₁, GL₂ y GL₆ y entre GL₃, GL₄ y GL₅ en todos los

tratamientos, siendo también este último grupo, estadísticamente similar a las sólidas GS₇ y GS₁₃. El resto de las gelatinas de formulación sólida presentaron un efecto más intenso sobre los polifenoles del vino, donde GS₈ y GS₁₄ no presentaron diferencias significativas posiblemente debido a su idéntico origen, mientras GS₉, GS₁₀, GS₁₁ y GS₁₂ fueron las muestras de mayor extracción.

Los valores obtenidos luego de 48 horas de clarificación fueron más elevados que los propuestos por Zoecklein *et al.*, (2001) y Bordeau y Scarpa (2000), quienes señalan que el contenido promedio de fenoles totales para los vinos tintos jóvenes de esta variedad es de aproximadamente 1300 mg/L EAG. Por otro lado, los resultados concuerdan con lo propuesto por Fleischmann (2001), Huerta (2006) y Morales (2009), quienes señalan que las gelatinas tienen un efecto sobre los polifenoles totales de un vino tinto, los que disminuyen a medida que aumenta la dosis de gelatina. Según Molina (2000), dosis de gelatinas enológicas sobre 10 g/L tienen un efecto apreciable sobre polifenoles que participan en la astringencia del vino tinto, no obstante este efecto dependerá de la selectividad de las proteínas del agente clarificante para interactuar con polifenoles presentes.

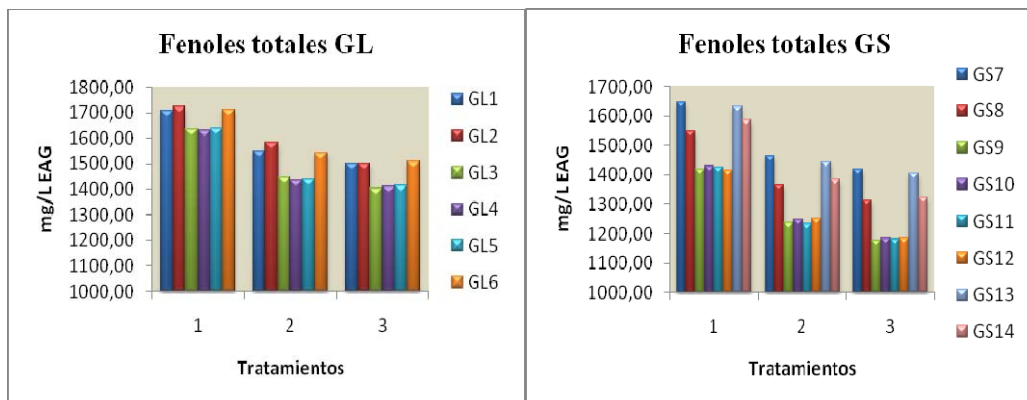


Figura 10. Efecto de tres tratamientos diferentes con gelatinas comerciales sobre los fenoles totales de un vino del cv. Cabernet Sauvignon.

Efecto del clarificante sobre los taninos totales del vino

Según Flanzky (2000), la reacción de floculación entre las proteínas de un clarificante con los taninos del vino no estaría relacionada con la unión por cargas opuestas, debido a que al pH de vino los taninos no tendrían carga. Opuesto a esto, Delanoe *et al.*, (1988), Zoecklein *et al.*, (2001) y Riberau-Gayon *et al.*, (2006) mencionan que la coagulación y posterior floculación de un clarificante proteico ocurre con polifenoles, principalmente con los taninos. Inicialmente la coagulación se genera por la deshidratación de las proteínas (electropositivas) en contacto con los taninos (electronegativos) formando un coloide hidrófobo que posteriormente floculará y sedimentará. Según Pyenaud (1989) la sedimentación se vería favorecida en presencia de ciertos minerales, como Hierro (Fe⁺²), ya que éste se uniría al coloide hidrófobo acelerando su sedimentación.

En la **Figura 11** se muestra el comportamiento de los taninos totales frente a tres dosis diferentes de gelatina. Considerando 2,15 g/L de procianidina del vino presentes inicialmente, se observa que todas las gelatinas, independientes de su formulación, ejercen una disminución proporcional al aumento de las dosis, no existiendo diferencias estadísticas entre los tres tratamientos para todas las muestras. El comportamiento de las muestras sigue el mismo patrón anterior, agrupándose las muestras entre las que no presentan diferencias significativas. Las muestras de formulación líquida, son las de menor extracción tánica, mientras que las sólidas, específicamente el grupo de las muestras GS₉, GS₁₀, GS₁₁ y GS₁₂, fueron las muestras de mayor extracción.

Por otro lado, las muestras GS₇ y GS₁₃ presentan un comportamiento estadístico similar, mientras que GS₈ y GS₁₄ presentan un origen común traducido en un comportamiento estadístico similar. Según Maury *et al.*, (2001) las gelatinas son más selectivas con los taninos más polimerizados y galoilados. Por otro lado, mientras más elevado es el PM de las proteínas utilizadas para la clarificación, mayor es la precipitación de taninos (Moreno-Arribas y Polo, 2009), afirmaciones que en conjunto con los contenidos proteicos medidos explicarían los resultados.

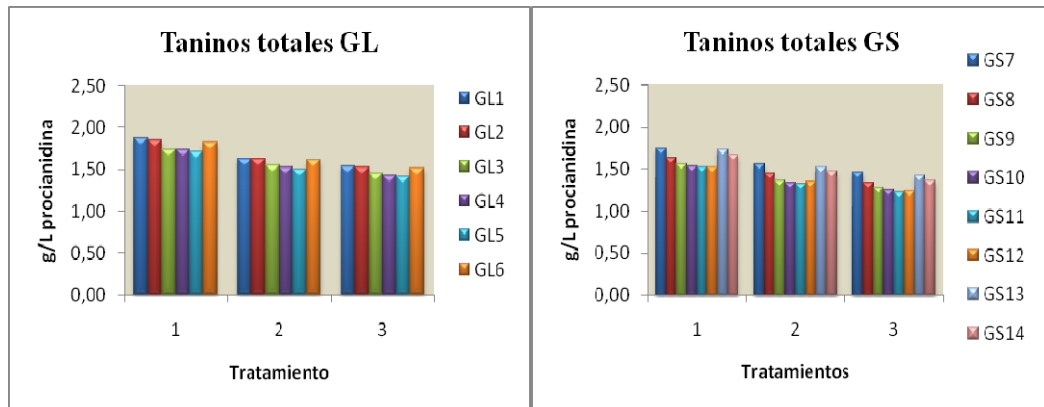


Figura 11. Efecto de tres tratamientos diferentes con gelatinas comerciales sobre los taninos totales de un vino del cv. Cabernet Sauvignon.

La disminución de taninos es proporcional al aumento de las dosis, tendencia similar a la descrita por otros autores (Fleischmann, 2001; Huerta, 2006 y Morales, 2009). Según Zamora, (2003), el rango de taninos en los vinos tintos, está entre 1 y 5 g/L de procianidina, siendo valores ideales para crianza en barricas los mayores a 3 g/L. Los valores observados en las muestras estudiadas están dentro de los rangos mencionados, aunque su baja concentración inicial se debe a la elaboración de carácter artesanal del vino y su gran variación frente a las distintas dosis, a la baja estabilidad de estos compuestos en un vino joven.

Efecto del clarificante sobre los antocianos totales del vino

Según Mazza *et al.* (1999), la concentración y composición de antocianos en el vino varían según la especie, variedad, temporada, manejos agronómicos, clima y suelo. Por otro lado Moyer *et al.*, (2002) señalan que los niveles de antocianos en las plantas varían de acuerdo a la época del año, ubicación geográfica y genotipo. En el vino variarán además de acuerdo a los manejos y cuidados durante la elaboración, en busca de una mejor extracción (Riberau-Gayon *et al.*, 2006). Los antocianos son compuestos bastante inestables cuando se encuentran en forma libre. Factores como el pH o los niveles de SO₂ influirán sobre fenómenos de copigmentación que favorecen al equilibrio de la materia colorante (Zamora, 2003).

Los antocianos forman estructuras estables con los taninos favoreciendo la estabilidad del vino frente a posibles oxidaciones o precipitaciones. Parámetros sensoriales importantes en la calidad como el color, astringencia o aroma se ven favorecidos por esta asociación. Un vino con las características necesarias para ser criado en madera, no hará más que favorecer la formación de estas estructuras, modificando positivamente la calidad. Por el contrario, vinos varietales o jóvenes, no presentan una estructura tan compleja, pudiendo sufrir mayores alteraciones luego de la clarificación.

Las concentraciones de antocianos observadas en el estudio son comparables a los resultados obtenidos por Romero (2009). En los ensayos con las distintas dosis de gelatina y para ambas formulaciones, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre T₂ y T₃. La excepción a esto fueron las muestras GS₈ y GS₁₄ las cuales no presentaron diferencias entre T₁ y T₂ pero si con T₃. El comportamiento de cada gelatina es presentado a continuación en la **Figura 12**.

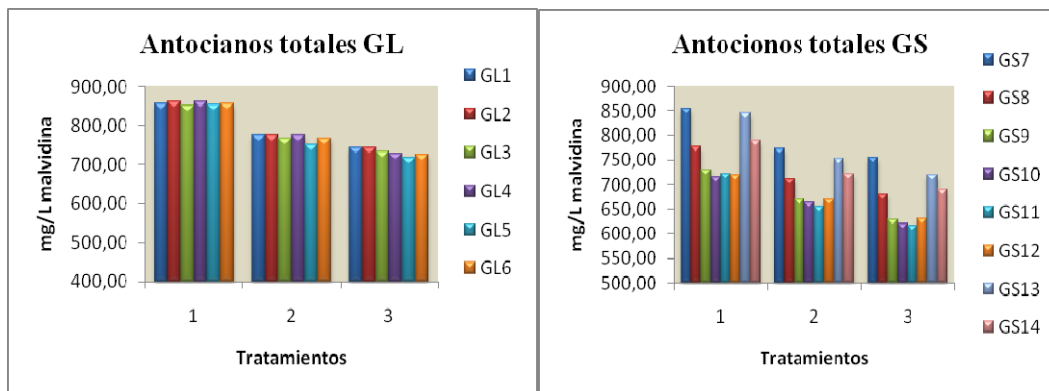


Figura 12. Efecto de tres tratamientos diferentes con gelatinas comerciales sobre los antocianos totales de un vino del cv. Cabernet Sauvignon.

Se puede observar que todas las gelatinas líquidas, sumadas GS₇ y GS₁₃, presentan un comportamiento estadístico similar para todos los tratamientos, siendo mínima la remoción de antocianos a dosis bajas. El resto de las muestras sólidas se agrupan entre las que no presentan diferencias estadísticas, destacando GS₈ y GS₁₄ que tienen un idéntico origen y elaboración, y GS₉, GS₁₀, GS₁₁ y GS₁₂, que además fueron las que mayor antocianos removieron de la solución. Según Riberau-Gayon *et al.*, (2006), las gelatinas enológicas no tendrían un gran efecto sobre la materia colorante de vinos

tintos jóvenes. Por otro lado, el aumento de las dosis de gelatina genera la misma tendencia observada por Flieschmann, (2001) y Morales, (2009) aunque la extracción o remoción de la materia colorante no es significativa estadísticamente. Los valores observados antes y después de la clarificación son cercanos a los descritos para la misma variedad por Romero, (2009) y, por el contrario, son elevados en comparación a los observados por Morales, (2001); Huerta, (2006) y Ketter, (2008).

Efecto del clarificante sobre la intensidad colorante del vino

Las características cromáticas de los vinos hacen referencia a su luminosidad y color. La luminosidad corresponde a la transmisión de luz a través del vino y es inversamente proporcional a la absorbancia y la intensidad colorante del vino. La cromaticidad o color corresponde a la longitud de onda predominante. Los espectros de absorción de los vinos tintos jóvenes presentan un máximo de absorción a los 520 nm (característicos del color rojo) y un mínimo a los 420 nm (característico color amarillo); por otro lado, en los vinos tintos viejos el fenómeno es a la inversa, la absorción a 520 nm llega a ser inferior que aquella a 420 nm (Obreque, 2010).

La intensidad colorante, así como todos los otros parámetros antes estudiados, variarán en función de la concentración de compuestos fenólicos presentes en la uva y el vino; a su vez estos compuestos variarán de una temporada a otra en función de todos los factores ya mencionados. Es así como para una misma variedad, proveniente de una misma zona geográfica, se pueden presentar valores diferentes para un determinado parámetro. Romero (2009) observó valores en vinos Cabernet Sauvignon más elevados que los resultados observados, mientras que Morales (2001) y Ketter (2008) obtuvieron valores similares a los encontrados inicialmente en el vino estudiado. El comportamiento de esta fracción frente a diferentes dosis de gelatina se muestra a continuación en la **Figura 13**.

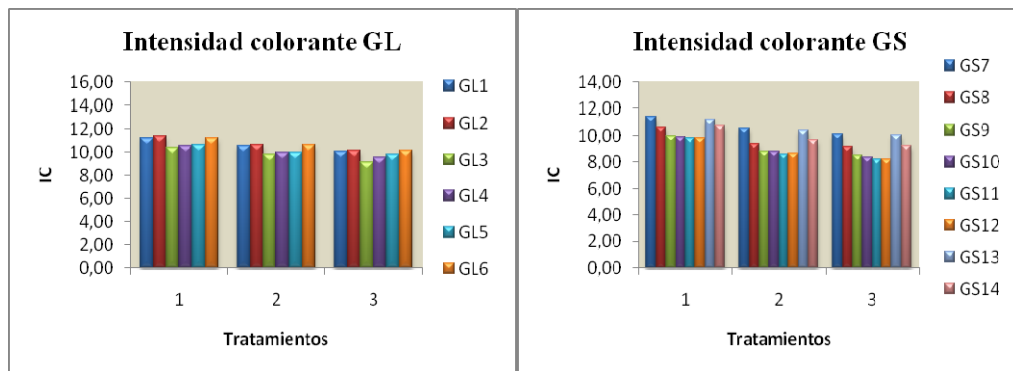


Figura 13. Efecto de tres dosis de diferentes gelatinas comerciales sobre la intensidad colorante de un vino del cv. Cabernet Sauvignon.

Se puede observar que para todas las muestras, el comportamiento de los tratamientos resultó similar, no habiendo diferencias significativas para T₂ y T₃. Las gelatinas líquidas presentaron un comportamiento estadístico similar entre ellas y con las muestras GS₇ y GS₁₃. El resto de las gelatinas sólidas presentaron cuantitativamente una mayor extracción en comparación a las líquidas, aunque en términos prácticos resultó

insignificante la variación de la intensidad colorante, corroborando así lo propuesto por Peynaud, (1989) y Vivas *et al.*, (2000), quienes postularon que los clarificantes proteicos tienen un bajo efecto sobre la disminución de este parámetro. Las gelatinas GS₉, GS₁₀, GS₁₁ y GS₁₂ son al igual que para el resto de los parámetros analizados, las muestras que generaron una mayor remoción de compuestos fenólicos.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados y condiciones empleadas para este estudio, se puede concluir lo siguiente:

- Todas las gelatinas enológicas estudiadas, presentan una composición proteica diferente. Sin embargo las gelatinas de formulación sólida presentan una concentración proteica mayor según distintos métodos de análisis.
- Las gelatinas líquidas no presentan una composición polipeptídica evidente, pudiendo estar constituidas por polímeros sintéticos afines al colorante de proteínas Coomassie blue.
- Las moléculas de proteínas que constituyen las gelatinas sólidas presentan claras diferencias en sus tamaños.
- En comparación con las gelatinas líquidas, las gelatinas sólidas presentaron un efecto clarificador mayor, siendo más notable el efecto que ejercen sobre la composición fenólica global tanto de la SH como del vino cv. Cabernet Sauvignon analizado.
- La clarificación producida mediante un producto de origen proteico, como las gelatinas, genera modificaciones irreversibles en la fracción polifenólica del vino tratado, lo que produciría alteraciones en las propiedades sensoriales u organolépticas del vino.
- La realización de pruebas preliminares para determinar la dosis exacta de clarificante a utilizar, es importante ya que disminuiría los riesgos de sobreencolado, que causan daños irreversibles en los vinos tratados con estos productos.

LITERATURA CITADA

- Bate-Smith, E. 1981. Astringent tannins of the leaves of geranium species. *Phytochemistry*, 20: 211-216 p.
- Bordeau, E. Y J. Scarpa. 2000. Análisis químico del vino. Textos universitarios. Facultad de Agronomía. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago. 253 p.
- Bollang, D., M. Rozycki and S. Edelstein. 1996. *Proteins Methods*. A John & Sonns, INC., Publication. 415 p.
- Bramhall S., Noack N., M. Wu and J.R. Loewenberg. 1969. A simple colorimetric method for determination of protein. *Analytical Biochemistry*. Vol. 31, 146-148 p.
- Castellari, M., Spinabelli, U., C. Riponi and A. Amati. 1997. Influence of some technological practices on the quantity of resveratrol in wine. In: *Z Lebensmittel Unters Forschung*, Germany. 151-155 p.
- Cheyner, V., M. Moutunet y P. Sarni-Manchado. 2000. Los compuestos fenólicos p. 114-136. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Ediciones Mundi-Prensa Madrid, España. 783 p.
- Cosme, F., R. Da-Silva and O. Laureano. 2007. Protein fining agents: characterization and red wine fining assays. *Italian Journal Food Science*, 19: (1), 82-98 p.
- Delanoe, D., C. Maillard y D Maisondieu. 1988. *El vino, del análisis a la elaboración*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 197-199 p.
- Dinnella, C., Recchia, A., Fia, G., M. Bertuccioli and E. Monteleone. 2009. Saliva characteristics and individual sensitivity to phenolic astringent stimuli. *Chemical Senses*, 34: 295-304 p.
- Donoso, C. 2001. Caracterización de la composición fenólica de vinos comerciales del cultivar Sauvignon blanc provenientes de cinco valles de Chile. Memoria de título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. 77 p.
- Durham J.P and R. López-Solís. 1979. Effect of sodium hydroxide upon protein binding to filter paper disks and its significance in the determination of protein in colorimetric and radioisotopic assays. *Analytical Biochemistry*. vol. 100, 98-99 p.
- Espinoza, A. 1995. Tratamiento, clarificación y estabilización de vinos. En: *Producción y elaboración de vinos*. Fundación Chile, Santiago. 38 p.
- Flanzy, C. 2000. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Ediciones

Mundiprensa Madrid, España. 783 p.

Fleischmann, H. 2001. Efecto del uso de cuatro clarificantes sobre la composición fenólica de un vino cultivar Carménère. Memoria de Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 82 p.

Frankel, E., A. Waterhouse and P. Teissedre. 1995. Principal phenolic phytochemical in selected California wines their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43: 890-893 p.

García-Barceló, J., 1990. Técnicas analíticas para vinos, Ediciones FAB. Barcelona, España. 1713 p.

García-Pérez, H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Laboratorios Beterá. Revista Universo Diagnostico*, 2: 31-41 p.

Glories, Y. 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. Thèse Doctorat en Sciences, Université de Bordeaux II, Francia. 364 p.

Helmerhorst, E. and F. Oppenheim. 2007. Saliva: a Dynamic Proteome. *Journal of Dental Researches*, 86: 680 p.

Hidalgo, J. 2003. Tratado de Enología. Tomo 2. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 1423 p.

Hornsey, I. 2007. The chemistry and biology of winemaking. Published in The Royal Society of Chemistry. 457 p.

Hu, S., Xie, Y., Ramachandran, P., Ogorzalek-Loo R., Li Y., J. Loo and D. Wong. 2005. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics*, 5: (6), 1714-1728 p.

Huerta, I. 2006. Efecto del uso de distintos clarificantes sobre la composición fenólica de vinos de los cultivares Cabernet Sauvignon y Chardonnay. Memoria Ingeniero Agrónomo, Universidad de Chile. 88 p.

Ketter, R. 2008. Caracterización de la composición fenólica de vinos comerciales de cv. Cabernet Sauvignon proveniente de tres valles de Chile, de las vendimias 2002 y 2003. Memoria de Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 56 p.

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

Lagune-Ammirati, L. 1997. Pratiques vinicoles, produits oenologiques, nettoyage, désinfection, contrôle qualité au chai. *Journal International des Sciences de la Vigne*

et du Vin, Bordeaux, France. 99-101 p.

Lagune-Ammirati, L. 1998a. Le controle qualité des gélatines pour la clarification du vins. Faculté d'Oenologie, Université de Bordeaux, France. 7 p.

Lagune-Ammirati, L. 1998b. Nos gélatines liquides. Séminaire Laffort. 6 p.

Lagune, L. et Y. Glories. 1996. Les nouvelles données concernant le collage des vins rouges avec les gélatines œnologiques. *Revue des Œnologues*, 80: 18-20 p.

Lau, W., Hwang, C., Brugge, H., Iglesias-Silva, G., Duarte-Garza, H., Rogers, W., Hall, K., Holste, J., B. Gammon and K. Marsh. 1997. A continuously weighed pycnometer for measuring fluid properties. *Journal of Chemical and Engineering*, 42: (4) 738-744 p.

Lomote, B. 2007. *Manual de Métodos Inmunológicos*. Universidad de Costa Rica. 90 - 93 p. Acceso libre en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/> visitada el 26 de Julio del 2010.

López, R. y D. Miranda. 1986. Changes in the polypeptide composition of mouse parotid glands after stimulation of secretion and DNA synthesis by isoproterenol. *Biochim. Biophys*, 881: 422-429 p.

López-Cisternas, J., Castillo, J., L. Traipeand and R. López-Solís. 2007. A Protein Dye-Binding Assay on Cellulose Membranes for Tear Protein Quantification: Use of Conventional Schirmer Strips. *Cornea*, 26: (8) 970-976 p.

Lowry, O., Rosenbrough, N., A. Lewis and R. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275 p.

Marchal, R., Marchal-Delahaut, L., A. Lallement and P. Jeandet. 2002. Wheat gluten as a clarifying agent of red wines. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 177-184 p.

Maury, C., Sarni-Manchado, P., Lefebvre, S., V. Cheynier and M. Moutonet. (2001). Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *American Journal of Viticulture*, 52: 140-145 p.

Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., B. Girard and B. Ewert. 1999. Anthocyanins, phenolics and color of Cabernet franc, Merlot and Pinot noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4009-4017 p.

Molina, R. 1994. *Clarificación de mostos y vinos*. A. Madrid Vicente Ediciones. Madrid, España. 128 - 195 p.

Molina, R. 2000. *Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas*. AMV Ediciones. Mundi-Prensa. Madrid, España. 317 p.

Morales, C. 2001. Caracterización de la fracción fenólica del cv. Cabernet Sauvignon en cinco valles de Chile, en dos temporadas. Memoria de título profesional de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 98 p.

Morales, E. 2009. Efecto del uso de clarificantes proteicos de origen vegetal sobre la composición fenólica de vinos de los cultivares Cabernet Sauvignon y Chardonnay. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Agropecuarias mención Producción Agroindustrial. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 75 p.

Moreno-Arribas, M and C. Polo. 2009. Wine Chemistry and Biochemistry. Springer Science Media, NY, USA. 490 - 495 p.

Moyer, R., Hummer, K., Finn, C., B. Frei and R. Wrolstad. 2002. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 519-525 p.

Obradovic, D. 2006. Grape-derived tannins and their application. Australian and New Zealand grapegrower and winemaker. ISSN 0727-3606. N° extra 509. 66-73 p.

Obreque, E. 2010. Análisis de mostos y vinos. Manual de laboratorio Enología I. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 37 p.

Ough, C. S. 1992. Winemaking Basics. Food products press Editions. New York, USA. 335 p.

Paetzold, M et Y Glories. 1990. Etude des gélatines utilisées en œnologie par mesure de leur charge macromoléculaire. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 24 : 79-86, 102 p.

Peña, A. 1998. Contribución al conocimiento del origen de problemas sensoriales en vinos. Su relación con la composición fenólica y la presencia de compuestos organoclorados. Tesis doctoral. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. España. 227 p.

Peña-Neira, A. 1999. Compuestos fenólicos en enología. Conceptos básicos. Seminario internacional de microbiología y polifenoles del vino. Universidad de Chile. 150 p.

Peña-Neira, A. 2002. Composición fenólica de vinos comerciales chilenos. Revista Vitivinicultura, Chile, 4: 46-51 p.

Peña-Neira, A. 2006. Los taninos y su importancia en la calidad de uvas y vinos. Revista Vendimia, Chile, 50: 18-20 p.

Peynaud, E. 1989. Enología Práctica. Conocimiento y elaboración de vino. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 309-314 p.

Ponce, E. 2007. Efecto sobre el nivel de carga frutal en la composición química de las bayas y vinos Cabernet Sauvignon del valle del Maipo. Memoria de título profesional

de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 71 p.

Pszczolkowski, P. 1998. Encepado de vides finas de Chile: problemática y diversificación. En: Tópicos de actualización en Viticultura y Enología. Pontificia Universidad Católica de Chile. 234 p.

Ramírez, C 2008. Efecto de una gelatina sobre la precipitación de la composición fenólica de un tanino enológico. Memoria de Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 14 - 33 p.

Rankine, B. 1995. Manual práctico de Enología. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 394 p.

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., P. Sudraud y P. Ribéreau-Gayón. 1980. Tratado de Enología, tomo I. Editorial Hemisferio Sur. 643 p.

Ribéreau-Gayón, P., Glories, Y., A. Maujean and D. Dubourdieu. 2006. Handbook of Enology vol.2. The chemistry of wine stabilization and treatments. Secon edition. 109-415 p.

Romero, C. 2009. Caracterización fenólica de bayas y vinos de vides viníferas de los cultivares Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon y Carménère provenientes del valle del Maipo. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Agropecuarias, mención Enología y Vitivinicultura. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 43-47 p.

Sepúlveda, E. 2008. Manual de trabajos prácticos. Curso Análisis de Alimentos. Departamento de Agroindustria y Enología. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. 13-20 p.

Sims, C., J. Eastridge and R. Bates. 1995. Changes in phenols, color, and sensory characteristics of muscadine wines by pre and post-fermentation additions of PVPP, casein, and gelatin. American Journal of Enology and Viticulture, 46: (2) 155-158 p.

Troost, R. 1985. Tecnología del vino. Editorial Omega. Barcelona, España. 1103 p.

Ureta, F., E. Bordeu y P. Pszczolkowski. 1981. El vino, Antecedentes sobre su fabricación, degustación y cultura. Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile. 132 p.

Vivas, N., Bertrand, A., Canal-Llaubères, R., Feuillat, M., Hardy, G., Lamadon, F., A. Lonvaud-Funel et P. Pellerin. 2000. Produits de traitement et auxiliaires d'élaboration des mouts et des vins. Editions Féret, Bordeaux, France. 114 - 118 p.

Vivas, N et M. Norier. 2003. Sur l'estimation et le quantification des composéés phenoliques des vins. Bulletin de la Office International de la Vigne et du Vin, 76: (865-866): 281-303 p.

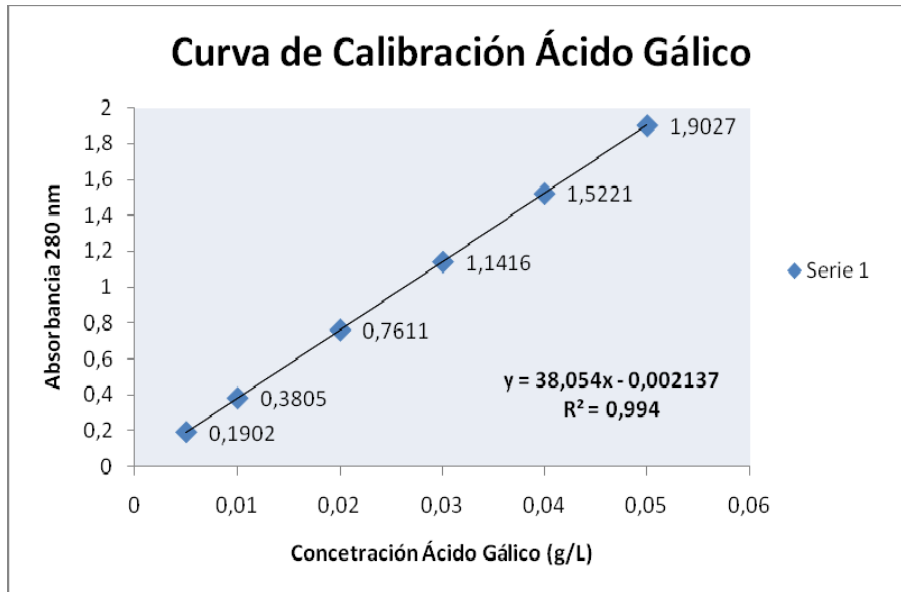
Vogt, E., Jakob, L., E. Lemperle y E. Weis. 1984. El vino: obtención, elaboración y análisis. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 108 p.

Zamora, F. 2003. Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. AMV Ediciones. 159 p.

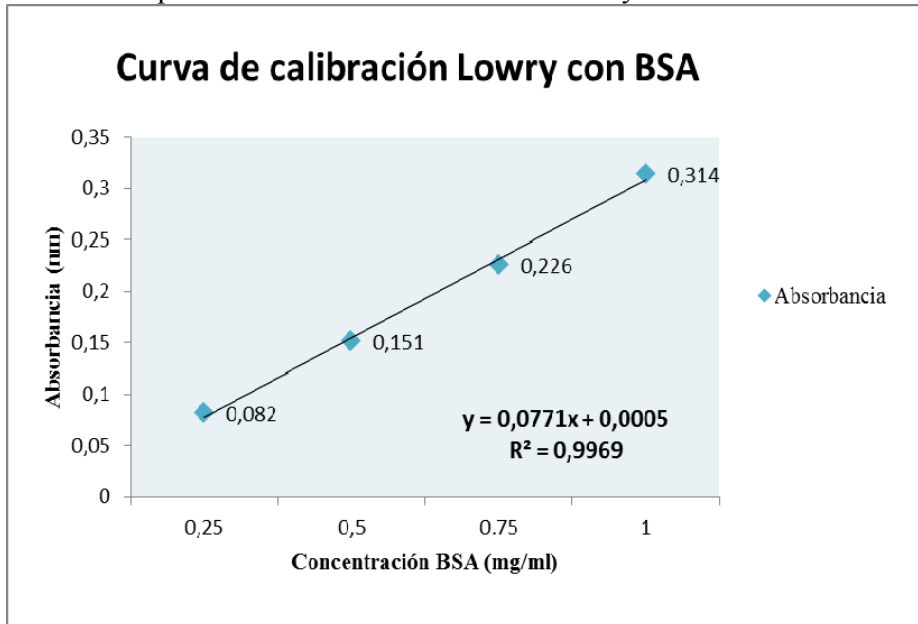
Zoecklein, B., Fugelsang, K., B. Gump y F. Nury. 2001. Análisis y Producción de vino. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza, España. 613 p.

APENDICE I

Cuadro 6. Curva de calibración ácido gálico para la medición del contenido de fenoles totales.

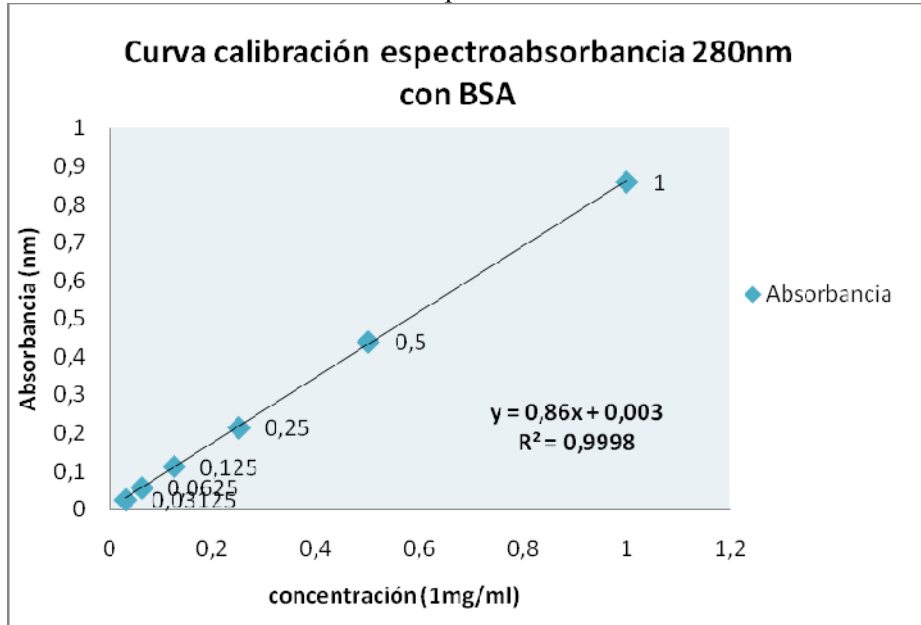


Cuadro 7. Curva de calibración con Seroalbumina bovina para la medición del contenido total de proteínas mediante el método de Lowry.

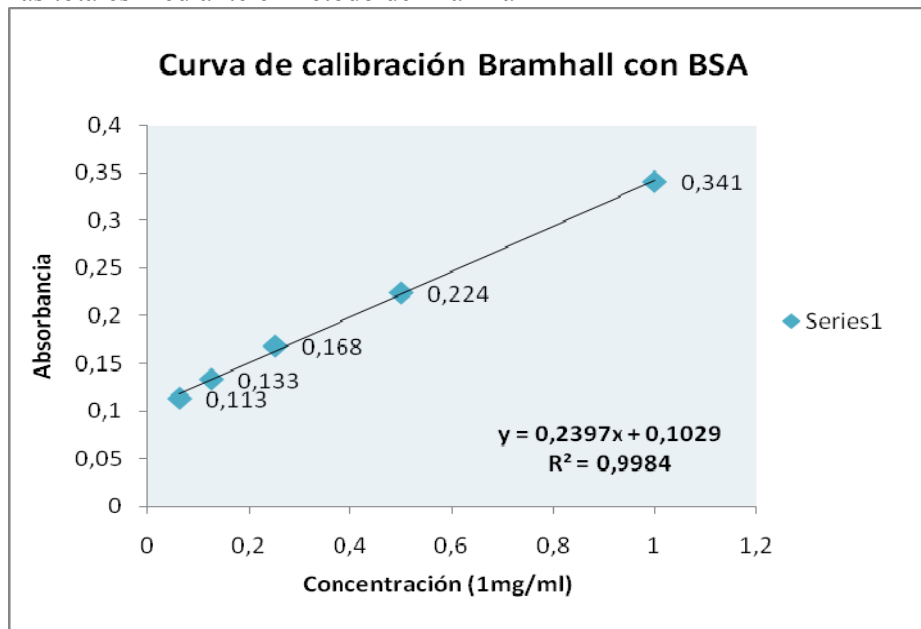


APÉNDICE II

Cuadro 8. Curava de calibración con Seroalbumina bovina para la cuantificación de proteínas totales mediante el método de espectroabsorbancia a 280nm.



Cuadro 9. Curva de calibración con seroalbumina bovina para la cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bramhall



APENDICE III

Cuadro 10. Efecto de una dosis de gelatina de 5 g/hL sobre la composición fenólica global de una solución hidroalcohólica.

Gelatina	Fenoles (mg/L EAG)	Taninos (g/L procianidina)	Intensidad Colorante
GL₁	740,87 ± 3,53 a	1,91 ± 0,069 a	16,28 ± 0,075 a
GL₂	728,26 ± 4,49 a	1,93 ± 0,019 a	16,17 ± 0,16 a
GL₃	690,77 ± 2,19 b	1,73 ± 0,019 b	15,95 ± 0,105 b
GL₄	685,51 ± 8,05 b	1,69 ± 0,078 b	15,72 ± 0,089 b
GL₅	694,45 ± 2,41 b	1,71 ± 0,029 b	15,88 ± 0,106 b
GL₆	734,74 ± 1,85 a	1,87 ± 0,097 a	16,57 ± 0,047 a
GS₇	692,69 ± 4,61 b	1,72 ± 0,019 b	15,86 ± 0,047 b
GS₈	615,43 ± 3,64 c	1,62 ± 0,12 c	14,65 ± 0,11 c
GS₉	525,56 ± 2,41 d	1,55 ± 0,029 d	13,75 ± 0,051 d
GS₁₀	533,97 ± 5,97d	1,53 ± 0,078 d	13,88 ± 0,12 d
GS₁₁	519,61 ± 7,15 d	1,57 ± 0,078 d	13,33 ± 0,021 de
GS₁₂	523,64 ± 4,74 d	1,56 ± 0,069 d	13,57 ± 0,106 d
GS₁₃	688,66 ± 3,15 b	1,71 ± 0,048 b	15,70 ± 0,042 b
GS₁₄	622,62 ± 2,58 c	1,64 ± 0,13 c	14,75 ± 0,12 c

*Letras iguales en sentido vertical indican que no existen diferencias significativas entre gelatinas $p \leq 0,05$

Cuadro 11. Efecto de una dosis de gelatina de 10 g/hL sobre la composición fenólica global de una solución hidroalcohólica.

Gelatina	Fenoles (mg/L EAG)	Taninos (g/L procianidina)	Intensidad Colorante
GL₁	634,71 ± 4,88 a	1,60 ± 0,051 a	15,06 ± 0,163 a
GL₂	628,40 ± 8,15 a	1,64 ± 0,107 a	15,24 ± 0,157 a
GL₃	574,44 ± 2,41 b	1,43 ± 0,051 b	14,85 ± 0,210 b
GL₄	569,01 ± 7,94 b	1,39 ± 0,073 b	14,46 ± 0,227 b
GL₅	584,78 ± 4,55 b	1,42 ± 0,056 b	14,62 ± 0,115 b
GL₆	637,16 ± 1,61 a	1,59 ± 0,091 a	15,15 ± 0,058 a
GS₇	578,29 ± 2,37 b	1,42 ± 0,034 b	14,73 ± 0,082 b
GS₈	477,39 ± 1,85 c	1,31 ± 0,045 c	13,68 ± 0,108 c
GS₉	402,23 ± 2,19 d	1,24 ± 0,193 d	12,76 ± 0,035 d
GS₁₀	412,21 ± 3,17 d	1,23 ± 0,045 d	12,89 ± 0,075 d
GS₁₁	391,19 ± 5,11 d	1,28 ± 0,012 d	12,36 ± 0,163 de
GS₁₂	398,73 ± 4,22 d	1,26 ± 0,040 d	12,53 ± 0,069 d
GS₁₃	567,08 ± 4,77 b	1,40 ± 0,051 b	14,58 ± 0,035 d
GS₁₄	467,93 ± 2,09 c	1,35 ± 0,040 c	13,86 ± 0,049 c

*Letras iguales en sentido vertical indican que no existen diferencias significativas entre gelatinas $p \leq 0,05$

APENDICE IV

Cuadro 12. Efecto de una dosis de gelatina de 15 g/hL sobre la composición fenólica global de una solución hidroalcohólica.

Gelatina	Fenoles (mg/L EAG)	Taninos (g/L procianidina)	Intensidad Colorante
GL₁	533,97 ± 4,25 a	1,44 ± 0,012 a	14,68 ± 0,115 a
GL₂	515,58 ± 5,01 a	1,46 ± 0,059 a	14,63 ± 0,170 a
GL₃	454,13 ± 1,89 b	1,31 ± 0,029 b	13,91 ± 0,045 b
GL₄	468,35 ± 3,58 b	1,30 ± 0,104 b	13,86 ± 0,160 b
GL₅	465,87 ± 3,28 b	1,31 ± 0,048 b	13,92 ± 0,140 b
GL₆	521,71 ± 1,89 a	1,42 ± 0,023 a	14,24 ± 0,085 a
GS₇	512,95 ± 2,89 a	1,32 ± 0,038 b	13,77 ± 0,044 b
GS₈	377,18 ± 4,58 c	1,24 ± 0,012 c	12,70 ± 0,087 c
GS₉	354,05 ± 2,41 c	1,15 ± 0,029 d	11,54 ± 0,110 d
GS₁₀	366,14 ± 8,93 c	1,12 ± 0,051 d	11,66 ± 0,032 d
GS₁₁	327,25 ± 3,69 d	1,18 ± 0,029 d	11,17 ± 0,105 d
GS₁₂	335,66 ± 3,5 d	1,16 ± 0,012 d	11,43 ± 0,135 d
GS₁₃	506,99 ± 3,21 a	1,30 ± 0,029 b	13,58 ± 0,025 b
GS₁₄	389,27 ± 3,15 c	1,27 ± 0,029 c	12,95 ± 0,042 c

*Letras iguales en sentido vertical indican que no existen diferencias significativas entre gelatinas $p \leq 0,05$

Cuadro 13. Efecto de una dosis de gelatina de 5 g/hl sobre la composición fenólica global de un vino cv. Cabernet Sauvignon.

Gelatina	Fenoles (mg/L EAG)	Taninos (g/L procianidina)	Antocianos (mg/L malvidina)	Intensidad Colorante
GL₁	1707,21 ± 4,61 a	1,88 ± 0,0223 a	857,14 ± 3,86 a	11,23 ± 0,0458 a
GL₂	1725,60 ± 2,74 a	1,85 ± 0,0295 a	860,85 ± 2,26 a	11,37 ± 0,0265 a
GL₃	1636,69 ± 6,02 b	1,74 ± 0,0387 b	851,15 ± 4,71 a	10,34 ± 0,0416 b
GL₄	1631,44 ± 9,92 b	1,73 ± 0,0223 b	861,42 ± 3,56 a	10,51 ± 0,0058 b
GL₅	1640,54 ± 3,94 b	1,71 ± 0,0112 b	854,87 ± 1,31 a	10,65 ± 0,0361 b
GL₆	1713,19 ± 2,01 a	1,83 ± 0,0112 a	856,57 ± 6,97 a	11,22 ± 0,0265 a
GS₇	1644,58 ± 5,73 b	1,75 ± 0,0193 b	852,86 ± 2,15 a	11,44 ± 0,0321 a
GS₈	1549,10 ± 7,88 c	1,64 ± 0,0193 c	776,96 ± 6,69 b	10,60 ± 0,0529 b
GS₉	1418,58 ± 4,01 d	1,56 ± 0,0112 d	729,03 ± 2,99 c	9,97 ± 0,0208 c
GS₁₀	1428,80 ± 6,61 d	1,54 ± 0,0112 d	714,76 ± 3,56 c	9,87 ± 0,0153 c
GS₁₁	1425,37 ± 4,01 d	1,52 ± 0,0112 d	721,61 ± 5,83 c	9,78 ± 0,0414 c
GS₁₂	1415,66 ± 4,97 d	1,53 ± 0,0112 d	719,58 ± 8,94 c	9,82 ± 0,0421 c
GS₁₃	1631,44 ± 5,31 b	1,73 ± 0,0193 b	844,59 ± 3,24 e	11,22 ± 0,0153 a
GS₁₄	1585,45 ± 5,31 c	1,68 ± 0,0193 c	789,23 ± 5,5 b	10,77 ± 0,0231 b

*Letras iguales en sentido vertical indican que no existen diferencias significativas entre gelatinas $p \leq 0,05$

APÉNDICE V

Cuadro 14. Efecto de una dosis de gelatina de 10 g/hL sobre la composición fenólica global de un vino cv. Cabernet Sauvignon.

Gelatina	Fenoles (mg/L EAG)	Taninos (g/L procianidina)	Antocianos (mg/L malvidina)	Intensidad Colorante
GL₁	1550,41 ± 3,42 a	1,63 ± 0,0112 a	776,39 ± 1,31 a	10,52 ± 0,0158 a
GL₂	1580,63 ± 2,63 a	1,62 ± 0,0193 a	776,11 ± 2,62 a	10,63 ± 0,0115 a
GL₃	1448,80 ± 2,01 b	1,55 ± 0,0112 b	768,69 ± 2,43 a	9,82 ± 0,0115 b
GL₄	1436,10 ± 1,52 b	1,53 ± 0,0193 b	774,11 ± 4,39 a	9,98 ± 0,0361 b
GL₅	1442,45 ± 5,73 b	1,51 ± 0,0124 b	751,85 ± 4,71 a	9,95 ± 0,0361 b
GL₆	1541,65 ± 5,31 a	1,61 ± 0,0193 a	768,12 ± 4,31 a	10,64 ± 0,0306 a
GS₇	1462,82 ± 2,74 b	1,55 ± 0,0387 b	773,39 ± 3,46 a	10,57 ± 0,0503 a
GS₈	1367,34 ± 5,26 c	1,45 ± 0,0387 c	711,62 ± 6,65 b	9,40 ± 0,0551 bc
GS₉	1235,51 ± 1,52 d	1,36 ± 0,0112 d	669,68 ± 5,57 c	8,82 ± 0,0115 d
GS₁₀	1245,80 ± 1,31 d	1,34 ± 0,0193 d	664,26 ± 6,79 c	8,78 ± 0,0321 d
GS₁₁	1232,81 ± 2,74 d	1,33 ± 0,0193 d	655,70 ± 3,86 c	8,58 ± 0,0158 d
GS₁₂	1249,09 ± 8,21 d	1,35 ± 0,0223 d	670,25 ± 9,87 c	8,65 ± 0,0513 d
GS₁₃	1441,80 ± 4,61 b	1,53 ± 0,0223 b	752,42 ± 2,62 a	10,38 ± 0,0211 a
GS₁₄	1382,67 ± 7,32 c	1,48 ± 0,0402 c	721,61 ± 2,26 b	9,47 ± 0,0252 bc

*Letras iguales en sentido vertical indican que no existen diferencias significativas entre gelatinas $p \leq 0,05$.

Cuadro 15. Efecto de una dosis de gelatina de 15 g/hL sobre la composición fenólica global de un vino cv. Cabernet Sauvignon.

Gelatina	Fenoles (mg/L EAG)	Taninos (g/L procianidina)	Antocianos (mg/L malvidina)	Intensidad Colorante
GL₁	1503,11 ± 7,92 a	1,53 ± 0,0193 a	744,72 ± 4,22 a	10,03 ± 0,0306 a
GL₂	1502,24 ± 7,24 a	1,52 ± 0,0193 a	743,01 ± 4,39 a	10,12 ± 0,0351 a
GL₃	1405,44 ± 2,74 b	1,46 ± 0,0112 b	734,45 ± 3,09 a	9,23 ± 0,0158 b
GL₄	1410,75 ± 5,92 b	1,43 ± 0,0295 b	728,17 ± 6,46 a	9,35 ± 0,0306 b
GL₅	1414,64 ± 4,22 b	1,41 ± 0,0511 b	717,04 ± 9,15 a	9,46 ± 0,0411 b
GL₆	1508,08 ± 6,02 a	1,51 ± 0,0223 a	724,12 ± 2,99 a	10,13 ± 0,0493 a
GS₇	1416,83 ± 5,31 b	1,46 ± 0,0193 b	753,57 ± 5,5 a	10,09 ± 0,0173 a
GS₈	1311,72 ± 5,92 c	1,33 ± 0,0295 c	680,23 ± 5,5 b	9,20 ± 0,0208 b
GS₉	1177,70 ± 6,74 d	1,28 ± 0,0295 d	627,73 ± 4,05 c	8,54 ± 0,0473 c
GS₁₀	1183,10 ± 6,02 d	1,25 ± 0,0193 d	620,60 ± 1,78 c	8,37 ± 0,0404 c
GS₁₁	1179,36 ± 6,02 d	1,22 ± 0,0193 d	616,03 ± 3,86 c	8,19 ± 0,0265 c
GS₁₂	1185,58 ± 6,57 d	1,24 ± 0,0112 d	631,44 ± 5,61 c	8,23 ± 0,0153 c
GS₁₃	1402,82 ± 4,61 b	1,42 ± 0,0112 b	718,47 ± 3,92 a	10,02 ± 0,0416 a
GS₁₄	1324,86 ± 9,45 c	1,37 ± 0,0112 c	690,79 ± 6,97 b	9,27 ± 0,0252 b

*Letras iguales en sentido vertical indican que no existen diferencias significativas entre gelatinas $p \leq 0,0$

APENDICE VI

Cuadro 16. Efecto de los tratamientos para cada gelatina solida sobre la composicion fenolica global de un vino cv. Cabernet Sauvignon

		Fenoles (mg/L EAG)	Taninos (g/L procianidina)	Antocianos (mg/L malvidina)	Intensidad Colorante
GS₇	T1	1644,58 ± 5,73 a	1,75 ± 0,0193 a	852,86 ± 2,15 a	11,44 ± 0,0321 a
	T2	1462,82 ± 2,74 b	1,55 ± 0,0387 b	773,39 ± 3,46 b	10,57 ± 0,0503 b
	T3	1416,83 ± 5,31 b	1,46 ± 0,0193 c	753,57 ± 5,5 b	10,09 ± 0,0173 b
GS₈	T1	1549,10 ± 7,88 a	1,64 ± 0,0193 a	776,96 ± 6,69 a	10,60 ± 0,0529 a
	T2	1367,34 ± 5,26 b	1,45 ± 0,0387 b	711,62 ± 6,65 a	9,40 ± 0,0551 b
	T3	1311,72 ± 5,92 b	1,33 ± 0,0295 c	680,23 ± 5,5 b	9,20 ± 0,0208 b
GS₉	T1	1418,58 ± 4,01 a	1,56 ± 0,0112 a	729,03 ± 2,99 a	9,97 ± 0,0208 a
	T2	1235,51 ± 1,52 b	1,36 ± 0,0112 b	669,68 ± 5,57 b	8,82 ± 0,0115 b
	T3	1177,70 ± 6,74 c	1,28 ± 0,0295 c	627,73 ± 4,05 b	8,54 ± 0,0473 b
GS₁₀	T1	1428,80 ± 6,61 a	1,54 ± 0,0112 a	714,76 ± 3,56 a	9,87 ± 0,0153 a
	T2	1245,80 ± 1,31 b	1,34 ± 0,0193 b	664,26 ± 6,79 b	8,78 ± 0,0321 b
	T3	1183,10 ± 6,02 c	1,25 ± 0,0193 c	620,60 ± 1,78 b	8,37 ± 0,0404 b
GS₁₁	T1	1425,37 ± 4,01 a	1,52 ± 0,0112 a	721,61 ± 5,83 a	9,78 ± 0,0414 a
	T2	1232,81 ± 2,74 b	1,33 ± 0,0193 b	655,70 ± 3,86 b	8,58 ± 0,0158 b
	T3	1179,36 ± 6,02 c	1,22 ± 0,0193 c	616,03 ± 3,86 b	8,19 ± 0,0265 b
GS₁₂	T1	1415,66 ± 4,97 a	1,53 ± 0,0112 a	719,58 ± 8,94 a	9,82 ± 0,0421 a
	T2	1249,09 ± 8,21 b	1,35 ± 0,0223 b	670,25 ± 9,87 b	8,65 ± 0,0513 b
	T3	1185,58 ± 6,57 c	1,24 ± 0,0112 c	631,44 ± 5,61 b	8,23 ± 0,0153 b
GS₁₃	T1	1631,44 ± 5,31 a	1,73 ± 0,0193 a	844,59 ± 3,24 a	11,22 ± 0,0153 a
	T2	1441,80 ± 4,61 b	1,53 ± 0,0223 b	752,42 ± 2,62 b	10,38 ± 0,0211 b
	T3	1402,82 ± 4,61 b	1,42 ± 0,0112 c	718,47 ± 3,92 b	10,02 ± 0,0416 b
GS₁₄	T1	1585,45 ± 5,31 a	1,68 ± 0,0193 a	789,23 ± 5,5 a	10,77 ± 0,0231 a
	T2	1382,67 ± 7,32 b	1,48 ± 0,0402 b	721,61 ± 2,26 a	9,47 ± 0,0252 b
	T3	1324,86 ± 9,45 b	1,37 ± 0,0112 c	690,79 ± 6,97 b	9,27 ± 0,0252 b

*Letras iguales en sentido vertical indican que no existen diferencias significativas entre gelatinas $p \leq 0,05$

APENDICE VII

Cuadro 17. Efecto de los tratamientos para cada gelatina líquida sobre la composición fenólica global de un vino cv. Cabernet Sauvignon.

		Fenoles (mg/L EAG)	Taninos (g/L procianidina)	Antocianos (mg/L malvidina)	Intensidad Colorante
GL₁	T1	1707,21 ± 4,61 a	1,88 ± 0,0223 a	857,14 ± 3,86 a	11,23 ± 0,0458 a
	T2	1550,41 ± 3,42 b	1,63 ± 0,0112 b	776,39 ± 1,31 b	10,52 ± 0,0158 b
	T3	1503,11 ± 7,92 b	1,53 ± 0,0193 c	744,72 ± 4,22 b	10,03 ± 0,0306 b
GL₂	T1	1725,60 ± 2,74 a	1,85 ± 0,0295 a	860,85 ± 2,26 a	11,37 ± 0,0265 a
	T2	1580,63 ± 2,63 b	1,62 ± 0,0193 b	776,11 ± 2,62 b	10,63 ± 0,0115 b
	T3	1502,24 ± 7,24 b	1,52 ± 0,0193 c	743,01 ± 4,39 b	10,12 ± 0,0351 b
GL₃	T1	1636,69 ± 6,02 a	1,74 ± 0,0387 a	851,15 ± 4,71 a	10,34 ± 0,0416 a
	T2	1448,80 ± 2,01 b	1,55 ± 0,0112 b	768,69 ± 2,43 b	9,82 ± 0,0115 b
	T3	1405,44 ± 2,74 b	1,46 ± 0,0112 c	734,45 ± 3,09 b	9,23 ± 0,0158 b
GL₄	T1	1631,44 ± 9,92 a	1,73 ± 0,0223 a	861,42 ± 3,56 a	10,51 ± 0,0058 a
	T2	1436,10 ± 1,52 b	1,53 ± 0,0193 b	774,11 ± 4,39 b	9,98 ± 0,0361 b
	T3	1410,75 ± 5,92 b	1,43 ± 0,0295 c	728,17 ± 6,46 b	9,35 ± 0,0306 b
GL₅	T1	1640,54 ± 3,94 a	1,71 ± 0,0112 a	854,87 ± 1,31 a	10,65 ± 0,0361 a
	T2	1442,45 ± 5,73 b	1,51 ± 0,0124 b	751,85 ± 4,71 b	9,95 ± 0,0361 b
	T3	1414,64 ± 4,22 b	1,41 ± 0,0511 c	717,04 ± 9,15 b	9,46 ± 0,0411 b
GL₆	T1	1713,19 ± 2,01 a	1,83 ± 0,0112 a	856,57 ± 6,97 a	11,22 ± 0,0265 a
	T2	1541,65 ± 5,31 b	1,61 ± 0,0193 b	768,12 ± 4,31 b	10,64 ± 0,0306 b
	T3	1508,08 ± 6,02 b	1,51 ± 0,0223 c	724,12 ± 2,99 b	10,13 ± 0,0493 b

*Letras iguales en sentido vertical indican que no existen diferencias significativas entre gelatinas $p \leq 0,0$

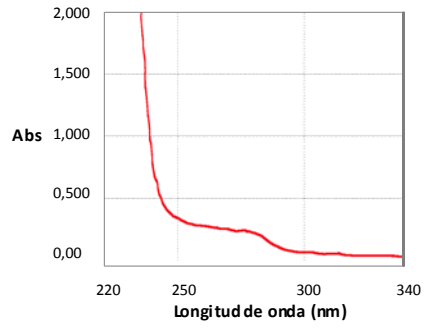
Cuadro 18. Determinación del nitrógeno y proteínas total mediante el método de Kjendahl para las muestras de formulación líquida.

Gelatinas Líquidas	Nitrógeno Total (%)	Proteína Total (%)
GL ₁	1,42	7,88
GL ₂	1,34	7,43
GL ₃	1,62	8,98
GL ₄	1,56	8,65
GL ₅	1,59	8,82
GL ₆	1,31	7,27

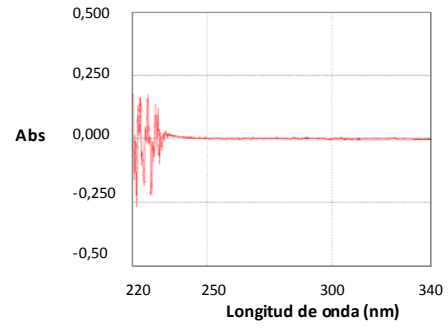
APÉNDICE VIII

Espectros de absorbanca de las gelatinas enológicas

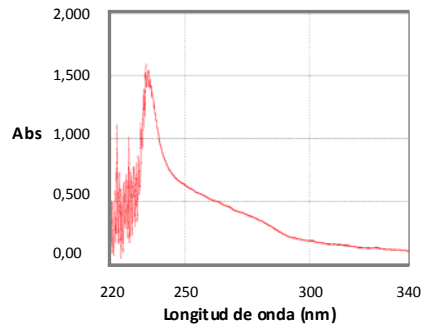
GL1



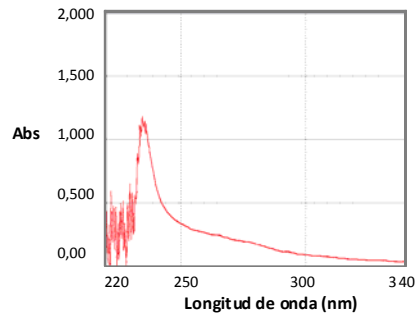
GL2



GL3

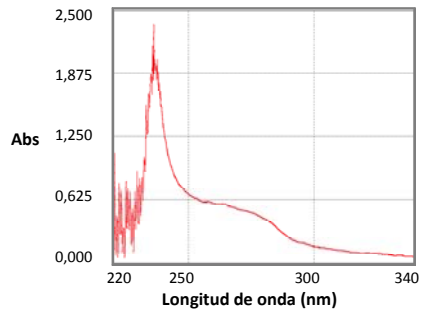


GL4

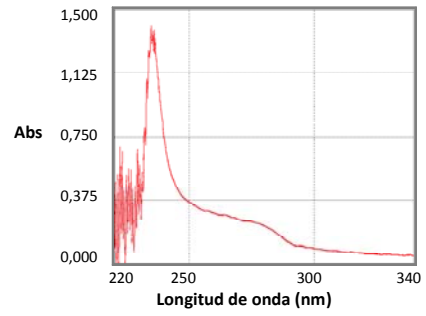


APÉNDICE IX

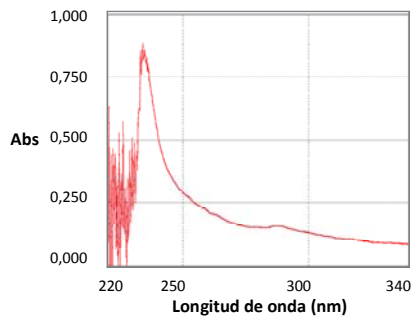
GL 5



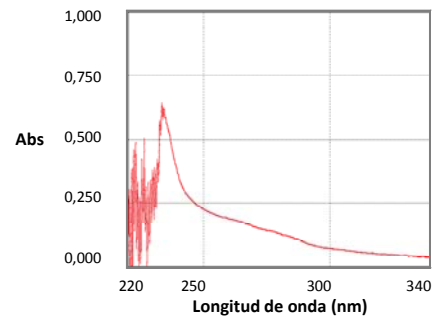
GL 6



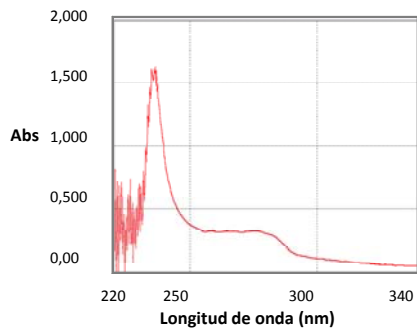
GS 8



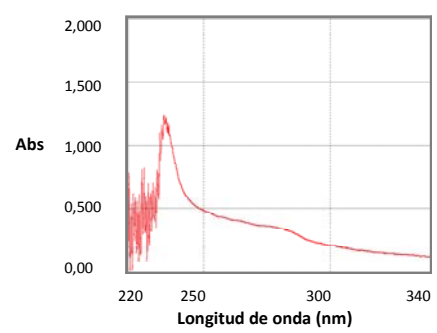
GS 9



GS 10

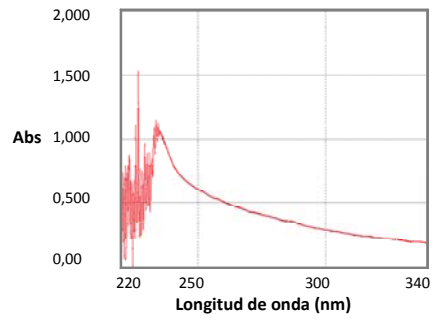


GS 11

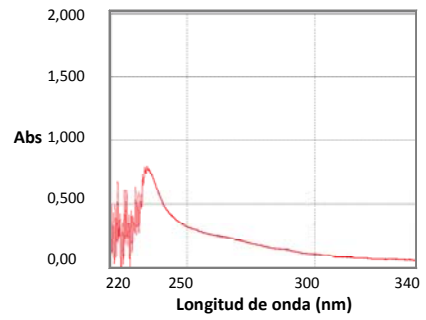


APÉNDICE X

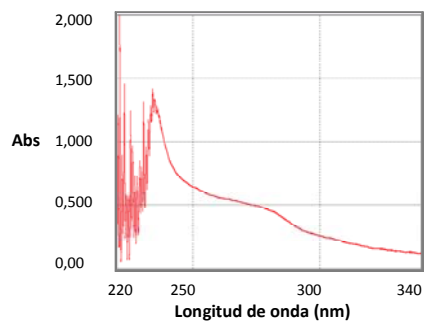
GS 12



GS 13



GS 14



ANEXO I

Fabricación de las gelatinas:

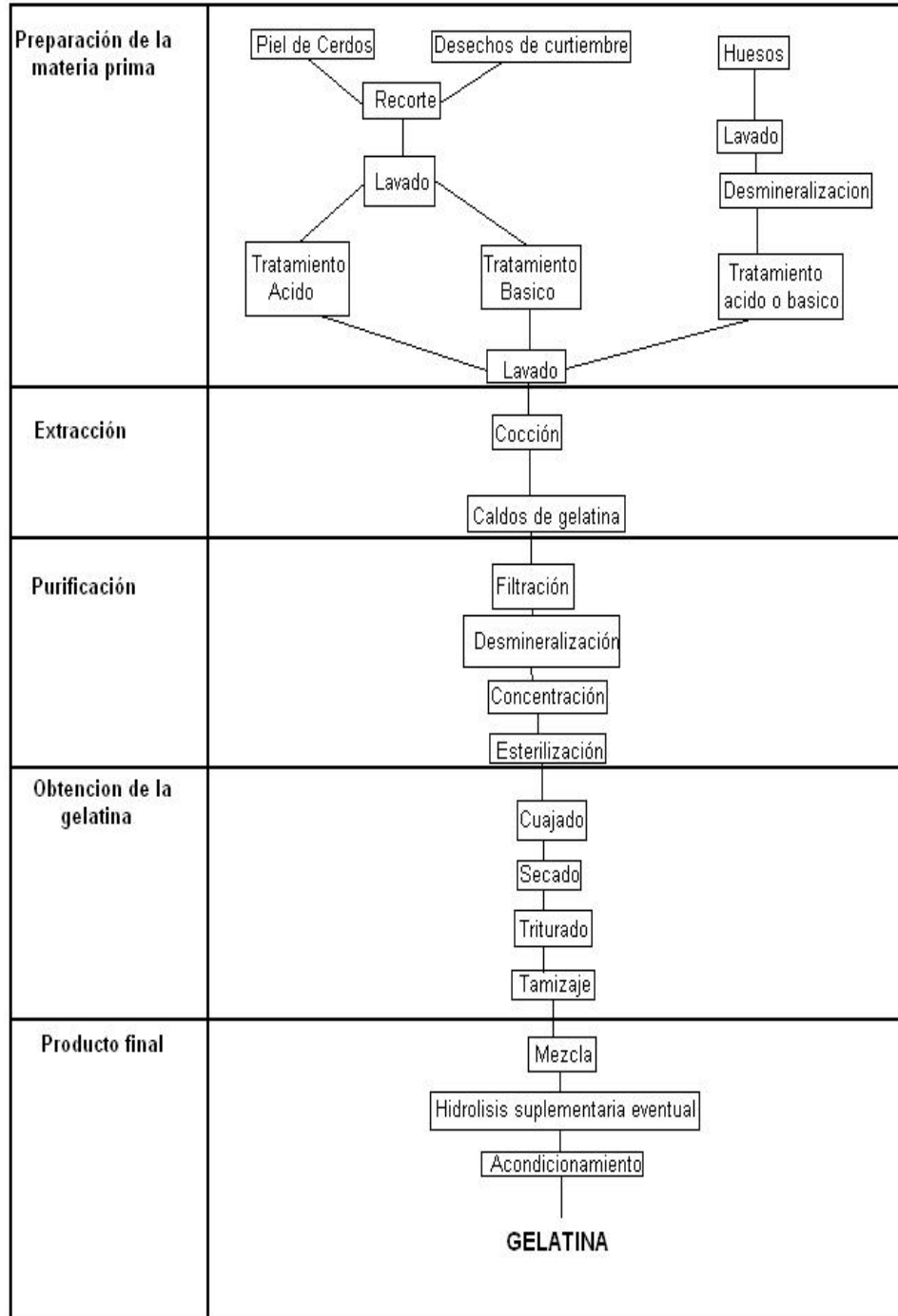


Figura 2. Fabricación de gelatinas a partir de residuos animales (Lagune y Glories, 1996).