



INFORME FINAL PROYECTOS FIC GOBIERNO REGIONAL DE ATACAMA

DATOS DEL PROYECTO

- Nombre del proyecto: Mejoramiento Tecnológico del proceso fermentativo del vino pajarete de la Región de Atacama, para aumentar su competitividad.
- Ejecutor: Universidad de Santiago de Chile
- Encargado Proyecto: María Angélica Ganga

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DEL PROYECTO

El vino pajarete (D.O.), vino dulce elaborado con uvas de la III región, representa un rubro tradicional y con un importante crecimiento en los últimos años, fruto de la ejecución de un plan de fomento para este rubro. Esto ha permitido a los productores comercializar legalmente su producto, aumentar el volumen de producción, y mejorar el precio de venta. Las brechas trabajadas hasta el momento han sido el diseñar y transferir un paquete tecnológico que ha permitido producir un vino que da cumplimiento a la ley que lo rige (denominación de origen) y por otro lado, aumentar el volumen de producción de este vino mediante la transferencia de esta tecnología a nuevos beneficiarios. Sin embargo, el conocimiento microbiológico en cada uno de los procesos de elaboración del vino no ha sido trabajado, ni mucho menos explotado la microbiota nativa que pueda haber presente en el territorio.

En el proceso de la elaboración de vino pajarete existen variables tecnológicas que no cuentan con manejos técnicos adecuados y que hoy en día se trabajan en base a protocolos generales establecidos en la literatura. Es necesario identificar cuáles son las variables que podrían potenciar la calidad final del vino pajarete y darle un valor agregado al producto.

Las variables que serán abordadas en este proyecto para mejorar la calidad y darle valor agregado al vino pajarete son las siguientes: Control microbiológico e inoculación de levaduras nativas.

Ambas variables se consideran de gran importancia y es por esto que este proyecto propone generar información que sirva de base para controlar microbiológicamente los pasos fermentativos asociados a la producción de pajarete. Esta información consiste en determinar tanto **la carga y como la composición microbiana (levaduras y bacterias) durante el proceso de producción de pajarete, para luego lograr la caracterización de propiedades de los microorganismos relacionadas con las estrategias de control de los mismos (tolerancia a metabisulfito, etc.)**. Esta información base permitirá establecer las bases para el manejo microbiológico en el proceso.

El objetivo general de este proyecto es Mejorar el proceso tecnológico del vino pajarete de la región de atacama, mediante el control microbiológico del proceso lo que permitirá aumentar su calidad y competitividad a mercados nacionales e internacionales.

Para llevar a cabo el objetivo general es que se plantearon tres objetivos específicos:

- Desarrollo de protocolos para la estabilización microbiológica en el proceso de fermentación del vino pajarete.
- Identificar y desarrollar levaduras nativas de la Región de Atacama para la elaboración de vino pajarete.
- Desarrollar y difundir un paquete tecnológico para el proceso de fermentación del vino pajarete de la región de Atacama

RESUMEN DE ACTIVIDADES Y RESULTADOS

Actividades realizadas o en ejecución en el período

Nombre	Objetivos	Resultados
1. Selección de productores de pajarete para ensayos microbiológicos	Seleccionar a productores de vino pajarete para llevar a cabo los ensayos microbiológicos.	Se seleccionaron 5 productores de vino pajarete que aplican tecnología. Además se seleccionó 3 productores que no aplicaban tecnología
2. Elaboración de protocolos de vinificación 2012	Estandarizar el proceso de vinificación de vino pajarete.	Protocolo terminado.
3. Asistencia Técnica a productores de vino pajarete 2012	Asistir a los productores de vino pajarete en el proceso de vinificación.	Vinos temporada 2012.
4. Aislamiento, caracterización y selección de levaduras de la zona del Huasco	Aislar levaduras de la zona del Huasco. Caracterizar biológica y molecularmente los aislados obtenidos. Seleccionar mediante parámetros tecnológicos aquellas levaduras con potencial enológico.	Set de levaduras seleccionadas caracterizadas molecularmente Identificación del origen de nativo de las levaduras aisladas de la zona del Huasco. Selección de al menos 4 cepas de levaduras con potencial tecnológico y organoléptico. Selecciona de 1 levadura que fue ensayada en la vendimia 2013 (Anexo I)
5. Ensayos elaborados tanto a nivel de laboratorio	Se llevó a cabo una vinificación en los laboratorio de la Usach con un volumen de 3,5 L por fermentador, usando las 3 levaduras nativas seleccionadas (por triplicado); y como control la levadura comercial EC1118.	Una vez llevada a cabo la selección, se realizaron fermentaciones a nivel de laboratorio en mosto sintético y mosto natural (Anexo I). La fermentación fue seguida mediante el consumo de azúcar, y producción de alcohol. En el caso de la fermentación en mostro natural, en febrero 2013 se traslado un replica de cada ensayo a la zona de Huasco para que fueran degustado los vinos por los propios productores. Se propusieron 3 cepas de levadura nativas que fueron utilizadas en fermentación en 3,5L de mosto natural La fermentación fue seguida al igual como lo indicado anteriormente. Luego se realizó un panel de cata con los productores de pajarete llevando como resultado se obtuvo que la levadura 1 sería la que ensayaría en la vendimia 2013 (Anexo I).

6. Ensayos en terreno con la levadura seleccionada de la zona del Huasco. Vinificación 2013 con levadura nativa	Primera producción de vino pajarete realizado con levadura nativa	Los productores quedaron muy satisfechos de los logros alcanzados, pues la levadura nativa obtuvo aspectos organolépticos y tecnológicos de gran interés. Primera producción de vino pajarete con levaduras nativas (Anexo I)
7. Confirmación de la contaminación de levaduras comerciales en los productores con tecnología	Aislamiento de microorganismos	Verificación que los productores con tecnología posee contaminación con levaduras comerciales, por ello, la levadura seleccionada se obtuvo desde productores totalmente artesanales (Anexo II)
8. Producción a nivel masivo (laboratorio) de levadura nativa	Obtener una mayor masa de levadura para su uso en la vendimia 2013	Se puso a punto el crecimiento de levaduras en un fermentador de 5 L de capacidad. Esto ha permitido obtener cantidad de levadura suficiente para realizar ensayos con los productores de pajarete (Anexo V)
9. Definición del carácter nativo de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas en el valle del Huasco	Determinación del carácter nativo	Mediante métodos moleculares se determinó el carácter nativo de las cepas de levaduras seleccionadas (Anexo III).
10. Confirmación de la predominancia de la levadura nativa en la producción de vino pajarete 2013	Definición de la predominancia de la levadura en la producción de vino pajarete 2013	Mediante métodos moleculares se definió la predominancia de las levaduras que fueron utilizados en la producción 2013 (Anexo IV)
11. Levadura nativa seleccionada	Obtención de cepas de levaduras de origen nativo para la elaboración de vino pajarete	Se logro tener una levadura nativa <i>Flumen auri</i> que durante la vendimia 2013 fue utilizada entregando aromas deseados por los productores de pajarete (Anexo I)
12. Cepario de levadura de la región del Huasco	Cepario de levaduras	Se tiene un set de al menos 40 cepas de levaduras <i>S. cerevisiae</i> estandarizadas y guardadas en LAMAP Usach, Además se guardaron levaduras no <i>Saccharomyces</i> .
13. Obtención de un protocolo para el control bacteriano	Protocolo	Con el fin que los productores de pajarete pudieran controlar la contaminación bacteriana se llevo a cabo un documento (Anexo VI) que fue entregado a los productores.
14. Apoyo técnico a Pajareteros del Huasco Alto y Alto del Carmen (Anexo VII)	Apoyar a los Pajareteros del Huasco Alto y Alto del Carmen en asistencia técnica	Lanzamiento Programa Iniciativa de Desarrollo de Mercado Charla técnica en uso de bomba enológica Ejecución de Proyecto Iniciativa de Desarrollo de Mercado 2013 “comercialización de pajarete” Adjudicación de proyecto FOSIS “Fortalecimiento de los Tratamientos PostFermentativos del Vino Pajarete para mejor su Calidad y conservación” Capacitación en análisis físico químico de vinos
15. Actividades de Difusión (Anexo VIII)	Difundir los resultados y actividades del proyecto	Se apoyo a los pajareteros en diferentes actividades donde presentaron su producto, ejemplo de ello son: - Presentación ante la Subdirectora de Corfo-Atacama - “vino de honor” en ceremonia de inauguración de salas en el CFT-UDA Copiapó

		<ul style="list-style-type: none"> - Participación en actividad “Como Huasco” con los productores de pajarete en una rueda de negocios en la Ciudad de Vallenar (SERCOTEC). - Degustación con profesionales de Corfo - Participación y apoyo a productores de pajarete en la “Atexpo” para hacer contacto con posibles clientes de empresas mineras - Organización de una degustación e vinos con periodista de la revista <i>Vitis Magazine</i>, Gonzalo Rojas. Apoyo a productores de pajarete en el Stand de la III Región a actividad de SERNATUR en el Parque Alberto Hurtado, Santiago. - XXXIV Congreso Nacional de Microbiología - ExpoMundo Rural 2013
16. Formación de capital humano	Incorporación de alumnos tesistas para desarrollar sus capacidad de trabajo, investigación e innovación en el apoyo de la producción de vino pajarete	<ul style="list-style-type: none"> - Se llevaron 3 tesis de pregrado durante el desarrollo de este proyecto 1) Gustavo Lorca “Mejoramiento tecnológico del proceso fermentativo del vino pajarete para aumentar su competitividad” Trabajo de tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología. Facultad de Ingeniería de la Universidad de Santiago de Chile. Obtención del título 28 de agosto de 2013. 2) Sandra Uribe “Selección de levaduras nativas para la producción de vino pajarete”. Trabajo de tesis para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Facultad Tecnológica de la Universidad de Santiago de Chile. Fecha de Examen Octubre 2013. 3) Hans Finklestein “Producción de biomasa de levadura para la elaboración de vino pajarete” Trabajo de tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología. Facultad de Ingeniería de la Universidad de Santiago de Chile. Fecha de Examen Diciembre 2013.

CONCLUSION GENERAL:

El desarrollo del proyecto ha permitido realizar un análisis de los microorganismos presentes durante la elaboración del vino pajarete de la zona del Huasco. Mediante ello, se desarrolló un manual microbiológico de la elaboración de vino pajarete que ha permitido mejorar la calidad general del producto. Este tipo de iniciativa ha permitido incorporar tecnología a un producto de tradición en la zona, con el fin de mejorar su producción manteniendo su esencia como producto de la región.

El estudio de la microbiota ha permitido además definir las potencialidades tecnológicas que poseen especialmente las levaduras de la zona, ya que el uso de levaduras nativas en la elaboración del vino pajarete ha hecho que éste vuelva a retomar sus cualidades sensoriales, sin disminuir aspectos de su elaboración, como es tiempo de fermentación. Estos resultados son promisorios para continuar con esta investigación de tal manera de poder obtener microorganismos propios de las zonas vitivinícolas que logren diferenciar el producto y ello con un impacto de posicionamiento en el mercado, lo cual permitirá abrir nuevas expectativas para los productores de la zona del Huasco.

ANEXO I

Análisis de microfermentación en mosto sintético.

Cinéticas de pérdida de CO₂: Utilizando mosto sintético se analizó la capacidad fermentativa cada una de las cepas nativas de *S. cerevisiae* seleccionadas. Como control se utilizaron las cepas comerciales EC1118 y Actiflor. El análisis estadístico (ANOVA) indicó con un 95% de confianza que, a excepción de la cepa nativa 7, no existen diferencias significativas en cinética fermentativa (Figura 1 y 2)

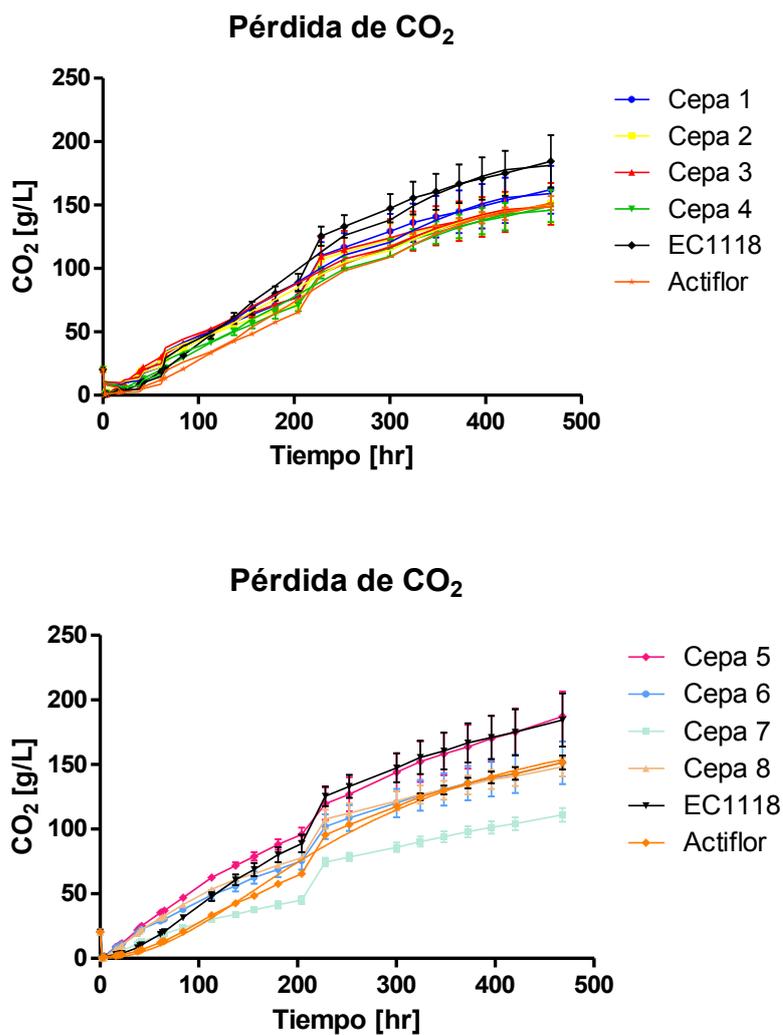
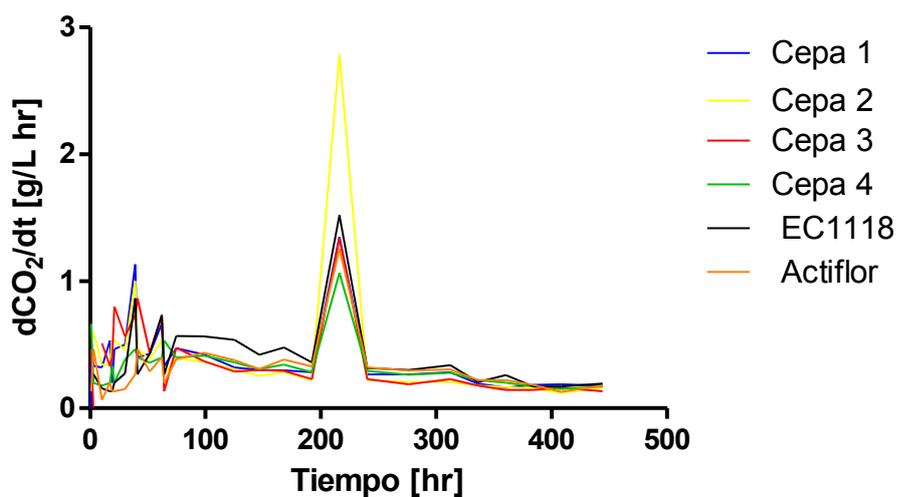


Figura 1. Cinética de pérdida de CO₂ de las cepas en estudio. a) Cepas 1 a 4. b) Cepas 5 a 8. En ambos se presentan las levaduras comerciales EC1118 y Actiflor.

Tasa de producción de CO₂



Tasa de producción de CO₂

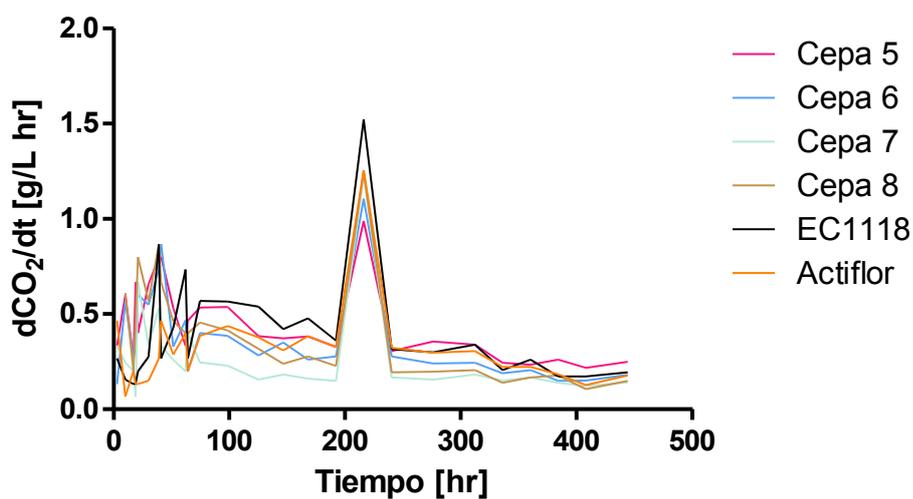


Figura 2. Propiedades cinéticas de las cepas en estudio correspondiente a la curva de la primera derivada de la pérdida de CO₂. a) Cepas 1 a 4. b) Cepas 5 a 8.

Una vez finalizadas las fermentaciones se llevó a cabo un análisis químicos de los vinos obtenidos La Tabla 1 muestra los resultados sobre la concentración de etanol, así como azúcares reductores

Tabla 1. Determinación de la concentración de etanol y azúcares residuales para cada cepa en estudio.

Cepas de levadura	Concentración de Etanol [%v/v]	Concentración de Azúcar residual [g/L]
1	10,57 ± 1,79 ^b	186,87 ± 4,70 ^c
2	11,40 ± 0,78 ^{bc}	185 ± 3,38 ^c
3	11,37 ± 1,56 ^{bc}	188,37 ± 7,95 ^c
4	10,57 ± 0,70 ^b	176,47 ± 1,99 ^{bc}
5	11,47 ± 1,56 ^{bc}	212,70 ± 12,38 ^d
6	9,97 ± 2,55 ^a	163,73 ± 27,93 ^b
7	6,83 ± 1,00 ^d	130,20 ± 4,61 ^a
8	10,40 ± 1,21 ^b	172,93 ± 10,91 ^{bc}
EC1118	13,57 ± 1,50 ^c	220,63 ± 11,65 ^d
Actiflor	12,33 ± 0,49 ^{bc}	216,87 ± 2,17 ^d

Valores dentro de una columna con letras similar no poseen diferencias significativas Test LSD ($p > 0.05$).

Una vez analizado los resultados mostrados en la Tabla 1, se seleccionaron aquellas cepas capaces de alcanzar niveles de etanol cercanos a 14 % v/v y niveles de azúcar residual que superen los [45 g/L].

De las 8 cepas en estudio, las cepas 2, 3, 5, 6 y 8, poseen una capacidad fermentativa similar a la de las cepas comerciales EC1118 y Actiflor generando un producto con niveles de etanol cercano al 14% y con niveles de azúcar residual por sobre los 45 g/L. A su vez estas cepas nativas son sensibles a la aplicación de SO₂ y resistentes a la toxina asesina de otras levaduras. Lo anterior permitirá cumplir con las normas de producción del vino Pajarete.

A) Análisis de microfermentación en mosto natural.

Durante este periodo se llevó a cabo microfermentación en un volumen de 15mL, con el fin de hacer una primera selección de levaduras. Estas fermentaciones se llevaron a cabo a 16°C por 21 días. Durante el periodo fermentativo se siguió ésta por la pérdida de CO₂ de la fermentación. Este seguimiento se observa en la Figura 3.

En la Figura 3 se observa que las cepas 5, 6, y 7 no presentan una curva de pérdida de CO₂ comparable a las levaduras comerciales EC1118 y Actiflor, evidenciando una menor capacidad fermentativa.

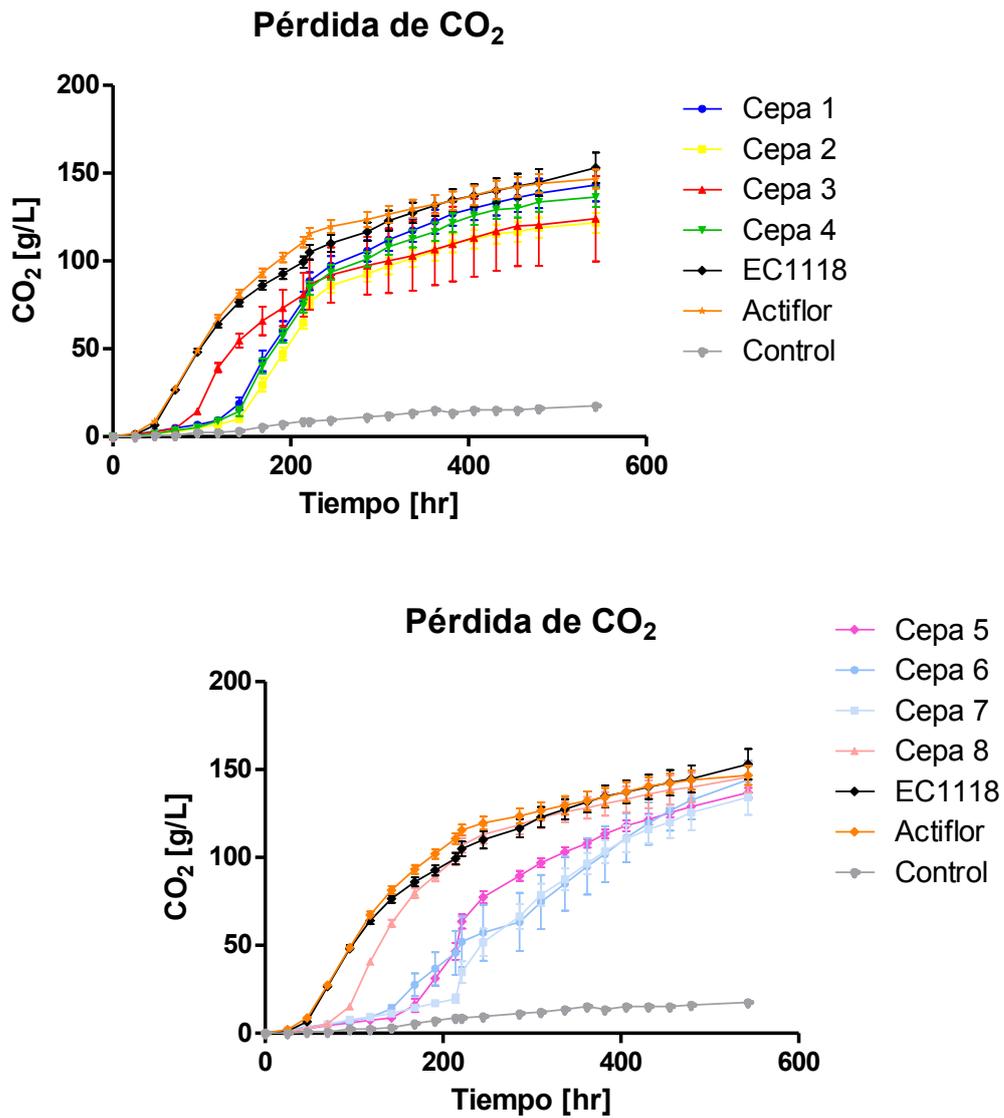


Figura 3. Cinética de pérdida de masa de las cepas en estudio. a) Cepas 1 a 4. b) Cepas 5 a 8. En ambos se presentan las levaduras comerciales EC1118 y Actiflor y el control negativo.

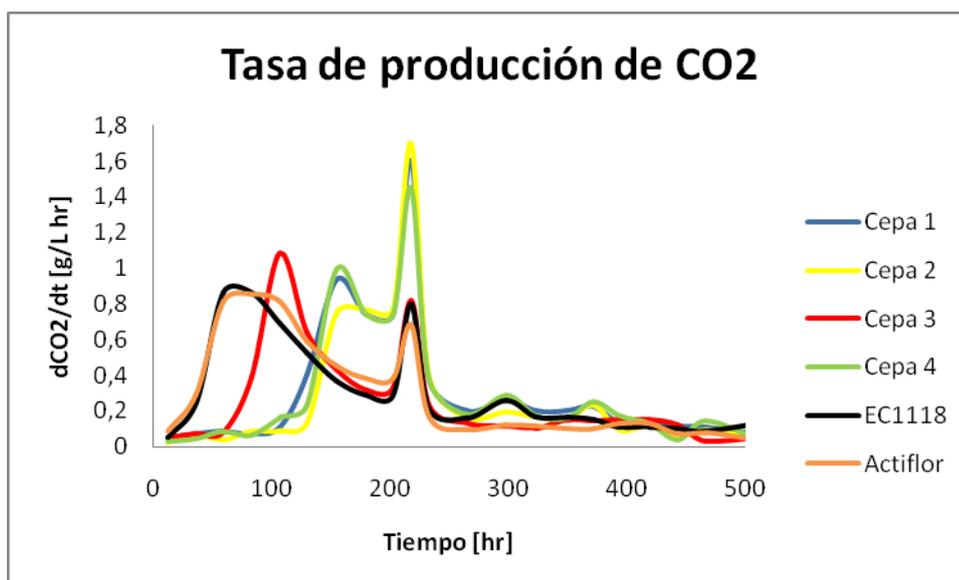
Por su parte la tabla 2 muestra la comparación estadísticas de las diferencias en relación a la velocidad máxima de velocidad obtenida en cada fermentación realizada.

Tabla 2 Valores de velocidad máxima de fermentación de cada ensayo. Mosto natural

Cepa de levadura ensayada	Velocidad de fermentación (perdida de CO ₂ /hora)
Control negativo (sin inoculación)	17,6 a
2	121,733bc
3	124,133bc
7	134,267bc
4	136,4bc
5	136,933bc
1	143,333bc
6	144,267bc
8	145,733bc
Actiflor	146,667bc
EC1118	153,067c

Números con diferentes letras en una columna difieren en un nivel de $p < 0.05$ (Test ANOVA)

Por su parte, la Figura 4 muestra las tasa de producción de CO₂ de las cepas ensayadas



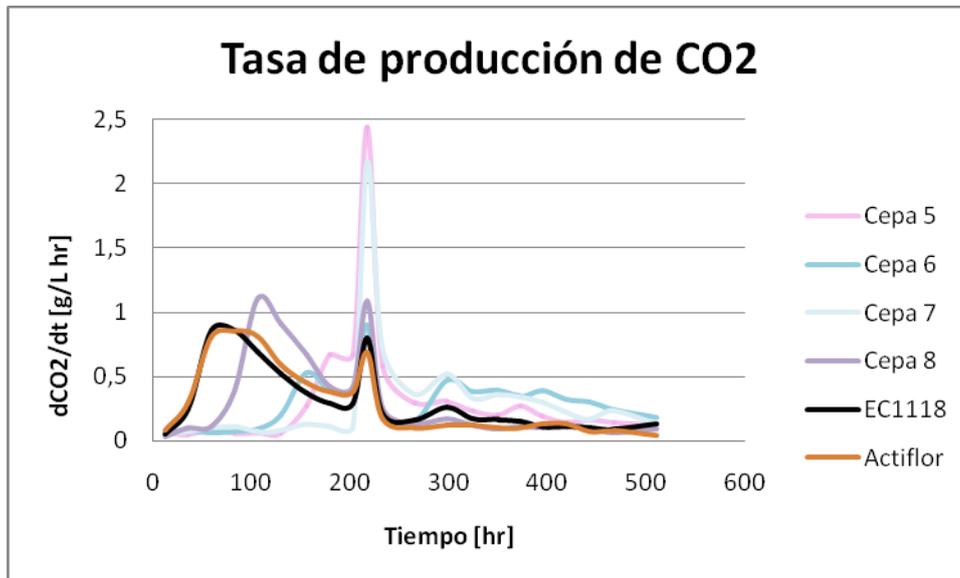


Figura 4. Propiedades cinéticas de las cepas en estudio correspondiente a la curva de la primera derivada de la pérdida de CO₂. a) Cepas 1 a 4. b) Cepas 5 a 8.

Según criterios estrictos de selección de levaduras autóctonas, según Bierzo-Boned y Suárez (1991), Navarra-de León y col (1994), indican que la mínima altura de la campana de gauss, producida entre el tercer y cuarto día de actividad fermentativa, debe ser la elegida. En este caso quienes cumplen con este criterio de selección son las cepas 3 y 8

B) Análisis comparativo de microfermentación en mosto natural y mosto sintético.

Luego de realizada la microvinificación se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos a los vinos obtenidos, tanto sintético como natural. La Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3 Parámetros enológicos de interés para elección de cepas nativas, concentración de azúcar residual y producción de etanol en mosto natural y sintético.

Cepa	Mosto sintético		Mosto natural	
	Azúcar residual [g/L]	Etanol %v/v	Azúcar residual [g/L]	Etanol %v/v
Cepa 1	186,87 ± 4,70 ^d	10,57 ± 1,79 ^c	194,27 ± 6,38 ^{bc}	14,07 ± 1,11 ^{cde}
Cepa 2	185 ± 3,38 ^d	11,40 ± 0,78 ^{cd}	182,5 ± 11,49 ^{bc}	13,67 ± 0,58 ^{bcd}
Cepa 3	188,37 ± 7,95 ^d	11,37 ± 1,56 ^{cd}	198 ± 3,72 ^{bcd}	13,87 ± 0,59 ^{cd}
Cepa 4	176,47 ± 1,99 ^{cd}	10,57 ± 0,70 ^c	199,9 ± 2,41 ^{cd}	14,3 ± 0,26 ^{de}
Cepa 5	212,70 ± 12,38 ^e	11,47 ± 1,56 ^{bcd}	194,23 ± 15,16 ^{bc}	14,27 ± 1,03 ^{de}
Cepa 6	163,73 ± 27,93 ^c	9,97 ± 2,55 ^c	192,83 ± 6,18 ^{bc}	12,87 ± 0,15 ^{bc}
Cepa 7	130,20 ± 4,61 ^b	6,83 ± 1,00 ^b	180,97 ± 25,39 ^b	12,43 ± 0,85 ^b
Cepa 8	172,93 ± 10,91 ^{cd}	10,40 ± 1,21 ^c	190,87 ± 2,2 ^{bc}	12,87 ± 0,75 ^{bc}
EC1118	220,63 ± 11,65 ^e	13,57 ± 1,50 ^d	215,03 ± 6,09 ^{de}	14,07 ± 0,89 ^{cde}
Actiflor	216,87 ± 2,17 ^e	12,33 ± 0,49 ^{bcd}	222,27 ± 5,12 ^e	15,3 ± 0,46 ^e
Control	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1,2 ^a

Se analizaron los datos por triplicado y los resultados corresponden al promedio. Valores con diferentes letras en una columna difieren en un nivel de $p < 0.05$ (Test ANOVA simple).

Los valores de azúcar residual están sobre los 45 g/L, por lo que se cumple con la característica de vino dulce en ambos casos, a pesar que en el test ANOVA se evidencien diferencias frente a las levaduras comerciales. Por otro lado, los valores de etanol indican que en mosto de laboratorio la cantidad producida es más baja en comparación con el mosto natural, en este último se observa que el porcentaje volumen/volumen se acerca o sobrepasa los 14 grados alcohólicos en las cepas nativas 1,2,3,4,5, esto indica que es posible encontrar potencial tecnológico en las cepas analizadas.

Para un análisis de comparación entre mostos de laboratorio y natural se utilizó la prueba estadística T de student, con el fin de dar validez a los parámetros que aporta el mosto sintético ratificando o no similitud con los valores del mosto natural. Para ello, primero se verificó que cada grupo de datos tuviese una distribución normal con un 95% de confianza. Una vez aplicada y determinada la normalidad, se realiza una prueba de hipótesis, en la cual se debe seguir un criterio en que los valores estadísticos P deben ser mayores a 0,05 para corroborar que las medias son iguales y en este caso identificar si existen diferencias significativas entre mosto sintético y natural como se muestra en la tabla 4

Tabla 4 Análisis comparativo de producción de CO₂, azúcar residual y etanol.

Parámetro	Valor P	Interpretación estadística
Producción de CO ₂ [g/L]	0,0249	Si existen diferencias significativas
Azúcar residual [g/L]	0,01	Si existen diferencias significativas
Producción de Etanol %v/v	0,0	Si existen diferencias significativas

Se realizó un análisis estadístico multivariado de coordenadas principales para variables cuantitativas (producción de CO₂, azúcar residual, y %v/v etanol) en medio sintético y natural (Figura 5). El propósito del análisis es obtener un número reducido de combinaciones lineales de las 6 variables de datos, arrojando 2 componentes estadísticos. En conjunto, se explica el 86,4% de la variabilidad de los datos originales. La figura 3 corresponde a una gráfica de componentes principales, la cual muestra la dispersión de cada cepa frente a los parámetros enológicos de interés para la selección de cepas. En el plano determinado por los componentes principales hay levaduras que se ubican muy alejados de los grupos que les corresponden por sus valores de fermentación, además están muy por debajo de los parámetros de cepas comerciales, las que son utilizadas como punto de comparación para la elección de cepas.

Tabla 5 de Pesos de los Componentes

	<i>Componente</i>	<i>Componente</i>
Parámetro	1	2
Azúcar residual N	0,480466	-0,14472
Azúcar residual S	0,494093	-0,107056
Etanol N	0,431545	-0,0321084
Etanol S	0,42027	0,423344
Producción CO2 N	0,196832	0,718302
Producción CO2 S	0,351318	-0,520948

N mosto natural, S mosto sintético

Tabla 6 Componentes Principales

	<i>Componente</i>	<i>Componente</i>
<i>Cepa</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
Cepa 1	0,155294	0,172319
Cepa 2	-0,252229	-2,41735
Cepa 3	-0,123036	-0,903441
Cepa 4	-0,0603425	0,173782
Cepa 5	1,21229	-1,02055
Cepa 6	-1,22207	0,611581
Cepa 7	-4,08734	0,796927
Cepa 8	-1,02264	0,654126
EC1118	2,77861	0,683579
Actiflor	2,62147	1,24903

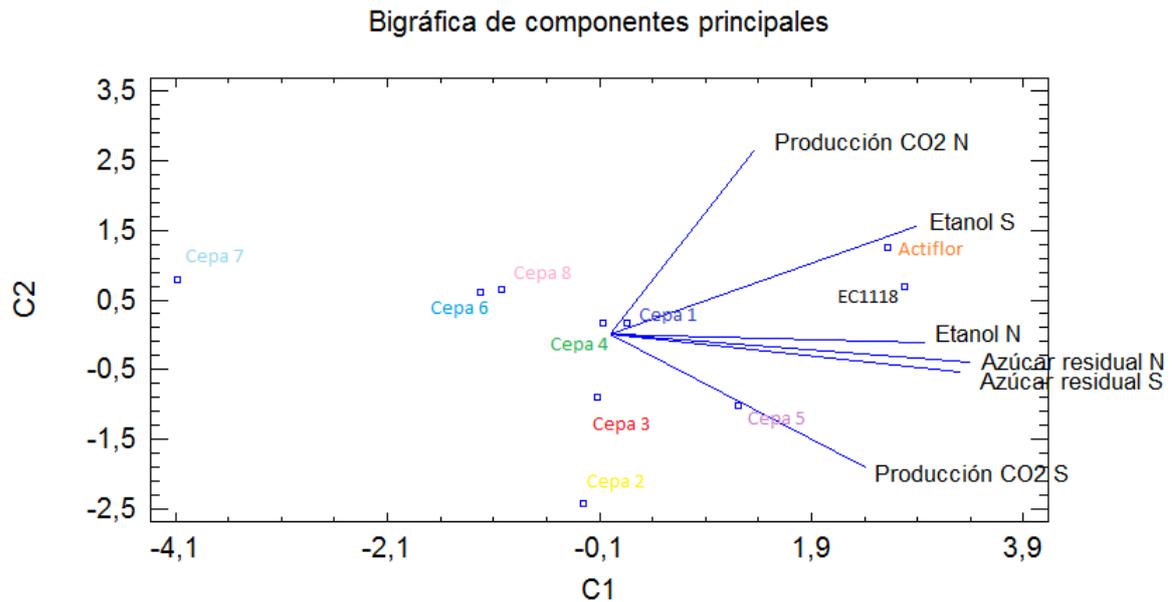


Figura 5. Componente principales

Proceso fermentativo:

Se llevó a cabo la fermentación en 12 reactores de 5 litros cada uno con 3,5 litros de mosto natural Moscatel de Alejandría (vendimia 2012) (Figura 6).

Cada fermentación fue inoculada con las cepas de levaduras seleccionadas anteriormente 1, 2 y 3. Como cepa control se utilizó la levadura comercial EC1118. Cada fermentación se realizó por triplicado inoculándola con una concentración celular de 1×10^6 cel/mL. Los reactores se dejaron fermentar a 18°C, inicialmente, y se realizó un seguimiento de la fermentación a través de la cuantificación de azúcares reductores, descenso de la densidad y la concentración celular en la fermentación. Luego de 16 días de evolución de la fermentación se optó por aumentar la temperatura de la cepa comercial a 25°C; mientras que las cepas 1, 2 y 3 se dejaron a 20°C. Sin embargo, se observó que en el caso de las cepas nativas la velocidad de fermentación disminuyó (Figura 7) optando dejar todas las fermentaciones a 25°C (día 19).



Figura 6. Contenedores en donde se llevaron a cabo las fermentaciones

- Seguimiento de la fermentación

a) Azúcares reductores

La concentración de azúcares reductores se determinó con la técnica de Nelson Somogyi (1952). La Tabla 7 y Figura 7 muestra la evolución de la fermentación hasta el día 21, puesto que hasta la fecha aun continúa la fermentación

Tabla 7 Concentración de azúcares reductores durante el proceso fermentativo

Días	Concentración azúcares reductores g/L			
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa EC1118
1	329±0	333±0	337±0	338±0
5	267±8	271±16	269±6	311±15
7	268±18	272±3	299±27	326±10
12	228±24	256±29	234±26	252±25
14	226±2	221±2	228±6	269±9
19	225±4	219±12	209±6	241±11
21	190±13	191±10	174±11	187±3

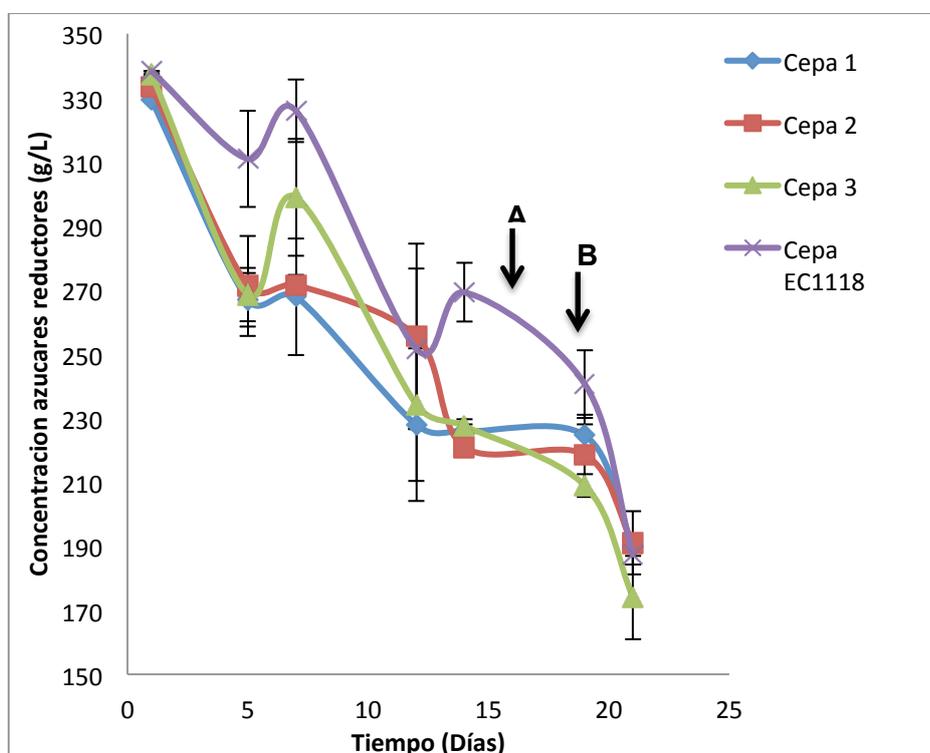


Figura 7 Evolución de los azúcares reductores en el proceso fermentativo **A:** Modificación de la temperatura de fermentación para la cepa EC1118 un aumento a 25 °C. **B:** Modificación de la temperatura de fermentación; para la cepa 1, cepa 2 y cepa 3 a 25°C.

b) Densidad

La Tabla 8 muestra la evolución de la densidad de la fermentación.

Tabla 8 Evolución de la densidad durante el proceso fermentativo

Días	Densidad g/mL			
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa EC1118
1	1,144±0	1,144±0	1,144±0	1,144±0
5	1,105±0,002	1,105±0,002	1,105±0,001	1,127±0,001
7	1,090±0,003	1,095±0,002	1,094±0,003	1,116±0,002
10	1,095±0,001	1,097±0,001	1,097±0,001	1,118±0,001
12	1,086±0,002	1,085±0,003	1,083±0,002	1,104±0,001
14	1,082±0,001	1,082±0,002	1,081±0,001	1,098±0,003
17	1,073±0	1,072±0,001	1,071±0,002	1,084±0
19	1,065±0,002	1,064±0	1,059±0,002	1,066±0,001

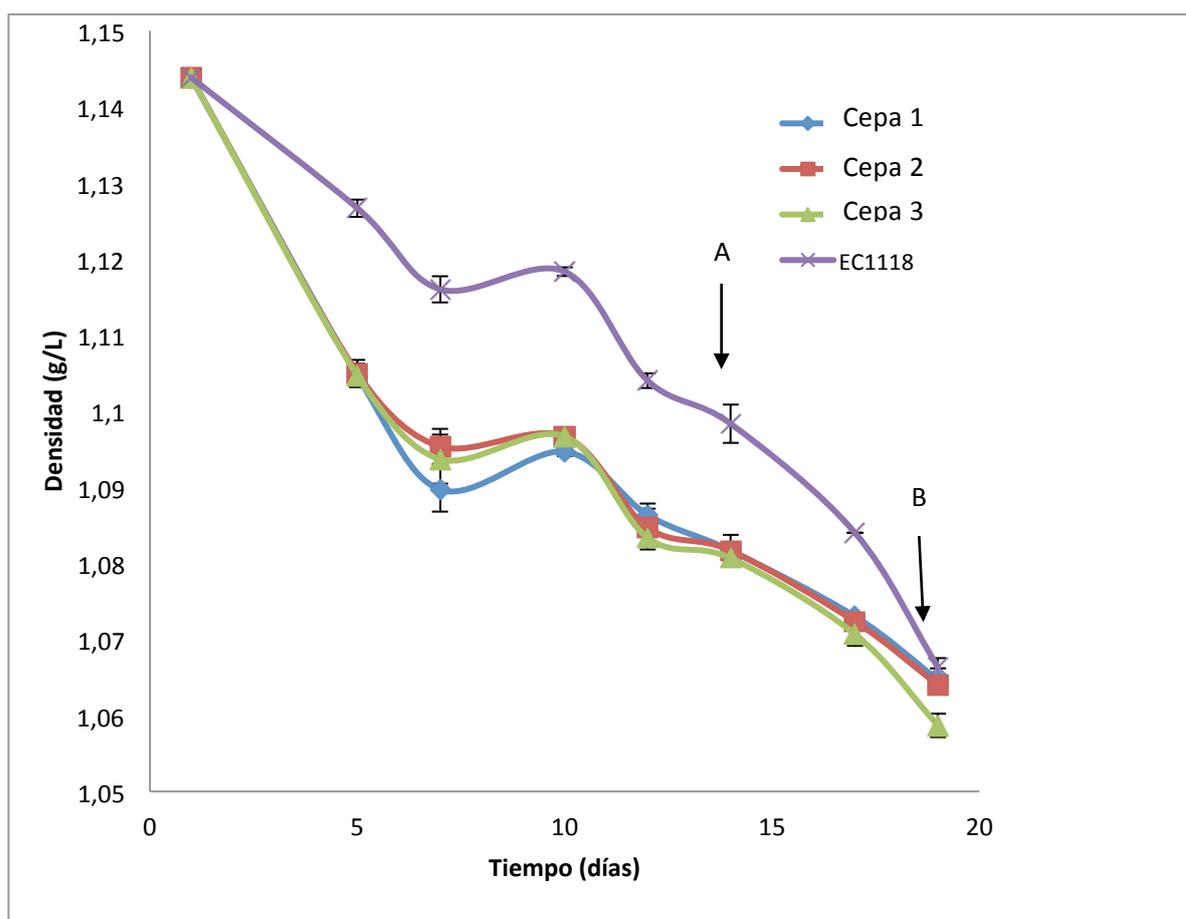


Figura 8 Evolución de la densidad del proceso fermentativo. Flechas A: cambio de temperatura de fermentación cepa comercial EC1118; B: cambio de temperatura de fermentación cepas nativas 1, 2 y 3

c) Concentración celular

Como otro parámetro de seguimiento de la fermentación se cuantificó la concentración de levaduras, mediante la metodología de microgota (Quezada, 2012). La Tabla 9 y Figura 9 muestran los resultados obtenidos hasta el día 17

Tabla 9 Población de levaduras durante el proceso fermentativo

Días	Concentración celular ufc/mL			
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa EC1118
1	3,5E+05 ± 0E+00	2,3E+05±0E+00	1,9E+05±0E+00	9,0E+04±0E+00
5	3,6E+07± 8E+06	2,1E+07±1E+06	1,4E+07±7E+06	1,0E+07±3E+06
7	6,9E+07±9E+06	7,5E+07±3E+07	4,3E+07±1E+07	1,0E+08±8E+07
10	6,5E+07±1E+06	6,4E+07±1E+07	4,3E+07±1E+07	2,1E+08±1E+08
12	6,7E+07±8E+06	4,3E+07±1E+07	3,6E+07±2E+07	2,2E+08±8E+07
14	3,6E+07±3E+06	4,1E+07±5E+06	2,6E+07±1E+07	1,4E+08±5E+07
17	4,6E+07±1E+07	4,3E+07±6E+06	4,6E+07±1E+07	2,5E+08±1E+08

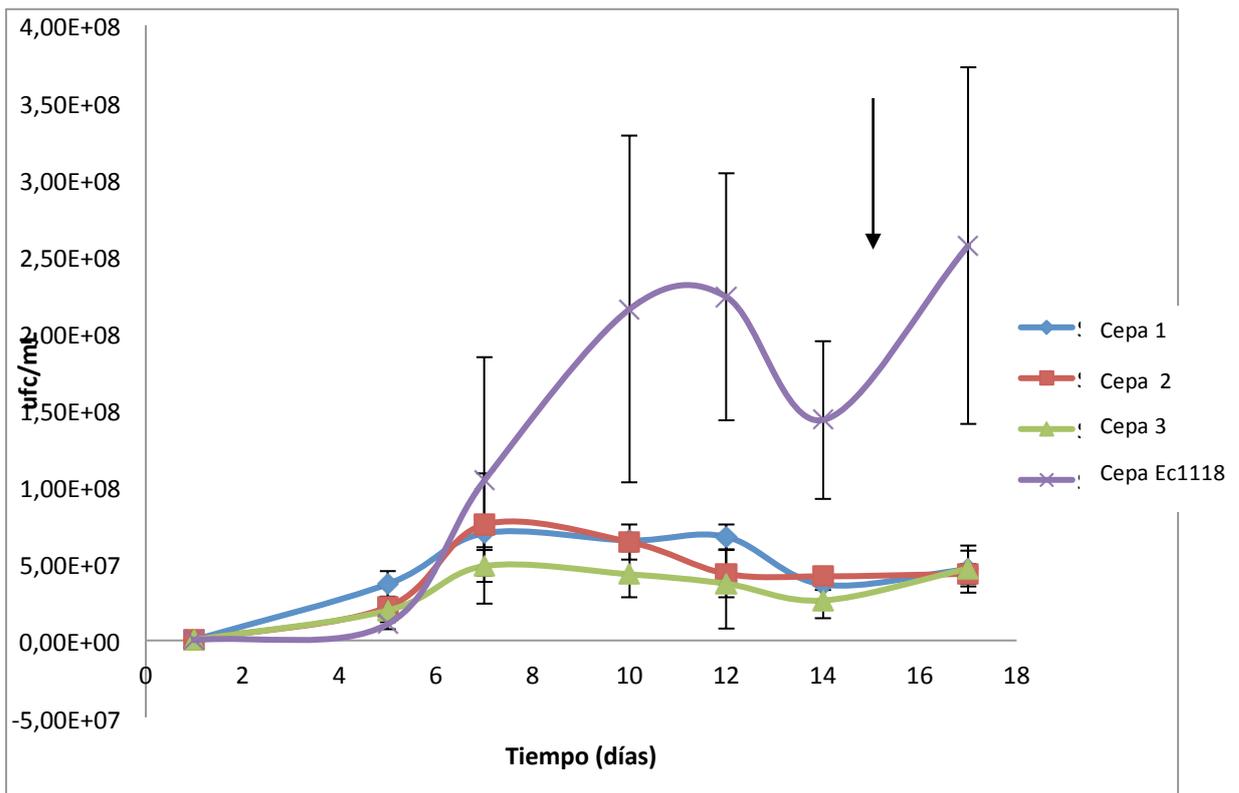


Figura 9 Evolución de la población de levaduras en el proceso fermentativo. La flecha indica el cambio de temperatura para la fermentación inoculada de la cepa comercial EC1118

Estas fermentaciones fueron evaluadas por los productores de pajarete (Figura 9)



Figura 9. Panel de degustación llevado a cabo por los productores de pajarete de la región del Huasco.

Referencias

Somogyi, (1952), Notes on sugar determination, *Journal of Biological Chemistry* **195**:19-23.

Quezada, E. (2012). Evaluación del uso de la cepa *Metschnikowia pulcherrima* L-1781 seca en la producción de compuestos volátiles en vino. Tesis para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Facultad Tecnología.

ANEXO II

Una de las incógnitas que se nos planteo fue que si en los productores artesanales estarían contaminadas sus bodegas con cepas de levaduras comerciales. Esto debido a que en los proyectos, previos al presente, y de manera de estandarizar la producción de pajarete, se introdujo el uso de levaduras foráneas.

Como primera actividad se realizó un análisis molecular RAPD para determinar un patrón molecular característicos de las levaduras comerciales mas utilizadas por los productores de pajarete. Luego de una búsqueda bibliográfica se determino que el partidor OPA E13 daría un patrón electroforético diferenciar entre cepas comerciales. La figura 10 muestra los resultados obtenidos.

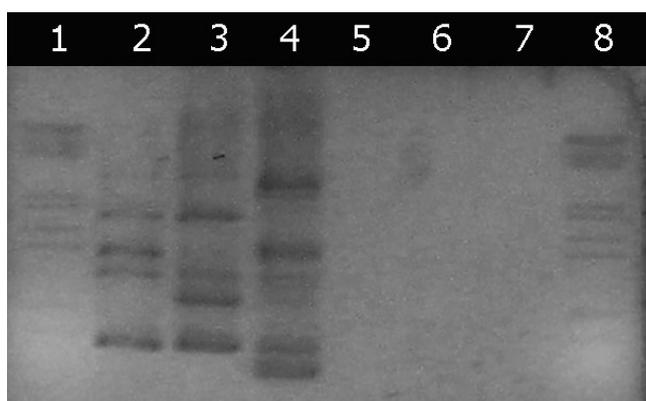


Figura 10. Gel de agarosa para análisis RAPD. Carriles 1 y 8: estándar de tamaño molecular DNA fago λ digerido con *EcoRI* + *HindIII*. Carril 2: Amplificado de DNA de la cepa comercial Actiflor; carril 3: amplificado de DNA de la cepa EC118; carril 4: Amplificado de DNA de levadura *Metchnikowia pulcherrima*.

Una vez que se contaba con un patrón característico de las cepas comerciales se procedió a analizar las colonias de levaduras obtenidas de productores con tecnología:

- 10 colonias del productor Anaberta Debia
- 9 colonias del productor Sandra Ramírez
- 10 colonias del productor Verónica Gahona
- 10 colonias del productor Don Julio Flores

Como forma de ejemplo se muestran los geles del análisis de las colonias de los productores Anaberta Debia y Sandra Ramírez (Figura 11)

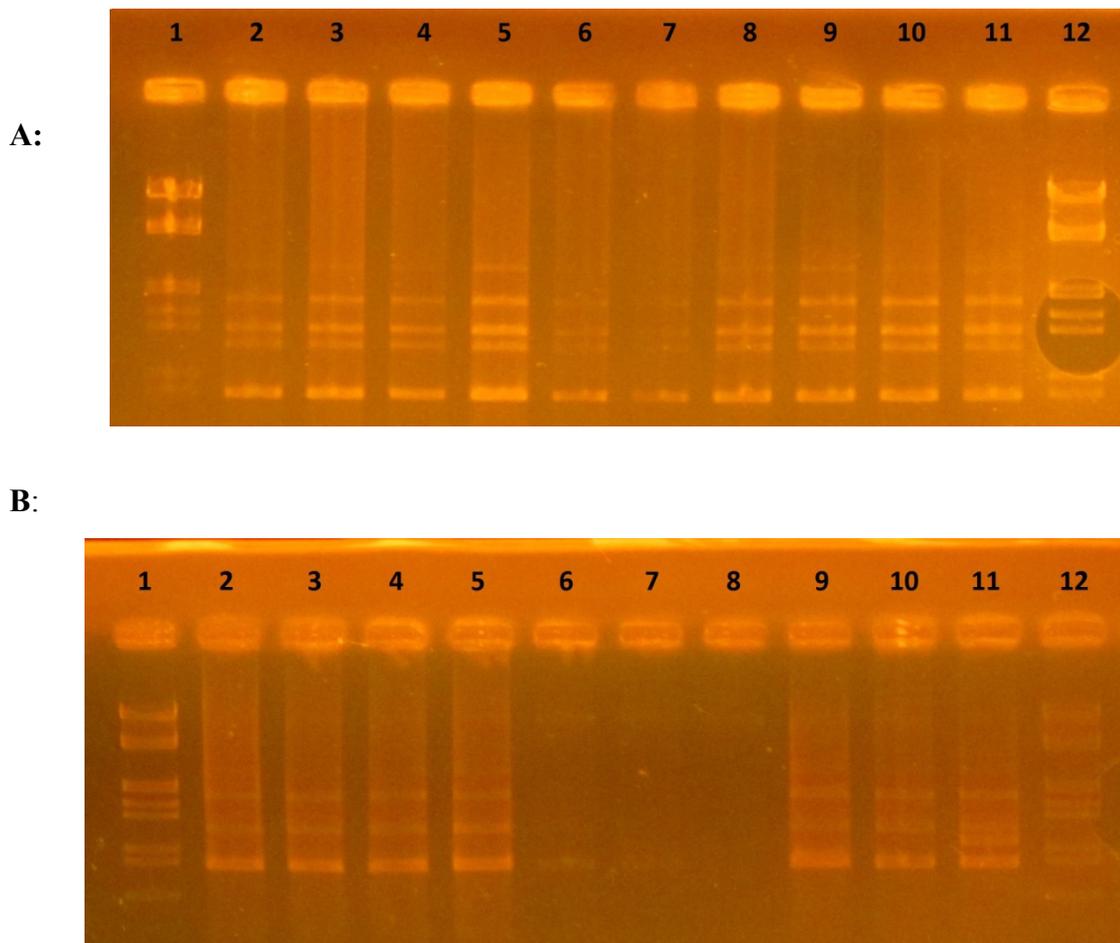


Figura 11. Gel de agarosa del patrón de RAPD obtenida por las colonias de levaduras amplificadas con el partidor OPAE13. A= carriles 1 y 8: estándar de tamaño molecular DNA fago λ diferido con *EcoRI* + *HindIII*. Carriles 2 al 11 colonias 1, 8, 12, 21, 75, 77, 78, 92, 96, 101 del productor Anaberta Debia. B= carriles 1 y 12: estándar de tamaño molecular DNA fago λ diferido con *EcoRI* + *HindIII*. Carriles 2 al 10 colonias 3, 12, 13, 17, 36, 55, 44, 61, 98 del producto Sandra Ramírez : carril 11 colonia 16 del productor Verónica Gahona.

ANEXO III

a) Definición del carácter autóctono de las cepas aisladas del valle del Huasco

A las 3 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas y seleccionadas organolépticamente por los productores de vino pajarete, se les realizó un análisis molecular con el fin de determinar el carácter autóctono de éstas. Como fue reportado en el informe de Enero, se llevó a cabo un primer análisis, mediante la técnica de RAPD, otorgando que las 3 cepas de levaduras de la zona del Huasco son genéticamente diferentes a la cepa comercial EC1118.

Otra técnica que permite diferenciar entre cepas de levaduras, es la conocida como RFLP del DNA mitocondrial (Figura 12). Este método consiste en la extracción de DNA total de la célula y el uso de una enzima de restricción, en este caso *HinfI*, que reconoce una gran cantidad de sitios de DNA nuclear, por lo que este se digiere casi en su totalidad, mientras que los sitios de corte DNAm_t son pocos, lo que genera fragmentos discretos visibles en electroforesis. Estos fragmentos discretos conforman un patrón molecular de DNAm_t

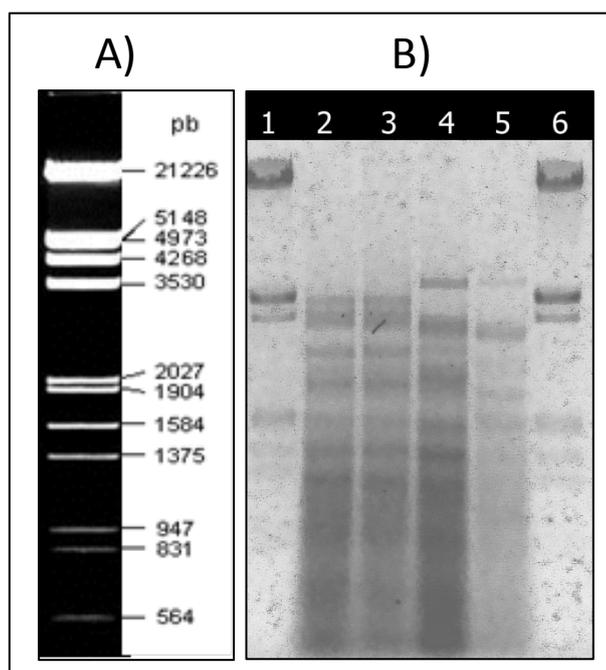


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa del patrón de DNA mitocondrial de cepas *S. cerevisiae* analizadas. A) Marcador de tamaño molecular ADN del fago λ digerido con *HindIII* + *EcoRI*. A la derecha se especifica el tamaño de las bandas en pares de bases. B) Carril 1: Marcador de tamaño molecular de fago λ -DNA digerido con las enzimas *EcoRI* + *HindIII*. Carril 2- 4: Amplificado de DNA *S. cerevisiae* obtenidas de fermentaciones artesanales. Carril 5: Amplificado de DNA *S. cerevisiae* de cepa comercial EC1118.

Según lo observado en la Figura 12, las cepas *S. cerevisiae* nativas 1 y 2 son muy similares, mientras la cepa *S. cerevisiae* nativa 3 es diferente de las levaduras mencionadas, pero muy parecida a la levadura comercial EC1118. Si bien esta técnica nos indicaría que habría una gran similitud genética entre las cepas aisladas, es necesario realizar otro tipo de experimentos para que permitan determinar el carácter nativo de las cepas aisladas de la región del Huasco.

b) Definición del carácter autóctono mediante técnica de RAPD (Gac; 2004)

Como se mencionó anteriormente, con la técnica RAPD y utilizando varios partidores es posible encontrar distancias genéticas y geográficas, las cuales evidencian el grado de parentesco entre las levaduras en estudio. Se utilizaron 12 partidores que mostraron un mayor grado de polimorfismo entre las cepas de *S. cerevisiae* en un trabajo experimental previo (Gac, 2004). Estos partidores se presentan en la Tabla 11, los cuales fueron sintetizados por INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES S.A.

Tabla 11. Partidores utilizados para el análisis de RAPD y sus secuencias nucleotídicas.

Partidores	Secuencia
OPAD 08	5'GGC AGG CAA G3'
OPAD 11	5'CAA TCG GGT C3'
OPAD 14	5'GAA CGA GGG T3'
OPAE 09	5'TGC CAC GAG G3'
OPAE 10	5'CTG AAG CGC A3'
OPAE 12	5'CCG AGC AAT C3'
OPAE 13	5'TGT GGA CTG G3'
OPAE 15	5'TGC CTG GAC C3'
OPAE 20	5'TTG ACC CCA G3'
OPAF 02	5'CAG CCG AGA A3'
OPAF 06	5'CCG CAG TCT G3'
OPAF 10	5'GGT TGG AGA C3'

Este método permitió diferenciar, e identificar las distancias genéticas existentes entre las cepas seleccionadas (desde fermentaciones espontaneas) y la cepa comercial EC1118 (utilizada por productores de pajarete). Además a modo de control se utilizaron cepas *S. cerevisiae* autóctonas chilenas provenientes del valle de Curicó (cepa L00211), valle del Maule (cepa L02884), y valle de Maipo (cepa L02889). A modo de control negativo, que para estos casos se denomina *outgroup*, se utilizó la levadura *Dekkera bruxellencis* (L2480). Los resultados se reflejan en patrones moleculares de bandas electroforéticas en un gel de agarosa (1.5%). En cada gel de agarosa se cargaron los DNAs amplificados de la reacción RAPD de las cepas *S. cerevisiae* en estudio, EC1118, *S. cerevisiae* chilenas autóctonas y el *outgroup*, utilizando un partididor por cada gel, tomando registro fotográfico de estos, un ejemplo de estos geles se presenta en la figura 13.

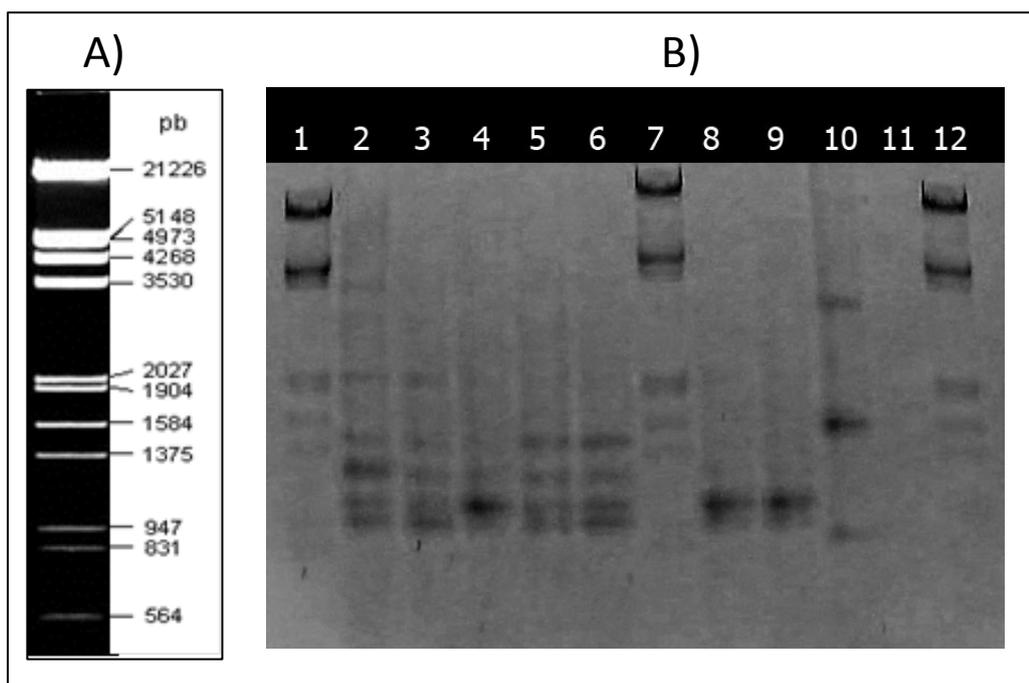


Figura 13. Ejemplo de electroforesis en gel de agarosa de producto PCR de la técnica RAPD utilizando diferentes partididores, en este caso usando el partididor F-02. A) Marcador de tamaño molecular fago λ -DNA digerido con *HindIII* y *EcoRI*. A la derecha se especifica el tamaño de las bandas en pares de bases. B) Carriles 1, 7 y 12: Marcador de tamaño molecular fago λ -DNA digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Carriles 2, 3 y 4: Amplificado de DNA *S. cerevisiae* obtenidas de fermentaciones artesanales. Carril 5: Amplificado de DNA *S. cerevisiae* comercial EC1118. Carril 6: Amplificado de DNA *S. cerevisiae* autóctona chilena del valle de Curicó (L00211). Carril 8: Amplificado de DNA *S. cerevisiae* autóctona chilena del valle del Maule (L02884). Carril 9: Amplificado de DNA *S. cerevisiae* autóctona chilena del valle de Maipo (L02889). Carril 10: Amplificado de DNA *Dekkera bruxellencis* (L2480). Carril 11: control negativo de la reacción de PCR.

Los resultados de la electroforesis fueron analizados utilizando el software *Quantity one* (Bio-rad), el cual permitió cuantificar y determinar el tamaño molecular (en pares de bases) para cada banda electroforética, y así obtener patrones moleculares para cada cepa, estos valores fueron determinados a partir del marcador molecular. Con esta información se construye una matriz binaria de presencia y ausencia de banda, la cual se ingresa en formato de texto al software *Free Tree versión 0.9.1.50*. Este programa es utilizado para la construcción de árboles filogenéticos y se basa en

la distancia genética existente entre las muestras analizadas. Finalmente, estas distancias genéticas se observan en un dendrograma (Figura 14).

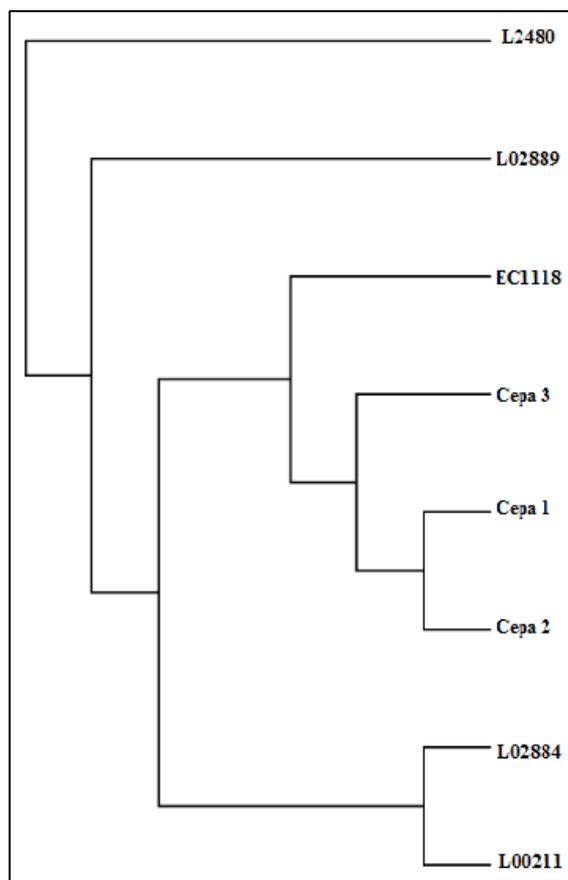


Figura 14 Dendrograma resultante del análisis de datos entregados por los patrones moleculares de cada cepa usando el método RAPD con 12 partidores diferentes. L2480: *Dekkera bruxellencis*; L02889: *S. cerevisiae* autóctona chilena del valle de Maipo; EC1118: *S. cerevisiae* comercial; Cepas 1, 2 y 3: *S. cerevisiae* obtenidas de fermentaciones artesanales; L02884: *S. cerevisiae* autóctona chilena del valle del Maule; L00211: *S. cerevisiae* autóctona chilena del valle de Curicó.

Estos resultados indican que las cepas 1, 2 y 3 obtenidas de fermentaciones artesanales, tienen una menor distancia genética con la levadura comercial EC1118, lo que no significa que sean iguales a ésta, pero poseen un grado de parentesco. Por el resultado anterior no se comprueba el carácter autóctono de estas levaduras. Considerando que estas levaduras en estudio (Cepas 1, 2 y 3) fueron aisladas a partir de fermentaciones artesanales y tomando en cuenta la cercanía con EC1118, surge la necesidad de realizar un nuevo análisis RAPD, esta vez considerando un mayor número de levaduras comerciales.

REFERENCIAS:

- Gac, S. (2004). *Evaluación molecular del carácter autóctono en aislados silvestres de Saccharomyces cerevisiae para uso vitivinícola*. Memoria para optar al título profesional de ingeniero en biotecnología molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Querol, A.; Barrio, E., y Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 439- 446.

ANEXO IV

Confirmación molecular de la predominancia de la levadura nativa en la producción de pajarete 2013

1. Utilizando la técnica de digestión del DNA mitocondrial se pudo confirmar que la levadura utilizada este año por alguno de los productores de pajarete (que fueron seleccionados), predominó en sus fermentaciones,

La figura 15 muestra:

Carril 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 y 1.6 Digestion del DNA mitocondrial de las levaduras aisladas del pie de cuba de la levadura nativa (Flumer auris) realizado por el productor Julio Flores - Flumer Auris; C1 Control positivo, Flumer auri obtenido desde el laboratorio.

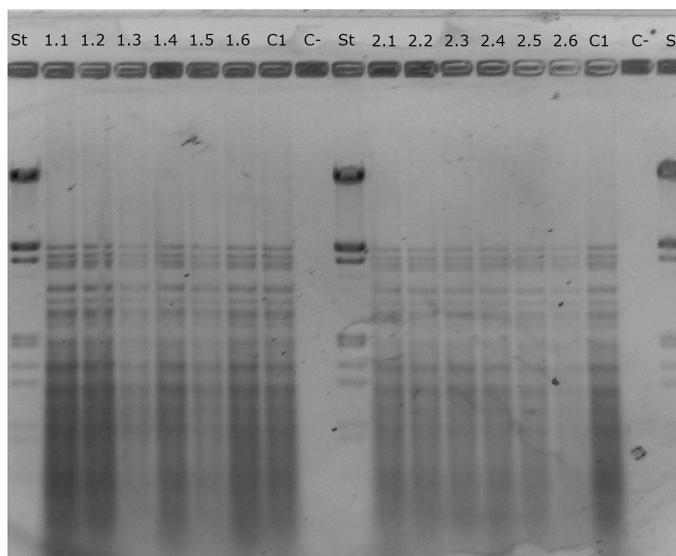
Carriles 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 colonias de levadura aisladas del vino ya terminado con la levadura nativa del productor Julio Flores.

C1: Control positivo Flumen auri obtenido de nuestro laboratorio

C-: control negativo

St Standares de peso molecular

FIGURA 15



ANEXO V

Puesta a punto de uso de fermentador para crecimiento de levaduras

El reactor que fue adquirido fue construido por la empresa Biocl, modelo Biocl20-02, es un reactor a escala de laboratorio con cuerpo de vidrio, de 2 L de capacidad, 1.7 L de volumen de trabajo. Puede operarse en diferentes modalidades: Cultivo por Lote (Batch), Cultivo por Lote Alimentado (Fedbatch) y Cultivo Continuo. Posee diversas entradas y salidas para el medio de cultivo, buffer de pH, aire e inculo. También posee unos accesorios para instalar el electrodo de pH y de oxígeno disuelto. Los diferentes accesorios pueden verse en la Figura 6. En este reactor se pueden controlar pH, temperatura, oxígeno disuelto, velocidad de agitación y flujo de alimentación. Posee un medio de agitación con turbina tipo Rushton ideal para la homogeneidad del cultivo de levaduras.



Figura 16. Accesorios del Reactor: 1: Toma de muestra; 2: intercambiado de calor tipo U, 3: Electrodo pH/OD, 4: conductor; 5 electrodo pH/OD, 6: toma de muestra, 7: descarga, 8: conductor, 9: termómetro, 10: dosificación sustancia, 11: dosificación sustancia, 12: salida de aire, 13: dosificación sustancia, 14: entrada de aire, 15: agitador, 16 dosificación sustancia

El Reactor para su funcionamiento, cuenta con los siguientes equipos para su uso: bombas peristálticas, bomba dosificadora de pH, termocirculador, motor de agitación, controlador de pH, electrodo de pH, controlador de OD, electrodo OD, rotámetro y un aireador. Con el fin de asegurara la esterilidad del bioreactor se llevaron a cabo una serie de pruebas las cuales no han satisfecho del todo a las necesidades. Por ello, se realizaron diferentes ensayos como:

- 1) Cultivo tipo Batch esterilizado e instalado con agitación, aireación y termorregulación, sellado con algodón y papel aluminio en los fittings no usados para el método de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue YPD sin inocular y la prueba duro 3 días. Al final de la prueba, el cultivo se mantuvo estéril y sin contaminación.
- 2) En la segunda prueba, el cultivo fue de tipo Batch en un principio, se siguieron los mismos pasos que en la prueba anterior pero luego del primer día de prueba se instalaron mangueras en los fittings de alimentación y descarga del reactor para simular Cultivo Continuo. Se hicieron pasar 2 L de medio YPD los cuales fueron recolectados en botellas Schott Duran de 1 L y se dejaron cultivando a 25 °C durante 1 día. Luego de incubar las botellas, se vio una turbiedad en el medio de cultivo, por lo que se asumió que el medio de cultivo se había contaminado.

3) En la tercera prueba, el cultivo fue de tipo Batch, se siguieron los mismos pasos que la primera prueba, solo que al segundo día de la esterilización, el medio ya estaba turbio y contaminado.

4) En la cuarta prueba, el cultivo nuevamente fue de tipo Batch, pero al momento de la esterilización ocurrió un problema, el medio de cultivo en el autoclave se salió por los accesorios ubicados en la tapa del reactor. Se pensó que podía ser un problema del autoclave, por lo cual se usó un segundo autoclave con que se cuenta, el cual funciona a una menor presión. El resultado fue el mismo mencionado anteriormente, por lo cual se realizó una prueba para saber por dónde se escapó el medio de cultivo. La prueba consistió en sumergir el reactor completamente en agua y se colocó aireación, se sellaron las entradas y salidas del reactor y se observó la salida del aire del reactor por medio de los accesorios en la tapa. Por casi todos los accesorios salían burbujas de aire, por lo cual se envió el reactor a la empresa fabricante (Biocl) para que chequeara las fallas detectadas en las diversas pruebas de esterilización.

Como equipo investigador se puso en contacto con la empresa Biocel, quien realizó un chequeo para establecer fallas técnicas en el sellado del reactor por medio de una prueba que indique que el medio de cultivo se mantuvo estéril en un tiempo determinado. Al momento de sellar el reactor para la esterilización en el autoclave en Biocl, se realizó el mismo sellado que se efectuó en el laboratorio y que indica el manual de operación del reactor, con la única diferencia que para un mejor sello de las mangueras se usaron binder clips como indica la figura 17

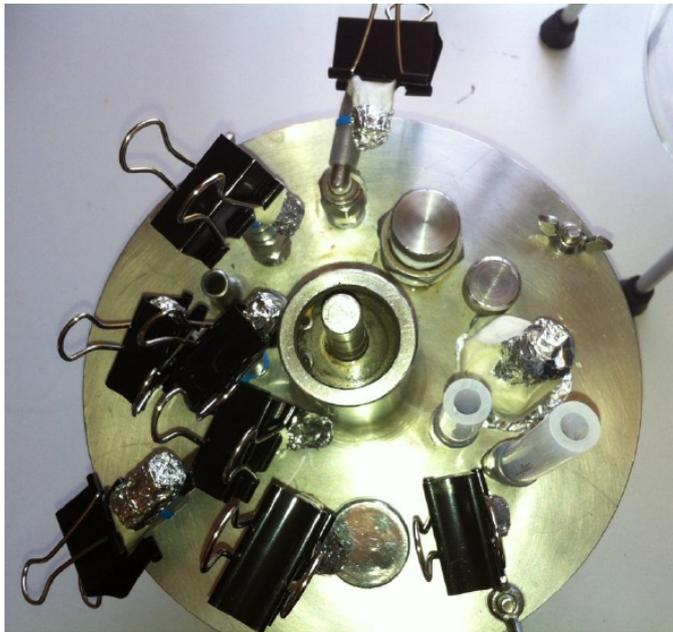


Figura 17 Preparación del reactor para su esterilización.

Posteriormente a su esterilización, se dejó bajo agitación por 52 horas y no se observó ningún cambio en el medio de cultivo ni turbidez de este como se muestra en la figura 18

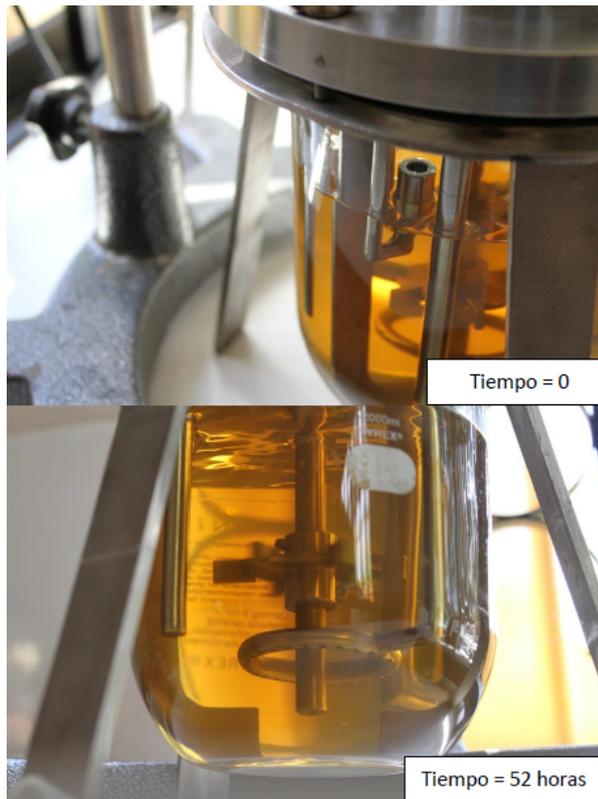


Figura 18. Tiempo inicial y final de la prueba de esterilización.

Luego de los negativos resultados obtenidos hasta el informe de Enero, se llevo a cabo una nueva prueba de esterilización del medio de cultivo para el crecimiento de levaduras. El cultivo realizado fue del tipo Batch, esterilizándolo a 121°C por 15 min. Posteriormente el fermentador fue instalado con agitación, aireación y termorregulación, sellado con algodón y papel aluminio en los fittings no usados para el método de cultivo.

Esto se dejo a 37°C durante 3 días para verificar la esterilidad del medio, sin inocular, verificando lamentablemente que ya al 3er días de agitación, una contaminación.

Con el fin de ser asesorados por la empresas BIOCL a la cual se le compró el fermentador, para que se efectuara un chequeo para establecer fallas técnicas en el sellado del reactor. Al momento de sellar el reactor para la esterilización en la empresa se realizó el mismo sellado que se ha llevado a cabo en nuestro laboratorio y que es indicado en el manual de operación del reactor, como indica la figura 19.

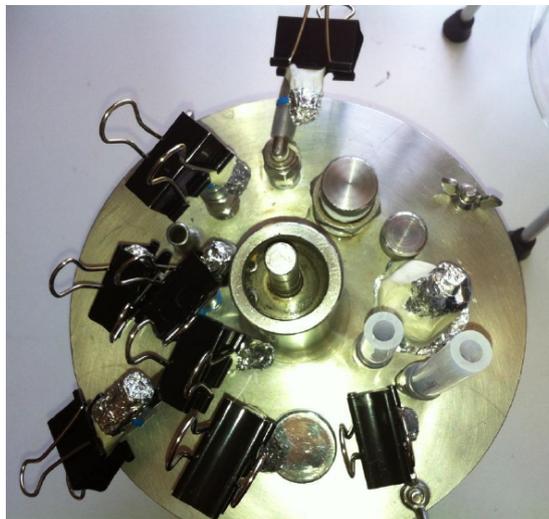


Figura 19 Preparación del reactor para su esterilización.

Posteriormente a su esterilización, se dejó bajo agitación, aireación y termorregulación por 6 días a 37°C, no observándose cambio en el medio de cultivo ni turbidez de éste como se muestra en la figura 20.



Figura 20 Tiempo final de la prueba de esterilización.

En nuestra estancia en la empresa BIOCL, se detectó una diferencia en el protocolo usado en nuestro laboratorio, todas las conexiones realizadas después de la esterilización en el autoclave se realizaron bajo una campana de flujo, evitando así cualquier tipo de contaminación externa.

Posteriormente a esta prueba de esterilidad realizada en Biocl, el reactor fue entregado a los laboratorio de la Usach donde se realizó una nueva prueba de esterilidad. Se procedió a autoclavar el reactor con el medio de cultivo (YPD) en su interior y con el fin de disminuir la presión se retiró una tapa de un fitting (sensor de oxígeno) y fue reemplazado por un sello de aluminio, el reactor fue autoclavado con medio de cultivo (YPD), y al momento de retirar el reactor del autoclave no se observó ninguna fuga del medio de cultivo. Se instaló el filtro de aire autoclavado y otros accesorios bajo campana de flujo laminar para evitar alguna fuente de contaminación.

Nuevamente se realizó una prueba de esterilidad del reactor, el cual se dejó bajo agitación, aireación y termorregulación. Después de 5 días de prueba no se observó turbiedad en el medio de cultivo como se ve en la figura 21.



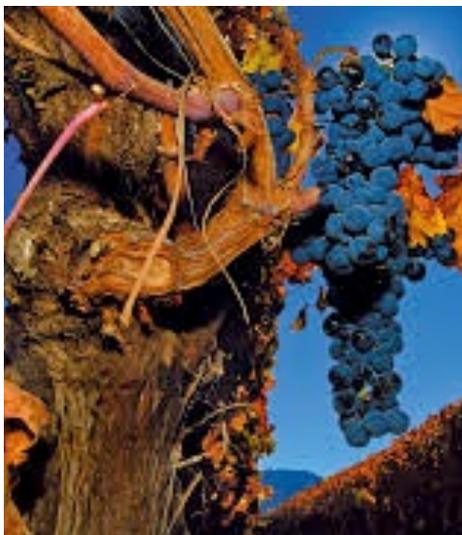
Figura 21. Reactor con medio de cultivo (YPD) estéril.

Entre Marzo – Abril se puso a punto los parámetros cinéticos para el crecimiento de las levaduras que fueron usadas en la vendimia 2013 para producción del vino pajarete.

ANEXO VI

PAJARETE VALLE DEL HUASCO

Manejo microbiológico en Pajarete



El pajarete es un producto que solo recientemente ha incorporado tecnología en su elaboración. Por tanto, algunas etapas en su proceso están expuestas a contaminación y pueden promover el desarrollo y la proliferación de las bacterias acéticas.

PAJARETE VALLE DEL HUASCO.- SECCIÓN 1

Carga microbiana

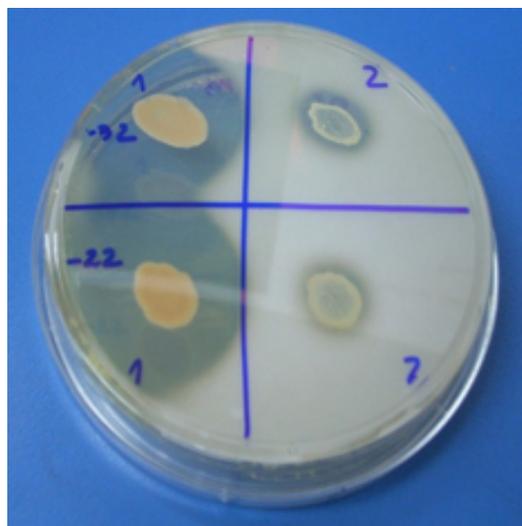


CARGA MICROBIANA EN PAJARETE

Los recuentos totales arrojaron cargas bacterianas importantes antes de la molienda. Los recuentos van desde 10 millones a 1000 millones de células microbianas por ml. Se puede resumir que los productores tienen una carga total de 100 millones células por ml.

Algunos aspectos importantes a considerar son:

1. La carga disminuye a medida que el procedimiento avanza, estimándose que en general la carga total corresponde a 1 millón de células microbianas por ml.
2. En cuanto bacterias presentes, especial atención llaman las denominadas bacterias acéticas. Estos microorganismos se presentaron en diversas etapas del proceso.



Las bacterias acéticas presentaron un recuento inicial de 1000 a 100 millones de bacterias por ml. No obstante, después de la fermentación el valor más común corresponde a 1000 bacterias acéticas por ml.

2

Composición bacteriana



COMPOSICIÓN BACTERIANA EN PAJARETE

Como era de esperarse de acuerdo a las cargas bacterianas (Sección 1), los aislados más comunes correspondieron al grupo de las bacterias acéticas, principalmente *Gluconobacter*.

Mediante el análisis molecular se corroboró la presencia de bacterias acéticas en algunos productores, llamando la atención la diversidad de *Gluconoacetobacter*. En algunos casos se estableció que las bacterias acéticas fueron de difícil detección, en contraste se presentaban bacterias del tipo *Pseudomonas putida*.

Algunos de estos aislados pueden soportar 300 ppm de SO₂, lo que dificulta su control.

Las bacterias acéticas como aquellas perteneciente a los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Gluconoacetobacter*, son alterantes del Pajarete. Ellas pueden producir el picado acético o subida de la acidez volátil, que perjudica las propiedades sensoriales del producto. Su control se basa en la buena higiene y adecuados tratamientos.



El antimicrobiano más usado en la enología es el Dióxido de azufre o SO₂ y este se aplica en forma de metabisulfito de potasio. Las dosis de SO₂ a aplicar están dadas por los microorganismos objetivos a eliminar, se consideraran rangos máximos de tolerancia y se prueba hasta el máximo permitido por ley; en el caso de Chile la legislación permite como máximo para vinos dulces 400ppm de SO₂ total.

3

Control microbiológico



RECOMENDACIONES GENERALES

Para el control microbiológico en el proceso de vinificación, se recomienda que:

1. El estado fitosanitario de la uva debe ser el mejor posible, evitando así tener una carga inicial alta y un desarrollo de bacterias indeseadas durante todo el proceso de vinificación.
2. La higiene de la bodega debe ser óptima, se debe limpiar y desinfectar, lo mejor posible, antes del comienzo de la vendimia toda maquinaria, estanque e instrumental a usar durante la el proceso de elaboración.
3. Se debe tratar de que la elaboración del producto se realice bajo condiciones de anaerobiosis estrictas.

La mayoría de las bacterias presentes durante la vinificación pueden ser controladas mediante la aplicación de metabisulfito de potasio, usando dosis de 400ppm total (Sección 4). Sin embargo, después de terminada la fermentación la población residual de bacterias acéticas en los distintos productores, es relativamente alta. Esto puede provocar grandes problemas ya que con el nivel azúcar residual en Pajarete, estas bacterias pueden disminuir la calidad organoléptica y por lo tanto, bajar el valor comercial.



Dada la realidad actual de Pajarete, la dosis de metabisulfito a recomendar es la máxima permitida en Chile y en otros países. No obstante, si se quiere ampliar el mercado de este producto, es recomendable tener prácticas preventivas que eviten el desarrollo y proliferación de estas bacterias. Esto es relevante dado que en mercados como el europeo y el medio oriente, los niveles máximos permitidos de productos químicos aplicados a vinos, ha disminuido considerablemente.

4

Aplicación metabisulfito



APLICACIÓN DE METABISULFITO

El metabisulfito de potasio es un compuesto químico inorgánico. Físicamente es un polvo blanco o ligeramente cristalino. Existen varias formas de nombrar este compuesto: Metabisulfito potásico, disulfito potásico, pirosulfito potásico.

Su principal propiedad es que es capaz de disociarse en medio ácido para generar dióxido de azufre. Este tiene propiedades importantes para la elaboración de vinos y alimentos.

Antioxidante: posee propiedades reductoras, acaparando oxígeno e impidiendo la aparición de notas oxidativas.

Antimicrobiano: ejerce una actividad inhibidora sobre levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas.

Al tratarse de un producto tóxico, deben extremarse las precauciones. Evitar el contacto con los ojos y mucosas. La manipulación debe realizarla personal cualificado.

El metabisulfito se aplica en distintas etapas de elaboración del Pajarete: Molienda, Prensado y Final de fermentación, las dosis sugeridas se muestran en la siguiente tabla.

ETAPA	DOSIS
Molienda	10 g/100 Kg de uva
Prensado	5 g/100 Kg de uva
Final Fermentación	0,4 g/ Litro *

Se recomienda realizar previamente una disolución (en agitación enérgica), en las proporciones adecuadas en función de la dosis a utilizar.

Las dosis se deben agregar al proceso disolviendo la cantidad de metabisulfito de potasio necesario en agua o jugo de uva c vino, para una mejor homogenización en la aplicación.

*: es lo mismo que 400 ppm

ANEXO VII

ASESORIA A PRODUCTORES DE PAJARETE

Durante todo el proyecto se han asesorado a 5 productores de Pajarete y se han tomado las muestras respectivas y enviadas a USACH e INTA. Además se muestrearon los 3 productores que no aplican tecnología (Figura 22)

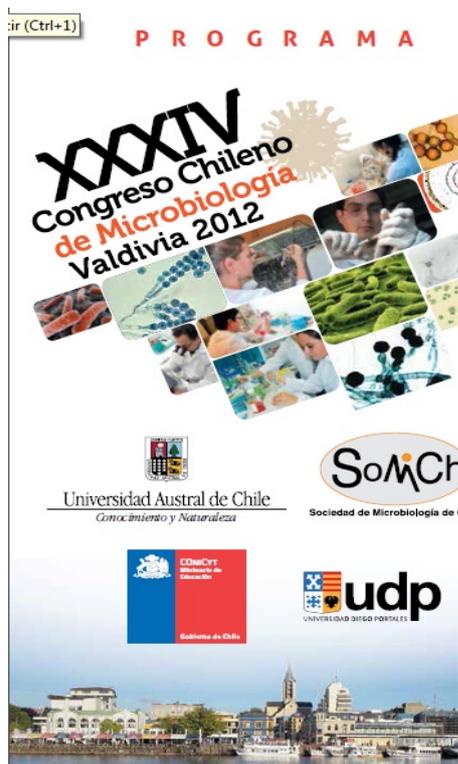


Figura 22: Productores de pajarete siendo asesorados por personal del proyecto

ANEXO VIII

DIFUSION DE RESULTADOS

1. Presentación del proyecto en el Congreso Nacional de Microbiología 2012.



*



B12 Selección de levaduras nativas para el mejoramiento del proceso fermentativo del vino Pajarete.

Wine fermentative process optimization through selection of native yeast.

Lorca G., Ratkevicius N., M. A. Ganga.

Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada. Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad Tecnológica. Universidad de Santiago de Chile. E – mail: gustavo.lorcama@gmail.com

El vino pajarete es un producto con denominación de origen de la III Región de nuestro país. Actualmente se están aplicando levaduras comerciales para asegurar la calidad de este producto, sin embargo, esto ha llevado a que el vino no presente diferencias con sus pares, perdiendo identidad, evitando así una inserción completa al mercado.

Las levaduras del género *Saccharomyces* son las principales responsables de la fermentación alcohólica, y su presencia durante el proceso asegura la calidad de los vinos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue seleccionar levaduras propias de la zona para la producción del vino Pajarete. Por tanto, se aislaron microorganismos desde mosto en diferentes estadios fermentativos, provenientes de productores con y sin tecnología. Posteriormente se seleccionaron un conjunto de levaduras a través de los siguientes parámetros: pertenecer al género *Saccharomyces*, mostrar una alta sensibilidad a SO₂, ser capaces de producir un vino con 14 ° alcohólicos y nivel de azúcar residual superior a 45 g/L.

Las muestras fueron sembradas sobre agar YPD suplementado con estreptomicina, luego replicadas sobre agar lisina, lo que permitió identificar levaduras sólo del género *Saccharomyces*. Posteriormente, se cultivó en medio YPD líquido con 80 ppm de metabisulfito de potasio durante 3 días a 28°C. A partir de esta selección, se obtuvieron 33 levaduras, que fueron identificadas mediante métodos moleculares (ITS-RFLP; RFLP mtDNA). Finalmente se realizaron ensayos de fermentación en mosto sintético, evaluando la capacidad de obtener un producto con las características fisicoquímicas deseadas para el vino Pajarete.

Financiamiento: Proyecto GORE ATACAMA Res. 374.



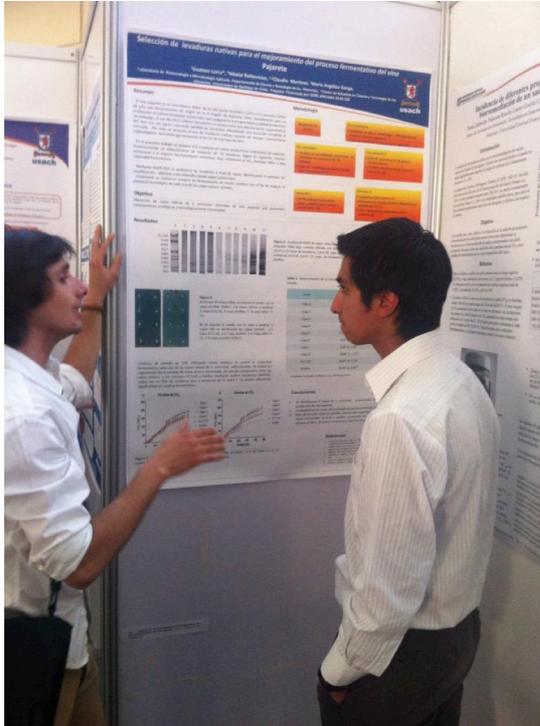
B28 Estudio de la microbiota bacteriana presente en Vino Pajarete de la III Región.

Study of the bacterial microbiota present in Pajarete Wine Region III.

Ilabaca C. y J. Romero.

Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile. E – mail: cilabacadiaz@gmail.com

El pajarete es un vino que se produce tradicionalmente con métodos artesanales, y recientemente ha tecnificado su elaboración. El pajarete es un vino dulce, con denominación de origen producido en la III Región. Las bacterias de la microbiota de este fermento pueden impactar fuertemente sobre las cualidades organolépticas del producto final. En este estudio se determinó la composición bacteriana presente en la elaboración de este vino, enfatizando la detección de bacterias acéticas. Se muestrearon las producciones de 5 productores de distintas zonas del valle de Huasco. La composición bacteriana se realizó aplicando métodos moleculares independientes de cultivo (PCR-TTGE) y comparándolos con aislamientos obtenidos mediante cultivo (GYC). La identificación de los aislados se realizó por PCR-RFLP y su comparación con perfiles de cepas tipo. Los aislados más frecuentemente detectados correspondieron a *Acetobacter acetii* y *Gluconobacter oxydans*; estas bacterias estaban presentes en todos los productores analizados. En tanto, la composición bacteriana fue determinada secuenciando las bandas de los perfiles de PCR-TTGE derivados desde el DNA extraído de cada muestra. En estos perfiles las bacterias acéticas dominantes correspondieron a *Gluconobacter oxydans* y *Gluconoacetobacter xylinus*. Ninguna banda de *Acetobacter* fue detectada en los productores testeados. En todos los productores analizados fue común encontrar bacterias lácticas, la más común correspondió a *Lactobacillus kunkeei*; mientras algunas muestras presentaron *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum*. Estos resultados son útiles para enfrentar el control microbiológico de estos fermentos y promover la presencia de microorganismos que beneficien las propiedades organolépticas.



Sesión de poster, en donde se respondieron a consultas de los asistentes

2. EXPOHUASCO

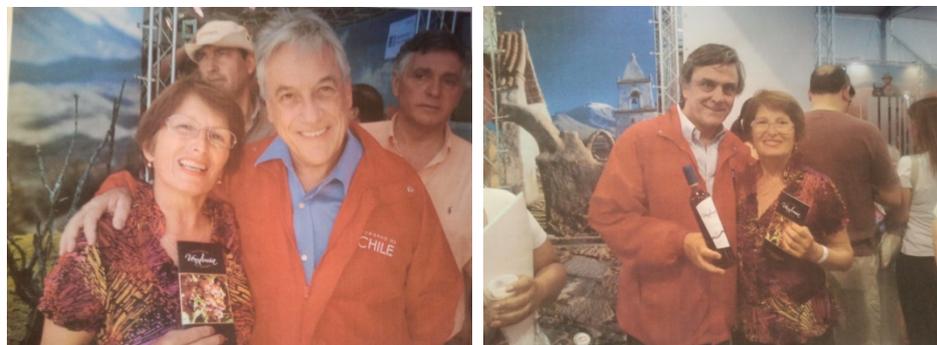
(Noviembre 2012)

Esta actividad fue realizada con éxito, ya que el motivo principal fue generar presencia del producto Pajarete en la actividad y además vender el producto.



Presentación del producto a los visitantes de la feria

3. SERNATUR Apoyo a los Productores de Pajarete en la asistencia de actividad de Turismo “Chile es Tuyo” representando a la III Región de Atacama (Noviembre 2012)



Presentación del vino pajarete con autoridades gubernamentales

4. Apoyo a los Productores de Pajarete en la asistencia en el cierre de Programa de Apoyo a Actividades Económicas financiado por FOSIS (Diciembre 2012)

Esta actividad fue una ceremonia de finalización del Programa de Apoyo a Actividades Económicas financiado por FOSIS. En esta ocasión se contó con la presencia del Director Regional de Fosis y se les mostró las máquinas que se compraron y su forma de uso.



Cierre del programa Fosis

5. Apoyo a los Productores de Pajarete en la asistencia al lanzamiento de la oficina de Turismo de la Provincia del Huasco por la Gobernación Provincial de Huasco (Diciembre 2012)



Lanzamiento de la oficina de Turismo de la provincia del Huasco

6. Apoyo a los Productores de Pajarete en la asistencia a ATEXPO 2012, para contactos comerciales (Enero 2013)



7. Apoyo a productores de pajarete en la II Feria Boulevard Dakar 2013.

Esta feria se llevó a cabo en Copiapó entre el 17 y 18 de enero, actividad organizada por la Municipalidad de Copiapó. El objetivo de participar en esta feria fue promocionar el vino pajarete en el Dakar 2013.



Productores de pajarete participando en la Feria

8. Apoyo en la degustación de pajarete con autoridades regional de Corfo (Febrero 2013)



Cata de vino pajarete con autoridad regional de Corfo.

9. Presentación de vino pajarete en la inauguración del CFT UDA (Marzo 2013)



Vino de Honor en la inauguración de salas del CFT - UDA