



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

Evaluación del uso de extractos proteicos de semillas de uvas (*Vitis vinifera* L.) en la clarificación fenólica de vinos tintos

Memoria de título

Matías Herrera Aviles

Talca-Chile 2022

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2023

HOJA DE APROBACION

APROBACIÓN:



Profesor Guía: Felipe Laurie Gleisner, Ingeniero Agrónomo, M.S., Ph.D.



Profesora co-guía: Liudis L. Pino Ramos, Licenciada en Química, M.S., Dr.

Fecha de presentación de la Defensa de Memoria: 26/01/2023

RESUMEN

Hoy en día, en el proceso de clarificación del vino, se utilizan cada vez más los extractos de proteínas vegetales y materiales endógenos de las uvas en reemplazo de las proteínas animales. Estudios previos sobre extractos de proteínas de semillas de uva demostraron su efectividad para disminuir la astringencia sin alterar significativamente el color del vino; por lo que en el presente estudio se determinó el efecto clarificante de un extracto proteico de semillas de uvas del cultivar *Syrah* sobre la composición fenólica de un vino Cabernet Sauvignon.

El experimento consistió en tratar el vino Cabernet Sauvignon con dos concentraciones del extracto (30 y 50 g/hL), y dejarlo actuar durante dos tiempos de contacto diferentes (48 y 72 horas). A continuación, se determinaron las concentraciones de los compuestos fenólicos y se analizaron las características cromáticas del vino tratado con el respectivo agente clarificante. Independientemente de la concentración utilizada, el extracto de semillas de uva disminuyó significativamente la composición fenólica y las antocianinas en la condición de mayor tiempo de contacto, pero no tuvo influencia sobre los taninos totales. En cuanto al color, la concentración alta del extracto aumentó significativamente la luminosidad.

Este estudio mostró que tanto la concentración como el tiempo de aplicación de extractos proteicos de semillas de uva pueden influir sobre las diferentes características del vino. Por lo tanto, se debería continuar investigando este extracto para confirmar los resultados y seguir optimizando la dosis, purificación y tiempos de tratamientos para diferentes vinos.

ABSTRACT

Nowadays, the process of wine clarification has incorporated the use vegetable protein extracts and grape endogenous material as a replacement of animal proteins. Previous studies on grape seed extracts proved their effectiveness in decreasing astringency without changing wine color; therefore, this study attempted to determine the clarification effect of a grape seed extract of *Syrah* cultivar on phenolic composition of a *Cabernet Sauvignon*.

The experiment consisted in treating a Cabernet Sauvignon wine with two doses of seed extract concentrations (30 and 50 g/hL), using two different times of contact (48 and 72 hours). Then, phenolic component concentrations were determined and color characteristics were analyzed for each wine treated with the clarification agent. Independently of the concentration, the grape seed extract decreased phenolic composition and anthocyanins significantly in the condition with larger contact time, but did not influence total tannins. Regarding wine color, the higher extract concentration increased luminosity significantly.

This study showed that concentration as well as application time of grape seed protein extracts can influence different wine characteristics. Investigation on this extract should be continued, not only to confirm the present results, but to keep optimizing the dose, purification and treatment times for different wines.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivo General	3
1.3 Objetivos específicos	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Importancia del vino	4
2.2 Producción de vino a nivel mundial y en Chile	4
2.3 Características y defectos organolépticos	5
2.4 Importancia y rol de los clarificantes en el vino	6
2.5 Clarificantes y su legislación	9
2.6 Alergenicidad, uso de proteínas exógenas en el vino y su legislación	11
2.7 Proteínas utilizadas en la vinificación y posibles inconvenientes relacionados con su permanencia en los productos finales	12
2.8 Clarificantes de origen animal	12
2.9 Clarificantes de origen vegetal y nuevas tendencias	14
2.10 Clarificante de semillas de uva	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Materiales	18
3.1.1 Equipamiento, instrumental y reactivos químicos	18
3.2 Métodos	19
3.2.1 Metodología de extracción de proteínas de semillas de uva	19
3.2.1.1 Preparación y remoción de la fracción lipídica del extracto	19
3.2.1.2 Solubilización alcalina con precipitación isoelectrica (adaptada de Gazzola et al., 2017)	19
3.2.1.3 Caracterización de las proteínas	20
3.2.2 Experimento de clarificación: Evaluación de la acción del clarificante	21
3.3 Desarrollo experimental	21
3.3.1 Descripción de los análisis fisicoquímicos para el vino	22

3.3.1.1 Determinación de taninos condensados totales mediante precipitación con metilcelulosa	22
3.3.1.3 Índice de Fenoles totales	24
3.3.1.4 Medición de color	24
3.3.1.5 Análisis de antocianinas	25
3.4 Análisis estadístico	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1 Concentración de proteínas en el agente clarificante	26
4.2 Efectos del agente clarificante sobre el vino	26
4.3 Análisis de compuestos fenólicos	27
4.4 Análisis de taninos totales	30
4.5 Características cromáticas de los vinos	31
5. CONCLUSIONES	34
6. BIBLIOGRAFÍA	35

1. INTRODUCCIÓN

Las características organolépticas de un vino son el resultado de la combinación de una serie de sustancias químicas tales como ácidos orgánicos, alcoholes, azúcares, compuestos fenólicos, y compuestos aromáticos, entre otros. Estas generan estímulos sensoriales que viajan como señales por el sistema nervioso, percibidas e interpretadas por el cerebro (Hernández, 2000). De este listado, los compuestos fenólicos son algunos de los más relevantes (García-Beneytez et al., 2002), por cuanto aportan al color, amargor y astringencia de los vinos (Ribereau-Gayon et al., 2003). Más específicamente, las antocianinas son las principales moléculas que determinan el color de los vinos tintos (Gordillo et al., 2019), mientras que los taninos y otros fenoles monoméricos contribuyen a la astringencia y amargor (Quijada-Morin et al., 2014). Por todo lo anterior, resulta de gran importancia controlar y regular la composición fenólica de los vinos durante su elaboración.

Una vez terminada la fermentación alcohólica, es habitual que los vinos se sometan a procesos de clarificación y estabilización para eliminar componentes inestables, disminuir la turbidez y macromoléculas formadas durante la maceración y fermentación; y al mismo tiempo, reducir el eventual exceso de astringencia o amargor de los vinos. Lo anterior, permite asegurar una adecuada conservación de la calidad y características sensoriales del producto (Vernhet, 2019).

Durante la clarificación del vino, se añaden sustancias exógenas que arrastran otras partículas en suspensión por floculación o adsorción. Para la clarificación fenólica, normalmente se utilizan sustancias de origen animal como la gelatina, caseína y la albúmina de huevo (Tschiersch et al., 2010). Sin embargo, debido al creciente problema de las reacciones alérgicas a los alimentos (ej. la potencial alergenicidad de las proteínas de la leche) y la creciente existencia de consumidores vegetarianos estrictos o veganos,

es que se han desarrollado alternativas al uso de proteínas de origen animal mediante el uso de proteínas de origen vegetal (Gambuti et al., 2016).

Los principales beneficios de los clarificantes de origen proteico son aumentar la limpidez y filtrabilidad del vino mejorando su claridad, la estabilidad de color y modular la percepción de la sensación en boca, eliminando o reduciendo algunos compuestos fenólicos de naturaleza coloidal implicados en procesos de oxidación o agresivos a las sensaciones gustativas (Marangon et al., 2019).

Según la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2011): Utilizar agentes clarificantes procedentes de material de uva, vino o levadura es una opción interesante pues no se introducen sustancias extrañas al vino, se reduce la probabilidad de causar reacciones alérgicas, y no se requiere declaración de etiqueta. Es por eso que los investigadores están en búsqueda de clarificantes que estén hechos a base de material de uva.

En el trabajo de Vincenzi et al. (2013), se extrajo con éxito un material endógeno de semillas de uva (GSE) correspondiente a proteínas de la semilla de uva que permitió reducir la astringencia de vinos tintos. Por su parte, Gazzola et al. (2014), caracterizaron las proteínas de la semilla de uva donde demostraron que se debe utilizar el material del endospermo purificado debido a que la cubierta de la semilla contiene una alta cantidad de polifenoles, especialmente taninos, que pueden enlazarse y precipitar las proteínas eliminando así algunos componentes proteicos del extracto. No obstante, se necesitan más estudios para optimizar la eficacia de los extractos de semilla como clarificantes, sobre todo en relación a la pureza proteica del extracto, la dosis aplicada y el tiempo de contacto con el vino.

1.1 Hipótesis

Los extractos de proteínas de semillas de uva son efectivos para la reducción del contenido fenólico de vinos tintos.

1.2 Objetivo General

Determinar el efecto clarificante de dos concentraciones de extractos proteicos de semillas de uvas del cultivar *Syrah* en dos tiempos de contacto en la composición fenólica de un vino *Cabernet Sauvignon*.

1.3 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de los compuestos fenólicos (fenoles totales, taninos totales, antocianinas totales) en vino tratado con extracto proteico de semillas de uva.
- Analizar las características cromáticas (luminosidad, coordenada rojo/verde, coordenada amarillo/azul, intensidad, tonalidad) del vino tratado con extracto proteico de semillas de uva.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importancia del vino

El vino tiene un papel económico, cultural, religioso y vinculado al placer que han sido importantes en el desarrollo de la vida occidental (Hernández, 2000). A nivel cultural la actividad vitivinícola pasó de producir artesanalmente, a ser una importante industria a fines del siglo XIX, siendo fuente de inspiración para escritores, cantores y otros artistas nacionales, siendo parte de la cultura chilena y de su patrimonio. Según Claudio Gay (S.F): “Los terroir de Chile son admirables para el cultivo de viñas, ya sea por su naturaleza o por la forma de anfiteatro que presentan sus colinas”. En Chile el proceso de modernización capitalista y la expansión de la economía chilena vinculada a la apertura del comercio del norte atlántico trajo una radical transformación en la industria vitivinícola chilena, invirtiendo en maquinarias, técnicos, importación de cepas, sistemas de transporte y construcciones de bodegas subterráneas, floreciendo la actividad económica desde el año 1880 hasta el día de hoy siendo reconocida internacionalmente por su inconfundible sello y calidad (Biblioteca Nacional de Chile, S.F).

2.2 Producción de vino a nivel mundial y en Chile

A nivel mundial el vino tiene un rol económico de grandes dimensiones con una producción mundial de alrededor de 260 Mill hL, de los cuales al año 2019 se estimó un consumo global de 244 Mill. hL. Por su parte, Chile produce 12 Mill. hL y el consumo aparente es de 2.4 Mill. hL, el cual registró un aumento del 4,6% comparado al año anterior, en el cual el consumo aparente fue de 2,3 Mill. hL. La suma de las exportaciones de todos los países ha aumentado tanto en volumen estimado 105,8 Mil. hL. (+1,7%) como en valor con 31800 Mill. EUR (+0,9%) en relación al año 2018 (OIV, 2020).

Los principales exportadores de vinos a destacar son Italia, España y Francia, que juntos exportaron 57,1 Mill. hL, los cuales representan el 54% del mercado mundial, y en

valor, el año 2019 representaron 9800 Mill. EUR, 6400 Mill.EUR y 2700 Mill. EUR. Estos 3 países representan el 60% del valor total de vinos exportados en 2019. Chile exportó 9,8 Mill. hL en el año 2021, lo que en valor representa 1,9 Mill. EUR. En relación al año 2020 Chile aumentó su exportación en un +2.9% y experimentó un incremento en valor respecto al mismo año en un +8% (Flaño, 2022).

Los principales importadores en términos de volumen en 2019 fueron Alemania, Reino Unido y EE.UU que importaron 40,4 Mill. hL alcanzando así un 38% del total mundial y en valor representan un 39 % del valor total de las importaciones mundiales de vino alcanzando los 11900 Mill. EUR. Respecto a Chile los principales importadores de vinos son China, importador con 63.841 miles de litros, seguido por Brasil 67.682 miles de litros, Reino Unido 53.417 miles de litros y Japón 41.647 miles de litros. Los países importadores de vinos chilenos mencionados han aumentado su participación en el mercado alrededor de un 11% focalizando su importación en vinos con denominación de origen (Flaño, 2022).

2.3 Características y defectos organolépticos

Los vinos, para mantener su calidad y valorización dada por la especificidad de las diferentes vendimias y las condiciones del medio (terruño), deben pasar por tratamientos y estabilizaciones que eviten, prevengan y disminuyan las consecuencias de los defectos organolépticos (Ribereau-Gayon et al., 2003). Los estímulos provenientes de las características organolépticas que viajan como señales desde los ojos, la nariz y la boca a través del sistema nervioso permiten al consumidor encontrar la aceptación o el rechazo del producto (Hernandez, 2000). La sensación organoléptica global reposa en un equilibrio armonioso entre las sensaciones positivas como el cuerpo, constitución, estructura, lo graso, y las negativas como el amargor, la dureza, la astringencia y lo magro, las cuales están directamente ligadas a las diferentes moléculas presentes en el vino, su naturaleza y concentración. Antocianinas y taninos son los involucrados en la sensación organoléptica, los cuales reaccionan con las glicoproteínas de la saliva (mucina) y las proteínas de la pared bucal (Ribereau-Gayon et al.,2003). Según la naturaleza de los taninos y la concentración, las consecuencias pueden ser una sensación

armoniosa y fundida o por el contrario una agresividad revelada creando la sensación de amargor o astringencia (Scollary et al., 2012), sin embargo esta sensación se ve afectada por macromoléculas o agregados que pueden producir turbidez y precipitación, afectando la estabilidad y armonía en la sensación de boca o la percepción aromática (Scollary et al.,2012; Villamor y Ross, 2013; Diako et al., 2016 citado por Vernhet., 2018).

Las desviaciones organolépticas menores, borran la fineza de los aromas frutados, introduciendo cierta uniformidad y manifestando la sensación de pesadez, provocando un enmascaramiento olfativo, lo cual puede ser de origen químico (oxidaciones, reducciones, contactos con ciertos materiales) o de procesos microbiológicos (Ribereau-Gayon et al.,2003).

Existen numerosos procedimientos más o menos empíricos para disminuir los gustos desagradables y los malos olores (Ribereau-Gayon et al., 2003). Estas técnicas de conservación han permitido evitar los defectos correspondientes, pero en la actualidad estas presentan menor interés y las legislaciones se han vuelto mucho más exigentes con respecto a ello. Algunos de los compuestos utilizados y que podrían seguir siendo usados en la actualidad son: Carbón Adsorbente (a base de animales o carbón vegetal), leche y aceites. Estos compuestos son empleados en tratamientos y procedimientos que involucran a coloides presentes en el vino, debido a sus propiedades fisicoquímicas, están ligados a las condiciones de aumento de tamaño de partículas, produciendo su floculación y su sedimentación (Ribereau-Gayon et al., 2003).

2.4 Importancia y rol de los clarificantes en el vino

La clarificación consiste en introducir en un vino turbio una sustancia floculante, que sedimenta arrastrando otras partículas en suspensión. Este tratamiento implica interacciones fisicoquímicas entre el agente clarificante y los componentes del vino. Estas interacciones inducen una agregación, seguida de un aumento del tamaño de las partículas (floculación) que favorece su sedimentación. Los mecanismos exactos

involucrados en la clarificación no están claramente establecidos y probablemente sean diversos. Las partículas coloidales y suspendidas pueden quedar atrapadas en la red formada por las especies que interactúan y/o incluirse en los agregados debido a interacciones directas con el clarificante. También, pueden sedimentarse por arrastre simple (suspensiones no diluidas). Además de su efecto clarificador, los agentes de clarificación también se utilizan para eliminar sustancias del vino con el fin de mejorar el color, el sabor y/o la estabilidad. Esto implica interacciones fisicoquímicas específicas entre los clarificantes y algunos de los componentes del vino, y la eliminación de estos componentes. Así, en los vinos tintos, estos tratamientos se utilizan para clarificar, pero también para suavizar la agresividad/intensidad tánica y mejorar el paso por boca, o para estabilizar respecto a la precipitación de colorantes coloidales (Vernhet, 2018).

Los clarificantes permiten alcanzar la limpidez y el brillo del vino, los cuales entregan la primera impresión visual que impacta en la percepción de la calidad del vino. Las turbiedades y los sedimentos provocan impactos perjudiciales por lo cual los consumidores rechazan el producto. (Vernhet, 2018). Además, los clarificantes permiten estabilizar los vinos, para así conservar la limpidez en el tiempo y la ausencia de depósitos que resulta de la turbidez, garantizando el respeto de las cualidades gustativas del vino no perturbadas por partículas en suspensión o precipitados (Ribereau-Gayon et al., 2003).

En el mecanismo de clarificación destaca una etapa química y otra física. En la primera, se conduce a partículas esencialmente coloidales que permanecen en solución dispersas (ej. polisacáridos, polifenoles oligoméricos, poliméricos y proteínas) que se van agregando, siendo sensibles a las interacciones fisicoquímicas (Vernhet., 2018). Posteriormente, su asociación produce una floculación (2da etapa “física”), la cual tiene un efecto estabilizante eliminando partículas invisibles, pero inestables y al mismo tiempo clarificando y reaccionando con las partículas en suspensión disminuyendo el enturbiamiento (Ribereau-Gayon et al., 2003).

El tratamiento de estabilización y clarificación que se desee efectuar para conservar la limpidez y la prevención de alteraciones cualitativas del sabor o color debe ser eficiente

y selectivo, ya que puede impactar a la sensación y percepción organoléptica. Por aquello se debe tomar en cuenta el papel de los microorganismos presentes, cambios químicos susceptibles, interacciones, equilibrios y estabilidades fisicoquímicas coloidales (Scollary et al., 2012; Villamor y Ross, 2013; Diako et al., 2016). La clarificación y estabilización final, realizada durante las semanas previas al embotellado, debe ser entonces razonada en función del tipo y estilo del vino, así como de las especificaciones del mercado (Vernhet., 2018).

La turbidez de un vino o nivel de partículas sólidas suspendidas suele ser mayor en vinos tintos jóvenes, después de la fermentación estos poseen varios cientos de unidades de turbidez nefelométrica (NTU) la cual se evalúa a través de un nefelómetro. Para obtener vinos brillantes, estas unidades deben estar por debajo del orden de dos NTU (Vernhet, 2018)

Esta medida de turbidez ayuda a estabilizar el vino, otorgando un margen objetivo al cual los clarificantes deben llegar.

Cuando se trata de vinos tintos, los agentes de clarificación son principalmente las proteínas y el éxito del tratamiento depende en gran medida de sus interacciones fisicoquímicas con los polifenoles, especialmente los taninos, y los pigmentos polimerizados. Tradicionalmente se utilizaban gelatinas, clara de huevo o albúmina de huevo. Sin embargo, en los últimos 20 años, la crisis de la encefalopatía espongiforme bovina y la potencial alergenicidad de las proteínas del huevo han desencadenado un interés creciente por otras proteínas no animales para la clarificación del vino (Marchal et al., 2002; Maury et al., 2003; Tolin et al., 2012; Gambuti et al., 2012 citado por Vernhet, 2018).

Se han estudiado nuevos agentes clarificantes, incluidas proteínas vegetales que ahora están disponibles y también extractos de proteínas de levadura. Todas estas proteínas presentan una amplia diversidad en términos de distribución de masa molecular, composición de aminoácidos y conformación en solución (conformación extendida y lineal versus globular), lo que afecta tanto sus propiedades fisicoquímicas como la accesibilidad de los polifenoles a los sitios de interacción. Estos parámetros modulan la

extensión y especificidad de sus interacciones con los polifenoles del vino y eventualmente con las partículas, y su efecto clarificante. Las interacciones y la clarificación también se ven fuertemente afectadas por la composición fenólica del vino, por su pH y fuerza iónica y por la presencia de co-solutos como, por ejemplo, los polisacáridos que interactúan a través de diferentes formas físico-químicas como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals o interacciones débiles (Soares et al., 2012; Maury et al., 2016). Por lo tanto, los tratamientos de clarificación siguen siendo bastante empíricos en la vinificación y se requieren ensayos de clarificación para definir la mejor ayuda y dosis de clarificación de acuerdo con los objetivos. Los tratamientos de “desfangado” (o desborre) y clarificación pueden verse obstaculizados en los vinos por la presencia de polisacáridos como las pectinas o los β -glucanos. En tales casos, los tratamientos enzimáticos a menudo permiten resolver el problema (Canal-Lalaubè res, 1993; Villettaz et al., 1984 citado por Vernhet, 2018).

2.5 Clarificantes y su legislación

Rizzi et al. (2016) expone la clarificación desde un punto legislativo definiendo la clarificación como un procedimiento de aplicación frecuente que permite la limpidez y estabilización del vino, evitando la precipitación coloidal y formación de precipitados (Yokotsuka et al., 1995; Marchal et al., 2002a), mejorando las características organolépticas del vino y revelando características ocultas (Maury et al. 2003), reduciendo el amargor y la astringencia (Yokotsuka et al., 1995). La permanencia de componentes no derivados de la uva, levadura u otras bacterias fermentadoras, como las proteínas residuales de la clarificación, puede representar un riesgo para los consumidores sensibles a la proteína utilizada. Además, este expone una mirada holística al uso de clarificantes tomando en cuenta la preferencia del consumidor desde sus hábitos o creencias religiosas. Los clarificantes pueden persistir hasta el producto final, así como otros residuos. La principal preocupación acerca de la presencia de proteínas residuales exógenas es la salud de los sujetos alérgicos, aunque también debe tomarse en consideración el credo religioso y otras prácticas de vida del consumidor (Rizzi et al., 2016).

Al agregarle sustancias adsorbentes/reactivas buscando estabilizar y clarificar un vino, reducir la concentración o eliminar algún compuesto indeseable, afectamos la composición organoléptica del vino mejorándolas al reducir la astringencia, mejorar el color y sabor (Yokotsuka et al.,1995; Marchal et al., 2002). En una buena práctica de vinificación se supone utilizar la menor cantidad de agente clarificante para lograr el resultado deseado y que no permanezca la sustancia. Sin embargo, los vinos comerciales actuales no están libres de residuos de agentes clarificantes proteicos (Rizzi et al., 2016).

Por ley, los clarificantes son considerados generalmente como “Coadyuvantes de procesamiento”, sustancias que se agregan a un alimento durante su procesamiento que debieran eliminarse antes de alcanzar la forma final del producto o se convierte en componente natural en el alimento sin afectar técnica o funcionalmente al alimento.

Basado en la norma de la Administración de Alimentos y Medicamentos del código de regulaciones federales (FDA) “21 CFR 101.100” citada por Rizzi et al.,2016, la definición de coadyuvante es:

“Sustancias que se agregan a un alimento durante el procesamiento de dicho alimento utilizadas por su efecto técnico o funcional que se eliminan de algún modo del alimento antes de envasarlo en su forma final o se convierten en constituyentes naturales del alimento u se encuentra en niveles insignificantes.”

Aquello, también, es respaldado por las Regulaciones de Etiquetado de Alimentos del Reino Unido (1996) agregando: “... y que pueda dar lugar a la presencia no intencionada pero técnicamente inevitable de residuos de la sustancia o sus derivados en el producto final, siempre que estos residuos no presenten ningún riesgo para la salud”. Ambas regulaciones indican una preocupación por la inevitable presencia de residuos de sustancias coadyuvantes que podrían ser perjudiciales para el consumidor. En este último caso, la concentración final del agente sería, por definición, despreciable; por tanto, no existiría un riesgo significativo para los consumidores de vino alérgicos a las proteínas, y su indicación en la etiqueta del producto no sería obligatoria

Debido a la gran heterogeneidad de origen y mecanismos de acción de los clarificantes estos derivan en algunos contratiempos legales y técnicos, por esto debe evaluarse las consecuencias de acción y el efecto eventual del remanente en la salud del consumidor, por esto la elección del clarificante debe ser idóneo (Rizzi et al., 2016), aunque estos son aditivos que están presentes en un alimento en niveles insignificantes (FDA 2013)

2.6 Alergenicidad, uso de proteínas exógenas en el vino y su legislación

Los alérgenos ocultos o trazas que se encuentren como desechos inadvertidos y no reconocidos en la etiqueta del producto pueden inducir una amplia variedad de reacciones de hipersensibilidad en la población sensible. Ciertas proteínas utilizadas como clarificantes sin embargo se encuentran bajo un umbral de percepción y bajas concentraciones (Taylor et al., 2000; Rizzi et al., 2016).

No obstante, en el estado actual de las legislaciones nacionales o internacionales no se requiere ninguna indicación en la etiqueta para este tipo de proteínas, pero se espera que también se tenga en cuenta la indicación de proteína vegetal en una etiqueta de vino y que sea obligatoria en el futuro. La norma actual consiste en el uso la advertencia “Puede contener” en los etiquetados siendo este voluntario y sin pautas para su uso; sin embargo, existe una particularidad para los coadyuvantes de huevo y leche que si deben ser etiquetados el umbral adoptado por la legislación de la Unión Europea es de 0,25 mg/l (Reglamento de Unión Europea, 2012), en Chile la legislación establece que se debe declarar en la etiqueta cuando el ingrediente, alimento o derivado sea causante de hipersensibilidad (alergenos alimentarios) según la resolución del ministerio de salud, la cual contempla cereales que contengan gluten, huevos y sus productos, leche y sus productos (Resolución N° 427 Lista de alérgenos alimentarios que deben rotularse.,2010). Durante el proceso de vinificación se utilizan estos como coadyuvantes por lo cual deben ser declarados en la etiqueta, sin embargo, no se menciona un umbral específico para ser declarado. (Decreto 78, Artículo 22., 1986)

Respecto a la legislación por alérgenos Rizzi et al., (2016) observa que la inclusión forzada en los etiquetados puede distraer u opacar la atención del consumidor afectando a la percepción del producto, sin embargo, la consideración de las prácticas o hábitos de vida del consumidor se toman cada vez más en consideración ya sea por salud o hábitos culturales.

La inclusión forzada de la declaración “Contiene proteínas de leche” en la etiqueta del vino puede perjudicar a la percepción del producto. Esta preocupación ha hecho que los enólogos busquen otros agentes clarificantes por ejemplo: Lupino, gluten, proteínas de guisantes, etc. o enzimas tecnológicas que podrían estar presentes en cantidades trazas en el vino lo cual podría ser perjudicial para la salud (Rizzi et al., 2016).

2.7 Proteínas utilizadas en la vinificación y posibles inconvenientes relacionados con su permanencia en los productos finales

Los clarificantes más utilizados en la industria son la albúmina (huevos), caseína (leche), gelatina, bentonita, ferrocianuro de potasio y polivinilpirrolidona. Cada uno de estos es utilizado con fines específicos, y no necesariamente dirigidos a la remoción del exceso de fenoles. (Marangon et al., 2019).

2.8 Clarificantes de origen animal

La gelatina animal se usa ampliamente como agente clarificante gracias a su capacidad para clarificar el vino tinto, para reducir la astringencia del vino y por su bajo costo (Yokotsuka et al. 1995). Esta clarificación se utiliza principalmente para suavizar los vinos tintos eliminando el exceso de taninos. La gelatina es una mezcla de péptidos y proteínas producida por hidrólisis parcial de colágeno extraído de tejidos conectivos de animales. La primera preocupación provino de la explosión del caso de Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE), comúnmente conocida como Enfermedad de las vacas locas (Rizzi et al., 2016). El consumo de derivados de tejidos animales específicos se correlaciona con la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en humanos. Sin embargo, en la mayoría de las preparaciones de gelatina se derivan de pieles de cerdo, una fuente libre de BSE. Otro problema de la gelatina de “Ética alimentaria”

(Común con otros agentes clarificantes de origen animal como el pescado, el quitosano, la caseína y la albúmina de huevo) está relacionado con el respeto de los alimentos vegetarianos y Dieta vegana.

Las proteínas de la clara de huevo (albúmina) son un agente clarificante muy eficaz, utilizado durante mucho tiempo para clarificar los vinos tintos y todavía muy utilizado en la vinificación moderna, en particular estas son ideales para suavizar la astringencia del vino al unir y reducir el contenido de taninos, por lo que son más apropiadas para vinos con alto contenido de taninos o vinos con crianza en roble (Cosme et al., 2007). Los agregados resultantes son insolubles y pueden eliminarse mediante trasiego y/o filtración antes del embotellado o posterior maduración. Se ha informado que la prevalencia de alergia a las proteínas del huevo (particularmente a la ovoalbúmina) es de alrededor del 0,3% entre la población adulta (EFSA, 2011b).

Hasta donde se sabe, no se ha producido ningún caso de reacción alérgica tras el consumo de vino debido a la presencia de residuos de proteínas de clara de huevo (Restani et al., 2014). Moneret-Vautrinand Kanny (2004) informó que el 18% de las personas alérgicas al huevo pueden reaccionar a una concentración igual o inferior a 65 mg, mientras que el umbral para la clara de huevo capaz de desencadenar una reacción alérgica en el 1% de las personas sensibilizadas fue entre 1 y 2 mg.

La caseína de la leche es una fosfoproteína bien conocida que, en asociación con el sodio o el potasio, forma un flóculo que absorbe y precipita las partículas en suspensión. La caseína se utiliza principalmente como decolorante en los vinos blancos para reducir el pardeamiento resultante de la oxidación. También se recomienda para reducir el contenido de taninos en vinos blancos con exceso de roble (Weberet et al., 2007; Cosme et al., 2012). Las cuatro proteínas α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina (ambas proteínas de suero), α -caseína y β -caseína se consideran los principales alérgenos en la leche bovina (Shi et al., 2014), aunque la alergia a las proteínas de vaca en adultos es rara (EFSA 2011a), según Lamet et al., (2008) puede ser fatal.

2.9 Clarificantes de origen vegetal y nuevas tendencias

Las proteínas vegetales podrían utilizarse durante la clarificación como alternativa a las proteínas animales, especialmente las derivadas de leguminosas y trigo (Reglamento CE N° 2165, 2005b; FSANZ, 2004) mostraron una muy buena capacidad de clarificación (Maury et al. 2003; Cosme et al., 2012). Sin embargo, estas proteínas vegetales podrían representar un riesgo potencial para la salud de los sujetos alérgicos como la caseína y las proteínas de la albúmina de huevo. Las reacciones alérgicas provocadas por la ingestión de guisantes son comunes. El potencial alergénico de este cultivo aumenta debido a la reactividad cruzada, reacción alérgica a proteínas similares o que están biológicamente relacionadas, particularmente lentejas y garbanzos. Se han identificado dos alérgenos en las proteínas de los guisantes: vicilina y convicilina (Verma et al., 2013). Las proteínas de trigo están implicadas tanto en la alergia alimentaria como en la enfermedad celíaca, que se producen en personas sensibles después del consumo de productos de trigo (Hirschenhuber et al., 2006). Recientemente, se han propuesto otras proteínas vegetales como agentes clarificantes, como las zeínas de maíz (Simonato et al., 2009, 2013), patatina (Gambutì et al., 2012) y extractos de proteínas de quinoa (Pino-Ramos et al., 2022). El extracto de proteínas de quinoa (QP) contiene proteínas de almacenamiento globulinas 11S y albuminas (Brinegar y Goundan., 1993). QP ha demostrado disminuir la turbidez, taninos y otras medidas fenólicas de los vinos de manera similar a la proteína de papa y otros agentes clarificantes comerciales (Pino-Ramos et al., 2022).

Finalmente, el uso de proteínas de semilla de uva como agentes clarificantes del vino está cobrando gran interés, ya que su aplicación evitaría la introducción de proteínas exógenas (Vincenzi et al., 2013). La extracción de pequeñas cantidades de componentes de semillas de uva normalmente ocurre durante la vinificación, y la presencia de trazas de proteínas de semillas de uva se ha informado históricamente en el vino tinto (Yokotsuka et al., 1995). Desde este punto de vista, se consideran componentes “normales” o “endógenos” de la bebida sin problemas alergológicos o de ética alimentaria. Otras proteínas utilizadas en la elaboración del vino son las enzimas. La FDA, la Oficina de Comercio e Impuestos sobre el Alcohol y el Tabaco y la

Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) aprobaron preparaciones enzimáticas para la vinificación, para favorecer la clarificación y filtración (pectinasas, xilanasas, glucanasas, proteasas) y/o para la liberación de aromas varietales (glicosidasas). Estos preparados se venden como mezclas de enzimas, con más de una función (Guérin et al. 2009), pero no se especifica su composición exacta en la hoja de datos. Es bien sabido que se obtienen preparados de enzimas ricos en pectinasa de *Aspergillus* sp., y se utilizan comúnmente en la elaboración de vino tinto (Ducasse et al., 2010). Algunos casos de alergia oral a enzimas fúngicas (incluso si se refieren a la elaboración de pan) se describen en literatura (Baur et al., 1994).

2.10 Clarificante de semillas de uva

Las semillas de uva contienen un porcentaje de proteínas entre 7,7 y 15,4% (EL-Aal., 1992), el cual, también, puede variar dependiendo del tiempo de extracción que se encuentre este en la solución (Gazzola et al., 2017). Además, se identificó una globulina de alto peso molecular 60 kDa que contiene péptidos de 19-21 kDa y 38-44 kDa unidos por puentes disulfuros los cuales también fueron identificados por (Gianazza et al., 1989). En el año 2010, Zhouet et al., identificaron una proteína similar a la globulina 11S con pesos moleculares de 25,5 y 40 kDa. Se ha observado en diferentes estudios anteriores que la composición de las proteínas de las semillas varía según la variedad (Pesavento et al., 2008).

Para obtener la proteína de la semilla de uva se debe desengrasar la semilla o separar la cubierta de la semilla del endospermo, la cual tiene un alto contenido de fibras, polifenoles y taninos pudiendo unirse y precipitar componentes proteicos demostrado en el trabajo de Gazzola et al., 2014. Las proteínas del endospermo de la uva han sido estudiadas con un procedimiento de fraccionamiento de Osborne modificado (Sogi et al., 2002) en el cual se encontraron albúmina 20-40%, globulinas 2.8-4.2%, prolaminas y glutelinas. En el material remanente se utilizó detergente SDS donde se extrajo una fracción proteica no disponible el cual representaba el 17,3% de la proteína total, quedando un 32 % de las proteínas del endospermo sin extraer, utilizar endospermos o

purificaciones de ellos facilita la extracción de proteínas (Gazzola et al., 2014). En este trabajo, además, se comprobó que los patrones de organización de las proteínas cambian cuando estas están en condiciones reductoras, viéndose afectado los enlaces disulfuros que enlazan diferentes polipéptidos y afectando las fracciones de albúmina y globulina de bajo peso molecular. El uso del detergente SDS facilitó romper interacciones no covalentes el cual destruye las interacciones involucradas en la estabilización de complejos de proteínas lo que indica su naturaleza no covalente.

En el trabajo de Gazzola et al., 2017 se comparó la composición proteica de 6 agentes clarificantes (semillas de uva, patatina, proteínas de guisantes, caseinato de K, albúmina de huevo y gelatina) en condiciones reductoras y no reductoras donde se volvió a identificar una banda de 65 kDa consistente con una proteína de almacenamiento de semilla de uva 11S (Gazzola et al., 2014) y se demostró además la fuerte complejación preexistente de proteínas y sustancias fenólicas que desfavorecen la extracción de proteínas (Vincenzi et al., 2013).

El extracto proteico de semillas de uva ha mostrado efectos positivos, reduciendo a la turbidez del vino, precipitando sustancias fenólicas y mejorando las propiedades sensoriales reduciendo las notas vegetales, la acidez y astringencia, demostrando ser un eficiente clarificante en altas y bajas concentraciones. Las concentraciones que surtieron efecto fueron de 5, 10 y 20 g/hL (Gazzola et al., 2017).

El uso de orujos (pieles de uva) purificadas también ha demostrado ser un clarificante eficiente (Jimenez-Martinez et al., 2017) demostró que una dosis de 6 mg/mL con un tiempo de contacto de 5 días es adecuado para disminuir la concentración de taninos del vino sin producir grandes cambios en las características de color.

Los extractos de proteínas de semillas de uva aún no están disponibles comercialmente, ya que deben ser aprobados por la OIV y los entes regulatorios de los países productores de vinos.

En consideración a los antecedentes anteriores, se plantearon los experimentos que se describen a continuación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Equipamiento, instrumental y reactivos químicos

- Equipamiento, instrumental y reactivos para el análisis de fenoles totales

Reactivo de Folin-Ciocalteu (2 mol/L), ácido gálico (1000 mg/L) bicarbonato de sodio anhidro (99.9%), tubos para micro centrifugación de 2 mL (modelo CFT-001-015, jet Biofil), agua destilada, lector de microplacas (Epoch, modelo 7201000), microplacas de espectrofotometría de 96 pocillos (Sigma-Aldrich, 781602).

- Equipamiento, instrumental y reactivos para el análisis de taninos condensados totales por el método de precipitación por metilcelulosa:

Metilcelulosa (peso molecular c. 63 000), sulfato de amonio (>99%), solución de catequina al 98% adquiridos en Sigma Aldrich (Santiago, Chile), centrifuga Eppendorf (Eppendorf, 5415 R), agua destilada, lector de placas para espectrofotometría (Epoch, 7201000), microplacas de espectrofotometría de 96 pocillos (Sigma-Aldrich, 781602), y tubos para micro centrifugación de 1,5 mL.

- Equipamiento, instrumental y reactivos para la medición de color

Agua destilada, tubos para micro centrifugación de 2 mL, lector de placas de espectrofotometría, microplaca de espectrofotometría de 96 pocillos.

- Reactivos para la determinación de antocianinas

Analizador Y15 para vinos (Biosystems, Talca, Chile), kit para medir antocianos del equipo Y15 con código 12831 adquirido de BioSystems (Santiago, Chile).

- Equipamiento, instrumental y reactivos para la extracción proteica

Ácido clorhídrico (HCl, 37%), hidróxido de sodio (NaOH 2N), N hexano 96%, centrifuga High speed centrifuge modelo TG1650-WS, estufa universal a convección (Memmert Uni 550), residuo del prensado de orujos de la variedad *Syrah*,

proporcionados por la bodega Lourdes de Viña Concha y Toro, Talca (Pencahue, Chile), tubos conicos Falcon de 50 mL, multimixer (Ursus trotter ut-klot44p), filtró de PTF de 0,45 μm , de 30 mm de diámetro (Jet Biofil).

3.2 Métodos

3.2.1 Metodología de extracción de proteínas de semillas de uva

3.2.1.1 Preparación y remoción de la fracción lipídica del extracto

El extracto de semillas de uvas se preparó a partir de 100 g de semillas provenientes de residuo del prensado de orujos de la variedad *Syrah*, proporcionados por la bodega Lourdes de Viña Concha y Toro, Talca (Pencahue, Chile). El residuo se secó en una estufa universal a convección a 60 °C por 12 h. Una vez que las semillas estuvieron secas y limpias, se molieron 100 g en una multimixer hasta obtener un polvo uniforme.

Se desengrasaron 97 g de harina de semillas con *n*-hexano al 10% (p/v) (60 mL) durante 24 h y la solución se filtró a través de papel filtro Whatman dejando un extracto con peso de 85,3 g con pH 4,7 (adaptado de Gazzola et al., 2014)

3.2.1.2 Solubilización alcalina con precipitación isoelectrica (adaptada de Gazzola et al., 2017)

La harina de orujos se suspendió en agua al 10% (p/v) y se ajustó el pH a 10,5 con NaOH 2N. La suspensión se agitó y se llevó posteriormente a centrifugar a 12000 rpm por 15 min utilizando tubos cónicos Falcon de 50 mL. Se recolectó la fase líquida y se acidificó a pH 3,0 con 6 mol/L de HCl. El material precipitado con ácido se recuperó por centrifugación a 12000 rpm durante 15 min, a temperatura ambiente. Esta solución contenía aproximadamente 15% (p/v) de materia seca que equivalía a 18,7 gramos de 85,3 gramos desengrasados, la cual fue almacenada a -17 °C.

3.2.1.3 Caracterización de las proteínas

El contenido de proteína fue determinado utilizando un determinador de nitrógeno de carbono LECO TruSpec CN (LECO, St. Joseph, MI, EE.UU) por el método de Dumas. Dicho método consiste en determinar el contenido de una matriz orgánica combustionando una muestra a una alta temperatura, resultando nitrógeno molecular medido por conductividad térmica y determinado con un factor de conversión de nitrógeno a proteína de 5,53 (Zhou et al., 2011).

3.2.2 Experimento de clarificación: Evaluación de la acción del clarificante

La forma de evaluar la efectividad del clarificante fue a través de su aplicación a un vino joven *Cabernet Sauvignon*. La dosis máxima permitida por la Organización internacional de la vid y vino (OIV), en el código internacional de prácticas enológicas (OIV, 2016) dicta que no debe exceder los 50 g/hL en clarificantes de origen vegetal. Por ende, se evaluará las concentraciones de 50 y 30 g/hL, con dos tiempos de contacto entre el clarificante y el vino tratado (48 y 72 horas), en 45 mL de vino dispuesto en tubos Falcon de 50 mL y a temperatura ambiente.

3.3 Desarrollo experimental

El desarrollo experimental consistió en 4 tratamientos con 3 repeticiones: 2 concentraciones del extracto de semillas de uva de 30 y 50 gramos por hectólitro (g/hL) y 2 tiempos de contacto, de 48 y 72 horas. Se utilizó un control con 3 repeticiones que consiste en la muestra de vino *Cabernet Sauvignon* sin tratar, como se observa en la tabla 3.1. Finalizado los tratamientos estos fueron sometidos a las mediciones de taninos condensados totales por el método de metilcelulosa y polifenoles totales (flavonoides y no flavonoides) por el método Folin-Ciocalteu.

Tabla 3.1. Descripción de los tratamientos llevados a cabo y sus correspondientes abreviaciones.

<i>Tratamiento</i>	<i>Abreviaciones</i>	Descripción de los factores	
		Concentración	Tiempos (horas)
<i>Tratamiento 1</i>	T1	30 g/hL	48
<i>Tratamiento 2</i>	T2	50 g/hL	48
<i>Tratamiento 3</i>	T3	30 g/hL	72
<i>Tratamiento 4</i>	T4	50 g/hL	72

3.3.1 Descripción de los análisis fisicoquímicos para el vino

Llevada a cabo la clarificación del vino se analizaron algunos parámetros fisicoquímicos del vino: contenido de fenoles, contenido de antocianinas, taninos condensados totales y color. Estos análisis permitieron ver si existían diferencias entre el control y los tratamientos.

3.3.1.1 Determinación de taninos condensados totales mediante precipitación con metilcelulosa

Este método tiene como objetivo la medición de taninos totales, donde existe una interacción fisicoquímica entre el polímero metilcelulosa al 0,04% y los taninos condensados, causando precipitación favorecida por la centrifugación (Sarneckis et al., 2006). El polímero metilcelulosa al 0,04% tiene selectividad por los taninos condensados. Seguidamente se agrega agua destilada (Sarneckis et al., 2006). La muestra control no utiliza el reactivo, completando el volumen total con agua destilada. La lectura de estas muestras se realiza a 280 nm en un lector de microplacas (Biotek, epoch).

Luego de ser añadido un volumen de 25µl (microlitros) de vino a tubos eppendorf de 1500 µl junto a un volumen de 300 microlitros del polímero, se espera un tiempo de 2-3 minutos agitando suavemente. Se agrega un volumen de 200 µl de la sal sulfato de amonio y se completa el volumen del tubo eppendorf de la muestra con agua destilada. Se esperan 10 minutos antes de centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm. Cada tratamiento tiene 3 repeticiones. Finalmente se tomó el sobrenadante para ser puesto en microplaca para proceder a leer la absorbancia de la solución a 280 nm en el equipo EPOCH

Cálculos:

$$\text{Abs (taninos)} = \text{Prom (Abs control)} - \text{Prom (Abs de muestra)}$$

Abs = Absorbancia

Prom = Promedio

Seguido de la resta, este valor se interpola en la ecuación de la recta obtenida a través de la curva de calibración de catequina, finalizando con la multiplicación por el factor de dilución (FD:40) para obtener la concentración de taninos en mg/L.

Curva de calibración

Para la curva de calibración, se prepara una solución de catequina 98% (Sigma Aldrich) a una concentración de 1 mg/mL, con agua destilada y 10% de etanol absoluto, pues es uno de los flavan-3-oles más abundantes en el vino. Se preparan 5 disoluciones de la solución madre con diferentes concentraciones (0, 10, 25, 50, 100, 150, 200 mg/L) y se termina el análisis con la medición a 280 nm.

3.3.1.2 Determinación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

Este método se basa en la reducción química del reactivo de Folin (ácido fosfomolibdotúngstico) al reaccionar con los compuestos fenólicos. Visualmente esta reacción toma un color azulado debido a la oxido-reducción de metales. Así, cada placa con muestras de vino conteniendo diferente concentración de fenoles totales, tiene una intensidad de color diferente, la cual puede ser medida a una absorbancia de 765 nm (Biotek, epoch)

Para empezar, se debe realizar una dilución de la muestra (vino) 10 veces, es decir en un volumen de 1000 μ l, 100 corresponden a la muestra y 900 μ l al agua. De esta dilución se toman 20 μ l y se le agregan 1580 μ l de agua destilada, adicionando 100 μ l del reactivo Folin, se agita y se deja reposar 5 minutos. Se agregan 300 μ l de bicarbonato de sodio logrando así un espacio alcalino para que la reacción ocurra. Para finalizar se agita la muestra y se lleva a incubación por 30 minutos a 40°C. La lectura es a 765 nm en la microplaca, tomando 300 μ l de la muestra incubada. Posteriormente se interpola el resultado en una curva de calibración de ácido gálico y se multiplica por el factor de dilución.

Curva de calibración

Para analizar los resultados del Folin-Ciocalteu se requiere una solución de ácido gálico con 10% de etanol (0,5 gramos del ácido gálico seco en 10 mL etanol aforado a 100 mL con agua destilada). De esta solución se preparan disoluciones a diferentes concentraciones (0, 50, 100, 150, 250 mg/L). Se repiten los pasos del procedimiento anterior reemplazando el vino por diferentes concentraciones de ácido gálico.

3.3.1.3 Índice de Fenoles totales

La medición de este índice se hace a través de absorbancia a 280 nanómetros utilizando el espectrofotómetro de microplacas EPOCH, Biotek. La muestra de vino se diluyó en una proporción 1:50.

3.3.1.4 Medición de color

La medición de color en el vino se hace a través de los parámetros de CIELAB los que proporciona un espacio de color que es más perceptivamente lineal (un cambio en la cantidad de un valor de un color es proporcional a un cambio de la misma importancia visual). Los parámetros CIELAB se calcularon a partir de los espectros de absorción de las muestras utilizando el software MSCV (Universidad de Rioja, España), por lo cual es necesaria la dilución para obtener lecturas acertadas. Las mediciones de absorbancia a 450, 520, 570 y 630 nm utilizan una dilución 1:10 utilizando el espectrofotómetro de microplacas EPOCH, Biotek.

CIELAB= modelo cromático usado normalmente para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano, desarrollado con este propósito por la *Commission Internationale d'Eclairage* (Comisión Internacional de la Iluminación).

Lab= Son 3 parámetros L^* , a^* , b^* que representan: la luminosidad de color (L^*), coordenada entre rojo y verde (a^*) y la coordenada entre amarillos y azul (b^*).

L^* = representa una escala de 0-100 donde 100 indica blanco y 0 negro.

a*= valores negativos indican cercanía al verde y valores positivos indican cercanía al rojo.

b*= valores negativos indican cercanía al azul y valores positivos indican cercanía al amarillo.

Software MSCV= programa para Windows que calcula las coordenadas de color de vinos y brandies utilizando solo 4 valores de absorbancia.

3.3.1.5 Análisis de antocianinas

La medición de antocianinas es determinada por absorbancia a 520 nm en el equipo Y15. Este determina las antocianinas ionizables y ionizadas presentes en la muestra. Para la muestra se utilizó el kit para mediar antocianos del equipo Y15 con código 12831 adquirido de BioSystems (Santiago, Chile).

3.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software “Statgraphics Centurion 19.1.2” con el cual se realizaron análisis de varianza factorial, ANOVA factorial, para buscar diferencias significativas entre las varianzas de los tratamientos para cada factor (tiempo y concentración) y su interacción. Además, se realizaron comparaciones múltiples con Tukey para observar las diferencias entre tratamientos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Concentración de proteínas en el agente clarificante

El uso de la extracción alcalina para el proceso de extracción de proteínas de semillas de uva dio una concentración de alrededor de un 50% de proteínas, según el análisis de nitrógeno (factor de conversión de nitrógeno total 5.53). Esto corresponde a un valor similar a las extracciones previas realizadas por otros autores, utilizando materia prima equivalente (Vincenzi et al., 2013; Gazzola et al., 2017). Se considera además la naturaleza de las semillas de uva que contienen un alto contenido de polifenoles en el revestimiento de la semilla, que podrían interactuar con las proteínas de almacenamiento homólogas a la globulina 11S y 7S (Gazzola et al., 2014, 2017), debido a la interacción hidrófoba y la formación de enlaces de hidrógeno que se generan a distancias cortas (Vernhet, 2018).

4.2 Efectos del agente clarificante sobre el vino

En la tabla 1 se muestran los resultados de la clarificación con el extracto de semillas de uva. Se realizó un análisis ANOVA Factorial para observar los efectos del clarificantes según los factores concentración, tiempo e interacción entre ambos factores.

Tabla 1. Contenido de taninos, fenoles totales y antocianinas totales del vino *Cabernet Sauvignon* clarificado con extracto de proteínas de semillas de uva a concentraciones de 0, 30 y 50 g/hL a 48 y 72 horas.

Variables	Fenoles Totales mg/L	Taninos Totales mg/L	índice de Fenoles Totales	Antocianinas mg/L
Conc				
0	1746,33±59,02	1282,18 ± 99,70	34,68± 0,49	342,88 ± 2,61
30	1789,94± 52,79	1297,57 ± 133,77	33,46± 0,49	350,77 ± 2,38
50	1750,99± 52,79	1096,92 ± 89,18	34,09± 0,49	347,756 ± 2,38
Valor-P	0,825	0,3313	0,2573	0,1429
Tiempo				
48	1773,75± 43,10	1284,74 ± 78,65	35,55± 0,40 A	352,96 ± 1,88
72	1751,09± 46,55	1166,37 ± 98,59	32,6 ± 0,40 B	341,31 ± 2,13
Valor-P	0,7278	0,3754	0,0002*	0,0035*
CxT				
Valor P	0,5958	0,4036	0,2289	0,0208*
control	48H			341,21 ± 3,69 AB
T1	30 48H			360,2± 3,01 C
T2	50 48H			357,47 ± 3,01 B
control	72H			344,54± 3,69 ABC
T3	30 72H			341,34 ± 3,69 AB
T4	50 72H			338,04 ± 3,69 A

Resultados (Promedios ± Desv. Est.) expresados en mg/L. Conc: concentración; T: tiempo; CxT: Interacción CxT; Asteriscos (*) representan efectos simples o interacciones estadísticamente significativas con $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

4.3 Análisis de compuestos fenólicos

Los datos muestran variaciones significativas en el factor tiempo del índice de fenoles totales, y la interacción de las variables concentración y tiempo en antocianinas los cuales son descritos en los gráficos 1 y 2. No se observaron efectos significativos en las variables de fenoles y taninos totales

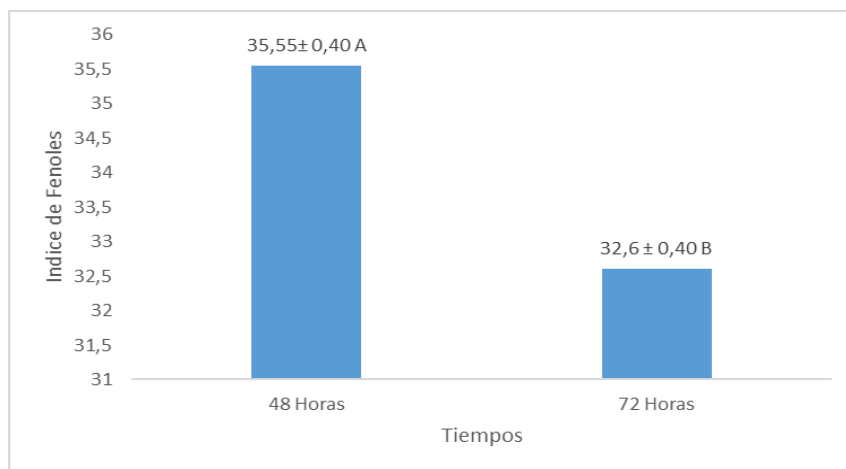


Figura 1. Índice de fenoles totales a 48 y 72 horas del vino *cabernet Sauvignon* clarificado con extracto de proteínas de semillas de uva a concentraciones de 30 y 50 g/hL.¹

En la figura 1 se muestra la variación del índice de fenoles de los tratamientos de 48 horas a 72 horas, ocurriendo una disminución significativa a través del tiempo en los tratamientos de 72 horas independiente este de la dosis, la disminución fue de un porcentaje del 8% en comparación al tiempo de 48 horas.

A la vista de estos resultados el extracto de semillas de uva podría afectar significativamente al índice de fenoles totales lo que concuerda con los resultados de Gazzolada, 2017, donde un aumento de la concentración del extracto como clarificante en los vinos no alteró el índice de fenoles y sí lo hizo el tiempo de exposición. En comparación con otros extractos de proteínas vegetales, Gordillo et al., 2020 obtuvo que el extracto de proteínas de guisante y papa presentan un resultado similar al extracto de proteínas de semillas de uva en la disminución de compuestos fenólicos.

No se encontraron diferencias significativas en fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu debido a la alta desviación estándar que presenta cada repetición, por lo cual no es posible determinar si hubo una influencia cuantitativa en esta variable.

¹ Resultados (Promedios ± Desv. Est.) expresados como número adimensional.

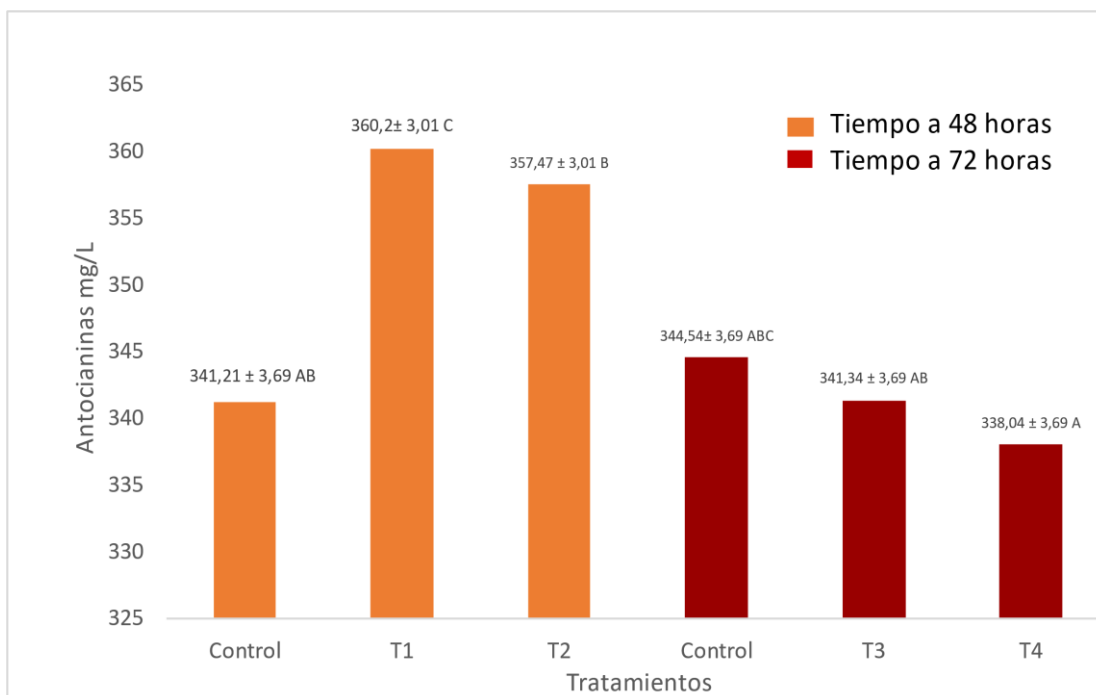


Figura 2. Contenido de antocianinas totales a 48 y 72 horas del vino *cabernet Sauvignon* clarificado con extracto de proteínas de semillas de uva a concentraciones de 30 y 50 g/hL. Resultados (Promedios \pm Desv. Est.) expresados en mg/L. códigos: T1, Tratamiento 30 g/hL a 48 Horas; T2, Tratamiento 50 g/hL a 48 Horas; T3, Tratamiento 30 g/hL a 72 Horas; T4, Tratamiento 50 g/hL a 72 Horas.

En la figura 2, se observa la variación en la concentración de antocianinas por la interacción del tiempo y concentración del extracto proteico de semillas de uva, se obtuvo un aumento y una leve reducción significativa de las antocianinas del vino, donde los tratamientos, T1 y T2 a 48 horas aumentaron su concentración de antocianinas en un 5% y los tratamientos T3 y T4 a 72 horas, disminuyeron su concentración de antocianinas en un porcentaje del 0,3%-2%. Este resultado concuerda con los estudios de Gordillo et al., 2021. Con relación a otro extracto de proteína vegetal como el de guisante, Segade et al., 2020, muestra una disminución de antocianinas significativa similar al obtenido por el extracto de proteínas de semillas de uva.

4.4 Análisis de taninos totales

En relación con los datos de taninos totales (Tabla 1), estos no se vieron afectados significativamente por la concentración, tiempo o interacción de ambos factores, lo cual podría deberse principalmente a la alta desviación estándar que presenta cada promedio cercano al 7%, por lo cual no es posible determinar si hubo una influencia cuantitativa en la concentración de taninos. En estudios previos Vicenzi et al., 2013, demostraron una disminución de la astringencia a través de una evaluación sensorial, pero no demostraron una disminución significativa en la disminución de taninos. Mientras que en el estudio de extractos proteico de origen vegetal de Jimenez-Martinez et al., 2019, se evaluó el uso de paredes celulares de orujos de uva, los cuales sí presentaban una disminución de taninos con relación al vino control.

4.5 Características cromáticas de los vinos

La tabla 2 muestra el efecto del tratamiento de clarificación sobre las características cromáticas (Promedios \pm Desv. Est.) del vino *Cabernet Sauvignon*. Los tratamientos afectaron significativamente la luminosidad y tonalidad, dos de los parámetros de CIELAB comparado al vino control.

Tabla 2. Parámetros colorimétricos del vino cabernet Sauvignon, clarificado con extracto de proteínas de semillas de uva a concentraciones de 30 y 50 g/hL a 48 y 72 horas.

Variables	L*	a*	b*	Ints	Ton
Conc					
0	17,38 \pm 0,18 A	47,54 \pm 0,23	27,42 \pm 0,35	7,67 \pm 0,17	0,61 \pm 0,002
30	17,72 \pm 0,18 AB	47,61 \pm 0,23	27,8 \pm 0,35	7,56 \pm 0,17	0,61 \pm 0,002
50	18,25 \pm 0,18 B	47,78 \pm 0,23	27,7 \pm 0,35	7,26 \pm 0,17	0,61 \pm 0,002
p-v	0,0183*	0,7562	0,7381	0,273	0,9166
Tiempo					
48	17,79 \pm 0,14	47,76 \pm 0,19	27,66 \pm 0,29	7,52 \pm 0,14	0,62 \pm 0,002A
72	17,78 \pm 0,14	47,53 \pm 0,19	27,62 \pm 0,29	7,47 \pm 0,14	0,61 \pm 0,002 B
p-v	0,952	0,403	0,9329	0,8386	0,0173*
CxT p-v	0,6855	0,1922	0,4154	0,6432	0,1759

Resultados (Promedios \pm Desv. Est.). Conc: concentración; CxT: Interacción C x T; L*: Luminosidad; a*: Coordenada rojo/verde; b*: Coordenada amarillo/Azul, Ints: Intensidad; Ton: tonalidad; Asteriscos (*) representan efectos simples o interacciones estadísticamente significativas con $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

La luminosidad es una propiedad de los colores que indica la apariencia luminosa del color, cuanto más claro el color, la luminosidad es más fuerte (Comisión Internacional de la Iluminación).

En el análisis estadístico los datos indican que la luminosidad aumento en uno de los dos tratamientos dependiendo de la concentración de extracto de proteína de semillas de uva a la que fue expuesto el vino, a una concentración de 30 g/hL no hubo un aumento y a una concentración de 50 g/hL hubo un aumento del 5% en relación con el control. Con respecto a la segunda variable afectada significativamente, hubo un efecto significativo

al comparar los tiempos de contacto del clarificante a 48 horas y 72 horas, aumentando la tonalidad a 48 horas en un 1,7% en relación a la de 72 horas, la que se mantuvo estable comparada al control, demostrando que el extracto proteico de semillas de uva tiene poca incidencia sobre el color de los vinos, como lo describió en sus resultados Gazzola et al., 2017. Con relación a otros extractos proteicos de origen vegetal, Gazzola et al., 2017; Gordillo et al., 2021, evalúan el uso de extractos proteicos de papa y guisantes en comparación al extracto proteico de semillas de uva. Sus resultados muestran que el mayor aumento de luminosidad fue obtenido por el extracto de proteína de papa, seguido por el de arvejas y el extracto de proteínas de semillas de uva. Respecto a la tonalidad, el mayor aumento lo tuvo el extracto de proteínas de semillas de uva, seguido por el extracto de proteínas de arvejas y papa.

Algunos efectos del extracto de proteínas de semillas de uva podrían deberse a la presencia de polifenoles coextraídos junto a las proteínas, los cuales provienen de la testa de las semillas. Unos de estos efectos podrían ser el aumento en la tonalidad y de las antocianinas a 48 horas y su caída a 72 horas, aquello podría deberse a la entrada de algunos polifenoles desde la semilla los cuales poco a poco a través del tiempo fueron formando coloides de mayor peso molecular junto a las proteínas del extracto de semillas y antocianinas del vino a través de diversas interacciones entre macromoléculas y partículas. Lo anterior es explicado por los autores Vernhet, 2018; Marangon, 2019; Gordillo et al., 2021 indicando que este podría deberse a la interacción fisicoquímica que se desarrollan entre macromoléculas y partículas las cuales están separadas por pocos nanómetros, teniendo un potencial de interacción relacionado a las interacciones de van der Waals, electrostáticas e hidrofóbicas/hidrofílicas polar, por lo cual se infiere que la disminución de las concentraciones de antocianinas es resultado del extracto de proteínas de semillas de uva y que este afecta tanto en su concentración como en el tiempo de aplicación.

En el caso del aumento de la luminosidad estos resultados se asemejan a los obtenidos por Gordillo et al., 2021 donde el aumento de luminosidad fue del 3% quienes demuestran que los clarificantes poseen selectividad para eliminar compuestos y

familias de antocianos específicos, influyendo en el contenido global de pigmentos de los vinos y proporción de antocianos individuales.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos de este estudio, la aplicación de extractos de proteínas de semillas en un vino *Cabernet Sauvignon* generó cambios estadísticamente significativos, disminuyendo la composición fenólica medida por índice de fenoles a través de absorbancia a 280 nanómetros, antocianinas y aumentando la luminosidad, pero no se distinguieron diferencias significativas en taninos totales y fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Se observaron cambios sobre la composición de los vinos bajo las condiciones descritas, sin embargo, se necesita más investigación con el fin de confirmar los resultados y seguir optimizando las dosis y tiempos de tratamientos para diferentes vinos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agricultura, M. de. (1986, 23 octubre). dto 78 (23-oct-1986) M. de Agricultura | Ley Chile. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. www.bcn.cl/leychile.

<https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=8815>

Baur X., Sander I., Jansen A., Czuppon A.B. (1994): Can amylases involved in bakery production be regarded as allergens? *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 124: 846–851.

Biblioteca Nacional de Chile. (s. f.). La cultura del vino en Chile. Memoria Chilena. Recuperado 1 de junio de 2022, de <http://www.memoriachilena.gob.cl/602/w3-article-3511.html#>.

Brinegar C and Goundan S, Isolation and characterization of chenopo-din, the 11S seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). *J Agric Food Chem*41:182–185 (1993).

Cáceres Mella, A. (2014). FLAVANOLES DE BAYAS Y VINOS Y LA INFLUENCIA DE FACTORES ENOLÓGICOS SOBRE SUS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y SENSORIALES. Tesis Doctorales en Xarxa. <https://www.tesisenred.net/handle/10803/128920?locale-attribute=es>.

Canal-Lalauberes, R.-M., 1993. Enzymes in winemaking. In: GH, F. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publisher, Switzerland.

Cosme F., Capao I., Filipe-Ribeiro L., Bennett R.N., Mendes Faia A. (2012): Evaluating potential alternatives to potassium caseinate for white wine fining: Effects on physicochemical and sensory characteristics. *LWT-Food Science and Technology*, 46: 382–387.

Diako, C., McMahon, K., Mattinson, S., Evans, M., Ross, C., 2016. Alcohol, tannins, and mannoprotein and their interactions influence the sensory properties of selected commercial merlot wines: a preliminary study. *J. Food Sci.* 81

Ducasse M.A., Canal-Llauberes R.M., de Lumley M., Williams P., Souquet J.M., Fulcrand H., Doco T., Cheynier V. (2010): Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry*, 118: 369–376.

EFSA (2011a): Scientific Opinion related to a notification from the International Organisation of Vine and Wine (OIV) on casein/caseinate/milk products to be used in the manufacture of wine as clarification processing aids pursuant to Article 6, paragraph 11 of Directive 2000/13/EC – for permanent exemption from labelling. *EFSA Journal*, 9: 2384.

EFSA (2011b): Scientific Opinion related to a notification from the International Organisation of Vine and Wine (OIV) on ovalbumin/egg white to be used in the manufacture of wine as clarification processing aids pursuant to Article 6, paragraph 11 of Directive 2000/13/EC – for permanent exemption from labelling. *EFSA Journal*, 9: 2385.

El-Aal, M.H.A. (1992) Factors affecting production of a near-white protein isolate from grape seed. *Die Nahrung* 2, 112–118.

European Commission (2007) Commission Directive 2007/68/EC of 27 November 2007 amending Annex IIIa to Directive 2001/13/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain food ingredients. *Official Journal of the European Union* L310,11–14

FDA (2013): Code of Federal Regulations, 21 CFR 101.100. Chapter I – Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services., Part 101 – Food Labeling.

Flaño A. 2022. Boletín del vino: producción, precios y comercio exterior avance a diciembre 2021. Santiago, Chile, ODEPA.

FSANZ (2004): Final assessment report. Application A482. Plant proteins as wine processing aids. Food Standards Australia, New Zealand.

Gazzola, D., Vincenzi, S., Gastaldon, L., Tolin, S., Pasini, G., and Curioni, A. (2014) The proteins of the grape (*Vitis vinifera* L.) Seed endosperm: fractionation and identification of the major components. *Food Chemistry* 155:132–139.

Gazzola, D., Vincenzi, S., Marangon, M., Pasini, G., and Curioni, A. (2017). Grape seed extract: the first protein-based fining agent endogenous to grapes. *Australian Journal of Grape and Wine*: 215–225.

Gambutì, A., Rinaldi, A., Romano, R., Manzo, N., and Moio, L. (2016). Performance of a protein extracted from potatoes for fining of white musts. *Food Chemistry* 190: 237–243.

Guérin L., Sutter D.H., Demois A., Chereau M., Trandafir G. (2009): Determination of activity profiles of the main commercial enzyme preparations used in winemaking.

Hernández A. 2000. Introducción al vino de Chile Elementos de Fisiología Sensorial. 2da edición Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile, 121 P.

Jiménez-Martínez, M. D., Bautista-Ortín, A. B., Gil-Muñoz, R., & Gómez-Plaza, E. (2019). Fining with purified grape pomace. Effect of dose, contact time and varietal origin on the final wine phenolic composition. *Food Chemistry*, 271, 570–576.

Marangon, M., Vincenzi, S., y Curioni, A. (2019). Wine fining with plant proteins. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 11).

Marchal, R., Marchal-Delahaut, L., Lallement, A., Jeandet, P., 2002. Wheat gluten used as a clarifying agent of red wines. *J. Agric. Food. Chem.* 50, 177-184

Maury, C., Sarni-Manchado, P., Lefebvre, S., Cheynier, V., Moutounet, M., 2003. Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 140-145

Maury, C., Sarni-Manchado, P., Poinsaut, P., Cheynier, V., Moutounet, M., 2016. Influence of polysaccharides and glycerol on proanthocyanidin precipitation by protein fining agents. *Food Hydrocolloids* 60, 598-605

Moneret-Vautrin D.A., Kanny G. (2004): Update on thresh-old doses of food allergens: Implications for patients and the food industry. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 4: 215–219

LECO Corporation, TruSpec CN Carbon Nitrogen Determinator Instruction Manual, version 2.5x. LECO Corporation, St Joseph, MN (2011).

Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2011). OENO resolution 417/2011. Fining using yeast protein extracts (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin: Paris, France) Availableonline: <http://www.oiv.int/public/medias/3490/e-code-ii-3214.pdf>

OIV (Organización Internacional de la Viña). 2020. Actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial 2019. OIV.

OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin).2014. OENO resolution 520-2014. Code of good fining practices for wine to be applied in the use of proteinaceous wine fining agents with allergenic potential (casein and egg white) (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin: Paris, France) Available online: <http://www.oiv.int/public/medias/1645/oiv-oeno-secsan-520-2014-en.pdf>

Quijada-Morín, N., W. Pascale y Rivas,G, J y D., Thierry y Escribano, T. (2014). Polyphenolic, polysaccharide, and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chemistry*. 154. 44-51.

Resolución No 427 - Lista de alérgenos alimentarios que deben rotularse, conforme al artículo 107, letra h del Reglamento sanitario de los alimentos. | UNEP Law and Environment Assistance Platform. (2010, 14 junio). <https://leap.unep.org/countries/cl/national-legislation/resolucion-no-427-lista-de-alergenos-alimentarios-que-deben>

Restani P., Uberti F., Tarantino C., Ballabio C., Gombac F., Bastiani E., Bolognini L., Pavanello F., Danzi R. (2014): Collaborative interlaboratory studies for the validation of ELISA methods for the detection of allergenic fining agents used in wine according to the criteria of OIV Resolution 427-2010 modified by OIV-Comex 502-2012. *Food Analytical Methods*, 7: 706–712.

Ribereau-Gayon, P; Glories, Y; Maujean, A; Dubourdieu, D./2003/Tratado de enología tomo 2 Química del vino estabilización y tratamientos.1ra edición. Buenos Aires, Argentina,Hemisferio Sur P. 228-229,287,344,350, 353,369 Figura 6.35.

Rizzi, C., Mainente, F., Pasini, G., Simonato, B., 2016. Hidden exogenous proteins in wine: Problems, methods of detection and related legislation - A review. *Czech Journal of Food Sciences* 34, 93-104

Sarneckis, C.J., Damberg R.G., Jones. P., Mercurio. M., Herderich, M.J., and Smith, P.A. (2006). Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimized tool for grape and wine analysis. The Australian Wine Research Institute.

Scollary, G.R., Pasti, G., Kallay, M., Blackman, J., Clark, A.C., 2012. Astringency response of red wines: potential role of molecular assembly. *Trends Food Sci. Technol.* 27, 25,36.

Segade, S. R., Paissoni, M. A., Vilanova, M., Gerbi, V., Rolle, L., and Giacosa, S. (2020). Phenolic composition influences the effectiveness of fining agents in vegan-friendly red wine production. *Molecules*, 25.

Soares, S., Mateus, N., de Freitas, V., 2012. Carbohydrates inhibit salivary proteins precipitation by condensed tannins. *J. Agric. Food. Chem.*60, 3966-3972.

Tschiersch, C., Nikfardjam, M. P., Schmidt, O., y Schwack, W. (2010). Degree of hydrolysis of some vegetable proteins used as fining agents and its influence on polyphenol removal from red wine. *European Food Research and Technology*, 231(1), 65–74.

Verma A.K., Kumar S., Das M., Dwivedi P.D. (2013): A comprehensive review of legume allergy. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 45: 30–46.

Vernhet, A. (2018). Red Wine Clarification and Stabilization. In *Red Wine Technology* 1ra edición, enology, Montpellier, France (pp. 237–251).

Vincenzi, S., Dinnella, C., Recchia, A., Monteleone, E., Gazzola., D.Pasini, G. and Curioni, A. (2013). Grape seed proteins: a new fining agent for astringency reduction in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine*:153–160.

Villamor R.R., Ross C.F., Wine matrix compounds affect perception of wine aromas. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 1-20

Villettaz, J.-C., Steiner, D., Trogus, H., 1984. The use of a beta glucanase as an enzyme in wine clarification and filtration. *Am. J. Enol. Vitic.* 35,253-256

Weber P., Steinhart H., Paschke A. (2007): Investigation of the allergenic potential of wines fined with various proteino-genic fining agents by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3127–3133

Zhou, T., Zhang, T., Liu, W., y Zhao, G. Physicochemical characteristics and functional properties of grape (*Vitis vinifera L.*) seeds protein. (2011). *International Journal of Food Science and Technology*, 46, pp. 635-641.