



Informe de Seguimiento técnico Final

Nuevos procesos de extracción en uvas para vinificación con dióxido de carbono

PYT-2012-0054

Período comprendido desde el 12 de abril de 2015 hasta el 31 de agosto de 2015

Instrucciones:

- La información presentada en el informe técnico debe estar directamente vinculada a la información presentada en el informe financiero, y ser totalmente consistente con ella.
- El informe debe incluir en los Anexo los cuadros, gráficos, fotografías y diapositivas, publicaciones, material de difusión, material audiovisual y otros materiales que apoyen o complementen la información y análisis presentados en el texto central.
- Todas las secciones del informe deben ser contestadas.
- Evite repetir información en las distintas secciones
- Utilice caracteres tipo Arial, tamaño 11, y utilice los espacios asignados para ello.
- Los informes deben ser presentados en versión digital y en papel (dos copias), en la fecha indicada como plazo de entrega en el contrato firmado con el postulante y/o Entidad Responsable.
- FIA se preocupa por el medio ambiente, si le es posible, por favor imprima a doble cara.

Contenido

1.	Antecedentes	3
2.	Costos.....	3
3.	Resumen del Período.....	4
4.	Objetivos Específicos	5
5.	Resultados.....	6
6.	Actividades.....	10
7.	Hitos Críticos	16
8.	Cambios en el entorno.....	17
9.	Difusión	18
10.	Auto Evaluación	
11.	Conclusión.....	20
12.	Anexos.....	

1. Antecedentes

1.1. Antecedentes Generales:

Nombre Ejecutor:	INDURA S.A.
Nombre(s) Asociado(s):	PUC - Viña Undurraga
Coordinador del Proyecto:	Claudia Sanchez
Regiones de ejecución:	Metropolitana
Fecha de inicio iniciativa:	01/09/2012
Fecha término Iniciativa:	31/08/2015
Tipo Convenio FIA:	FIC regional
Objetivo General:	Mejorar la extracción de compuestos que otorgan calidad al vino con nuevos equipos dosificadores y nuevos procesos de extracción en uvas para vinificación, a través del uso eficiente del CO2 como técnica de enfriamiento y congelación.

2. Costos

2.1. Costo general:

Costo total de la Iniciativa			
Aporte FIA			
Aporte Contraparte	Pecuniario		
	No Pecuniario		
	Total Contraparte		

2.2. Ejecución presupuestaria a la fecha:

Acumulados a la Fecha		Monto (\$)
Aportes FIA	Suma cuotas programadas	
	Suma cuotas pagadas	
	Suma gasto programado	
	Suma gasto real	
Aportes Contraparte	Gasto programado	
	Gasto real	
	Gasto pecuniario programado	
	Gasto pecuniario real	

3. Resumen del Período

- 3.1. Informar de manera resumida las principales actividades realizadas y los principales resultados obtenidos en el período. Entregar valores cuantitativos y cualitativos. Explicar cuáles son las posibilidades de alcanzar el objetivo general y de desarrollar el negocio propuesto. Cada resumen debe contener información nueva, sin repetir lo mencionado en el resumen de informes anteriores. (Máx. 300 palabras)

Este proyecto ha permitido fabricar y calibrar nuevos equipos dosificadores de CO₂ y validar nuevos procesos de extracción en uvas para vinificación cvs Pinot noir, Cabernet Sauvignon y Sauvignon blanc a través del desarrollo de ensayos controlados en laboratorio y ensayos a escala piloto, los cuales se acompañaron paralelamente con ensayos de congelación a escala de laboratorio, tanto para uva tinta como para uva blanca, con el fin de poder evaluar de manera exhaustiva los efectos producidos por la supraextracción. Los resultados en detalle se encuentran en los documentos anexos a este informe. Entre los principales resultados obtenidos se puede mencionar un aumento de la eficiencia en el uso del CO₂, disminuyendo hasta 0,18 kg CO₂/kg uva y mejoras en la calidad de los vinos: aumento del color y aumento de antocianinas en caso de los vinos tintos.

Los balances de los costos operacionales y económicos permitirán posicionar en el mercado el servicio de congelación mediante el uso de esta nueva técnica, que considera la aplicación de CO₂ mediante equipos diseñados especialmente para este fin.

Luego de las actividades de difusión de los resultados del proyecto a la industria nacional y de una actualización del estudio del mercado este servicio estaría disponible durante la próxima temporada de vendimia.

4. Objetivos Específicos (OE)

4.1. Porcentaje de Avance:

Nº OE	Descripción OE	% de avance
1	Desarrollo y calibrar nuevos sistemas de dosificación para el enfriamiento y congelación de uvas con CO ₂	100%
2	Determinar la relación entre la dosis de CO ₂ , el nivel de congelamiento y la calidad de la uva despalillada o entera con nuevos equipos dosificadores de CO ₂ .	100%
3	Evaluar el efecto sobre la calidad de vino de procesos de supra-extracción de uvas tintas y blancas a nivel piloto con nuevos equipos dosificadores de CO ₂ .	100%
4	Poner en el mercado de servicio de enfriamiento y congelación de uvas con CO ₂ .	80%

4.2. Descripción de estado de avance del período (Máx. 70 palabras por objetivo)

Nº OE	Descripción del Avance del Período
1	Objetivo previamente alcanzado. Sin avance durante el periodo informado.
2	Objetivo previamente alcanzado. Sin avance durante el periodo informado.
3	Tras la finalización de los procesos fermentativos, los vinos de los cultivares Sauvignon blanc, Pinot noir y Cabernet-Sauvignon fueron estabilizados tartáricamente, embotellados y analizados química (perfil fisicoquímico y composición fenólica) y sensorialmente. Los resultados se encuentran en los documentos adjuntos.
4	Durante el período informado, se realizó el estudio del mercado para poner el servicio en funcionamiento en el corto plazo y se programaron las actividades de difusión de los resultados del proyecto, teniendo además a la fecha, tres clientes potenciales interesados en el servicio para la próxima temporada de vendimia.

5. Resultados Específicos (RE)

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)			Valor Actual	
			Indicador (cuantificable)	Línea base (situación sin proyecto)	Meta proyecto	Resultado	% Avance
1	1	Nuevos equipos dosificadores de CO2 contruidos y calibrados	Servicio de congelado en uvas (Kg uva / año)	0	2.500.000	25.000	80% Los equipos se encuentran contruidos y calibrados, sin embargo el servicio está por entrar en mercado para la próxima temporada 2016
2	2	Determinación de las dosis específicas de CO2 según tipo de adición, nivel de congelación deseado y materia prima utilizada.	Eficiencia del uso del CO2 (Kg CO2 / Kg uva)	0,30	0,20 (reducción consumo CO2 en 25%)	0,20 (promedio)	100%. Reducción mayor a la esperada ya que línea base era mayor a lo estimado inicialmente.
3	3	Nuevas metodologías y recomendaciones técnicas del uso de la supra-extracción en uvas blancas cv. Sauvignon blanc congeladas con CO2	Proporción vino reserva cv. Sauvignon blanc (% vino reserva)	-	Aumento en 20%	Aumento de calidad comprobado científicamente de acuerdo a los resultados	100%
	4	Nuevas metodologías y recomendaciones técnicas del uso de la supra-extracción en uvas tintas cv. Pinot noir congeladas con CO2	Proporción vino reserva cv. Pinot noir (% vino reserva)	-	Aumento en 20%	Aumento de calidad comprobado científicamente de acuerdo a los resultados	100%

	5	Nuevas metodologías y recomendaciones técnicas del uso de la supra-extracción en uvas tintas cv. Cabernet Sauvignon congeladas con CO2	Proporción vino reserva cv. Cabernet Sauvignon (% vino reserva)	-	Aumento en 20%	Aumento de calidad comprobado científicamente de acuerdo a los resultados	100%
4	8	Servicio de enfriado y congelado de uva con CO2 disponible en el mercado nacional.	Oferta servicio (equipos disponibles)	0	2	Luego de las presentación se ha conseguido tener 3 clientes potenciales interesados para la próxima vendimia 2016 (	80% El equipo de Negocios (INDURA) se encuentra gestionando junto a los clientes interesados, la posibilidad de utilizar servicio para temporada 2016

5.1. Cuantificación del avance: (Cuantifique el avance para todos los resultados esperados)

5.2. Descripción del avance del período (describa sólo aquellos que han tenido actividad durante el período)

Nº RE	Descripción Avance	Problemas y Desviaciones	Repercusiones	Acciones Correctivas
1	Equipo calibrado y preparado para brindar el servicio de congelación.	El equipo funciona correctamente. El equipo debe funcionar bajo techo.	El equipo dosificador no logra alcanzar temperaturas de congelación bajo condiciones de lluvia o mojado de sus superficies exteriores.	Operar el equipo siempre bajo techo.

2	Las dosis de CO ₂ a utilizar y los rendimientos ya se encuentran calculados llegando a un promedio de 0,2 Kg de CO ₂ por Kg de uva	No hay problemas ni desviaciones adicionales.	-	ninguna
3	Se terminaron de elaborar los vinos Sauvignon blanc, para luego llevar a cabo análisis químico y sensorial: perfil fisicoquímico, compuestos volátiles (Tioles y Pirazinas) y análisis sensorial por panel entrenado. De forma adicional y en paralelo se desarrolló una prueba de congelación a pequeña escala en el laboratorio de enología de la Universidad Católica de Chile para poder evaluar los efectos de la congelación con CO ₂ y su efecto protector ante la oxidación de compuestos fenólicos en condiciones controladas de laboratorio.	No se presentan problemas ni desviaciones.	-	-
4	Los vinos Pinot noir fueron correctamente terminados de elaborar y todas las unidades experimentales fueron analizadas química y sensorialmente. En paralelo se desarrolló una prueba de congelación a escala de laboratorio para evaluar los efectos de la congelación con CO ₂ en compuestos fenólicos, principalmente en el desarrollo del color.	La demora en el inicio de las fermentaciones malolácticas influyó directamente en la oportunidad de análisis químico.	-	-

5	La situación de los vinos Cabernet-Sauvignon es similar a la de los vinos Pinot noir. A diferencia de estos últimos, durante la vinificación se efectuó una maceración post fermentativa dejando el vino en contacto con el orujo por 21 días. En paralelo se desarrolló una prueba de congelación a escala de laboratorio para evaluar los efectos de la congelación con CO2 en compuestos fenólicos, principalmente en el desarrollo del color	No se presentan problemas ni desviaciones.	-	-
6	El equipo se encuentra listo para ofrecer el servicio. Se ha avanzado en el estudio del mercado en las condiciones actuales y en la programación de actividades de difusión del servicio para industria del vino.	-	-	-

6. Actividades

6.1. Cuantificación del avance. Cuantifique el avance para todos los resultados esperados:

Nº OE	Nº RE	Actividades	Programado		Real		% Avance
			Inicio	Término	Inicio	Término	
1	1	Diseño de equipos dosificadores de CO2 para inyección y adición.	SEP 12	NOV 12	SEP 12	ENE 13	100%
1	1	Selección de diseños.	OCT 12	NOV 12	NOV 12	DIC 13	100%
1	1	Fabricación de equipos dosificadores.	NOV 12	ENE 13	ENE13	ENE 13	100%
1	1	Calibración de dosificadores de CO2 (Kg/min).	DIC 12	ENE 13	ENE 13	FEB 13	100%
2	2	Configuración y programación de los ensayos en terreno.	NOV 12	ENE 13	NOV 12	ENE 13	100%
2	2	Ensayo a escala piloto de separación de sólidos y adición selectiva de CO2: seguimientos de temperatura y estado de oxidación-reducción.	FEB 13	ABR 13	FEB 13	MAY 13	100%
2	2	Ensayos a escala piloto de adición de nieve carbónica en uva entera y despalillada: seguimientos de temperatura y estado de oxidación-reducción.	FEB 13	ABR 13	FEB 13	MAY 13	100%
2	2	Evaluaciones colorimétricas (dyostem).	FEB 13	ABR 13	FEB 13	JUN 13	100%

2	2	Evaluaciones histológicas de pieles y semillas.	FEB 13	OCT 13	FEB 13	OCT 13	100%
2	2	Evaluaciones de composición fenólica por espectroscopía Raman y UV visible	FEB 13	MAY 13	FEB 13	JUN 13	100%
2	2	Evaluaciones de extractabilidad de compuestos fenólicos.	FEB 13	MAY 13	FEB 13	JUN 13	100%
2	2	Análisis de datos y generación de resultados.	SEP 14	DIC 14	SEP 14	DIC 14	100%
3	3	Configuración y programación de los ensayos en terreno.	NOV 13	ENE 14	NOV 13	MAR 14	100%
3	3	Ensayo de supra-extracción escala piloto y calidad del vino cv. Sauvignon blanc 2014	FEB 14	MAY 14	MAR 14	ABR 14	100%
3	3	Evaluaciones químicas vinos blancos.	JUN 15	AGO 15	JUN 15	AGO 15	100%
3	3	Evaluaciones sensoriales vinos blancos.	JUL 15	AGO 15	JUL 15	AGO 15	100%
3	3	Análisis de tioles y piracinas en uvas y vinos blancos.	JUN 15	JUL 15	JUN 15	JUL 15	100%
3	3	Evaluaciones de composición fenólica de vinos blancos	JUN 15	AGO 15	JUN 15	AGO 15	100%
3	3	Análisis de datos y generación de resultados	JUN 15	AGO 15	JUN 15	AGO 15	100%

3	4	Configuración y programación de los ensayos en terreno.	NOV 14	ENE 15	NOV 14	ENE 15	100%
3	4	Ensayo de supra-extracción escala piloto con/sin maceración pre-fermentativa, cv. Pinot noir 2014.	FEB 14	MAY 14	FEB 14	MAY 14	100%
3	4	Ensayo de supra-extracción afinado en pequeña escala calidad del vino, cv. Pinot noir 2015.	FEB 15	ABR 15	FEB 15	ABR 15	100%
3	4	Evaluaciones químicas vinos tintos cv Pinot noir.	JUN 15	AGO 15	JUN 15	AGO 15	100%
3	4	Análisis composición fenólica vinos tintos cv Pinot noir.	SEP 14 MAY 15	ENE 15 AGO 15	SEP 14 MAY 15	ENE 15 AGO 15	100%
3	4	Evaluaciones sensoriales vinos tintos cv. Pinot noir.	SEP 14 JUN 15	NOV 14 JUL 15	SEP 14 JUN 15	NOV 14 JUL 15	100%
3	4	Análisis de datos y generación de resultados.	SEP 14 JUN 15	ENE 15 AGO 15	SEP 14 JUN 15	ENE 15 AGO 15	100%
3	5	Configuración y programación de los ensayos en terreno.	NOV 13 NOV 14	ENE 14 ENE 15	NOV 13 NOV 14	ENE 14 ENE 15	100%
3	5	Ensayo de supra-extracción escala piloto de tiempo de encubado, cv. Cabernet Sauvignon 2014.	MAR 14	JUN 14	MAR 14	JUN 14	100%

3	5	Ensayo de supra-extracción afinado escala piloto calidad del vino, cv. Cabernet Sauvignon 2015.	MAR 15	MAY 15	MAR 15	MAY 15	100%
3	5	Evaluaciones químicas vinos tintos cv. Cabernet Sauvignon.	JUN 15	AGO 15	JUN 15	AGO 15	100%
3	5	Análisis composición fenólica vinos tintos cv Cabernet Sauvignon.	MAY 15	AGO 15	MAY 15	AGO 15	100%
3	5	Evaluaciones sensoriales vinos tintos cv. Cabernet Sauvignon.	JUN 15	JUL 15	JUN 15	JUL 15	100%
3	5	Análisis de datos y generación de resultados.	JUN 15	AGO 15	JUN 15	AGO 15	100%

6.2. Descripción del avance del período (describa sólo aquellos que han tenido actividad durante el período)

Actividad	Descripción Avance	Problemas y Desviaciones	Repercusiones	Acciones Correctivas
Ensayo de supra-extracción escala piloto y calidad del vino cv. Sauvignon blanc 2015	El ensayo se llevó a cabo en viña Concha y Toro en la región del Maule, con uva Sauvignon blanc proveniente de la misma zona. Este año se encuentra trabajando a cargo del ensayo la alumna tesista del Master Vintage Internacional Patricia Bastos. Los vinos se encuentran finalizando su fermentación alcohólica, luego serán estabilizados por frío y finalmente embotellados para empezar la analítica	La calidad sanitaria de la uva no fue la óptima, encontrándose con una cantidad importante de botrytis cinerea, pero esta no debiera influir en los resultados del ensayo	Por determinar	
Ensayo de supra-extracción escala piloto cv. Pinot noir 2015.	El cv Pinot noir fue procesado y vinificado en dependencias de la viña Undurraga en la comuna de Talagante, a cargo del ensayo se encuentra el alumno residente de la especialidad de enología de la Universidad Católica de Chile Nicolás Tscherevilo. La uva fue vinificada en los tanques de 180 lts hechos para el proyecto. Se hizo maceración prefermentativa de dos días y luego se dio inicio a la FA Finalizada la fermentación alcohólica, los vinos fueron trasladados al laboratorio de enología de la misma universidad en donde están a la espera de comenzar su fermentación	- no hay desviaciones	-	-

	maloláctica, estabilización y análisis químico y sensorial.			
Ensayo de supra-extracción escala piloto de tiempo de encubado, cv. Cabernet Sauvignon 2015.	Por segundo año consecutivo, el ensayo de Cabernet-Sauvignon será realizado en viña Undurraga. La persona a cargo del proceso es Nicolas Tscherevilo. No se contemplaron cambios con respecto al diseño del año anterior.	Sin desviaciones	-	-

7. Hitos Críticos

7.1. Indique el grado de cumplimiento de los hitos críticos fijados:

Nº RE	Hitos críticos	Fecha Programado	% Avance a la fecha	Fecha Real Cumplimiento
1	Dosificadores calibrados y funcionando	Enero 2013	100%	Febrero 2013
2	Determinación de dosis adecuadas de CO2	Diciembre 2013	100%	Febrero 2015
3, 4, 5	Determinación preliminar del efecto de la supra-extracción sobre la calidad del vino	Enero 2015	100%	Febrero 2015
8	Servicio disponible en mercado nacional	Agosto 2015	80%	Febrero- Abril 2016

7.2. Describa el grado de cumplimiento y posibles desviaciones (máx. 200 palabras).

Se ha logrado diseñar, fabricar y calibrar equipos necesarios para llevar a cabo con éxito las aplicaciones de nieve carbónica en uvas para vinificación, mejorando la eficiencia del proceso y del uso del CO2, así como también haciéndola costo-eficiente.

Los procesos de congelado de tejidos de las uvas y la subsiguiente extracción de compuestos de calidad desde las uvas al vino muestra buenos resultados en procesos de vinificación en blanco y en tinto en los cultivares Sauvignon blanc, Pinot noir y Cabernet-Sauvignon. Estos resultados permiten validar la tecnología para su posterior liberación al mercado.

De esta forma se han cumplido la mayoría de los objetivos del proyecto y sin duda la disponibilidad del servicio en el mercado nacional se cumplirá para el desarrollo de la próxima vendimia.

8. Cambios en el entorno

8.1. Tecnológico

Se debe analizar la situación de la investigación básica y aplicada, así como los procesos, innovaciones, patentes, royalties o publicaciones de los agentes que intervienen y ofrecen soluciones en el sector en particular, en terceros relacionados y en toda la cadena de valor (Máx. 170 palabras)

Sin cambios en el entorno tecnológico hasta la fecha.

8.2. Mercado

Refiérase a los ámbitos de: oferta y demanda; competidores; nuevas alianzas comerciales; productos diferenciados, sustitutos o alternativos; mercados emergentes; productividad de los recursos humanos; precios de mercado, liderazgo del costo de producción; tipo de cambio, tasa de interés, disponibilidad de materias primas, barreras de entrada al mercado, tratados de libre comercio, subvenciones o apoyo estatal.

Sin cambios en el entorno de mercado hasta la fecha.

8.3. Otros

Describa cambios en leyes, regulaciones, impuestos, barreras normativas o legales, normas no escritas, normas medio ambientales, responsabilidad social empresarial “dumping” (laboral o ambiental), entre otros.

Sin cambios en otros entornos hasta la fecha.

9. Difusión

9.1. Describa las actividades de difusión programadas para el próximo período.

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Perfil de los participantes	Medio de Invitación
Enero-marzo 2016	Curicó y Talca (VII Reg)	Seminarios de difusión de resultados a la industria Chilena	80 Estimado	Enólogos y jefes de bodega	Plataforma de difusión INDURA/UC y ANIAE
Nov2015	Todos	Publicación en medio especializado	-	Público objetivo del rubro enológico	Digital y papel
2016	Clientes nacionales	Reuniones presenciales	20	Enólogos generantes técnicos	Vía e-mail – telefónico

9.2. Describa las actividades de difusión realizadas durante el período:

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes*	Documentación Generada*
Octubre 2015	Stgo	Charlas enológicas	100 aprox	Gráfica Anexo A 1
2015	Sta. Cruz	Charla Enológica INDURA	50 aprox	Gráfica Anexo A 2
2015	-	Publicación Web	-	Gráfica Anexo A 3

*Debe adjuntar en anexos material de difusión generado y listas de participantes

10.Auto Evaluación

10.1. ¿Considera que su proyecto logrará insertar en el mercado el bien o servicio o mejorar la competitividad? Explique (máx. 80 palabras)

Sí.

Esta afirmación se fundamenta en base a dos factores. El primero es la tecnología actualmente disponible, el producto del proyecto logrará mejorar una aplicación que hoy en día es sumamente ineficiente pero que aún así se realiza ampliamente en el mercado vitivinícola. Como segundo factor se presentan equipos calibrados y validados para este uso y procesos que han sido una mejora, demostrada científicamente respecto de su impacto sobre la calidad del vino.

10.2. ¿Cómo evalúa los resultados obtenidos en función del objetivo general del proyecto? (máx. 80 palabras)

La evaluación de los resultados lleva a concluir que los objetivos se han cumplido de acuerdo a la programación planteada en el proyecto. Los resultados de los ensayos demuestran el potencial de esta tecnología para aumentar el valor agregado al producto.

10.3. ¿Cómo evalúa el grado de cumplimiento de las actividades programadas? (máx. 80 palabras)

El grado de cumplimiento es alto. Se trabaja en la inserción del servicio en el mercado.

10.4. ¿Cómo ha sido la participación de los asociados? (máx. 80 palabras)

La Pontificia Universidad Católica de Chile y Viña Undurraga han cumplido con su participación y compromisos con el proyecto.

11. Conclusión

11.1. Concluya y explique la situación actual de la iniciativa, considerando amenazas u oportunidades (máx. 230 palabras).

El proyecto se encuentra terminado y sus objetivos cumplidos. Este proyecto ha permitido fabricar y calibrar nuevos equipos dosificadores de CO₂ y validar nuevos procesos de extracción en uvas para vinificación cvs Pinot noir, Cabernet Sauvignon y Sauvignon blanc a través del desarrollo de ensayos controlados en laboratorio y ensayos a escala piloto, los cuales se acompañaron paralelamente con ensayos de congelación a escala de laboratorio, tanto para uva tinta como para uva blanca, con el fin de poder evaluar de manera más exhaustiva los efectos producidos por la supraextracción.

Los resultados en detalle se encuentran en los documentos anexos a este informe. Entre los principales resultados obtenidos se puede mencionar un aumento de la eficiencia en el uso del CO₂, disminuyendo hasta 0,18 kg CO₂/kg uva y mejoras en la calidad de los vinos: aumento del color y aumento de antocianinas en caso de los vinos tintos.

Dentro de los próximos meses se realizarán actividades de difusión de los resultados del proyecto y la puesta en mercado del servicio. El nuevo dosificador de CO₂ funciona de manera óptima y su uso para congelar uvas y mejorar procesos de extracción ha sido comprobado científicamente

Santiago, 9 de octubre de 2015
N°14753 /15

INFORME

Resumen Gráfico Difusión

ANEXO A

SOPORTE GRAFICO

Soporte Gráfico	
1 Charla Enológica 2015 Stgo	
2 Charla Enológica INDURA, Santa Cruz	 O' PORTAL O'HIGGINS noticias, turismo y emprendimiento PORTADA REGIONAL TURISMO EMPRENDIMIENTO Montepío San Fernando Valdivia Temuco Bío Bío Concepción Talca San Vicente La Delfina Llanquihue Maitencillo Hualde Panguel Osorno Chilo INDURA capacitó a enólogos y jefes de bodega en Santa Cruz O' Portal O'Higgins 09 de octubre de 2015 14:30 hrs Montepío San Fernando Valdivia Temuco Bío Bío Concepción Talca San Vicente La Delfina Llanquihue Maitencillo Hualde Panguel Osorno Chilo La actividad permitió a enólogos de la Región de O'Higgins conocer en profundidad sobre técnicas innovadoras de viticultura y enología, además de intercambiar experiencias y conocimientos con la producción de vinos de alta calidad.  Más de 40 enólogos y jefes de bodega de la zona de O'Higgins se reunieron en la ciudad de Santa Cruz para recibir una capacitación sobre conocimientos relacionados con la producción de vinos, brindados por INDURA. Las participaciones gratuitas estuvieron acompañadas por el WINE TASTING con Bodega Casanova y un recorrido sobre vinos vinculados con la sostenibilidad de empresas que valoran calidad al vino, además de conocer técnicas e innovaciones vitícolas que se producen durante el proceso de elaboración.

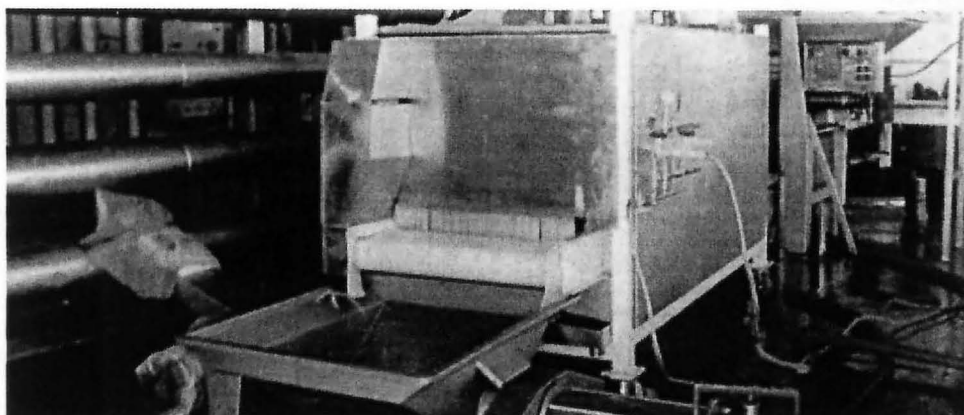


Dos realidades de la noticia regional

Portada Actualidad Educación Salud Ambiental Cultura Social Deporte
Emprendimientos Energía Literatura Experiencias Turismo Contacto Somos

Sistema de enfriamiento superficial de uvas

Actualidad -



En una actividad que reunió a más de 40 enólogos y jefes de bodega de la zona de Santa Cruz, el académico Álvaro González, dio a conocer el proyecto que desarrolla la institución académica junto a Indura, con recursos del Fundación de Innovación Agraria y de la compañía, el cual utiliza anhídrido carbónico para mejorar la extracción de compuestos aromáticos durante la vinificación.

"La investigación tiene como objetivo generar un prototipo que pueda ser utilizado con éxito durante la producción de vinos premium, que utiliza un sistema de enfriamiento superficial de uvas en base a CO2

Pontificia Universidad Católica de Chile
Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal
Departamento de Fruticultura y Enología

Influencia del congelamiento parcial de la película de las bayas en la extracción de compuestos fenólicos y calidad del vino Pinot Noir y Cabernet-Sauvignon

Proyecto de Título presentado como parte de los
requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo

Nicolás Alexander Tscherebilo Lobos

Profesor Guía: Edmundo Bordeu Schwarze, Ing. Agr., Enólogo, Ph. D.

Agosto, 2015

PATROCINIO

Este proyecto fue financiado con aportes provenientes del **FIA** (Fundación para la innovación agraria) código PYT-2012-0054: “Nuevos procesos de extracción en uva para vinificación con dióxido de carbono”, la empresa ejecutora **INDURA S.A.** y la **Viña Undurraga** quien colaboró con la materia prima y el espacio físico para las vinificaciones.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que me apoyaron durante este proceso, en especial a los profesores que estuvieron desde un inicio con inmensa disponibilidad respondiendo dudas y solucionando problemas, Edmundo Bordeu y Alvaro González.

A todos los que estuvieron conmigo durante el desarrollo de esta investigación, tanto en la Viña Undurraga como en el laboratorio de enología de la universidad.

A Alejandra Zuñiga por su ayuda y paciencia infinita en todas las etapas de esta investigación.

A todos mis amigos con una mención especial a C. Berrios, J. Donoso, J. Bull, J. Zapata y F. Faúndez que sin ellos el paso por la universidad no hubiese sido lo mismo.

Finalmente quiero detenerme a agradecer con mucho cariño a mi familia, sin ellos nada de esto sería posible, gracias por el apoyo de todos estos años y por acompañarme en el camino.

En memoria de Oleg Tscherebilo Sizanova

INDICE

	Página
1. RESUMEN DE PROYECTO DE TÍTULO DE	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. Introducción	3
3.2. Composición de la película de la baya	3
3.3. Técnicas de extracción a baja temperatura	5
3.3.1. Maceración en frío	5
3.3.2. Crio extracción	5
3.3.3. Supra extracción	6
3.4. Compuestos fenólicos y su evolución dentro del vino	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. Materia prima	8
4.2. Diseño experimental	8
4.3. Ensayo de laboratorio	9
4.4. Ensayo industrial	11
4.5. Medición temperatura durante el ensayo industrial	14
4.6. Medición del gasto y eficiencia de CO ₂ durante el ensayo industrial	14
4.7. Vinificación	15
4.8. Análisis químicos de mostos y vinos	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
5.1. Experimento congelación de laboratorio	20
5.1.1. Desarrollo de las temperaturas durante prueba de laboratorio	20
5.1.2. Composición química del macerado al final del experimento de laboratorio	21
5.1.3. Evolución de color del macerado durante el experimento laboratorio	21
5.2. Ensayo industrial	24
5.2.1. Proceso de congelación	24
5.2.2. Gasto CO ₂	25
5.2.3. Temperaturas de la uva durante el proceso de congelación	26
5.2.4. Composición del mosto antes de la fermentación	27
5.2.5. Evolución de la fermentación	28
5.2.6. Composición química básica del vino	30
5.3. Desarrollo de color y compuestos fenólicos	30
5.3.1. Evolución de la intensidad colorante	30
5.3.2. Evolución del matiz	32
5.3.3. Evolución de los compuestos fenólicos totales (DO 280)	33
5.3.4. Antocianas y taninos totales en el vino terminado	34
5.3.5. Intensidad colorante y matiz de los vinos finales a igual pH y sin influencia del sulfuroso según el protocolo de Iland	35
6. CONCLUSIONES	37
7. LITERATURA CITADA	38

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Análisis químicos básicos realizados en el experimento de laboratorio en uva Pinot Noir	21
Tabla 2. Gasto de CO ₂ , rendimiento de CO ₂ y tiempo de residencia de las bayas en cada repetición del tratamiento de congelación para Pinot Noir	25
Tabla 3. Gasto de CO ₂ , rendimiento de CO ₂ y tiempo de residencia de las bayas en cada repetición del tratamiento de congelación para Cabernet Sauvignon	25
Tabla 4. Temperaturas de entrada y salida del equipo de congelación medida en la película de la uva Pinot Noir y Cabernet Sauvignon despalillada	26
Tabla 5. Análisis químicos básicos realizados en el ensayo industrial en uva Pinot Noir después de la corrección	27
Tabla 6. Análisis químicos básicos realizados en el ensayo industrial en uva Cabernet Sauvignon	28
Tabla 7. Composición química básica de vino terminado Pinot Noir	30
Tabla 8. Análisis químicos en vino terminado Cabernet Sauvignon	30
Tabla 9. Antocianas y taninos totales en el vino terminado Pinot Noir para el ensayo industrial	34
Tabla 10. Antocianas y taninos totales en el vino previo maceración postfermentativa y vino terminado Cabernet Sauvignon para el ensayo industrial	35
Tabla 11. Resultados según protocolo Iland para vino terminado Pinot Noir	35
Tabla 12. Resultados según protocolo Iland para vino terminado Cabernet Sauvignon	36

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Composición de la película de la baya. C: Cutícula, EP: Epidermis e Hipodermis	4
Figura 2. Bandejas de uva Pinot Noir para el experimento de laboratorio. Izquierda testigo y derecha tratamiento de frío con CO ₂ sólido	10
Figura 3. Unidades experimentales para el experimento de laboratorio	11
Figura 4. Izquierda: Despalilladora. Centro: Segunda estación de control de calidad. Derecha: Pallets con gamellas de uva Cabernet Sauvignon	12
Figura 5. Izquierda: Banda transportadora y ventiladores luego durante el proceso de congelación. Derecha: Dispensador de CO ₂ al interior del equipo	13
Figura 6. Izquierda: Panel de control para las velocidades de las bandas transportadoras. Centro: Llaves de paso para activar los dispensadores al interior del equipo. Derecha: "Portacryo" estanque de 2 toneladas de CO ₂	13
Figura 7. Izquierda: Uva saliendo de la máquina con los dispensadores de CO ₂ cerrados Derecha: Uva saliendo de la máquina con los dispensadores CO ₂ abiertos	14
Figura 8. Izquierda: Técnicos instalando los sensores de la balanza en donde se colocará el "Portacryo". Derecha: Pantalla y panel de control de la balanza	15
Figura 9. Izquierda: Cuba que corresponde a una unidad experimental. Derecha arriba: Cromatografía en papel con malolactica incompleta. Derecha abajo: Cromatografía en papel con malolactica terminada	18
Figura 10. Evolución de la temperatura durante el ensayo de congelación de laboratorio	20
Figura 11. Evolución de la intensidad colorante del macerado de uvas Pinot Noir congeladas y testigo durante el desarrollo del experimento de laboratorio	22

Figura 12. Evolución del matiz del macerado de uvas Pinot Noir congeladas y testigo durante el desarrollo del experimento de laboratorio	23
Figura 13. Evolución de los compuestos fenólicos del macerado de uvas Pinot Noir congeladas y testigo durante el desarrollo del experimento de laboratorio	24
Figura 14. Evolución de la temperatura (termocupla) antes y después de pasar por la máquina dispensadora de CO ₂ para los dos tratamientos en Pinot Noir	27
Figura 15. Curvas de densidad y temperatura promedio durante la fermentación de Pinot Noir en el ensayo industrial	29
Figura 16. Curvas de densidad y temperatura promedio durante la fermentación de Cabernet Sauvignon en el ensayo industrial	29
Figura 17. Evolución de la intensidad colorante durante la fermentación de Pinot Noir en el ensayo industrial	31
Figura 18. Evolución de la intensidad colorante durante la fermentación de Cabernet Sauvignon en el ensayo industrial	31
Figura 19. Evolución del matiz durante la fermentación de Pinot Noir en el ensayo industrial	32
Figura 20. Evolución del matiz durante la fermentación de Cabernet Sauvignon en el ensayo industrial	32
Figura 21. Evolución de los compuestos fenólicos durante la fermentación de Pinot Noir en el ensayo industrial	33
Figura 22. Evolución de los compuestos fenólicos durante la fermentación de Cabernet Sauvignon en el ensayo industrial	34

1. RESUMEN PROYECTO DE TÍTULO DE

Nicolás Alexander Tscherebilo Lobos para el título de Ingeniero Agrónomo presentado el 26 de agosto de 2015. Título: **Influencia del congelamiento parcial de la película de las bayas en la extracción de compuestos fenólicos y calidad del vino Pinot noir y Cabernet sauvignon.**

Resumen aprobado: Sr. Edmundo Bordeu Schwarze

La supra extracción nació como una posibilidad para aumentar la concentración de los compuestos extractables que existen en la piel de la baya. Esta corresponde a una congelación parcial de la película, la que forma cristales de agua que dañan la estructura celular generando una extracción más fácil de polifenoles como antocianas y proantocianidinas mejorando las características de color y sensoriales del vino.

La congelación de la uva se logró con un equipo diseñado por INDURA en el que por dispensadores de CO₂ sólido lograban llegar a temperaturas de hasta -40 grados Celsius dentro de la cámara del equipo. Se realizaron dos experimentos a escala semi industrial. En los cepajes Cabernet-Sauvignon y Pinot noir Existieron 3 unidades experimentales por tratamiento los cuales fueron con congelación (frío) y sin congelación (testigo). La fermentación alcohólica clásica fue exactamente igual para todas las repeticiones. Este proceso se llevó a cabo en las instalaciones de la Viña Undurraga

.Los resultados obtenidos muestran una mejor extracción y mejores colores en las fases tempranas de la vinificación pero las diferencias con el testigo tienden a disminuir hacia el final de la maceración.

2. ABSTRACT

Supra extraction is a technique that can be used to increase the extraction of phenolic compound from the grapes skin. By freezing the skin, the water found crystalizes and damages the cell structure making easier the extraction of polyphenols, anthocyanins and proanthocyanidins.

The freezing of the grape was achieved by using a machine designed by INDURA. This machine consists on solid CO₂ dispensers which creates temperatures as low as -40°C inside its chamber..Two experiments one with Cabernet-Sauvignon and another with Pinot noir were planned. There were 3 experimental units per treatment which were with freezing and without freezing (control). The classic alcoholic fermentation was exactly the same for all the treatments.

The results show a better extraction, resulting in better color, in particular early in wine making but the differences with the control become smaller when maceration is extended.

3. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Introducción

La calidad de un vino está determinada por su composición química, fenólica y aromática. Gran parte de estos compuestos son extraídos desde la película de las bayas durante los procesos de maceración, ya sea, pre fermentación alcohólica, durante o post fermentación. Existe la posibilidad de lograr una extracción más eficiente si se utilizan las técnicas apropiadas. En este caso, gracias a la aplicación de dióxido de carbono en su estado sólido, se puede congelar parcialmente la piel de las bayas generando una cristalización del agua existente dentro de las células de esta. Esta cristalización y aumento en tamaño del agua de las células, genera la ruptura interna de las membranas celulares para tener como resultado una mejor extracción de los compuestos mencionados anteriormente.

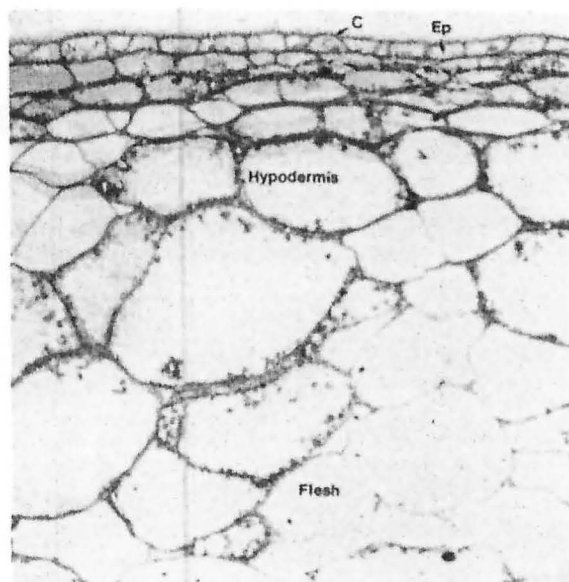
Otro aspecto que es importante mencionar, es que al aplicar dióxido de carbono en cualquier estado en la uva, mosto o vino, se está protegiendo del oxígeno para evitar cualquier tipo de oxidación.

El objetivo principal de esta investigación es mejorar la calidad del vino por acción del dióxido de carbono a través del equipamiento desarrollado por INDURA, junto con aumentar la eficiencia del gasto de CO₂, para lograr el efecto de congelación.

La meta es lograr un aumento en la calidad del vino terminado para tener así, un aumento del precio por botella. INDURA, con esta investigación, busca desarrollar y mejorar nuevas tecnologías útiles para el mundo de la enología.

3.2. Composición de la película de la baya

La película de la baya corresponde a un 5-10% del total peso seco de la baya y su función principal es la de proteger de daños físicos, climáticos, infecciones y la posible deshidratación. La piel de la uva se puede dividir en tres capas principalmente, La capa más externa, la cutícula, es una capa compuesta por ácidos grasos hidroxilados y está cubierta por una capa cerosa hidrofóbica. La epidermis es la capa intermedia y esta consiste en una capa de una o dos células generalmente. Por último tenemos la hipodermis, esta está compuesta por varias capas de células y contiene la mayor parte de los compuestos fenólicos de la piel. (Pinelo *et al.*, 2006).



Fuente: Ribereau-Gayon *et al.*, 2006.

Figura 1. Composición de la película de la baya. C: Cutícula, EP: Epidermis e Hipodermis.

Es importante tener en cuenta que la pared celular es altamente compleja y dinámica al momento de formar vínculos con otras células y proteger compuestos aromáticos y fenólicos y estructuras internas de cada una. La estructura de la pared está formada casi en su totalidad por hemicelulosa, proteínas que mantienen la cohesión y fluidez y por último las pectinas. Según Ortega-Regules *et al.* (2005) en la pared celular la celulosa y las pectinas podrían alcanzar hasta un 40% del total de los polisacáridos que podemos encontrar en esta pared.

Para extraer todos estos compuestos que encontramos dentro de las células de la baya durante la maceración, es necesario romper la pared celular. Hay más de un factor a considerar para lograr una buena extracción fenólica, como por ejemplo, la concentración inicial en la baya, la madurez, el uso de las técnicas enológicas y por último como mencionamos antes, la composición de la pared celular.

Algunas técnicas que se usan en la actualidad para lograr una mejor extracción son las maceraciones en frío, la adición de enzimas que degraden la pared celular y el controlar apropiadamente los tiempos de maceración dentro de otras (Pérez, 2013).

3.3. Técnicas de extracción a baja temperatura

Como se mencionó con anterioridad, es necesario romper la pared celular para extraer satisfactoriamente los compuestos que se encuentran almacenados al interior de las células. Durante una vinificación normal, los dos factores que más influyen la extracción son la temperatura y el tiempo de maceración (OIV, 2015).

3.3.1. Maceración en frío

Esta es la técnica más usada por los enólogos en la actualidad y de la que se cuenta mayor información disponible. Consiste en dejar la uva despalillada o molida a bajas temperaturas (10 a 15°C) durante algunos días previo al inicio de la fermentación. A través de difusión y reacciones enzimáticas se logra aumentar la concentración de compuestos aromáticos y colorantes en el mosto y de esta manera existe una mejoría en las características finales del vino.

Una de las prácticas más comunes en este tipo de tratamiento, es cosechar la uva en horas de baja temperatura, prefiriendo las noches y las mañanas para la cosecha. Esto se hace para disminuir los costos energéticos asociados a bajar la temperatura inicial de la materia prima. Cuando el mosto está dentro de las cubas de fermentación, la temperatura se controla con las chaquetas instaladas al exterior de esta. Alegria *et al.* (2014).

Según Heatherbell *et al.* (1996) en una maceración en frío en Pinot Noir no encontraron diferencias entre los tratamientos, solo en el caso de agregar una dosis de SO₂ aumentaría el contenido de antocianinas en el vino joven, pero estas diferencias se desaparecen en el vino. Según Watson *et al.* (1995) con una pre maceración en frío la concentración de antocianinas, la intensidad colorante y los flavonoles fueron menores en el vino con tratamiento de frío que en el testigo.

En contraposición, De Santis (2010) afirma que la maceración en frío aumenta la extracción de los compuestos fenólicos, en particular las antocianinas.

3.3.2. Crio extracción

Esta técnica fue desarrollada principalmente para ser usada en vinos blancos, pero con el tiempo, se ha empezado a utilizar en vinos tintos para mejorar su calidad.

Los racimos completos son congelados llevándolos a temperaturas de -2°C y se mantienen ahí durante 1 a 2 días aproximadamente, para luego ser prensada a bajas temperaturas. Al usar este método, generalmente se tiene como resultado un aumento en la concentración de los azúcares y algunos compuestos aromáticos especialmente en uva sobremadura. Parenti *et al.* (2003).

Se pueden obtener 2 tipos distintos de mosto, el primero con una mayor concentración de azúcares se obtiene con el primer prensado, y este prensado se realiza cuando todavía queda parte de la uva congelada. Este mosto se considera de mejor calidad para hacer vinos tipo “ice wine” por su alto contenido de azúcar. El segundo mosto de más baja calidad se obtiene con un segundo prensado de la uva una vez que esta se descongelo por completo y se encuentra a temperatura ambiente. El mosto obtenido con este segundo prensado tiene una menor concentración de azúcares.

Para esta técnica, es necesario tener una cosecha manual, ya que si se hace mecánicamente, se vuelve menos eficiente porque ya se liberó parte del mosto previo a cualquier tipo de tratamiento de frío, Alegria (2014).

3.3.3. Supra extracción

La técnica de la supra extracción es una derivación del método anterior y también se usa principalmente en vinos blancos. En la actualidad se ha empezado a aplicar cada vez más en variedades tintas.

Este método se enfoca en congelar la uva para que se formen cristales de hielo al interior de las células, este cristal destruye la pared celular para que cuando la uva se descongele se puedan extraer más compuestos. En vinos con maceración, este tratamiento acelera la extracción de estos compuestos.

Se pueden encontrar cambios como, una mayor concentración de azúcares aumentando el grado de alcohol probable y un aumento en la extracción de los precursores aromáticos propios de la variedad que se expone al frío. Threlfall *et al.* (2003).

Para este caso se utiliza dióxido de carbono sólido para congelar las bayas, en adición a su efecto congelante, se logra una protección contra la oxidación. Esto ocurre gracias a la sublimación del sólido generando una capa gaseosa que desplaza al oxígeno. Frissant *et al.* (2012).

Alegría (2014) menciona que con el daño que se genera con este tipo de congelación, se logra un aumento en la extracción total de catequinas, proantocianidinas y fenoles.

3.4. Compuestos fenólicos y su evolución dentro del vino

Los compuestos fenólicos generalmente se dividen en dos grupos, los flavonoides y los no flavonoides.

De todos estos compuestos, lo que más influencia tienen en el color y la evolución sensorial son las antocianas y los flavanoles (Zamora, 2003).

Las antocianas son las que entregan el color a las uvas tintas y estas se encuentran en forma de glucósidos. Las 5 antocianas encontradas en uvas tintas son: 3-D-glucósidos de malvidina, delfinidina, peonidina, cianidina y de petunidina, las cuales están unidas o acilados con los ácidos acético, cafeico o p-cumárico (Zoecklein *et al.*, 2001). En vinos blancos los flavanoles son los que entregan el color amarillo. Estos son la quercetina, miricetina y kaemferol y sus glicósidos. Estos compuestos también se pueden encontrar en vinos tintos en concentraciones que varían entre los 4,6 y 41,6 mg/L (McDonald *et al.*, 1998).

Las antocianas en la mayoría de las variedades tintas las encontramos al interior de las vacuolas de las células de la epidermis y la primera capa de la hipodermis, por esta razón es tan importante poder penetrar las paredes celulares, porque la mayor concentración del color de la uva está ahí. El color de estos pigmentos está directamente relacionado al pH del medio en el que se encuentra, pero existe un fenómeno llamado copigmentación que se refiere a las interacciones entre antocianas y/o otros elementos existentes en el medio. Estas relaciones pueden modificar el color y hacen que este no solo dependa del pH del vino (Flanzy, 2003). Las antocianas en medios ácidos tienen a tomar un color más rojizo y mientras el pH aumenta, el color se va tornando más azulado para luego pasar a matices más amarillentos (Ribéreau- Gayon, 2006). Todos estos cambios en coloración son reversibles exceptuando las pérdidas de color generadas por la oxidación del vino.

Las antocianas también sufren cambios debidas al SO₂. Al estar en la presencia de este, las antocianas sufren de un blanqueamiento generando una pérdida de color.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Materia prima

En esta investigación se llevaron a cabo 3 experimentos principales. Para el experimento de congelación con maceración controlada en el laboratorio, se utilizó uva de la variedad Pinot Noir proveniente del predio de la Viña Aquitania en el Valle del Malleco. Para los experimentos a escala industrial se ocupó uva de las variedades Pinot Noir y Cabernet Sauvignon de la cosecha 2015. Estas vienen del Valle de Leyda de los terrenos de la Viña Undurraga y del Valle del Maipo en Isla de Maipo respectivamente, y fue aportada por la Viña Undurraga.

La uva fue cosechadas a mano y transportada a la bodega en gamellas con un peso aproximado de 10 Kg cada una.

4.2. Diseño experimental

Para los tres experimentos se mantuvo la misma dinámica, donde solo se realizaron dos tratamientos, uno donde se congelaba la uva con CO₂ sólido (nos referiremos a este como “Frío”) y su contraparte el “Testigo” el cual no se le aplicó tratamiento alguno.

Para el ensayo industrial se tuvo dos tratamientos, uno correspondiente al congelado y el otro al testigo, para cada tratamiento hubo tres repeticiones, teniendo en total seis unidades experimentales. Para cada ensayo se contaban con aproximadamente 6 pallets llenos de gamellas con la uva. Para que las unidades experimentales fueran homogéneas entre ellas, se aleatorizó la forma de ir cargando la línea de producción seleccionando uva de los distintos pallets para que todas las unidades experimentales sean iguales. Fueron necesarios aproximadamente 1000 Kg de uva por tratamiento, es decir, un aproximado de 2000 Kg de uva Pinot Noir y otros 2000 Kg de Cabernet Sauvignon para llenar los 6 tanques fermentadores de 180 L que se usaron para cada ensayo industrial, estos se llenaron hasta los 150 L aprox. Estas cubas se conectaron al sistema de frío de la Viña para controlar la temperatura.

Una vez terminado el proceso de fermentación alcohólica se tomaron 15 L de la gota de cada unidad experimental y se llevó a las instalaciones de la universidad para que realizaran la fermentación maloláctica, su posterior embotellado y análisis químicos.

4.3 Ensayo de laboratorio

Para el experimento del laboratorio se realizaron 4 repeticiones por tratamiento llegando a un total de 8 unidades experimentales. Cada unidad experimental consistía en una bandeja de aluminio donde se colocaban 371 g de uva despallada seleccionada al azar dentro de racimos similares.

En este experimento, se realizó una clasificación de los racimos a utilizar para tener una selección lo más homogénea posible. El despallado de estos racimos fue manual teniendo la precaución de no reventar las bayas para evitar cualquier tipo de maceración no deseada.

Una vez separadas las 8 bandejas de aluminio se le extendió una capa de nieve carbónica en el fondo a las 4 bandejas que serían las unidades experimentales para el tratamiento de frío. Se prosiguió a agregar una capa de bayas (371 g por bandeja) intentando no dejar bayas montadas entre ellas para lograr tener un mejor contacto con la nieve carbónica en el caso de las repeticiones con el tratamiento. A las 4 bandejas con la base de nieve carbónica luego de agregar la uva se tapó con otra capa de nieve carbónica para luego tapar todas las unidades experimentales con film plástico y tapas de cartón.

Al mismo tiempo, se prepararon las 4 bandejas testigo con exactamente la misma cantidad de uva, con la diferencia de que a estos no se les agregó nieve carbónica.

A todas las bandejas se le midió la temperatura cada 15 minutos con un termómetro infrarrojo. Las lecturas se realizaron desde el minuto 0 hasta que se determinara que las uvas con el tratamiento de frío se descongelaron satisfactoriamente. Las mediciones se realizaron por los siguientes 150 minutos.

Con las 8 bandejas descongeladas, se procedió a moler las bayas apretándolas cuidadosamente con las manos para evitar pérdidas de mosto. Una vez terminada la molienda, el contenido de cada bandeja se depositó dentro de frascos idénticos claramente rotulados.

Para evitar el inicio de la fermentación, a cada frasco se le adicionó una dosis de 3 g/HL de natalicia y de SO_2 (3 g/HL) para eliminar cualquier tipo de bacterias y levaduras. Cada frasco quedó con un aproximado de 325 ml considerando el mosto y los orujos de las uvas. Para asemejar la extracción a la realidad, se agregó a cada frasco alcohol técnico al 96% hasta alcanzar un volumen de 12% de alcohol en la mezcla.

Para evitar cualquier tipo de efecto del oxígeno en las unidades experimentales, cada vez que se abrieron los contenedores, previo al obturado de estos, se remplazaba todo el espacio libre con nitrógeno gaseoso. Todas las unidades experimentales fueron guardadas en el refrigerador a 4°C durante todo el periodo del experimento.

Durante la semana que duró este experimento, se hicieron muestreos diarios realizados a la misma hora todos los días para conocer el desarrollo de la maceración y la extracción de compuestos colorantes.

El muestreo diario consistió en tomar 2 ml en tubos Eppendorf de cada unidad experimental para luego centrifugar las muestras por 5 minutos a 4000 rpm. Para no alterar la concentración de las unidades experimentales, cada vez que se tomaron muestras, se devolvió el mismo volumen de una solución de agua destilada con alcohol técnico al 12%.

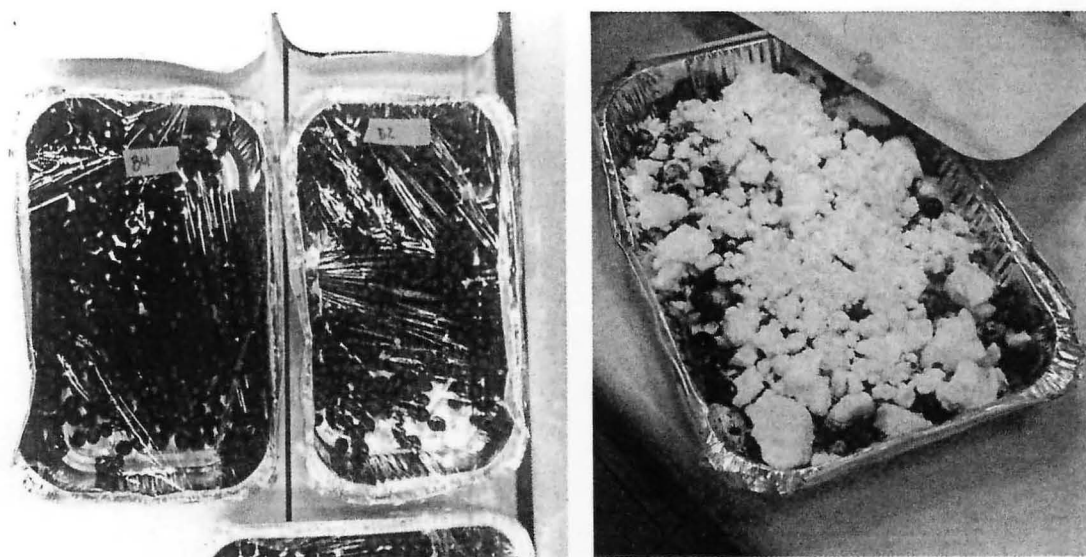


Figura 2. Bandejas de uva Pinot Noir para el experimento de laboratorio. Izquierda testigo y derecha tratamiento de frío con CO₂ sólido.



Figura 3. Unidades experimentales para el experimento de laboratorio.

4.4. Ensayo industrial

En los ensayos a escala industrial se utilizó uva de buena calidad, esta uva fue cosechada a mano y almacenada en una cámara de frío previo su procesamiento. La línea de producción fue ensamblada será descrita a continuación. Las gamellas de los distintos pallets se descargaban en una primera mesa de selección donde se eliminaba todo lo que no fuesen racimos sanos, como por ejemplo, hojas, madera o uva con algún tipo de defecto. Los racimos limpios luego subían por un elevador para ser depositados en una despalladora sin los rodillos para moler la uva. Una vez despalladas, las bayas pasaban por una segunda mesa de selección donde se hacía una limpieza más específica donde se eliminaban restos del raquis, bayas enfermas y cualquier otro material que podría haber pasado la primera revisión. Las bayas luego suben por un segundo elevador que las deja caer en la entrada de la máquina congeladora diseñada por INDURA (Esta máquina será descrita más adelante). Para la uva con el tratamiento de frío, se encendían los dispensadores de CO_2 y para tener una igualdad de condiciones, la uva testigo también se hizo pasar por la máquina pero esta vez con todos los dispensadores apagados. Al salir de la máquina, la uva subió por un tercer y último elevador donde para el caso de Pinot Noir lo llevaría directo a las cubas de fermentación para luego

moler la uva con un pisón metálico dentro de estas. Para el Cabernet Sauvignon se mejoró el proceso, luego del tercer elevador, la uva pasaba por el moledor de rodillos y era recibida en un bins previamente desinfectado. Esta uva luego se pasaba con baldes para el llenado de cada unidad experimental o cuba.

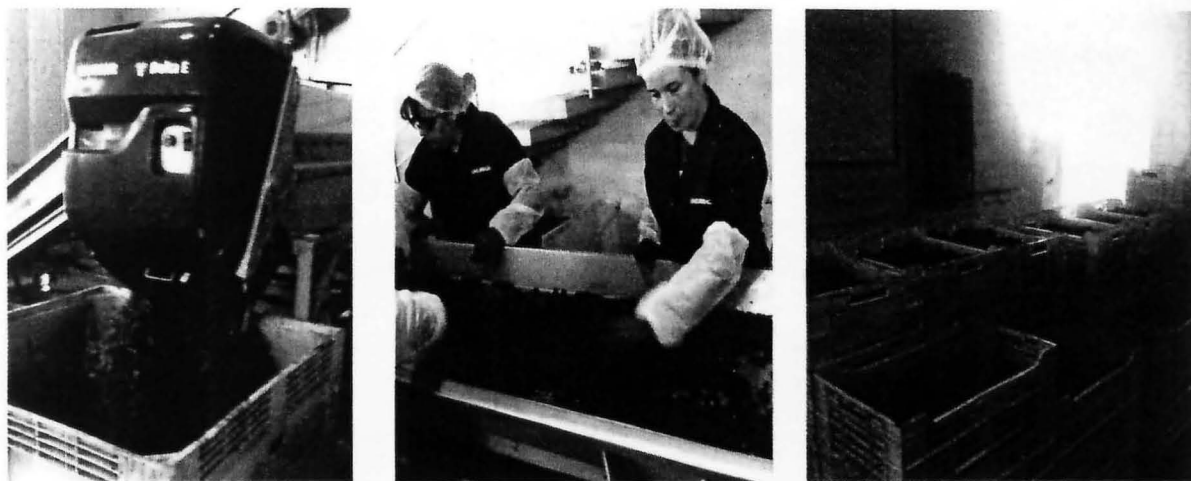


Figura 4. Izquierda: Despalilladora. Centro: Segunda estación de control de calidad. Derecha: Pallets con gamellas de uva Cabernet Sauvignon.

La máquina diseñada para congelar la película de la baja consiste en 5 bandas transportadoras que se encargan de hacer avanzar las bayas por su interior el tiempo requerido para su congelamiento parcial. El tiempo aproximado que toma en recorrer el interior de la máquina es de entre 3 y 3.5 minutos. Además de las bandas transportadoras, el equipo tiene 10 dispensadores de CO_2 (2 a cada altura de las bandas transportadoras) para la difusión del refrigerante al interior del equipo. Además de los dispensadores, hay instalados 4 ventiladores, 2 a cada lado para generar un flujo de aire en el interior y permitir la sublimación de la nieve carbónica y así bajar la temperatura de las bayas. Para conocer la temperatura al interior del equipo en todo momento, existen termómetros instalados directamente en los dos lados de este.

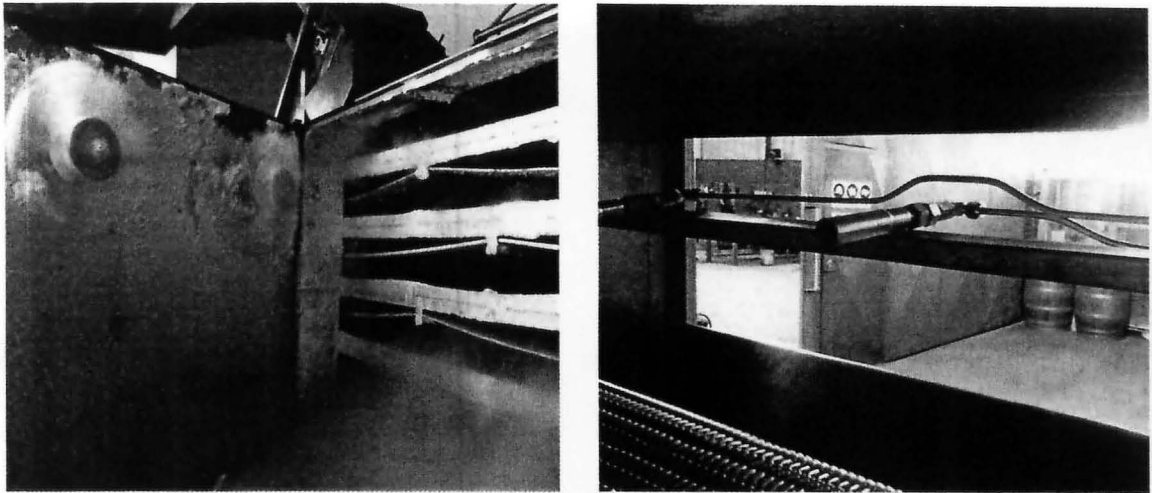


Figura 5. Izquierda: Banda transportadora y ventiladores luego durante el proceso de congelación. Derecha: Dispensador de CO₂ al interior del equipo.

La máquina está capacitada para poder cambiar la velocidad de las bandas con un panel de control que está en uno de los costados del equipo. Además de poder controlar la velocidad, también se pueden activar o desactivar las parejas de dispensadores y regular su flujo con una serie de válvulas que controlan el ingreso del CO₂.

El CO₂ que se ocupó en este ensayo fue aportado por INDURA. Para suplir con las demandas de este equipo, fue necesario traer un tanque especializado llamado "Portacryo". Este tiene una capacidad de almacenamiento de 2 toneladas de CO₂.

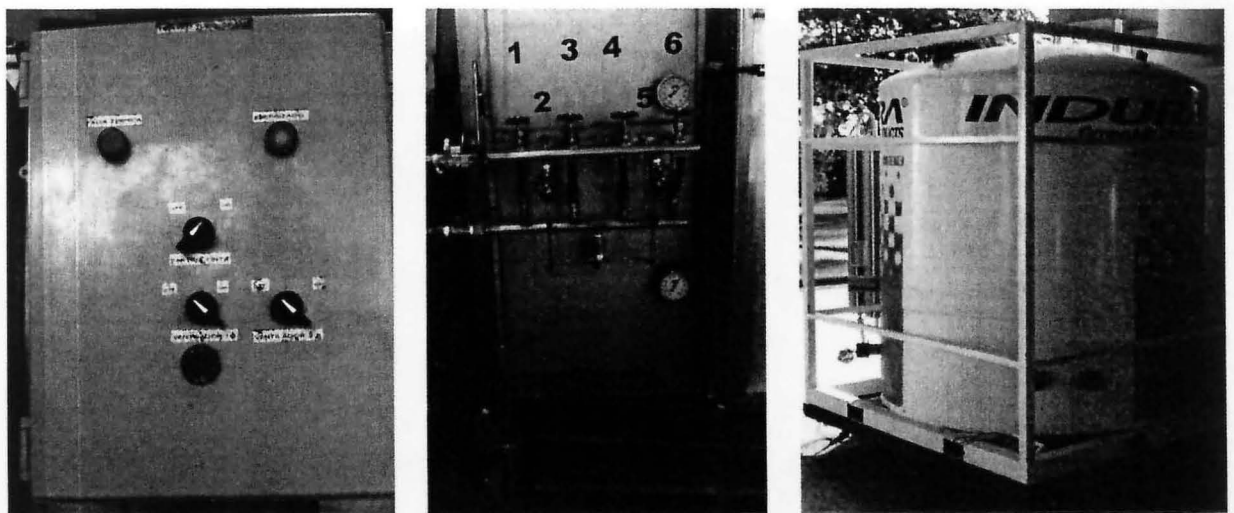


Figura 6. Izquierda: Panel de control para las velocidades de las bandas transportadoras. Centro: Llaves de paso para activar los dispensadores al interior del equipo. Derecha: "Portacryo" estanque de 2 toneladas de CO₂.

4.5. Medición temperatura durante el ensayo industrial

Se intentó medir la temperatura durante el proceso completo con dos instrumentos distintos, una termocupla y un termómetro infrarrojo, para medir respectivamente la cara interna de la piel de la baya perforando la baya y la temperatura superficial. Se realizaron mediciones a la entrada y a la salida del equipo tanto para el tratamiento de frío como para el testigo. Para el Pinot Noir no existió la posibilidad usar un termómetro infrarrojo por lo tanto solo se utilizó la termocupla. Las mediciones se realizaron cada 2 minutos durante todo tiempo que duró el proceso.

Las mediciones con la termocupla refleja las temperaturas de las bayas individuales mientras que el lector infrarrojo nos entrega la lectura de la masa de fruta que entra o sale del equipo.

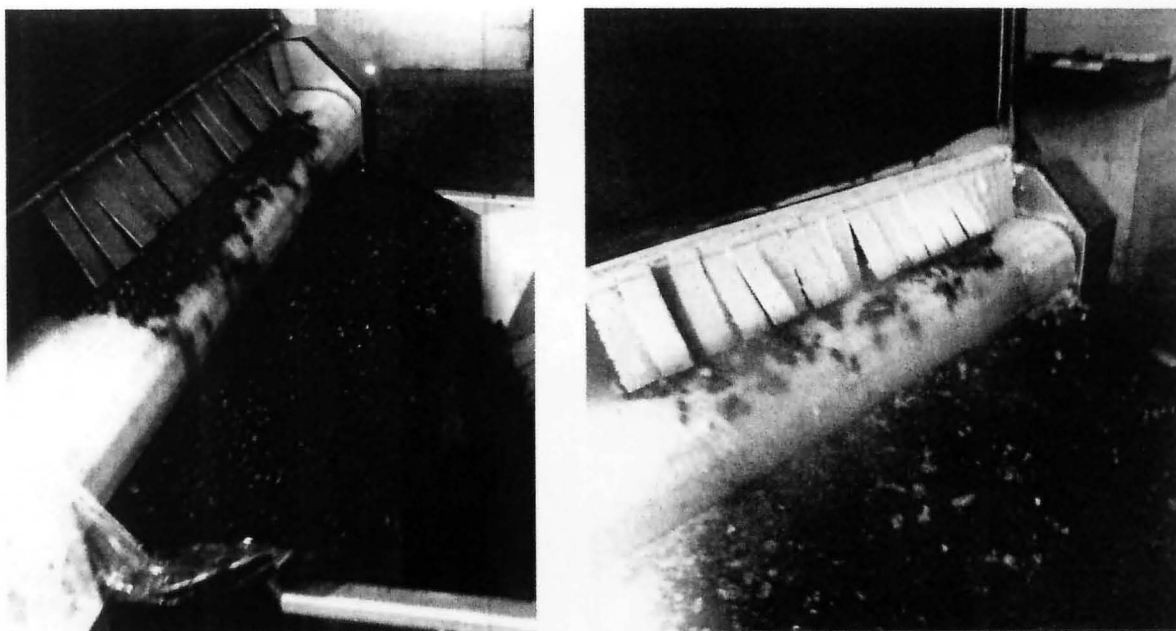


Figura 7. Izquierda: Uva saliendo de la máquina con los dispensadores de CO₂ cerrados. Derecha: Uva saliendo de la máquina con los dispensadores CO₂ abiertos.

4.6. Medición del gasto y eficiencia de CO₂ durante el ensayo industrial

Para determinar el gasto exacto de CO₂ que se usó para enfriar la uva en los tratamientos de frío, el “Portacryo” se instaló sobre 4 celdas de pesaje donde cada una era capaz de medir hasta 1,2 toneladas. Esto permitió pesar en todo momento el estanque de CO₂

y así determinar el gasto individual por unidad experimental, se anotó el peso del "Portacryo" al momento que se empezó a recibir uva congelada de una unidad experimental y se volvió a anotar una vez que se procesó el volumen de uva deseado.

La eficiencia del proceso de congelación es un tema vital para la factibilidad económica de esta investigación, por lo que se calcularon los kilos de uva para cada tratamiento contando la cantidad de gamellas que se usaron y multiplicándolas por el peso promedio de estas, para luego poder determinar el gasto kilos de CO₂ por kilo de uva.

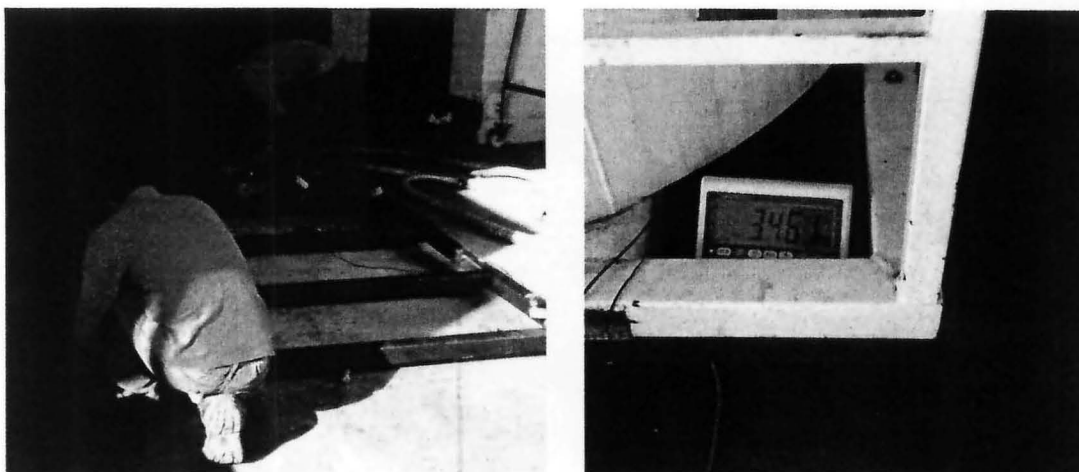


Figura 8. Izquierda: Técnicos instalando los sensores de la balanza en donde se colocará el "Portacryo". Derecha: Pantalla y panel de control de la balanza.

4.7. Vinificación

Las cubas que se utilizaron tienen una capacidad total de 180 L pero para fines enológicos, la capacidad máxima posible es de 150 L. Cada cuba tiene un portalón en la parte superior y uno en la parte inferior. Además de estos dos portalones, tienen dos llaves de salida, una en la base del tanque y otra a la altura del portalón inferior. La refrigeración se realiza conectando un serpentín en el interior de la cuba al sistema de frío de la bodega.

Tanto las cubas con tratamiento de frío como las testigos, se llenaron con un aproximado de 150 L cada una. Una vez que la uva estuviese correctamente molida, se les agregó una dosis de 5 g/Hkg de sulfuroso usando una solución de meta bisulfito de potasio al 10% y 2 g/Hkg de enzimas pectolíticas. Estas aplicaciones fueron idénticas tanto para Pinot Noir como para Cabernet Sauvignon.

En el caso del Pinot Noir, por problemas con el sistema de refrigeración en la viña, se realizó una maceración pre fermentativa de 3 días en vez de los 5 presupuestados inicialmente. En Cabernet Sauvignon la maceración pre fermentativa fue de aproximadamente 15 horas, ya que se esperó que la uva con el tratamiento de frío alcanzara una temperatura adecuada para ser inoculada.

En el Pinot Noir debido alto grado brix con el que se cosechó la uva, se tuvo que realizar una corrección agregando agua acidificada con 5 g/L de ácido tartárico. El mosto tenía en promedio 27,3 grados brix iniciales y se trató de dejar cercano a los 21 grados brix sin alterar la acidez propia del mosto. Pese a que se intentó dejar las 6 cubas del Pinot Noir con el mismo volumen de uva, las tres repeticiones del tratamiento de frío quedaron con un volumen cercano a los 130 L, en cambio, las cubas testigo tenían un volumen de 120 L. Debido a esta diferencia en volumen, la adicción de agua acidificada tuvo que ser distintas para mantener la misma proporción y no alterar la extracción ni la concentración de cada una. Para las cubas con tratamiento de frío, se agregaron 18 L de agua acidificada y para las cubas testigo solo se agregó 16,6 L.

La inoculación en los dos casos se realizó con una temperatura de 18°C. Se utilizó la levadura RHONE 2056 (Lallemand) para inocular las cubas de Pinot Noir, en cambio, para los Cabernet Sauvignon se aplicó Lalvin CLOS (Lallemand). Las dosis utilizadas fueron 20 g/HL y las levaduras se re hidrataron según las instrucciones del fabricante. Junto con las levaduras se agregó una dosis de 20 g/HL de FERMAID K (Lallemand).

Una vez inoculadas las cubas de fermentación, se procedió a medir la temperatura y la densidad del mosto dos veces por día, idealmente a las 8 am y 8 pm. Durante la fermentación, se realizaron pisoneos diarios previo a la lectura de las 8 am.

Se tomaron 5 ml de muestra de cada unidad experimental día por medio. Esta muestra se tomó luego de realizar el pisoneo. El pisoneo permitió homogenizar el mosto dentro de la cuba previo el muestreo. Estas muestras se tomaron para luego evaluar el desarrollo de los compuestos colorantes del vino. La primera muestra se tomó previo a la inoculación de las cubas.

Durante la fermentación, tanto para Pinot Noir como Cabernet Sauvignon, se realizaron remontajes aireados al inicio y final de la fase de fermentación tumultuosa, estos se realizaron a densidades de 1.070 y 1.040. Para estos remontajes se recibió el mosto en baldes

de 20 L desde la llave inferior de las cubas, esto se repitió 5 veces por cada unidad experimental.

En Pinot Noir se realizó solo una aplicación de FDA (Fosfato de amonio) con una dosis de 10 g/HL. Esta aplicación se realizó junto con el primer remontaje aireado a los 1.070 puntos de densidad. Para el Cabernet Sauvignon en ambos remontajes aireados se aplicó una dosis de 10 g/HL de DAP.

Una vez terminada la fermentación alcohólica en Pinot Noir, de cada unidad experimental se tomaron 20 L de vino gota y se llevaron en garrafas de 5 L a las instalaciones del laboratorio de la universidad para seguir la fermentación maloláctica. En el caso de Cabernet Sauvignon, al término de la fermentación alcohólica, el vino se mantuvo en contacto con el orujo. Esta maceración post fermentativa se mantuvo hasta que se cumplieron 21 días desde el inicio de la fermentación alcohólica.

La fermentación maloláctica no se inició espontáneamente y luego de dos meses sin algún indicio de esta, se decidió inocular los vinos con bacterias lácticas, en este caso se aplicó la bacteria VP41 (Lallemand) con una dosis de 3 g/HL.

Una vez determinado el fin de las fermentaciones malolácticas, las garrafas se sulfitaron con una dosis de 2,5 g/HL de SO₂. Una vez sulfitados los vinos, se embotellaron en botellas de 750 ml y fueron obturadas con corchos cilíndricos. Se corrigió el SO₂ libre a 20 mg/L previo embotellado.

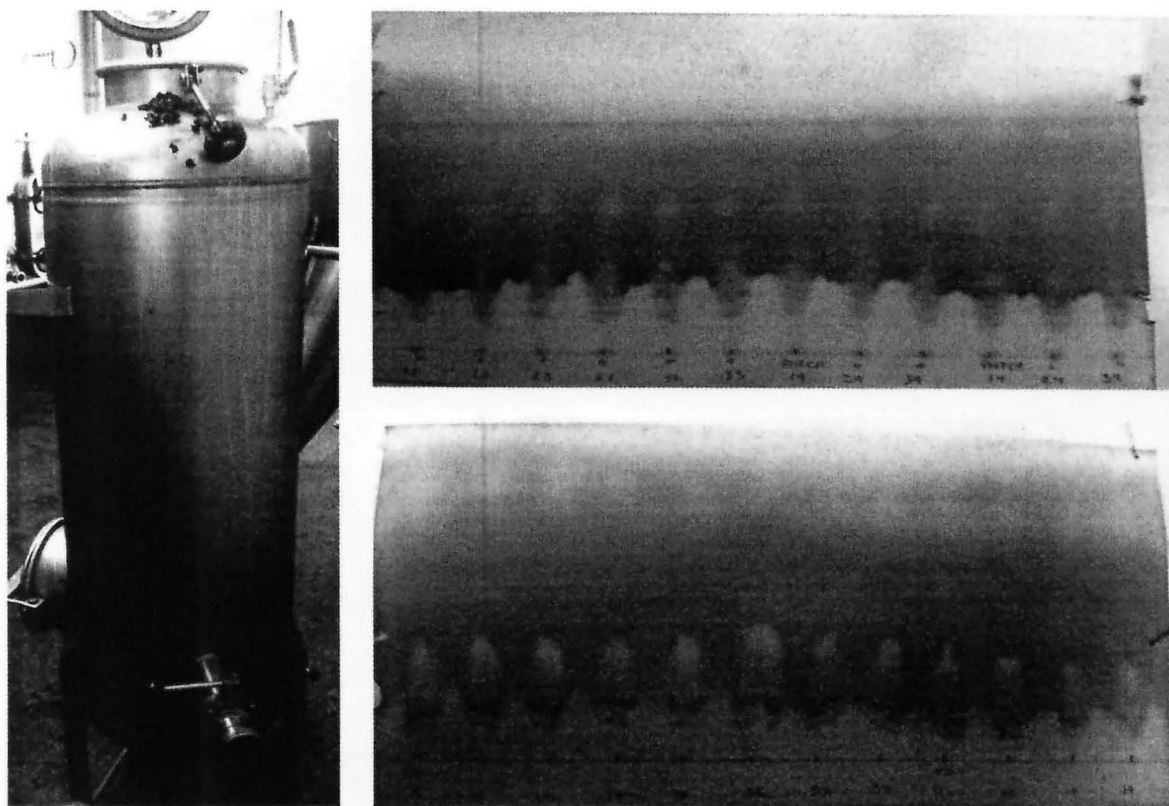


Figura 9. Izquierda: Cuba que corresponde a una unidad experimental. Derecha arriba: Cromatografía en papel con maloláctica incompleta. Derecha abajo: Cromatografía en papel con maloláctica terminada.

4.8. Análisis Químicos de Mostos y Vinos

Para el experimento de laboratorio se realizaron algunos análisis básicos al mosto además de lecturas diarias para determinar el desarrollo de los compuestos colorantes durante la maceración. Los análisis finales realizados fueron pH por potenciometría, acidez total por determinación potenciométrica y tanino total por precipitación con metilcelulosa. Los análisis diarios fueron, intensidad colorante y matiz (índices de Sudraud) y compuestos fenólicos por densidad óptica a 280 nm.

En los ensayos a nivel industrial se tomaron muestras de 200 ml de los mostos el día que fueron inoculadas y muestras de 5 ml día por medio iniciando junto con la inoculación, estas fueron congeladas y analizadas junto con el vino terminado.

Al mosto se le realizaron análisis de pH y acidez titulable por potenciometría, grados brix por refractometría y se determinó el grado de alcohol probable según tablas.

Al vino terminado se le determinó pH y acidez total por potenciometría, azúcares residuales por el método de Luff, grado alcohólico por ebullometría.

Además se le midió fenoles totales, intensidad colorante y matiz, tanino total por precipitación con metilcelulosa (Sarneckis *et al.*, 2006) y antocianas totales por cambio de pH.

Para eliminar la influencia del pH y el sulfuroso sobre el color, se siguió el protocolo según Iland (2004). Se midió el matiz e intensidad colorante al vino con el pH final, con pH ajustado a 3,5 y con pH 3,5 más acetaldehído. Estas determinaciones se también a muestras de Cabernet Sauvignon previo maceración post fermentativa para conocer los efectos de esta en el vino terminado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Experimento Congelación de Laboratorio

Para este experimento los puntos principales fueron las temperaturas y desarrollo de estas durante el proceso de congelación. Con igual importancia se evaluaron características químicas básicas de los mostos y el desarrollo del color durante la maceración. Todo esto se realizó para comprobar que si existen diferencias significativas al momento de aplicar la supra extracción en las bayas previo a la ejecución del ensayo a escala industrial.

5.1.1 Desarrollo de las temperaturas durante prueba de laboratorio

La figura 9 presenta la temperatura promedio en grados Celsius de cada tratamiento durante la prueba de congelación a escala reducida. Las lecturas se hicieron cada 15 minutos con un termómetro infrarrojo. Se terminó la toma de datos 30 minutos desde que la nieve carbónica se sublimó por completo en las bandejas con el tratamiento de frío.

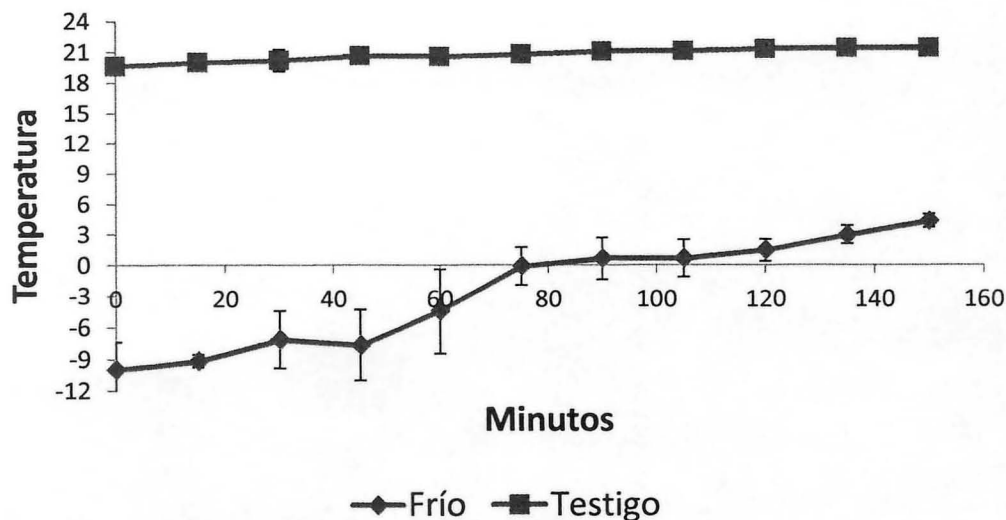


Figura 10. Evolución de la temperatura durante el ensayo de congelación de laboratorio.

5.1.2. Composición química del macerado al final del experimento de laboratorio

Se obtuvo en el tratamiento de congelación, una acidez total más baja y un pH también significativamente más alto que en el testigo. Estas diferencias se puede deber a una mayor extracción de cationes, principalmente potasio. Este, neutraliza los ácidos del medio y aumenta la precipitación de los tartratos debido a las bajas temperaturas generadas por el tratamiento. (Spayd 1987).

Tabla 1. Análisis químicos básicos realizados en el experimento de laboratorio en uva Pinot Noir.

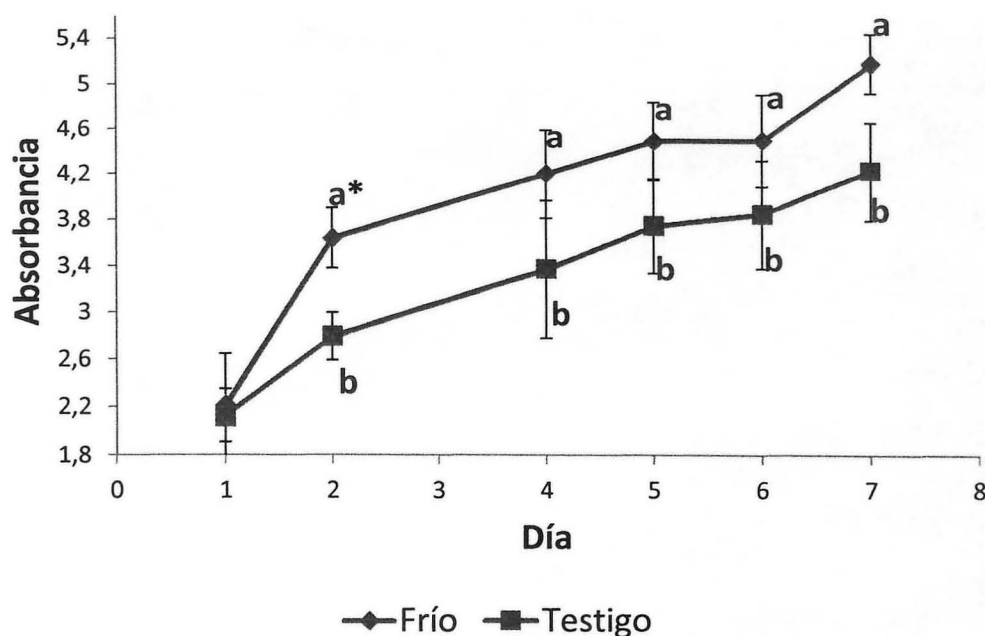
Tratamiento	pH	Acidez Total (g/L H ₂ SO ₄)	Tanino Total (mg/L eq. Catequina)
Frío	4,24a* ±0,04	2,38b ±0,15	794a ±79
Testigo	4,33b ±0,06	2,67a ±0,10	708a ±113

*Valores seguidos con la misma letra en una columna, no tienen diferencia significativa según prueba T de Student (rojo P:0,05 y verde P: 0,1).

En adición a las claras diferencias que existen en el pH y la acidez total, pese a no ser significativa, se puede observar un aumento de la carga tánica en el tratamiento con congelación.

5.1.3. Evolución de color del macerado durante el experimento laboratorio

Durante todo el periodo de este ensayo se midieron las características colorantes diariamente (figuras 10 y 11).



*Valores seguidos con la misma letra para un mismo día, no son diferentes según prueba T de Student (rojo P:0,05 y verde P: 0,1)

Figura 11. Evolución de la intensidad colorante del macerado de uvas Pinot Noir congeladas y testigo durante el desarrollo del experimento de laboratorio.

Al evaluar la intensidad colorante (Figura 10), se observa un aumento significativo de esta en el tratamiento de frío durante todo el proceso exceptuando el primer día. La diferencia lograda ya al segundo día de maceración, de alrededor de 30%, se mantiene relativamente estable durante los 7 días de maceración. Con estos resultados obtenidos a pequeña escala, se pueden esperar diferencias similares en los ensayos industriales.

Pese a no existir diferencias significativas en el matiz (Figura 11), se puede notar una tendencia a un matiz menor en el tratamiento de frío aunque esta diferencia va desapareciendo a medida que se prolonga la maceración. Se busca tener un matiz menor ya que este es una razón entre los pigmentos amarillos y rojos de un mosto o vino. Esto reflejaría una mayor extracción temprana de antocianinas en las uvas sometidas a congelación.

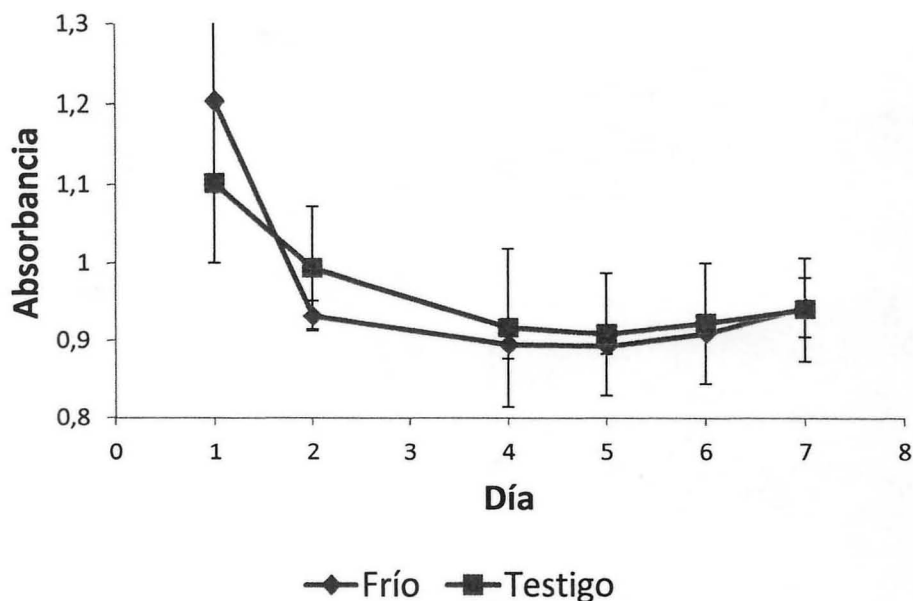


Figura 12. Evolución del matiz del macerado de uvas Pinot Noir congeladas y testigo durante el desarrollo del experimento de laboratorio.

En lo que respecta a la evolución de los compuestos fenólicos (DO 280) (Figura 12), también se encuentran diferencias significativas a favor al tratamiento de frío. Es importante mencionar que en estas lecturas existieron problemas de calibración de los equipos, los que fueron subsanados con posterioridad. Por este motivo, se puede ver grandes barras de error y una evolución irregular. Pese a estos problemas se logra obtener una mayor concentración de compuestos fenólicos significativa en el tratamiento de frío en un par de muestreos.

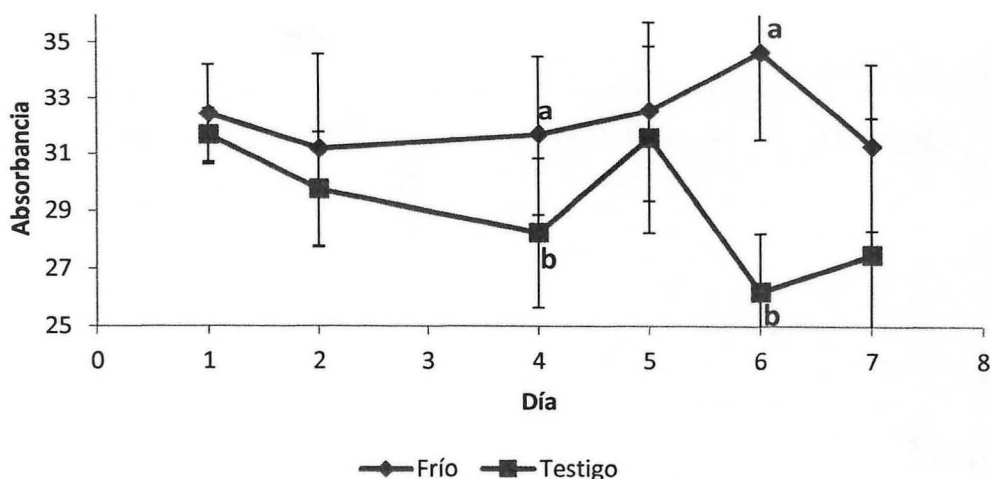


Figura 13. Evolución de los compuestos fenólicos del macerado de uvas Pinot Noir congeladas y testigo durante el desarrollo del experimento de laboratorio.

Al analizar en conjunto todos los resultados obtenidos en el ensayo de laboratorio, se ve un cuadro muy favorable para encontrar diferencias positivas en vinos con este tratamiento de congelación a nivel industrial.

5.2 Ensayo industrial

Se analizan a continuación en conjunto los resultados obtenidos en los ensayos similares realizados con Pinot noir y Cabernet-Sauvignon. Se analizan los gastos y rendimientos de CO_2 durante los procesos de congelación, los resultados de los análisis químicos básicos para el mosto y vino, y por último, el desarrollo de color durante las fermentaciones y algunos compuestos fenólicos en los vinos terminados.

5.2.1. Proceso de congelación

Los parámetros analizados durante los procesos de congelación fueron principalmente, el gasto de CO_2 en cada repetición, la temperatura interna de la máquina, los kilos de uva tratados, el tiempo total del tratamiento y el tiempo que tomó la uva en pasar por el equipo. Todos estos valores son de vital importancia a la hora de analizar la factibilidad económica del proyecto y para poder comparar los rendimientos alcanzados con los de etapas anteriores en el desarrollo y calibración del equipo.

5.2.2. Gasto CO₂

En las tablas 2 y 3 se presentan los kilos gastados de CO₂ en cada tratamiento en Pinot Noir y Cabernet Sauvignon respectivamente.

Tabla 2. Gasto de CO₂, rendimiento de CO₂ y tiempo de residencia de las bayas en cada repetición del tratamiento de congelación para Pinot Noir.

Tratamiento	Gasto (Kg CO ₂)	Rendimiento CO ₂ (Kg CO ₂ / Kg de uva)	Tiempo residencia (Minutos)
Frío 1	58,0	0,16	3,3
Frío 2	71,0	0,19	3,3
Frío 3	75,0	0,20	3,3
Promedio	68,0	0,18	3,3

Tabla 3. Gasto de CO₂, rendimiento de CO₂ y tiempo de residencia de las bayas en cada repetición del tratamiento de congelación para Cabernet Sauvignon.

Tratamiento	Gasto (Kg CO ₂)	Rendimiento CO ₂ (Kg CO ₂ / Kg de uva)	Tiempo residencia (Minutos)
Frío 1	108,0	0,33	3,3
Frío 2	73,0	0,22	3,3
Frío 3	78,0	0,24	3,3
Promedio	86,3	0,26	3,3

Fueron utilizados en total 1118Kg de uva Pinot Noir y 998Kg de Cabernet Sauvignon, estas cantidades fueron divididas en partes iguales para calcular los resultados de rendimiento en base a los kilos efectivos de CO₂ consumidos en cada repetición. Por primera vez durante los tres años de esta investigación, el equipo funcionó de manera adecuada en todas las repeticiones realizadas.

El rendimiento promedio para cada tratamiento fue 0,18 y 0,26 Kg de CO₂/Kg uva y si promediamos esos valores, conseguimos un rendimiento de 0,22 Kg de CO₂/Kg uva en todos tratamientos. Si el costo por kilo de CO₂ en la actualidad es de entre 250 a 400 pesos dependiendo de las cantidades de CO₂ utilizadas, estamos hablando de un aumento entre 55 y 88 pesos por kilo de uva tratada. En años anteriores de este proyecto, los rendimientos fueron

inferiores y el aumento en el costo ha sido mucho mayor, alcanzando hasta 280,5 pesos por kilo de uva tratada. Esto significa una mejora sustancial de los rendimientos y costos del ensayo para este año.

El aumento de costos no es tan alto si se compara con el valor agregado que este tratamiento le puede dar al vino terminado.

5.2.3. Temperaturas de la uva durante el proceso de congelación

Como se mencionó anteriormente, se midió la temperatura de la uva tanto a la entrada como a la salida de la máquina de frío para los 2 tratamientos. En la tabla 4 se presentan las temperaturas medidas con distintos instrumentos en los dos ensayos.

Tabla 4. Temperaturas de entrada y salida del equipo de congelación medida en la película de la uva Pinot Noir y Cabernet Sauvignon despalillada.

Tratamiento	TemperaturaC°			
	Entrada	Salida	Entrada	Salida
	TC	TC	IR	IR
PN Frío	17,8 ±1,58	-3,2 ±1,29	-	-
PN Testigo	16,8 ±0,35	16,7 ±0,55	-	-
CS Frío	19,3 ±0,29	-2,2 ±0,98	18,7 ±0,68	-5,99 ±2,04
CS Testigo	17,6 ±0,34	17,7 ±0,16	18,7 ±0,75	18,1 ±0,57

TC: Temperaturas medidas con Termocupla. IR: Temperaturas medidas con termómetro infrarrojo

El equipo claramente es capaz de lograr la congelación en el periodo de 3,3 minutos que es el tiempo que se demora la uva en recorrer las bandas internas. Las temperaturas que se observaron dentro de la máquina fluctuaron entre los -40 y los -30°C.

La figura 13 presenta el seguimiento de las temperaturas con termocupla durante los 30 minutos que duró el llenado de las tres cubas con el tratamiento de congelación y otros 30 minutos que duró el llenado de las tres cubas testigo en la variedad Pinot Noir. Las temperaturas se mantienen en forma bastante estable bajo 0°C a la salida del equipo excepto durante los primeros 5 minutos en que hay mayores fluctuaciones. En el caso del Cabernet Sauvignon, las mediciones con los dos instrumentos presentan curvas muy similares (Datos no presentados).

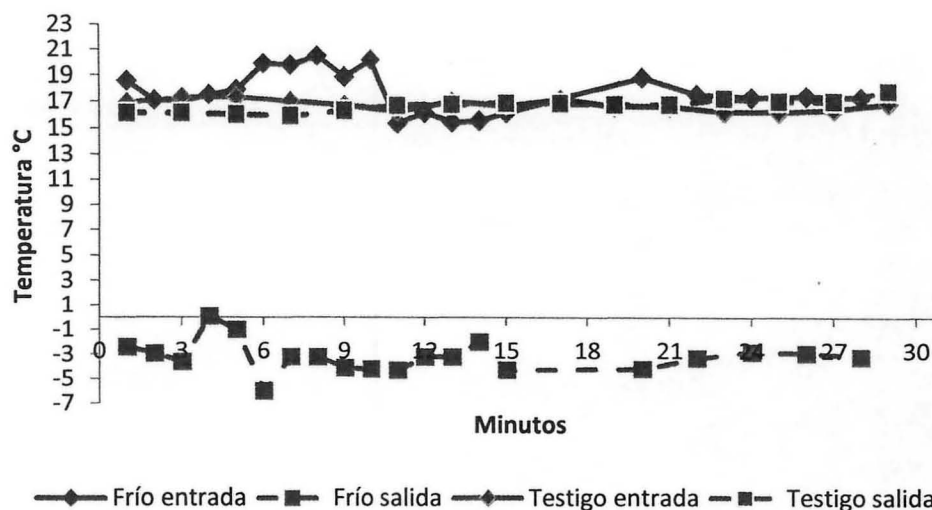


Figura 14. Evolución de la temperatura (termocupla) antes y después de pasar por la máquina dispensadora de CO₂ para los dos tratamientos en Pinot Noir.

5.2.4. Composición del mosto antes de la fermentación

Tanto en el mosto de Pinot Noir como en Cabernet Sauvignon, podemos ver que no existen mayores diferencias, excepto en la acidez total, donde encontramos una acidez significativamente inferior en el tratamiento de congelación en ambos casos. Esto coincide con el ensayo de laboratorio y con los resultados de ensayos de años anteriores (Alegría, 2014). La explicación de este efecto sería nuevamente la mayor extracción de cationes desde las partes sólidas (Boulton, 1980).

Tabla 5. Análisis químicos básicos realizados en el ensayo industrial en uva Pinot Noir después de la corrección

Tratamiento	pH	Acidez Total (gr/L H ₂ SO ₄)	Densidad	°Brix	GAP
Frío	3,32a*±0,00	4,62b ±0,02	1092a ±1,52	21,5a ±0,31	12,3a ±0,21
Testigo	3,31a ±0,04	4,78a ±0,08	1090a ±1,52	21,1a ±0,23	12,0a ±0,12

*Valores seguidos con la misma letra en una columna, no tienen diferencia significativa según prueba T student (rojo P: 0,05 y verde P: 0,1)

Tabla 6. Análisis químicos básicos realizados en el ensayo industrial en uva Cabernet Sauvignon.

Tratamiento	Acidez Total				
	pH	(gr/L H ₂ SO ₄)	Densidad	°Brix	GAP
Frío	3,64a* ±0,02	3,48b ±0,06	1101a ±0,6	24,5a ±0,11	14,3a ±0,06
Testigo	3,68a ±0,03	3,64a ±0,09	1102a ±0,6	24,4a ±0,00	14,3a ±0,00

*Valores seguidos con la misma letra en una columna, no tienen diferencia significativa según prueba T student (rojo P:0,05 y verde P: 0,1)

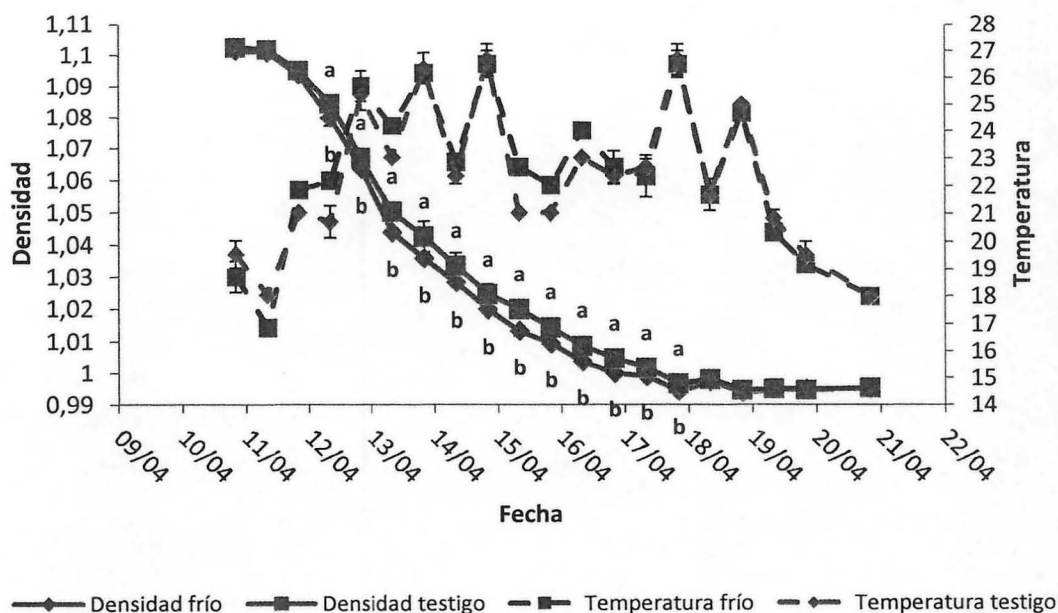
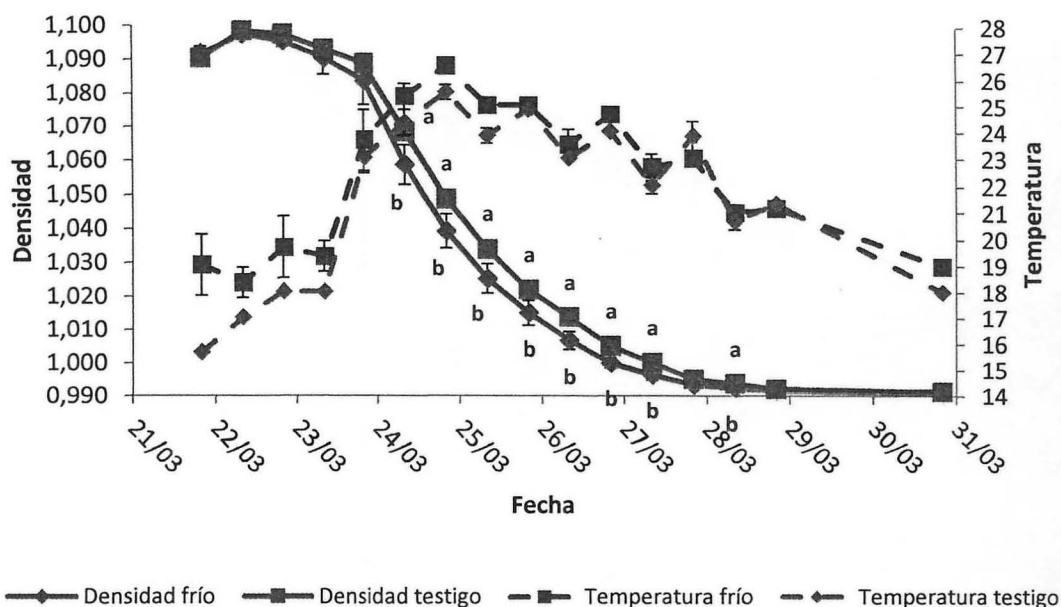
5.2.5. Evolución de la Fermentación

Las fermentaciones ocurrieron sin problemas, pese a la dificultad del control de temperatura en Cabernet Sauvignon. Por problemas con los paneles de control, se decidió desconectar las cubas del sistema de la viña y se comenzó a controlar la temperatura con duchas de agua caliente durante el día. En Pinot Noir no fue necesario realizar este tipo de procedimientos.

En ambos casos, la fermentación ocurrió de manera más rápida para las cubas con el tratamiento de frío.

Para el Pinot Noir, en varias oportunidades, las temperaturas de los tratamientos de frío, están por sobre las testigo entre 1 a 2°C. En este caso, no se sabe si la mejora en la fermentación se dio por la mayor temperatura, o si una mejor fermentación, aumentó la temperatura.

En Cabernet Sauvignon pese a temperaturas similares, se observó también una fermentación más rápida en la uva congelada., lo que podría atribuirse a una mayor liberación de nutrientes gracias a la congelación. Sin embargo, este comportamiento de las fermentaciones ha sido relativamente variable en los distintos realizados en distintas temporadas del proyecto.



5.2.6. Composición química básica del vino

Las diferencias de acidez obtenidas en los análisis prefermentativos, se perdieron, pero aún se puede observar que en el Cabernet Sauvignon, se tiene una acidez total un poco menor en el vino de uva congelada. En Pinot Noir, el pH también es apenas más alto (significativo al 10%), Sin embargo, la diferencia es mínima y no representa una diferencia real en las características del vino.

Tabla 7. Composición química básica de vino terminado Pinot Noir.

Tratamiento	Azúcar residual (g/L)	°Alcohol (°GL)	pH	Acidez Total (g/L H ₂ SO ₄)
Frío	1,8a* ±0,13	14,0a ±0,15	3,363a ±0,01	4,49a ±0,15
Testigo	1,7a ±0,09	14,0a ±0,00	3,360b ±0,00	4,35a ±0,06

*Valores seguidos con la misma letra en una columna, no tienen diferencia significativa según prueba T student (rojo P:0,05 y verde P: 0,1)

Tabla 8. Análisis químicos en vino terminado Cabernet Sauvignon.

Tratamiento	Azúcar residual (g/L)	°Alcohol (°GL)	pH	Acidez Total (g/L H ₂ SO ₄)
Frío	3,17a* ±0,25	14,2a ±0,0	3,57a ±0,01	4,18a ±0,09
Testigo	3,41a ±0,03	14,2a ±0,0	3,57a ±0,01	4,28a ±0,03

*Valores seguidos con la misma letra en una columna, no tienen diferencia significativa según prueba T student (rojo P:0,05 y verde P: 0,1)

5.3. Desarrollo de color y compuestos fenólicos

Los resultados presentados a continuación se basan en la toma de muestras durante el periodo de la fermentación alcohólica. Los datos de los vinos finales serán presentados en tablas aparte.

5.3.1. Evolución de la intensidad colorante (IC)

En Pinot Noir como para Cabernet Sauvignon, se pueden encontrar diferencias significativas durante la primera semana de fermentación, presentando mayores valores para los vinos con el tratamiento de frío. Estas diferencias tienen a perderse a medida que avanza la fermentación y se prolonga la maceración (Figuras 17 y 18). Este resultado es coincidente con lo antes señalado en el experimento de laboratorio en el que la maceración sólo duró una semana.

Por lo tanto, desde un punto de vista práctico este tratamiento podría ser utilizado en vinos que necesiten maceraciones cortas. Esto aumentaría la cantidad inicial de pigmentos colorantes sin aumentar la cantidad de elementos no deseados como podría ser en el caso del Pinot Noir, taninos que bajan la calidad final del vino por estar vinculados a una astringencia muy agresiva.

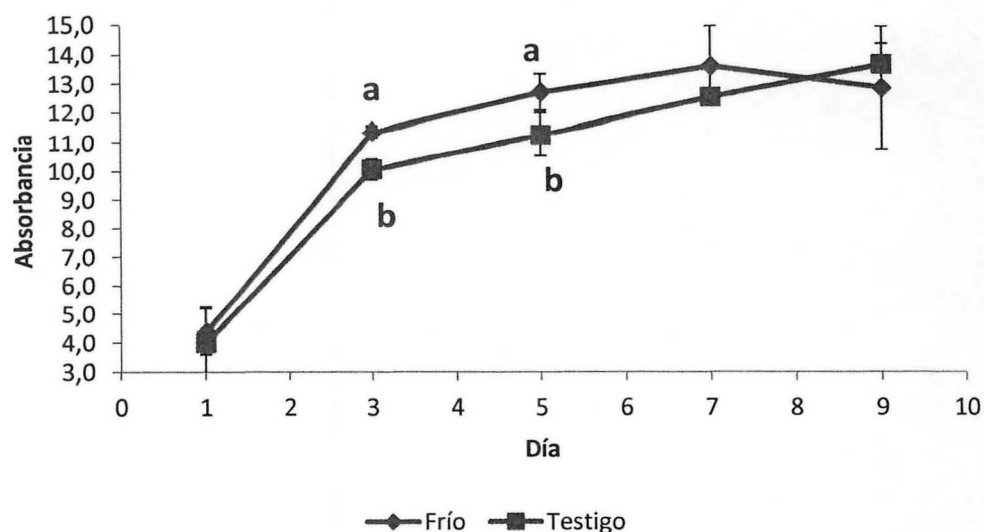


Figura 17. Evolución de la intensidad colorante durante la fermentación de Pinot Noir en el ensayo industrial.

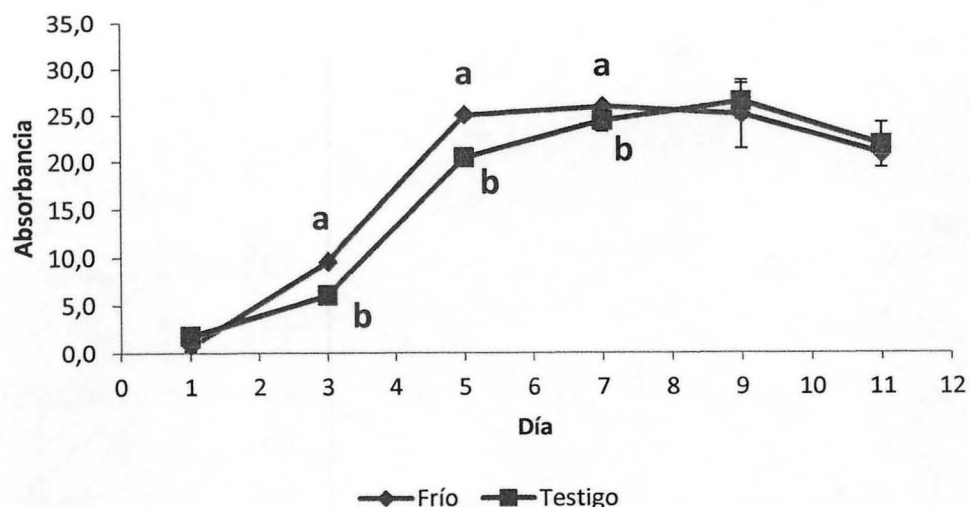


Figura 18. Evolución de la intensidad colorante durante la fermentación de Cabernet Sauvignon en el ensayo industrial.

5.3.2. Evolución del matiz

Las diferencias que aparecen en matiz, siguen el mismo patrón que las vistas previamente en el experimento de laboratorio, pero en la mayoría de los casos, no alcanzan a ser significativas. Se confirma una tendencia a que los vinos con el tratamiento de frío, presentan valores menores que los vinos testigo pero esta diferencia se pierde al prolongarse la maceración.

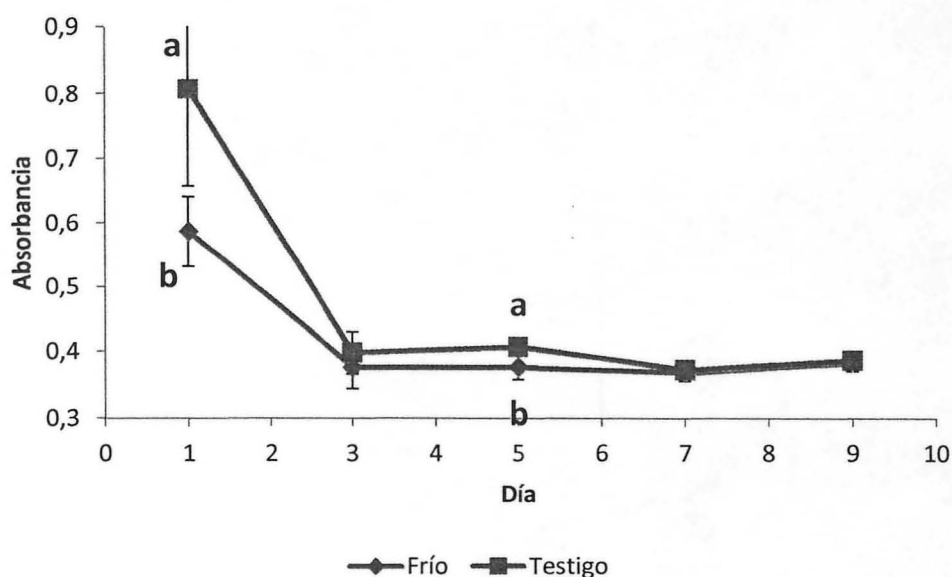


Figura 19. Evolución del matiz durante la fermentación de Pinot Noir en el ensayo industrial.

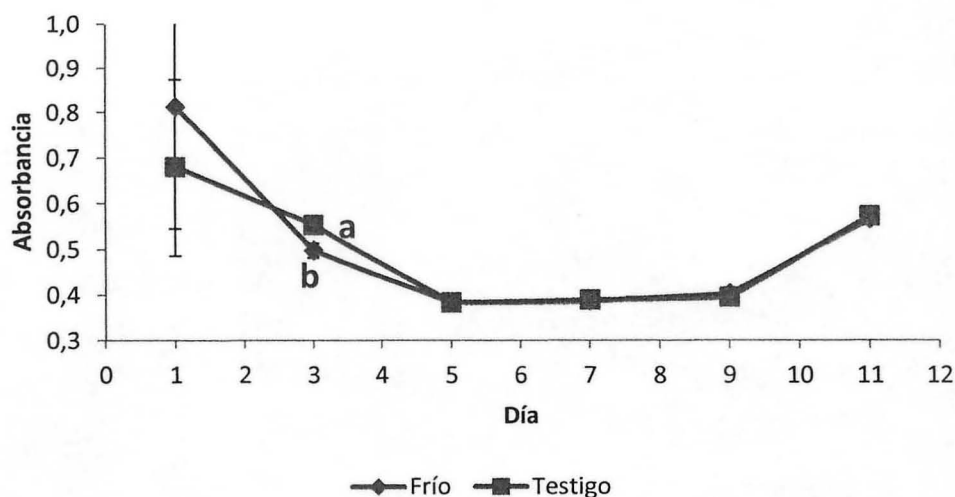


Figura 20. Evolución del matiz durante la fermentación de Cabernet Sauvignon en el ensayo industrial

5.3.3. Evolución de los compuestos fenólicos totales (DO 280)

Durante los días iniciales de la fermentación, existe en ambos casos un aumento significativo de los compuestos fenólicos. Estas diferencias se pierden a medida que la fermentación avanza.

Este aumento se debería principalmente a que con el tratamiento de congelación, los cristales rompen las paredes celulares de las células de la piel de la baya, liberando de manera más fácil los compuestos almacenados en su interior. Nuevamente este resultado es coincidente en su primera etapa con los mayores contenidos de fenoles totales obtenidos en el ensayo de laboratorio en el que la maceración fue más corta, sólo 7 días.

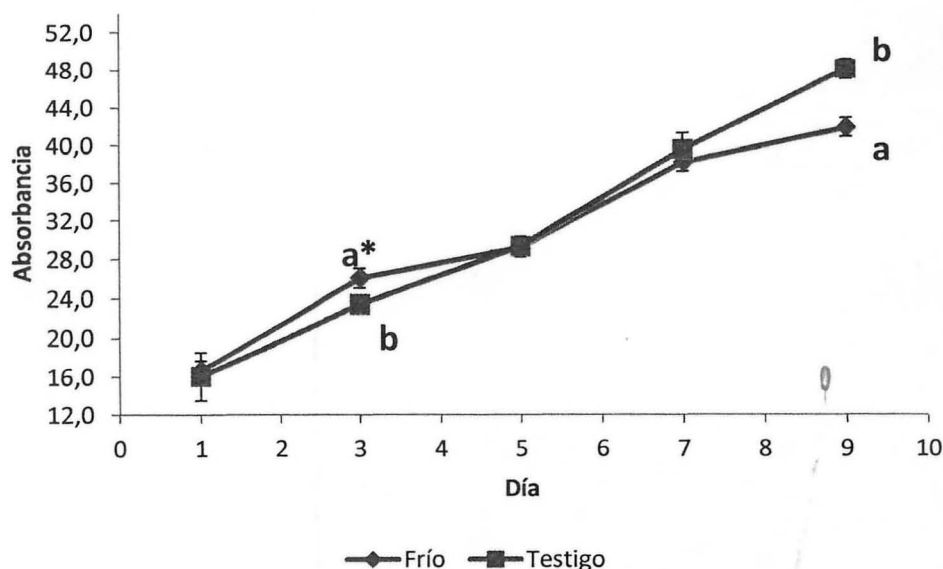


Figura 21. Evolución de los compuestos fenólicos durante la fermentación de Pinot Noir en el ensayo industrial

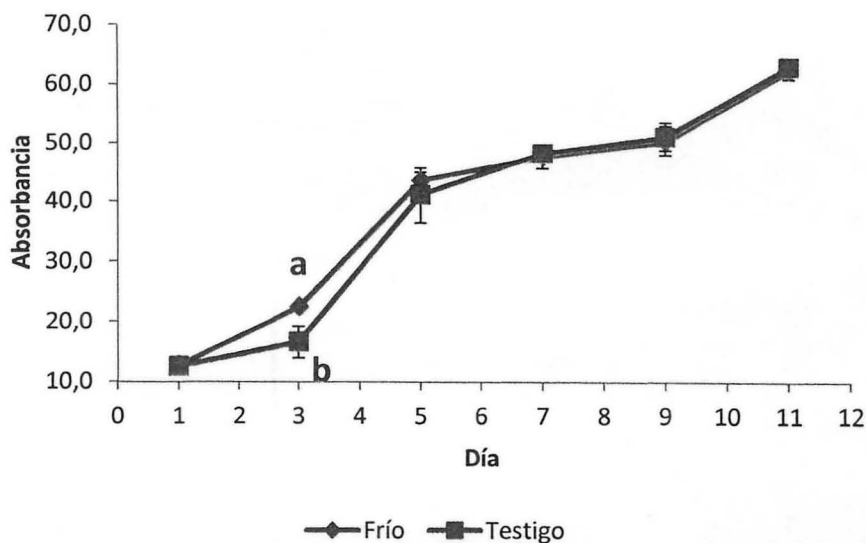


Figura 22. Evolución de los compuestos fenólicos durante la fermentación de Cabernet Sauvignon en el ensayo industrial

5.3.4. Antocianas y taninos totales en el vino terminado

Para determinar estos valores, se evaluaron los vinos finales luego de haber sido sulfitados al terminar la fermentación maloláctica. En el caso del Cabernet Sauvignon, se tomaron además muestras al final de la fermentación alcohólica previo a la maceración postfermentativa para investigar si las diferencias se acentuaban o disminuían con una maceración prolongada.

Tabla 9. Antocianas y taninos totales en el vino terminado Pinot Noir para el ensayo industrial.

Tratamiento	Antociana Total (mg/L)	Tanino Total (mg/L eq. Catequina)
Frío	359a ±7,7	937a ±95
Testigo	346a ±5,7	1049a ±57

Tabla 10. Antocianas y taninos totales en el vino previo maceración postfermentativa y vino terminado Cabernet Sauvignon para el ensayo industrial.

Tratamiento	Previo maceración post fermentativa		Vino terminado	
	Antociana Total	Tanino Total	Antociana Total	Tanino Total
	(mg/L)	(mg/L eq. Catequina)	(mg/L)	(mg/L eq. Catequina)
Frío	593a ±7,5	1802a ±116	632a ±10	1679a ±52
Testigo	569a ±8,6	1762a ±186	617a ±10	1732a ±207

En el caso del Pinot Noir (Tabla 9) no se encontraron diferencias significativas.

Como se puede observar en la tabla 10, en el Cabernet-Sauvignon tampoco se encontraron diferencias significativas ya sea antes o después de la maceración post fermentativa. Sin embargo, los promedios de antocianas son levemente más altos en ambos casos en el tratamiento de uva congelada.

5.3.5. Intensidad colorante y matiz de los vinos finales a igual pH y sin influencia del sulfuroso según el protocolo de Iland

Se realizaron mediciones en el vino terminado, en el vino terminado igualando el pH a 3,5 para descartar cualquier efecto del pH en el color, y por último, al vino terminado se le igualó el pH en 3,5 y se le agregó una dosis de acetaldehído para eliminar cualquier interferencia que pudiese generar el sulfuroso en el color.

Tabla 11. Resultados según protocolo Iland para vino terminado Pinot Noir.

Vino analizado	Tratamiento			
	Frío	Testigo	Frío	Testigo
Matiz	I.C.			
Vino final	0,471a* ±0,102	0,544a ±0,010	12,3a ±2,6	10,6a ±0,4
Vino final con pH modificado (3,5)	0,560b ±0,005	0,583a ±0,011	10,8a ±0,9	9,8a ±0,2
Vino final sin efectos de SO ₂ (acetaldehído)	0,564a ±0,029	0,553a ±0,002	11,5a ± 0,8	11,3a ±0,3

*Valores seguidos con la misma letra en una fila con un mismo análisis, no tienen diferencia significativa según prueba T student (rojo P: 0,05 y verde P: 0,1)

En el vino Pinot noir sin corregir, el tratamiento de frío tiene un matiz menor y una intensidad colorante mayor que el testigo pero las diferencias no son significativas. Al igualar los pH, se vuelve significativa al 5% la diferencia para el matiz. Esta diferencia sin embargo se pierde al eliminar el efecto del sulfuroso. En resumen se obtienen los cambios de color esperados pero sin diferencias significativas (Tabla 11).

Tabla 12. Resultados según protocolo Iland para vino terminado Cabernet Sauvignon.

Vino analizado	Tratamiento			
	Frío	Testigo	Frío	Testigo
	Matiz		I.C.	
Vino sin maceración post fermentativa	0,569a* $\pm 0,005$	0,575a $\pm 0,007$	20,9a $\pm 0,2$	21,8a $\pm 2,4$
Vino sin maceración post fermentativa con pH modificado (3,5)	0,571a $\pm 0,005$	0,567a $\pm 0,006$	20,9a $\pm 0,5$	21,8a $\pm 1,9$
Vino sin maceración post fermentativa sin efectos de SO ₂ (acetaldehído)	0,559a $\pm 0,009$	0,556a $\pm 0,005$	21,8a $\pm 0,3$	23,0a $\pm 0,9$
Vino final	0,557a $\pm 0,010$	0,559a $\pm 0,009$	17,4a $\pm 0,3$	17,8a $\pm 0,2$
Vino final con pH modificado (3,5)	0,546a $\pm 0,004$	0,538a $\pm 0,010$	18,2b $\pm 0,1$	18,9a $\pm 0,2$
Vino final sin efectos de SO ₂ (acetaldehído)	0,531a $\pm 0,011$	0,530a $\pm 0,009$	19,8a $\pm 0,4$	20,1a $\pm 0,2$

*Valores seguidos con la misma letra en una fila con un mismo análisis, no tienen diferencia significativa según prueba T student (rojo P: 0,05 y verde P: 0,1)

En el Cabernet Sauvignon, es importante destacar que durante la maceración postfermentativa, la IC de ambos tratamientos tuvo una disminución, esto se puede deber a una precipitación de materia colorante coloidal y a una fijación de compuestos colorantes por parte de los orujos.

En esta variedad, todas las diferencias que se obtuvieron durante la fermentación, con lo que respecta al desarrollo de color del vino final, se perdieron. Al contrario del Pinot Noir, aquí se encontró una tendencia a que los vinos con el tratamiento de frío al final tenían una IC un poco menor sin embargo, las diferencias tampoco son significativas.

Trata de mejorar estas tablas aunque tuvieras que separar más; están muy difíciles de visualizar.

6. CONCLUSIONES

En el experimento de laboratorio, se obtuvo una mayor intensidad colorante y un aumento de los compuestos fenólicos en el tratamiento de congelación. También para este tratamiento se logró ver una tendencia a tener un matiz menor.

A escala industrial, la máquina congeladora, logró llevar las bayas a temperaturas aproximadas de -3°C con un tiempo de residencia de 3,3 minutos y con un rendimiento entre 0,18 y 0,26 Kg CO_2/Kg de uva en Pinot Noir y Cabernet Sauvignon respectivamente.

La estructura básica del mosto y vino no se vio afectada con la congelación de la uva con la excepción de una menor acidez total en los mostos pero esa diferencia se perdió en el vino terminado.

Tanto en Pinot noir como en Cabernet-Sauvignon se logró un incremento en la intensidad colorante durante la primera semana de fermentación, y existe una tendencia significativa en algunos casos a un matiz menor

En los vinos terminados en general no se obtuvieron diferencias significativas en los contenidos fenólicos ni el color por lo que el tratamiento de congelación sería de interés principalmente en vinos de maceración corta.

7. LITERATURA CITADA

- Alegría, M., Jara, M., Cataldo, A., Aguirre, P., González, A. y Bordeu, E.** 2014. Influence of freezing skin grapes to extract phenolic compounds during red wine maceration. BIO Web of Conferences 3: 1-4.
- Alegria, M.** 2014. Influence of freezing grapes skins on phenolic compounds extraction in cabernet - sauvignon and pinot noir winemaking. Master International Vintage October 13, 2014.
- Bavčar, D., Baša, H., Čuš, F., Vanzo, A., Gašperlin, L. & Košmerl, T.** 2011. Impact of Alternative Skin Contact Procedures on the Aroma Composition of White Wine. S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 32 (2): 190-203.
- Bordeu, E. & Scarpa, J.** 1998. Análisis Químico del Vino. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
- Boulton, R.** 1980. The General Relationship Between Potassium, Sodium and pH in Grape Juice and Wine. Am. J. Enol. Vitic., Vol. 31 (2): 182-186.
- De Santis, D.** 2010. Effect of prefermentative cold maceration on the aroma and phenolic profiles of a merlot red wine. Italian Journal of Food Science n.1 Vol. 22: 47-53.
- Feuillat, M.** 1996. Vinification du Pinot Noir en Bourgogne par maceration préfermentaire à froid. Rev. Oenol. 83:29-31.
- Flanzy, C.** 2000. Enología: Fundamentos científicos y Tecnológicos. Editorial Mundi Prens, first edition, Madrid, España.
- Frissant, S., Delmas, C., Souquet, J., Samson, A., Moutounet, M. y Salmon, J.** 2012. Étude quantitative de la protection obtenue contre l'oxydation. Revue des oenologues. Novembre n.145: 21- 26.
- Heatherbell, D., Goldsworthy, S., Matthew, D.** 1997. Effect of prefermentation cold maceration on the composition, colour and flavour of Pinot Noir wine. New Zealand Grape and Wine Symposium, 30-36.
- Iland, P., Bruer, N., Edwards, G., Weeks, S. & Wilkes, E.** 2004. Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts. Patrick Iland Wine Promotions PTY LTD. Australia. 88-91.

- McDonald, M.S., Hughes, M., Burns, J., Lean, M., Matthews, D. and Crozier, A.** 1998. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 368-375.
- OIV, International Code of oenological practices.** 2013. Disponible en: file:///C:/Documents%20and%20Settings/pc/Mis%20documentos/Downloads/CODE_2015_EN.pdf Fecha de consulta: 18 Agosto 2015.
- Ortega-Regules, A., Cascales, I., Ros-García, J., López-Roca, J., Gómez-Plaza, E.** 2006. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta*, 563, 26-32.
- Parenti, A., Spugnoli, P., Calamai, L., Ferrari, S y Gori, C.** 2004. Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *Eur. Food. Res. Technol*: 360–366.
- Pérez, A.** 2013. Técnicas enológicas de frío y enzimáticas aplicadas a la extractabilidad de Syrah, Cabernet Sauvignon y Monastrell. Universidad de Murcia. Doctoral thesis. Departamento de Tecnología de Alimentos. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario.
- Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.** 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant-cell wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Food Science & Technology*, 17, 579-590.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A.** 2006. *Handbook of Enology. Volume 1. The microbiology of wine and vinifications.* Segunda edición. John Wiley and Sons, Ltd: UK.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean A., Dubourdieu, D.** 2006. *Handbook of Enology. Volume 2. The chemistry of wine, stabilization and treatments.* Segunda edición. John Wiley and Sons, Ltd: UK.
- Spayd, S., Nagel, C. W., Hayrynen, L.D. & Ahmedullah, M.** 1987. Effect of Freezing on the Composition of Must and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol 38 (3): 243-245.
- Threlfall, R., Main, G. y Morris, J.** 2006. Effect of freezing grape berries and heating must samples on extraction of components and composition parameters of red wine grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12: 161–169.

Watson, B., Price, F. & Valladao, M. 1995. Effect of fermentation practices on anthocyanin and phenolic composition of Pinot Noir wines. *Abstr. Am. J. Enol. Vitic.* 46:404.

Zamora, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos.* Ediciones Mundi-Prensa: España.

Zoeckelin, B., K. Fugelsang, B. Gump, F. Nury. 2001. *Análisis y producción de vino.* Editorial Acirbia, S.A., Zaragoza, España: 613.



Master International Vintage

Pontificia Universidad Católica de Chile

Groupe École Supérieure d'Agriculture d'Angers

**INFLUENCE OF FREEZING GRAPES SKINS ON AROMATIC AND
PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTION IN SAUVIGNON BLANC
WINEMAKING THROUGH THE EFFICIENT USE OF CO₂
VINTAGE INTERNATIONAL MASTER OF SCIENCE, VINE, WINE AND TERROIR
MANAGEMENT**

Author: Patricia Bastos

Tutor: Dr. Edmundo Bordeu

October, 13th 2015

INFLUENCE OF FREEZING GRAPES SKINS ON AROMATIC AND PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTION IN SAUVIGNON BLANC WINEMAKING THROUGH THE EFFICIENT USE OF CO₂

Author: Patricia BASTOS

VINTAGE MASTER 2013-1025, PROMO

Thesis supervisor: Edmundo BORDEU

Departamento de Enología, Pontificia Universidad Católica de Chile

Keywords: Supra-extraction, carbonic dry ice, white wine, aromatic compounds, protection from oxygen.

Planning	Wine quality can be improved by cold winemaking techniques such as pre-fermentative cold maceration, supra-extraction and cryoextraction. These techniques enhance the extraction of phenolic and aromatic compounds that are located in the skin and seeds of grapes by the disrupting of the cells membranes. Supra-extraction promotes this extraction by freezing partially the grapes using carbonic dry ice. This FIA project is a third part of a three-year project carried out by PUC, Indura and private wineries
Aims	Determine and evaluate through physicochemical and sensory analysis the quality of Sauvignon Blanc wines with different treatments: with and without supra-extraction technique. Determine the efficiency and the cost of this new technology developed by Indura S.A.
Methodology	The experiment consists in 2 treatments of Sauvignon Blanc: control and frozen grapes by solid CO₂, each one with 3 repetitions. Analysis of chemical profile of wine and protection from O₂, phenolics (spectrophotometer and HPLC), aromatic compounds (GC-MS) and sensory evaluation.
Results	Freezing treatments have higher values of aromatic compounds (IBMP and 3MH), of phenols, of low molecular weight polyphenols concentration with a significant difference in P-coumaric acid. In sensory evaluation, the assessors found higher values of pyrazines/vegetal aromas.
Conclusions	Increasing only 2 euros the price per box supra extraction, it is possible to pay the cost of the supra extraction trial and still have a profit of 3.6%.

INFLUENCE DE LA SUPRAEXTRACTION AFIN D'EXTRAIRE LES COMPOSES AROMATIQUES ET PHENOLIQUES PENDANT LA VINIFICATION DE SAUVIGNON BLANC AVEC UNE EFFICIENTE UTILISATION DE CO₂

Auteur: Patricia BASTOS

VINTAGE 2013-2015, PROMO 12

Patron de mémoire: Edmundo BORDEU

Departamento de Enologia, Pontificia Universidad Católica de Chile

Mots-clés: Supra-extraction, neige carbonique, vin blanc, composés aromatiques, protection contre l'oxygène

Planning	La qualité de vin peut être améliorée par des techniques de vinification en froid, comme par exemple pré-fermentation en macération à froid, supra extraction et cryoextraction. Ces techniques accroissent la extraction des composés aromatiques localisent en la pellicule et les pépins de les raisins par la rupture des membranes cellulaires. La supra-extraction est la congélation partielle de la pellicule des raisins en utilisant glace sèche carbonique. Le projet FIA est la troisième partie d'un projet de 3 années dirigée pour la PUC, Indura et de caves privées.
Objectifs de l'étude	Détermination et évaluation chimique et analyse sensoriel de la qualité des vins Sauvignon Blanc avec différents traitements, le témoin et le congelé par supra-extraction. Détermination de l'efficience et du coût de la nouvelle technologie désignée pour Indura S.A.
Méthodologie	L'expérience consiste en 2 traitements de Sauvignon Blanc: le témoin et le congelé en utilisent dosers de CO ₂ , chacun avec 3 répétitions. Analyse chimique du profil du vin et de la protection contre l'oxygène, composés phénoliques (spectrophotomètre, HPLC), les arômes variétaux (CG-SM) et évaluation sensoriel.
Résultats	Traitement congelé a des valeurs plus élevées de composés aromatiques (IBMP et 3MH), de phénols, de faible concentration moléculaire des polyphénols de poids avec une différence significative dans l'acide p-coumarique. Dans l'évaluation sensorielle, les évaluateurs ont trouvé des valeurs plus élevées de pyrazines / arômes végétaux.
Conclusions	L'augmentation de seulement 2 euros en le prix de la boîte de supra extraction, parmi de payer le coût de l'essai et ont bénéf de 3,6%.

TABLE OF CONTENTS

I.	INTRODUCTION	9
II.	GENERAL CONTEXT OF THE PROJECT	11
III.	CHILE WINE SECTOR	11
IV.	PROBLEMATIC	13
V.	OBJECTIVES	14
VI.	HYPHOTHESIS	15
VII.	LITERATURE REVIEW	16
	7.1. Grape skin composition, extractability and maturation	16
	7.2. Cold winemaking techniques	21
	7.2.1. Pre-fermentative cold maceration	21
	7.2.2. Cryoextraction	22
	7.2.3. Supra-extraction	24
	7.3. Wine aroma	24
	7.4. Aroma components	25
	7.4.1. Pyrazines	25
	7.4.2. The role of thiols for wine aroma	26
	7.4.3. Precursors of volatile thiols	28
	7.4.4. Other aroma components	29
	7.5. Factors affecting the development of the typical Sauvignon Blanc aroma	30
	7.6. Phenolic compounds in white wines	31
	7.7. Oxygen influence	32
	7.7.1. Yellowing and pinking phenomenon in white wines	32
VIII.	MATERIALS AND METHODS	34
	8.1. Operation of the CO ₂ dispenser equipment	34
	8.2. Laboratory experiment	38
	8.3. Experimental layout of the industrial experiment to freeze Sauvignon Blanc grapes	40
	8.3.1. Winemaking	43
	8.4. Chemical Analysis of wine	46
	8.4.1. Basic oenological parameters of the finished wine	46
	8.4.2. White wine spectral measures	47
	8.4.3. Thiols and pyrazines determination by gas chromatography	48

8.4.4.	Analysis of low molecular weight polyphenols by high-performance liquid chromatography	49
8.5.	Sensory evaluation	50
8.6.	Statistical analysis	51
IX.	RESULTS AND DISCUSSION	52
9.1.	Evolution of temperatures during the industrial experiment	52
9.2.	Must composition before the alcoholic fermentation	54
9.2.1.	Alcoholic fermentation	56
9.3.	Wine composition at the end of alcoholic fermentation	57
9.4.	Colour and phenolic composition of must and wine	58
9.5.	Concentration of low molecular weight polyphenols by HPLC	61
9.6.	Thiols contents	62
9.7.	Pyrazines contents	64
9.8.	Sensory evaluation	66
9.9.	Analysis of CO ₂ and equipment performance	71
9.10.	Supra-extraction treatment costs	77
X.	LIMITS AND CRITICS	81
XI.	CONCLUSIONS	82
XII.	REFERENCES	83
XIII.	ANNEXES	88

LIST OF FIGURES AND TABLES

Figure 1 – Chilean wine region map.	12
Figure 2 – The evolution of the weight of the berry follow then a double sigmoid curve.	20
Figure 3 – Theoretical schema of the evolution of Sauvignon Blanc grapes during the 7 weeks following veraison.	21
Figure 4 – Methopyrazines.	26
Figure 5 – The 2 enantiomers of 3-mercaptohexanol.	27
Figure 6 – Volatile thiols contributing to Sauvignon Blanc aroma.	28
Figure 7 – Thiols precursors identified in Sauvignon Blanc must: cysteine-S-conjugate.	29
Figure 8 – CO ₂ dispenser equipment being used.	35
Figure 9 – Thermometers to measure the internal temperature of the CO ₂ dispenser equipment, placed in each end.	35
Figure 10 – External control panel.	36
Figure 11 – Portacryo equipment.	37
Figure 12 – Portacryo tank, CO ₂ dispenser equipment and experimental tanks being transported.	37
Figure 13 – Trays with 400 Sauvignon Blanc berries each.	38
Figure 14 – Freezing treatment: tray covered with carbonic dry ice in the bottom and the top of berries.	39
Figure 15 – Treatments macerating in 500 mL bottles.	39
Figure 16 – Samples of the extract of the freezing treatment diluted to do spectral measures.	40
Figure 17 – Equipment layout at Concha y Toro's center.	41
Figure 18 – Conveyor belts inside of the CO ₂ dispenser equipment.	41
Figure 19 – Control treatment falling into a reception bins and then being protected with dry ice.	42

Figure 20 – Freezing treatment leaving the CO ₂ dispenser equipment and falling into a reception bins.	42
Figure 21 – Portacryo tank connected to the CO ₂ dispenser equipment by tubes.	43
Figure 22 – Infrared thermometer on left and thermocouple on right.	44
Figure 23 – Stainless steel tanks (200L of capacity).	45
Figure 24 – Sauvignon Blanc wine bottled in 75cl bottles closed with screwcaps.	46
Figure 25 – Turbidity meter.	47
Figure 26 – Evolution of freezing treatment temperatures measured with thermocouple.	53
Figure 27 – Evolution of density and temperature of the control and freezing treatments during the alcoholic fermentation of Sauvignon Blanc grapes.	56
Figure 28 – Principal component analysis of olfactory characteristics of the control and the freezing treatments.	67
Figure 29 – Spiderweb chart of olfactory characteristics of the control and the freezing treatments.	68
Figure 30 - Spiderweb chart of gustatory characteristics of the control and the freezing treatments.	69
Figure 31 – Cluster analysis of the panel behaviour.	70
Figure 32 – The principal component analysis of aromatic attributes in the case of the trained panel in the control and the freezing treatments.	71
Table 1 – Pressing programme 7.	44
Table 2 – Inlet and outlet temperature measured with thermocouple.	52
Table 3 – Statistical analysis for the inlet and outlet temperatures by treatment using one-way Anova at 95% confidence level.	53
Table 4 – Must composition of Sauvignon Blanc grapes frozen and a control before the alcoholic fermentation.	54
Table 5 – Press yield of Sauvignon Blanc grapes frozen and a control.	55

Table 6 – Must turbidity of Sauvignon Blanc grapes frozen and a control before the alcoholic fermentation measured by turbidity meter.	55
Table 7 – Wine composition of Sauvignon Blanc grapes of the control and the freezing treatments.	57
Table 8 – Sulphur dioxide contents of the control and the freezing treatments.	58
Table 9 – Colour of must of laboratory experiment in the control and the freezing treatments.	59
Table 10 – Colour of must and wine in the control and the freezing treatments	59
Table 11 - Phenolic composition of must and wine in the control and the freezing treatments.	60
Table 12 – Low molecular weight polyphenols of Sauvignon Blanc wines coming from frozen grapes and a control.	61
Table 13 – Thiols compounds descriptors and thresholds.	62
Table 14 – Average concentration in ng/l (ppt) and OAV of each thiols quantified in Sauvignon Blanc wines from frozen grapes and control.	63
Table 15 – Pyrazines compounds descriptors and thresholds.	64
Table 16 – Average concentration in ng/l (ppt) and OAV of each pyrazines quantified in Sauvignon Blanc wines from frozen grapes and control.	65
Table 17 – Sensorial evaluation of Sauvignon Blanc wines obtained from partially frozen grapes and a control results of the whole panel.	66
Table 18 – CO ₂ consumption (kg CO ₂ /kg grape) to freeze Sauvignon Blanc grapes during the vintage 2015.	74
Table 19 – CO ₂ consumption (kg CO ₂ /kg grape) to freeze Pinot Noir grapes during the vintage 2015.	75
Table 20 – CO ₂ consumption (kg CO ₂ /kg grape) to freeze Cabernet Sauvignon grapes during the vintage 2015.	75
Table 21 - CO ₂ consumption (kg CO ₂ /kg grape) to freeze Sauvignon Blanc grapes during the vintage 2014.	76

Table 22 - CO ₂ consumption (kg CO ₂ /kg grape) to freeze Pinot Noir grapes during the vintage 2014.	76
Table 23 - CO ₂ consumption (kg CO ₂ /kg grape) to freeze Cabernet Sauvignon grapes during the vintage 2014.	77
Table 24 – Parameters to calculate the total CO ₂ cost in chilean pesos and euros.	78
Table 25 – Sauvignon Blanc supra-extraction treatment costs for 100 000 kg in chilean pesos and euros.	79
Table 26 - Sauvignon Blanc supra-extraction treatment costs for 50 000 kg in chilean pesos and euros.	79
Table 27- Profit margin between a normal box of premium wine and a supra extraction box.	80

ABSTRACT

The thesis “Influence of freezing grapes skins on aromatic and phenolic compounds extraction in Sauvignon Blanc winemaking through the efficient use of CO₂” is a project financed by FIA (Fundación para la Innovación Agraria) code PYT-2012-0054 and it is a third part of a three-year project carried out by PUC, Indura and private wineries.

Supra-extraction promotes the aromatic and phenolic extraction by freezing partially the grapes using carbonic dry ice. The experiment was planned with three replicates per treatment, control and frozen treatments, having a total of six experimental units.

Basic chemical analysis, phenolic compounds analysis, aromatic molecules quantification (pyrazines and free thiols), HPLC analysis and sensory evaluation were performed to the 6 units of wine.

The results showed that the freezing treatment wines have higher values of some aromatic compounds as IBMP (green chili aromas, attractive in some new world style Sauvignon Blancs) and 3MH (grapefruit aromas). Higher values of phenols are detected in the freezing treatment wines with a significant difference in total hydroxycinnamates, the major non-flavonoid component of white wines. Freezing treatment wines have higher values of low molecular weight polyphenols concentration with a significant difference in P-coumaric acid.

In the sensory evaluation, the assessors found significantly more browning in the freezing treatment and higher but not significant values on colour intensity and viscosity. The freezing treatment wines also had a significantly higher intensity in pirazine/ vegetal aromas.

One of the limits connected to the implementation of supra-extraction technique is the higher cost of exploitation, refrigeration and freezing grapes. Increasing only 2 euros the price per box of premium wine (with the supra extraction technique used); it is possible to pay the cost of the supra extraction trial and still have a profit of 3.6%.

The benefit of this project is the increase of value in the wine production chain, which will allow a jump on the quality and identity of the product, benefiting the commercial strategy of the Indura S.A. enterprise and the university position in new technological wineries.

I. INTRODUCTION

The project named “Influence of freezing grapes skins on aromatic and phenolic compounds extraction in Sauvignon Blanc winemaking through the efficient use of CO₂” is a project financed by FIA (Fundación para la Innovación Agraria) code PYT-2012-0054, and carried out by Pontificia Universidad Católica de Chile in partnership with Indura S.A and private wineries.

The characteristic organoleptic taste, aroma and colour of wine depends on the compounds present in must. It's generally agreed that enhancing and preserving the intrinsic qualities of grapes results in a higher quality and characterization of the wine, with consequent possible increase in the commercial value of the final product (A. Parenti, P. Spugnoli, 2004). In recent years the must cooling techniques have been widely employed in the production of white wine, whose quality properties are attributed mostly to the aromatic compounds present in the berry skin. Their presence in the wine depends on several factors: including grape cultivar, maturity, soil, climate, terroir and production method (Lan and Tao, 2014).

To extract aromatic and phenolic compounds, different vinification treatments are used to rupture the cell walls of the berry skin. In recent years, several studies have focused on the effects of different vinification treatments on the quality attributes of wine. However, few studies have focused on the effects of freezing extraction on wine quality (Lan and Tao, 2014). The purpose of freezing extraction is increasing the aromatic profile by increasing extraction through increasing volume of the intracellular liquids thus disrupting the membranes (Álvarez and Aleixandre, 2005). Ice crystals rupture the berry skin cell walls, thereby promoting the release of polyphenols and aroma precursors (Couasnom, 1999; Parenti, 2004). Sauvignon Blanc is a French white wine cultivar of *Vitis Vinifera* and it is present in the largest wine producing countries such as France, South Africa, California, Chile, etc.

The typical aroma of Sauvignon Blanc wine can be described as vegetative, grassy, herbaceous, gooseberry, asparagus, green pepper, boxwood, eucalyptus, blackcurrant buds, rhubarb, capsicum, tomato leaves, nettles, grapefruit, passion fruit, white peaches, as well as acacia flowers and wood (Thibon et al., 2009). The aroma characteristics of Sauvignon Blanc develop considerably during fermentation leading to very aromatic wines. Sauvignon Blanc

wines tend to be crispy and acidic on the palate and are often divided into two classes, green and tropical (Coetzee and du Toit, 2011). The chemical components responsible for the “green” character are methoxypyrazines, especially 2-methoxy-3-isobutylpyrazine (IBMP) and 2-methoxy-3-isopropylpyrazine (IPMP) (Marais, 1994). Tropical aromas of Sauvignon Blanc wines are normally due to volatile thiols (also referred to as varietal thiols), of which 4-methyl-4-mercapto-pentan-2-one (4MMP) reminiscent of box tree, passion fruit and black currant and 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA), which have passion fruit and grape fruit aromas (du Toit et al., 2013). These compounds are present in the grapes in the free aromatic form (methoxypyrazines) or partially as non-aromatic precursors (thiols) that can be released by the yeast during alcoholic fermentation. Other aroma compounds such as esters, higher alcohols, fatty acids and monoterpenes are compounds that could potentially influence the aroma bouquet of a wine significantly. These aroma compounds exist either as precursors in the grapes (monoterpenes) or arise due to the yeast metabolism during fermentation (esters, higher alcohols, fatty acids) and often display fruity, floral and pleasant aromas (Coetzee, 2011).

Pre-fermentation practices determine the aromatic characteristics of white wine (Gayon et al., 2006). Maceration or pre-fermentative skin contact of crushed grapes under controlled conditions is the most popular process used to improve the aroma of wine (Bavcar et al., 2010).

The technique used in this project was supra-extraction, which consists in a partial freezing of the berry skin using CO₂ dosers and pressing the defrosted vintage, achieving a higher extraction of the epidermis compounds. In the case of Sauvignon Blanc variety the interesting compounds, associated to an improvement of the aromatic intensity, are in the berry skin.

II. GENERAL CONTEXT OF THE PROJECT

The project named “Influence of freezing grapes skins on aromatic and phenolic compounds extraction in Sauvignon Blanc winemaking through the efficient use of CO₂” is a project financed by FIA (Fundación para la Innovación Agraria) code PYT-2012-0054, and carried out by Pontificia Universidad Católica de Chile in partnership with private wineries that provided the vinification equipment and Indura S.A., who developed the CO₂ equipment and technology.

The partial freezing of the vintage was achieved with carbonic dry ice, using a machine designed by Indura S.A., which was made it specifically for this purpose, then the defrosted vintage was pressed and the must transferred to individual stainless steel tanks, where a typical white wine fermentation took place. The experiment was planned with three replicates per treatment, control and frozen treatments, having a total of six experimental units. Basic chemical analysis (pH, alcohol degree, volatile acidity, total acidity, residual sugar, etc.), spectral measures, aromatic molecules quantification (pyrazines and thiols), low molecular weight phenols by HPLC and sensory evaluation were performed to the 6 units of wine.

III. CHILEAN WINE SECTOR

Chile is located to the Southwest of South America with a total population of 17.5 M. The population is concentrated in the center of the country.

Chilean vitiviniculture is very important at an economic and social level and it has been recognized as one of the largest wine producers with an excellent price/quality relation. At the present, Chile is trying to have the recognition as a high quality wine exporter like competitors countries as, Australia and New Zealand. Due to that, it is of great importance to know well the raw material and the factors that can influence wine quality, so to have the knowledge of different practices of winemaking becomes necessary (González, 2012).

Chile is the 9th largest wine producer in the world, with 14 wine regions (Figure 1). The red varieties represent 73% and white varieties represent 27% (SAV, Ministerio de Agricultura, 2011). Chile has a total vineyards area of 205 Mha (OIV, 2012), with a 17,8 % increase relative to 2000 and it is the 10th vineyard area in the world.

Sauvignon Blanc is the white variety with the largest surface cultivated in Chile with 13.277,82 ha, being the second (12%) at national level for winemaking after Cabernet Sauvignon (36%) (González, 2012).



FIGURE 1 – CHILEAN WINE REGIONS MAP.
SOURCE: WINE OF CHILE

IV. PROBLEMATIC

The problematic proposed is to test the supra-extraction technique on Sauvignon Blanc grapes with the aim of improving the extraction of some important components, such as aromatic and phenolic compounds which will increase the quality of the final product. This increase of aromas and phenolic compounds extraction will preserve the characteristics of the grape variety and its terroir. All this taking in account the economic and efficiency aspects of the supra-extraction treatment.

The research problem of the thesis is based on the following question:

“Is the supra-extraction technique effective and economically feasible on aromatic compounds extraction and protection from oxygen to improve the Sauvignon Blanc wine quality through the efficient use of CO₂?”

To answer this important question it is crucial a literature review, a chemical and sensorial characterization of Sauvignon Blanc wines subjected to supra extraction from the actual vintage (2015).

V. OBJECTIVES

The main goal of this thesis is to compare the quality of Sauvignon Blanc wines obtained with a traditional white vinification method and a freezing treatment, which consists in freezing in a homogenous way the Sauvignon Blanc destemmed grapes using a new equipment developed by Indura S.A. and pressing the defrosted vintage, with the purpose of improving extraction from the grapes, such as thiols, pyrazines and phenolic compounds. The protection of the supra-extraction treatment from oxygen is another important matter to discuss and analyse. We want to demonstrate, from this method and using this new technology that we will favour the quality of the final product, the wine.

Another important aim is to prove that we can obtain a better wine quality by an efficient use of CO₂ dosers. To verify this we need to calculate mass balances, heat transfer balances and energetic yields. Also the economic aspect is an important part of the project to know if in a recent future this equipment can be attractive for the wine market.

So in summary, the objectives are:

- To determine and evaluate through physicochemical and sensorial analysis the Sauvignon Blanc wine quality obtained with and without supra-extraction technique used.
- To achieve the efficient use of CO₂ during the trial.
- To calculate the cost of the supra-extraction technique, using the new equipment developed by Indura.

VI. HYPHOTHESIS

To answer the research problem, the following hypothesis are proposed:

H1: The supra-extraction technique improves the extraction of aromatic compounds and phenols from the berry skins, resulting in better white wine quality.

H2: The CO₂ dispenser equipment developed by Indura is efficient on partially freezing grape skins of different varieties.

H3: The cost of the supra-extraction treatment is reasonable on the improvement of the wine quality.

VII. LITERATURE REVIEW

7.1. Grape skin composition, extractability and maturation

The raw material for making wine is the grape, which consists of several parts. A good understanding of grape composition is essential to understanding the process of winemaking and making better quality wine.

Berries are the fruit of the grape attached to the stem, representing 3 to 6% of weight, many berries make up the cluster or bunch of grapes. The essential parts of the berry include the skin (2 to 3% of weight), pulp (80 to 85% of weight), and seeds (5 to 8% of weight). The skin of the grape is composed by tissues with strong cellular structure, where it is possible to distinguish the epidermis (layer of cells covered with a wax-like coating called the cuticle, which renders the berry waterproof) and the hypodermis (tissue constituted by several layers of cells which are richer on elaborated substances).

The main components in the skin are: phenolic compounds (colouring matter: flavonoids for white varieties and anthocyanins and flavonoids for red varieties), aromatic substances in free form and aromatic precursors, pectic substances (which enter in the composition of cell wall) and minerals substances (potassium and others) (Navarre and Langlade, 2010).

Cells in the pulp have large vacuoles containing the cell sap or juice. When the berry is gently crushed, the fragile cells in the pulp are broken and the juice is released, this juice is commonly referred to as the free run (Dharmadhikari, 2001).

The seeds are localized in the center of the flesh and we can find two to four seeds in each berry. Seeds are rich in tannin which gives the astringency impression and are extracted during alcoholic fermentation (Dharmadhikari, 2001).

Freshly pressed grape juice consists of 70 to 80% of water and 20 to 30 % of dissolved solids such as organic and inorganic compounds. The important groups of compounds from the winemaking point of view are the following:

1- SUGAR

In grapes, a large portion of the soluble solid is sugars, glucose and fructose are the main sugars in the juice. Sugars in the grapes accumulate during all the maturation to reach a plateau. The final concentration varies with grape variety and climate between 160 to 260 g/L. The main sugars, more than 90%, in the grapes are glucose and fructose in a ratio close to one. These compounds are hexose sugars that also have the property to reduce Fehling's liquor. A small proportion of saccharose, less than 5%, is also present. The sugars are mainly produced by the leaves during the photosynthesis process. When leafs are growing, after a certain stage (approx. 30% of the adult size) the leaf will start to export the sugars toward other organs like small leaves or grapes (Saucier et Glories, 2002).

2- FREE ORGANIC ACIDS

Organic acids are the most abundant solids present in grape juice. The principal organic acids found in grapes are tartaric, malic, and to a small extent, citric. Many other organic acids, including amino acids, are also found in juice and wines, but tartaric and malic acid account for over 90% of the total acids present (Dharmadhikari, 2001). During the maturation period, the acidity in the grape gradually decreases, this can be measured in three ways:

- 1- The total acidity is generally measured by titration of the must with a molar solution of NaOH. The result can be expressed in equivalents of tartaric acid or in moles of acids.
- 2- The pH of the must can be measured with a pH electrode which measures the concentration of H^+ ions, where (Formula 1):

$$pH = -\log H_3O^+ \quad (1)$$

- 3- The specific concentrations of malic and tartaric acids, the two main grape acids, can be measured by chromatography or with enzymatic kits. The total content of these acids is obtained (ionised form or not).

During maturation, tartaric acid remains quite constant whereas malic acid decrease and seems to be used as a source of energy by the grape. (Saucier et Glories, 2002).

3- PHENOLIC COMPOUNDS

Phenolic compounds are important constituents of grapes and wine. Following sugars and acids, they are the most abundant constituents present in grapes. Phenolic compounds are a group of substances that are structurally diverse and are present in various amounts. They play a vital role in determining the wines colour and flavour and in the aging and maturation of wines. They also are involved in browning reactions in grapes and wines. The phenolic compounds are primarily located in the seeds and skins of the berry. The juice contains a very small amount (3 to 5% of total phenols). White wines are usually produced from juice with little skin and seed contact. Their phenolic content is low, in the range of 100 to 250 mg/L gallic acid equivalent (GAE) (Dharmadhikari, 2001).

4- NITROGENOUS COMPOUNDS

Nitrogenous compounds in grapes include ammonium and organic nitrogenous compounds such as amino acids, peptides, and proteins. The nitrogen content ranges with the grape variety, climate, soil, fertilization and terroir. The total nitrogen concentration of the berry increases during the maturation period and its increase is important due to the importance that they have as a nutrients for yeast and lactic acid bacteria. Nitrogen influences biomass formation (cell population or cell yield), rate of fermentation, and production of various by-products, which in turn affects the sensory attributes of wine. Proteins (nitrogenous compounds) are also involved in wine stability. Insufficient nitrogen in must can cause a sluggish or stuck fermentation and the formation of a "rotten egg" odour (H_2S) (Dharmadhikari, 2001).

5- AROMA COMPOUNDS

Many volatile odorous compounds are found in wine, these aromatic substances are derived from three major sources, grapes, fermentation and aging/maturation. Grapes contain numerous flavour compounds which give a variety their distinct varietal character. Examples: 2-methoxy-3-isobutylpyrazine (IBMP), 2-methoxy-3-isopropylpyrazine (IPMP), 4-vinylguaiacol, 3-mercaptohexanol (3MH), 4-vinylphenol and terpenes. The odorous compounds in grapes are largely present in the skin and the layers of cells immediately beneath it. The flavour compounds tend to increase during ripening (Dharmadhikari, 2001).

The antioxidant tripeptide glutathione is a natural constituent, and the main thiol, of wines. It has been found previously that glutathione, caffeic acid, gallic acid, and also wine phenolic extracts slow the decrease of several esters and terpenes during white wine storage and glutathione slows the decrease of volatile thiols during the storage of Sauvignon Blanc wine (Roussis, 2013).

6- MINERAL COMPOUNDS

Minerals are taken up by the vine from the soil, they usually make up approximately 0.2 to 0.6 % of the fresh weight of the berry. The important mineral compounds include: potassium, sodium, iron, phosphates, sulphate, and chloride. Potassium is the most important mineral, which accounts for 50 to 70 % of the cations in the juice. During ripening, the potassium content of the grape increases which leads to the formation of potassium bitartrate, causing the reduction of the acidity and increasing the pH (Dharmadhikari, 2001).

7- PECTIC SUBSTANCES

Pectins are cementing agents present in the cell wall. Chemically, they are complex polysaccharides made of galacturonic acid molecules linked together. During ripening, pectin is progressively hydrolysed by naturally occurring pectolytic enzymes, which renders the berry softer as it ripens. In juice, the pectin causes cloudiness by holding the particles of fruit pulp in suspension. To allow the suspended solids to settle and clarify the juice, commercial preparations of pectolytic enzymes are often used (Dharmadhikari, 2001). After understanding the composition of raw material, it is important to understand the grape maturation. In the period of maturation, a series of biochemical events occurs that influence the grape quality in relation to winemaking. The period of the grape maturation is classically defined to take place between the veraison and the date of the harvest. Before the veraison, the size of the berry increases due to the multiplication of the cells. After veraison the multiplication is stopped but the size of the cells increases and so does the weight of the berry. The evolution of the weight of the berry follows then a double sigmoid curve (Figure 2) (Saucier et Glories, 2002).

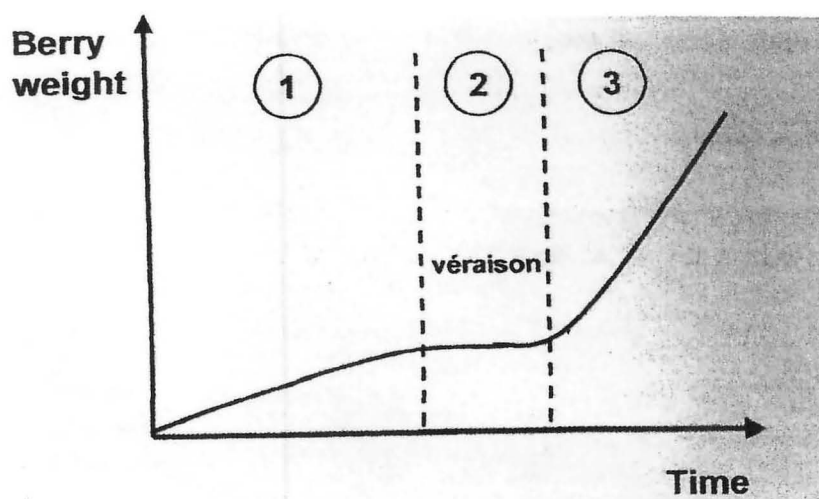


FIGURE 2 - THE EVOLUTION OF THE WEIGHT OF THE BERRY FOLLOW THEN A DOUBLE SIGMOID CURVE (SAUCIER ET GLORIES, 2002).

The berry undergoes structural changes in the skin cells during ripening. The major changes are located in the primary cell walls which composed of pectins, cellulose, hemicellulose, calcium and structural proteins. The process of softening is important for the oenologist because it can help the extraction of phenolic compounds and aroma precursors. Although this process is not fully understood at the molecular level, it seems that the content in soluble pectins increase during ripening, this is probably due to changes in polygalacturonase and pectin methyl esterase activities during maturation. Also the decrease in calcium content may limit the chelation between acid functions of the pectins, thus resulting in the softening of the skin (Saucier et Glories, 2002).

Optimum maturation can only correspond to a level of grape maturity that produces the best wine from a grape crop of a given parcel. However, the optimal aroma composition of a grape is not easy to define. In fact, the grape progressively loses its vegetal and herbaceous aromas during maturation, to acquire fruity aromas which are more or less stable towards the end of maturation. The formation of these different aromas in wine is relatively complex, some exist in free state in the grape, others are formed from precursors located in the must, during the pre-fermentation phase or during alcoholic fermentation. The grape has a potential for both undesirable herbaceous flavour and sought-after fruity aromas. These two potentials evolve in the opposite direction during maturation. According to the theoretical representation

in the figure 3, the grape would have an optimum composition in the 5 week following veraison (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

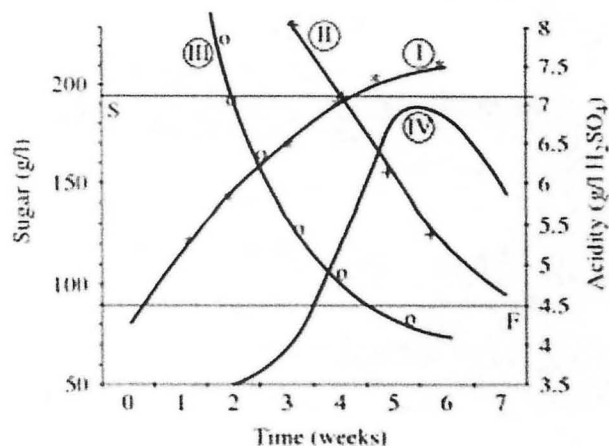


FIGURE 3 – THEORETICAL SCHEMA OF THE EVOLUTION OF SAUVIGNON BLANC GRAPES DURING THE 7 WEEKS FOLLOWING VERAISON. I: EVOLUTION OF SUGAR CONCENTRATION (S, MINIMUM CONCENTRATION IN FRANCE); II: EVOLUTION OF ACIDITY, OPTIMUM BETWEEN 5 AND 6 G/L H₂SO₄; III: EVOLUTION OF VEGETAL FLAVOUR (F, MINIMUM PERCEPTION THRESHOLD); IV: EVOLUTION OF FRUIT CHARACTER POTENTIAL (RIBÉREAU-GAYON ET AL., 2006).

7.2. Cold Winemaking Techniques

7.2.1. PRE-FERMENTATIVE COLD MACERATION

Pre-fermentative maceration or also known as skin contact maceration or pre-fermentation cold soak is a technique where the crushed white grapes are macerated with the skin, before the phase of must extraction and therefore the alcoholic fermentation. The aim of this technique is to extract the most quantity of aromatic components contained in the grapes skin, without acquiring other undesirable components and reaching a wine with a great

aromatic potential. The pre-fermentative maceration technique require certain equipment's and resources and it is meaningful when applied on aromatic varieties otherwise it is a waste of resources. The extraction of the aromatic components depends on maceration time applied, increasing when the time is longer, but taking in account that with too much time undesirable components such herbaceous substances can be extracted. The optimal time of maceration depends mainly of the grape variety and also of the ripening conditions of the grape. The optimal time is 9 to 12 hours, yielding aromatic gains of 30 to 40%. The acidity of the must decreases between 0.5 to 1.5 g/L (SO_4H_2), due to salt formation by potassium presence in the grapes skin and increasing the values of ashes and its alkalinity. The must also increases in amino acids concentration which increases the fermentation velocity and the formation of non-varietal aromas, as well as polysaccharides concentrations responsible for producing a feeling of greater volume in the mouth (Hidalgo Togores, 2003). The cold maceration is considered to increase fruity aroma and flavour (Álvarez et al., 2006) particularly the terpene concentrations in white musts (Baumes et al., 1989), to increase aromatic intensity and complexity (Heatherbell, 1994), to increase colour intensity and/or hue (Parenti et al., 2004; Durbourdieu et al., 1986) and generally to produce wines with softer astringency and increased bitterness.

7.2.2. CRYOEXTRACTION

Cryoextraction permits the selection of the most sugar-rich and therefore ripest grapes, a technique more used to make liqueur wines (Chauvet et al., 1986). This technique consists in freezing the whole grapes, then pressing the frozen vintage, obtaining a must rich in sugar content. The cryoextraction of grapes, by the direct contact of crushed grapes with a cryogen, constitutes one promising technical approaches in winemaking, to enhance the varietal character of white wines, well-balanced and better-rounded wines (Carillo et al., 2010). The selection of the most sugar-rich and thus ripest grapes by cryoextraction is the primary cause of improved wine quality (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Under these conditions the must could reach mean temperatures below 10°C for 1 to 7 days, which is incompatible with the increase of yeasts population and does not allow the alcoholic fermentation (Francesca et al., 2008). By blocking fermentation for several hours, it permits a coarse clarification by sedimentation. It is also capable of inhibiting the development of acetic bacteria, often present

in large quantities on botrytized grapes, as well as lactic bacteria, responsible for malolactic fermentation. Finally, sulphating restricts the proliferation of some spoilage microorganisms, particularly apiculated yeasts that “waste” sugar and form unwanted by-products in the wine (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Artificially imitating the elaboration of the famous ice wines, we can obtain a must yield of 60 to 80%.

The cryoextraction process can be performed in different ways, one of these requires the use of large capacity refrigerator groups to achieve the rapid cooling required. Another cooling system is based on using a cryogenic gas (CO_2 or N_2) (Carillo et al., 2010). CO_2 at atmospheric pressure can be in solid and in gas state as a function of the temperature employed. Because of these interesting characteristics: not toxic, low reactivity, low cost and high availability, solid or liquid carbon dioxide are largely utilised as cryogens in the oenological sector (Francesca et al., 2008).

Cryoextraction is based on the Raoult's law, who states that the freezing point of a solution lowers as the solute concentration increases. When the temperature of a white grape crop is lowered to 0°C , only the grapes containing the least amount of sugar are frozen. By pressing at this temperature, a selected juice is obtained which represents only part of the total juice volume. The potential alcohol content of this juice, however, is higher. By further lowering the temperature of the grape crop and the pressing, the number of frozen berries is increased. As a result, the selected must volume is further diminished and the potential alcohol content increased (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Due to the direct contact between the cryogen and the solid parts of the must, a partial solidification of endocellular water occurs, increasing of volume. The volume occupied by the same amount of water in the solid state is greater than the same in liquid phase. This phenomenon induces the laceration of the cellular membranes, cellular crash, and promotes the diffusion in the liquid phase of many interesting compounds, such as phenols, aromatic substances, etc., present in not yet crushed cells, skins and seeds. Moreover the lack of ethanol (alcoholic fermentation is quite completely inhibited) slows down, the extraction of the more complex and more aggressive tannins present in the seeds, allowing to obtain a well-balanced and better-rounded wines. The relevant amount of gas during the direct contact must/cryogen allows to reduce the diffusion of atmospheric oxygen in the liquid phase so decreasing the oxidation (Francesca et al., 2008).

However, these cryoextraction selected wines are clearly preferred over the control wines (Chauvet et al., 1986) due to their increased concentration, finesse and distinctiveness. This technique is applicable to all types of white grape crops but is especially interesting for noble-rotted grape crops. (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

7.2.3. SUPRA-EXTRACTION

The supra-extraction technique consists in cooling partially the grape skin and pressing whole grapes after they have been thawed. The freezing and thawing of the skins and lower epidermal layers results in modifications in tissue ultrastructure, producing a profound disorganization on the cellular tissues of the grape. In certain aspects, it produces an effect comparable to skin maceration. Notably, aromas and aroma precursors are released more easily from the grape. Extraction of skin phenolic compounds is, however, lower than with skin maceration and even immediate whole grape pressing (Ollivier, 1987). Sugar extraction from the skins is also increased by 0,3 - 0,6% potential alcohol during supra-extraction. Despite its slowness and elevated cost, supra-extraction promotes the aromatic expression of certain noble white varieties. (Ribéreau-Gayon et al., 2006). In the case of the Sauvignon Blanc variety the interesting compounds are associated to an improvement of the aromatic intensity, due mainly to the fact that most of the aromatic compounds and their precursors are in the berry skin.

The supra-extraction appears to be a winemaking technology able to put in evidence the organoleptic and chemical characteristics of grapes, producing coloured and aromatic wines. This technology seems to be able to meet the requests of modern consumer who chooses easily identifiable wines, typical products rich on coloured and aromatic substances and strongly related to their terroir (Francesca et al., 2008).

7.3. Wine aroma

Flavour compounds are volatiles that are perceived by the olfactory receptors in the nose and trigger an odorous sensation. The wine flavour is very complex since its

development is influenced by many biological, biochemical and technological parameters. Flavour compounds can either have its origin from the raisin, or they can develop during the alcoholic fermentation, other technological interactions or during the ripening process (Fretz, 2005).

7.4. Aroma Components

7.4.1. PYRAZINES

Pyrazines are characteristic for Sauvignon Blanc wines, where they positively correlate with notes as green pepper (Fretz, 2005). Methoxypyrazines are nitrogen containing ring substances and are secondary products of amino acid catabolism (Figure 4). Valine, glycine and methionine are considered to be precursors of 2-methoxy-3-isopropylpyrazine. However, the exact pathway for the formation of methoxypyrazines is not known, the indication are that the biosynthetic pathway differs completely from that of monoterpenes and C13-norisoprenoids. One methoxypyrazine is important in Sauvignon Blanc grapes and wine, namely 2-methoxy-3-isobutylpyrazine (IBMP), while 2-methoxy-3-isopropylpyrazine (IPMP), and 2-methoxy-3-sec-butylpyrazine (SBMP) are generally present. These components have extremely low threshold values and IBMP, which normally occurs in higher concentration than the other two can be perceived at a concentration of 2 ng/L in water (Marais, 1994).

Methoxypyrazines differ with respect to their aromas with green pepper-like aromas being typical of IBMP and pea/asparagus-like aromas typical of IPMP. Therefore the complexity and nuances of Sauvignon Blanc aroma will depend on, amongst other things, whether these components occur at levels above their threshold values. The presence of another pyrazine, namely 3-methoxy-2-ethylpyrazine, was also reported in Sauvignon Blanc grapes. The threshold value of this pyrazine is 425 ng/L, and as it is probably present at extremely low concentrations, it is unlikely to make any contribution to Sauvignon Blanc aroma. The same reason applies to 2-methoxy-3-methylpyrazine, having a threshold value of 4000 ng/L (Marais, 1994).

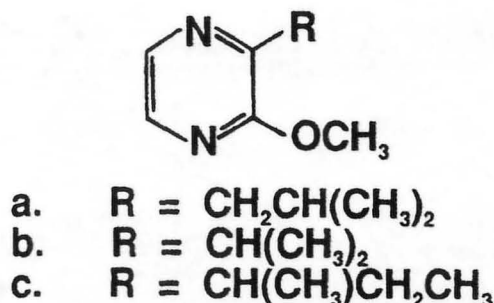


FIGURE 4 – METHOXYPYRAZINES: A) 2-METHOXY-3-ISOBUTYLPYRAZINE (IBMP); B) 2-METHOXY-3-ISOPROPYLPYRAZINE (IPMP); C) 2-METHOXY-3-SEC-BUTYLPYRAZINE (SBMP) (ALLEN, 1991).

7.4.2. THE ROLE OF THIOLS FOR WINE AROMA

Volatile sulphur compounds in wine can be divided into two categories: on one hand, certain volatile sulphur compounds may impact negative aromas, such as rotten egg, which originate from the formation of H_2S_2 by wine yeast. The production of secondary reductive odours can also contribute to negative off-odours described as cooked vegetables, onion and cabbage caused by sulphur containing compounds such as thioacetic acid esters and mercaptans (Coetzee and du Toit, 2011).

Sulphur containing substances generally have a very low threshold value and are therefore powerful flavour compounds. Few of them are considered to have a positive influence on wine aroma; their occurrence is more often correlated with off-flavours. The sulphurous off-flavour in wine is caused by numerous compounds, the formation can be due to improper addition of SO_2 , problems with the alcoholic fermentation, a lack of available nitrogen for the yeast metabolism, incorrect storage of the wine or traces of pesticides (Fretz, 2005).

However, other sulphur containing compounds can contribute to positive fragrances such as tropical, passion fruit and guava-like nuances (Coetzee and du Toit, 2011). Since approx. 15 years, the working group of professor Dubourdieu at the University of Bordeaux is working on the flavour compounds of the wine of Sauvignon Blanc. Thiols have been identified to be responsible for the typicity of Sauvignon Blanc (Fretz, 2005).

Some volatile thiols responsible for the fruity or tropical organoleptic flavours of Sauvignon Blanc wines are 4-methyl-4-mercapto-pentan-2-one (4MMP) reminiscent of box tree, passion fruit, broom and black current bud, which the threshold value is 0,1 g/L in water. Depending on its concentration level and the composition of wine, it also presents a cat urine aroma (Fretz, 2005; Coetzee and du Toit, 2012).

3-mercaptohexanol (3MH) is the most abundant of the identified thiols and its concentration on Sauvignon Blanc variety is 200 – 12000 (ng/L). 3-mercaptohexanol contains a chiral C-atom and exists therefore in two enantiomers (Figure 5). The enantiomers, very often, have different sensory properties, R- and S-3-mercaptohexanol have the same sulphurous note, and however, their esters have different odours. In the yellow passion fruit, the S-isomer is predominant (60 – 80%). According to Tominaga, the isomers are equally distributed in Sauvignon Blanc (46 – 57% S and 43 – 54% R) (Fretz, 2005).

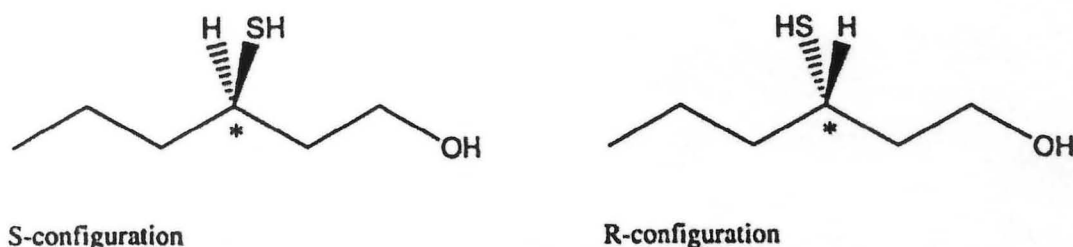


FIGURE 5 – THE TWO ENANTIOMERS OF 3-MERCAPTOHEXANOL (FRETZ, 2005).

3-mercaptohexyl acetate (3MHA) is responsible for the passion fruit, grapefruit and citrus aroma. 4-mercapto-4-methylpentan-2-ol (4MMPOH) can also contribute to the characters of citrus, passion fruit and grapefruit, although its organoleptic role is more limited, due to its concentration in wines seldom exceeding its olfactory threshold of 55 ng/L (Figure 6) (Coetzee and du Toit, 2012).

4-Mercapto-4-methylpentan-2-one 4MMP

3-Mercaptohexan-1-ol 3MH

3-Mercaptohexyl acetate 3MHA

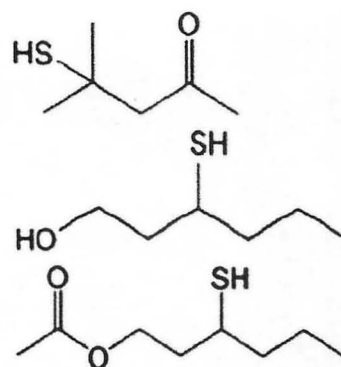


FIGURE 6 - VOLATILE THIOLS CONTRIBUTING TO SAUVIGNON BLANC AROMA (COETZEE AND DU TOIT, 2012).

Wines obtained from botytrised grapes have been found to contain significant amounts of especially 3-mercaptohexanol (3MH) as well as other volatile thiols (Coetzee and du Toit, 2011). Thiols are compounds that easily oxidize, losing their odorants characteristics, so any process which involves oxygen contact will lead for the irremediable loss of these aromas (Belancic and Agosín, 2002).

7.4.3. PRECURSORS OF VOLATILE THIOLS

Thiols can react with quinones to their mercapto derivatives. The precursors of the described thiols are S-cysteine conjugates. The transformation of the precursor into the flavour active molecule by a B-lyase of the yeast occurs during alcoholic fermentation. Cysteine-S-conjugate B-Lyases catalyse the cleavage of C-S bonds thus releasing the flavour active thiols. The formation of 3-mercaptohexanol occurs from its precursor during alcoholic fermentation, a small part of the degraded aromatic precursor is transformed in free aroma. When the alcoholic fermentation is inhibited by natamycin, the aroma released and the precursor's degradation are limited (Tominaga, 2000).

Only a low percentage (2 – 10%) of the precursors found in the must is actually transformed into the corresponding thiol during fermentation. Between 29 and 90% of the precursor disappear thus cannot be detected in the fermented must. The flavour precursor of 3-mercaptohexanol is located in the pulp (46%) and the grape skin (54%). That is why the

maceration of the grape berries is favourable for the concentration of the precursor. In the Sauvignon Blanc must, the S-glutathione conjugate of 3-mercaptohexanol was identified as well. During fermentation, only a small percentage (0.1 – 0.3%) of this precursor is transformed into 3-mercaptohexanol, it does not seem to play an important role as flavour precursor (Fretz, 2005). Figure 7 shows some precursors identified in the Sauvignon Blanc must.

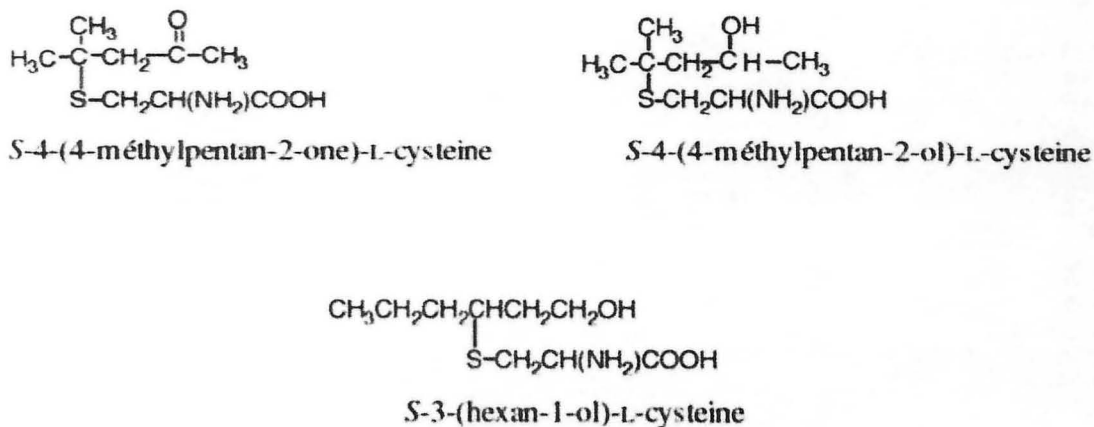


FIGURE 7 - THIOLS PRECURSORS IDENTIFIED IN SAUVIGNON BLANC MUST: CYSTEINE-S-CONJUGATE (TOMINAGA, 2000).

7.4.4. OTHER AROMA COMPONENTS

The terpenes are mainly linalool, geraniol, nerol and x-terpinol (Fretz, 2005). Enzyme-released hydrolysates enhanced wine aroma with respect to three nuances, namely floral, lime and also grassy. The first two aromas are probably caused by monoterpenes. Differences between Sauvignon Blanc and Chardonnay appeared to be minimal, monoterpene concentration constituted a greater percentage of the total aroma concentration of Sauvignon Blanc (Williams et al., 1992). The composition of the free and bound aroma components of Sauvignon Blanc variety, suggested that monoterpenes may play a role in its aroma (Williams et al., 1994). Monoterpenes with a p-menthene structure, occurring in relatively high concentrations in bound forms in Sauvignon Blanc grapes and wine, are menthenediol-1,

trans- and cis-sobrerol and menthenediol-2 are oxidized derivatives of alpha-terpineol and increase in concentration during ageing of wine (Marais, 1994).

The importance of C6-aldehydes and C6-alcohols in the typical grassy, leafy and herbaceous-like character of unripe grapes is well known. During crushing of grapes when grapes cells are broken in the presence of oxygen, high concentrations of hexanal and hexanol are formed from linoleic acid and trans-2-hexenal, trans-2-hexenol, trans- and cis-3-hexenols from linoleic acid (Drawert et al., 1966; Cordonnier & Bayonove, 1981; Aerny & Humbert, 1993). Since these components occurs in all grape juice, it appears that they are not impact components in the typical Sauvignon Blanc aroma, and that their possible contribution is probably masked by the effect of other components. In addition, aldehydes are generally present in wine as bisulphite compounds due to the effect of added SO₂. Aldehydes are also reduced to the corresponding alcohols during primary fermentation (Marais, 1994).

7.5. Factors affecting the development of the typical Sauvignon Blanc aroma

The intensity of the typical Sauvignon Blanc aroma and therefore the concentrations of the components responsible for this aroma are affected by origin and climate (Allen et al., 1988). The intensity is lower in hot areas, while in cool areas such as New Zealand it can be very prominent. The methoxypyrazines are light sensitive and easily degradable to other components, their concentrations decreased more rapidly in the presence of light over 12 months' storage in clear glass bottles (up to 60%), when compared to green and amber coloured bottles (up to 40%). When bottles were stored for 12 months in the dark, concentration decreases were drastically smaller ($\leq 4\%$), irrespective of glass colour (Maga, 1989). Methoxypyrazine concentrations decreased with an increase in sunlight exposure, obtained by a decrease in the number of leaf layers and different pruning techniques caused significant differences in IBMP levels (Allen, 1993). Regarding the localization of methoxypyrazines in grapes, these components probably occur in the solid parts of the grape berry, this may be possible be ascribed to the extraction of methoxypyrazines by ethanol during fermentation or by the liberation thereof from precursors by specific yeast strains (Allen, 1994). Methoxypyrazines concentrations decrease with grape ripening, the IBMP concentration decrease mainly occurred before sugar accumulation reached 50% of the final concentration. A cooler year yielded more cultivar typical wines than a warmer year. Apart

from methoxypyrazines concentrations, monoterpene and Ci3- norisoprenoid concentrations generally increase under the same conditions (Marais, 1994).

7.6. Phenolic compounds in white wines

Phenolic compounds represent an important group of secondary metabolites occurring in grapes and wine. In white wines, the hydroxycinnamic acids (caffeic acid, caftaric acid, p-coumaric acid, p-coutaric acid, ferulic acid, fertaric acid) are the main constituents from the phenolic compounds, we can find them in cell vacuoles from leaves and pulp in tartaric esters form. The concentration of hydroxycinnamates esters decrease during the berry development and stabilize at the maturity phase. Caftaric acid and p-coumaric acid concentrations in protected white must represent 40 and 20%, respectively. The ratio of caftaric and p-coumaric acids in grapes is controlled genetically and for that reason it can be used when identifying and determining the origin of grapevine varieties (Hidalgo Togo, 2003; Ritter et al., 1994).

The contents of hydroxybenzoic acids (gallic acid, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid) in wine are strongly dependent on the grapevine variety. Some studies observed that the global content in phenolic compounds, expressed in gallic acid, range between 50 and 350 mg/L on white wines, being the mainly acid present under flavanol ester form (Hidalgo Togo, 2003; Lampir L., 2013).

Flavonoids represent a large family of secondary metabolites. Flavan-3-ols belong to the class of flavonoid phenolic compounds, the major flavan-3-ol monomers found in grapes and wine include (+)-catechin, his isomeric (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-3-O-gallate (Lampir L., 2013). They accumulate in the grape seeds, but are also found in the skin of the grape berries. In white grape varieties, flavanols represent 46% to 56% of total phenolics. Flavonoids represent a large group of low molecular weight compounds with high antioxidant properties. Their specific chemical structure allows them to reduce oxidative stress through numerous mechanisms (Georgiev V. et al., 2014).

7.7. Oxygen influence

The application of SO₂ before pressing the must has as aim to avoid the enzymatic oxidation of the must and inhibit the PPO action (polyphenol oxidase, enzyme responsible for oxidative degradation of phenolic compounds). Although favouring the phenolic compounds extraction from berry skin and inducing a rapidly cells death, increasing the cellular permeability which can be traduced in a significant increase of phenolic compounds transference to the must (Singleton et al., 1980).

During crushing of grapes, oxygen comes into contact with the grape must. Oxidation enzymes such as polyphenol oxidase and laccase can oxidase phenolic compounds in the must. Grape Reaction Product (GRP) is formed due to the oxidation of phenolic compounds in juice, such as caftaric acid, leading to the formation of an o-quinone. This o-quinone can associate with thiols such as glutathione (GSH) forming GRP in the process. It has also been proved that o-quinones can also react with volatile thiols such as 3-mercaptohexanol (3MH). These o-quinones can originate from the oxidation of caftaric acid, (+)-catechin or (-)-epicatechin (Du Toit et al., 2013).

The Sauvignon Blanc juice is often treated very reductively to preserve these tropical aromas by adding sulphur dioxide (SO₂), ascorbic acid or inert gasses such as N₂ or CO₂ to the must. The precursors of volatile thiols (cysteinylated or glutathionylated) have been shown to be not very sensitive towards oxidation. Sulphur dioxide can also react with H₂SO₂ formed by the oxidation of phenolics, as well as to reduce the o-quinone back. Oxygen addition without SO₂ protection lead to lower levels of certain volatile thiols in the wines, with a corresponding decrease in certain phenols and glutathione concentrations. However, sulphur dioxide prevents this from happening. Methoxypyrazines levels are also less affected by oxidation (Du Toit et al., 2013).

7.7.1. YELLOWING AND PINKING PHENOMENON IN WHITE WINES

White wines that have been made using highly reducing conditions can sometimes develop a pink colouration on sudden exposure to air. The aroma and flavour often remain

unaltered. The pink colour often gives the impression of oxidation; oxidation however is a separate phenomenon (Skouroumounis et al., 2005)

Yellowing and pinking are different names that describe colour changes, they are versions of the same problem, discoloration associated with the over-oxidation of phenolic compound. The discoloration associated with the over-oxidation of a phenol can usually be sorted to an insufficient amount or incorrect selection of antioxidants necessary to adequately stabilize the polymer under “normal” or extreme processing conditions and/or chemical interactions that oxidatively transform a phenolic antioxidant under conditions which are unrelated to melting, for instance in the supra-extraction technique. The condition is strictly cosmetic and does not adversely affect the physical properties of the product (Holtzen, 1991).

When only SO₂ is present at bottling and not ascorbic acid, it is assumed that the pinking precursors are competing with free SO₂ for available oxidants, and that the rate of the pinking reactions is increased with increasing concentration of dissolved oxygen in the wine (Simpson et al., 1982). However, this pinking effect is 100% reversible. Upon exposure to intense light (sunlight, bright florescence) the colour species will reverse themselves and will return to normal (Holtzen, 1991).

VIII. MATERIAL AND METHODS

The methodology of the project “Influence of freezing grapes skins on aromatic and phenolic compounds extraction in Sauvignon Blanc winemaking through the efficient use of CO₂” consists in freezing Sauvignon Blanc grapes by supra-extraction technique, using a new technology developed by Indura S.A., which it was made specifically for this purpose and suffered some updates during the three years of FIA project. The experiment was planned with three replicates per treatment, control and freezing treatments, having a total of six experimental units.

8.1. Operation of the CO₂ dispenser equipment

The CO₂ dispenser equipment consists of a series of five conveyor belts where three are plastic and two metal meshes which move the stemmed grapes. The grapes skins were frozen by spreading CO₂ through 10 injectors distributed over the ends of the machine. Due to the fact that the cooling method is based in a sublimation of the CO₂, the machine has four internal fans which generate an air flow that allows the phenomenon (Figure 8). To control the internal temperature the equipment has two thermometers placed in each end (Figure 9).



FIGURE 8 - CO₂ DISPENSER EQUIPMENT BEING USED.

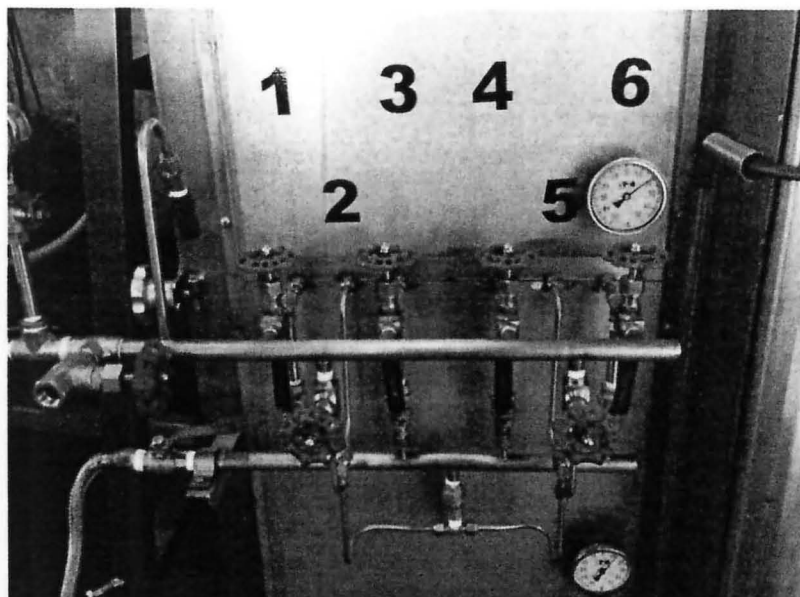


FIGURE 9 – THERMOMETERS TO MEASURE THE INTERNAL TEMPERATURE OF THE CO₂ DISPENSER EQUIPMENT, PLACED IN EACH END.

The conveyor belts speed as the flow of CO₂ inside the equipment are controlled by an external control panel. The speed of the motors that drive the conveyor belts is controlled by a potentiometer located on the control panel (Figure 10). The flow of CO₂ can be modified through manual valves which regulate the amount of CO₂ entering in the equipment arranged in groups of injectors. The supply of CO₂ is provided by a portacryo tank (Figure 11), which is connected to the CO₂ dispenser equipment by tubes. The portacryo with a capacity to store up to 4000 kg of CO₂ at high pressures is provided by Indura. This portacryo is a portable tank (Figure 12) and has a highly efficient insulation that ensures an efficient performance.

The CO₂ that is used, is considered a carbon neutral source because it is a by-product of electric generation in an ENAP refinery.

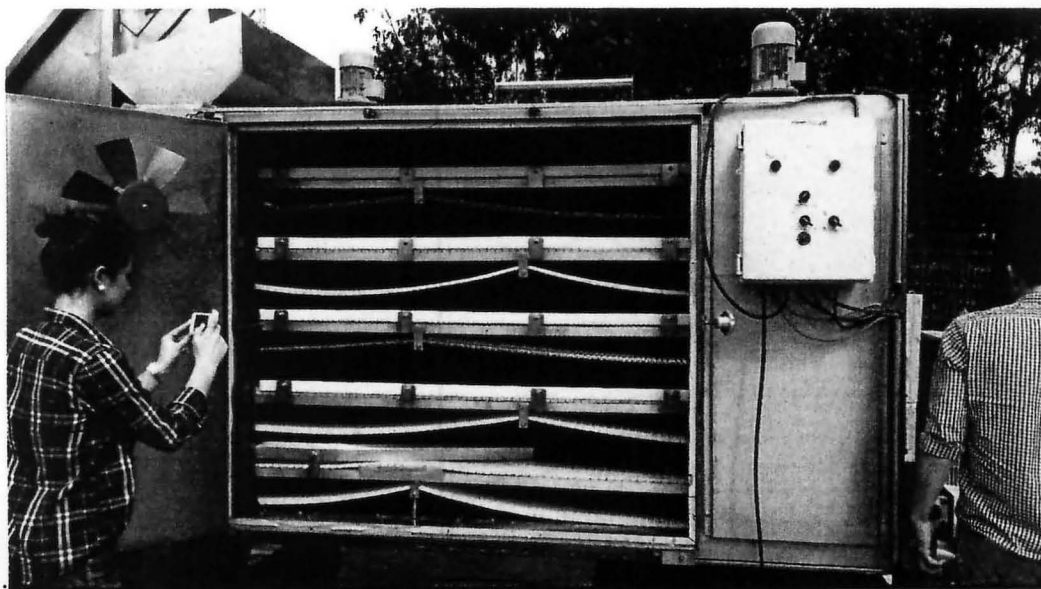


FIGURE 10 - EXTERNAL CONTROL PANEL.



FIGURE 11 – PORTACRYO EQUIPMENT.



**FIGURE 12 – PORTACRYO TANK, CO₂ DISPENSER EQUIPMENT AND
EXPERIMENTAL TANKS BEING TRANSPORTED.**

8.2. Laboratory experiment

This experiment consists in making a trial run with a similar volume of Sauvignon Blanc berries in each to achieve repeatable results, 4 repetitions per each treatment, control and freezing treatments were tested.

In a homogenous way, 8 trays of whole berries ($\cong 400$ berries) with similar sizes (Figure 13) were prepared, 4 trays are covered with carbonic dry ice in the bottom and top of berries, the other 4 trays without carbonic dry ice (Figure 14). The temperature was measured within 15 minutes, with a thermocouple and an infra-red thermometer, until the freezing treatment is sublimated. The berries from each tray were crushed by hand in a homogenous way and transferred to a Durham bottle and 500 mL or proportion of a hydroalcoholic solution at 12° alcohol and pH xx was added. CO₂ was sparged every moment the bottles were opened to avoid oxidation and 3 g/hL of Natamycin was added to avoid fermentation. Bottles were left to macerate during 7 days at 5°C (Figure 15). Samples were taken daily and always macerate extracted was replaced by 12° alcohol solution to avoid concentration.



FIGURE 13 - TRAYS WITH 400 SAUVIGNON BLANC BERRIES EACH.



FIGURE 14 –FREEZING TREATMENT: TRAY COVERED WITH CARBONIC DRY ICE IN THE BOTTOM AND THE TOP OF BERRIES.



FIGURE 15 - TREATMENTS MACERATING IN 500 ML BOTTLES.

Samples are filtered and then spectral measurements at 280 nm, 320nm and 420 nm wavelengths were made (Figure 16). Total phenolics, total hydroxycinnamates, total

flavonoids and brown pigments were determined following the protocols proposed by Iland et al. (2004) as it is described later.



FIGURE 16 – SAMPLES OF THE EXTRACT OF THE FREEZING TREATMENT DILUTED TO DO SPECTRAL MEASURES.

8.3. Experimental layout of the industrial experiment to freeze Sauvignon Blanc grapes

The Sauvignon Blanc grapes were harvested march 23rd manually, they came from “Sociedad Agrícola Parot y Barros” in the Maule Valley in plastic bins and the trial took place in Concha y Toro’s Center for Research and Innovation in Talca, Chile on march 24th.

The experiment design consisted in two different treatments, control treatment and freezing treatment (with the use of CO₂ dry ice), each treatment with 3 repetitions.

The equipment layout (Figure 17) consisted in a Bucher Vaslin detemmer Delta E2 and an elevator to introduce the Sauvignon Blanc grapes in the CO₂ dispenser equipment. With the help of the conveyor belts (Figure 18) the grapes move through the equipment and fall into a reception bins (Figure 19 and 20).

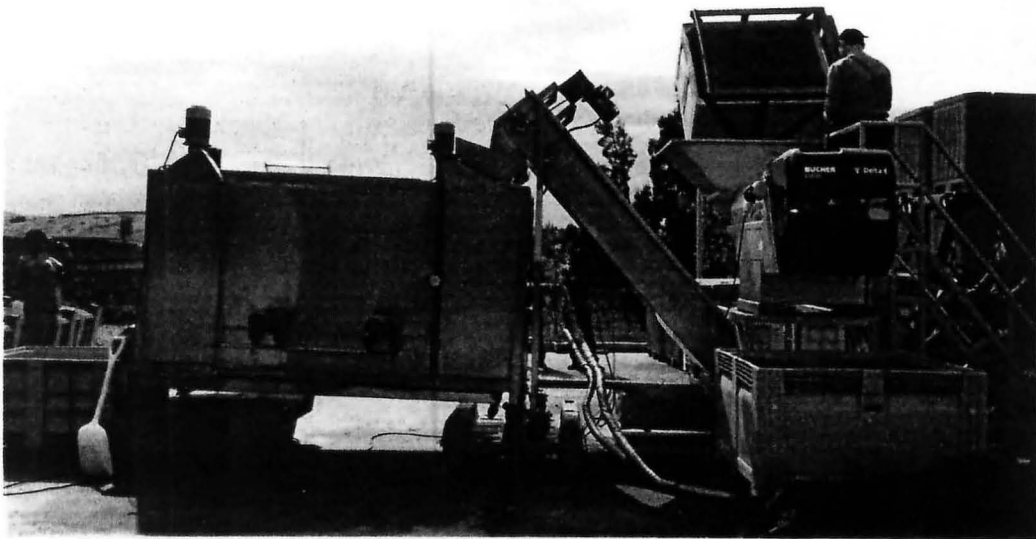


FIGURE 17- EQUIPMENT LAYOUT AT CONCHA Y TORO'S CENTER.

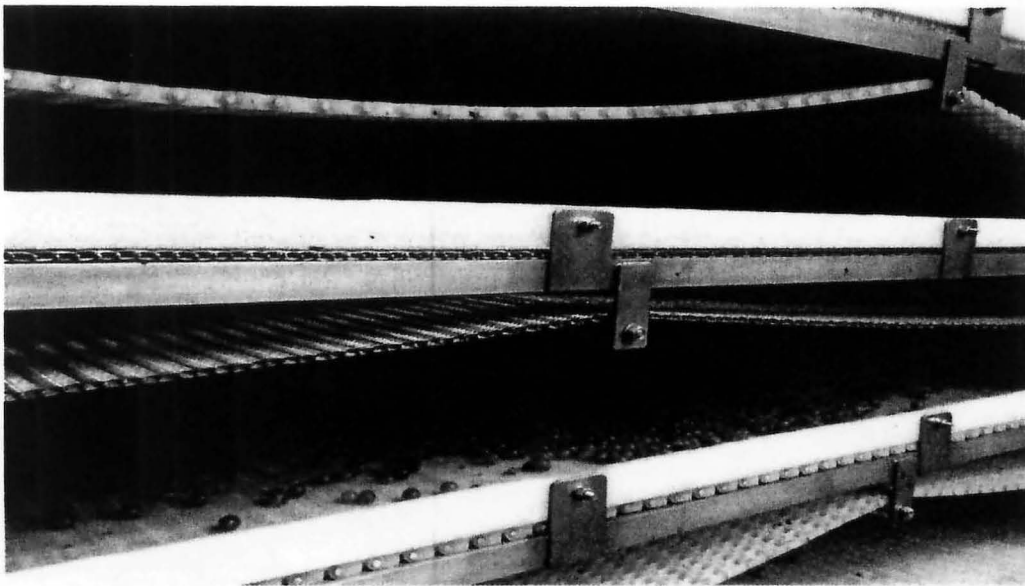


FIGURE 18 – CONVEYOR BELTS INSIDE OF THE CO₂ DISPENSER EQUIPMENT.



FIGURE 19 – CONTROL TREATMENT FALLING INTO A RECEPTION BINS AND THEN BEING PROTECTED WITH DRY ICE.

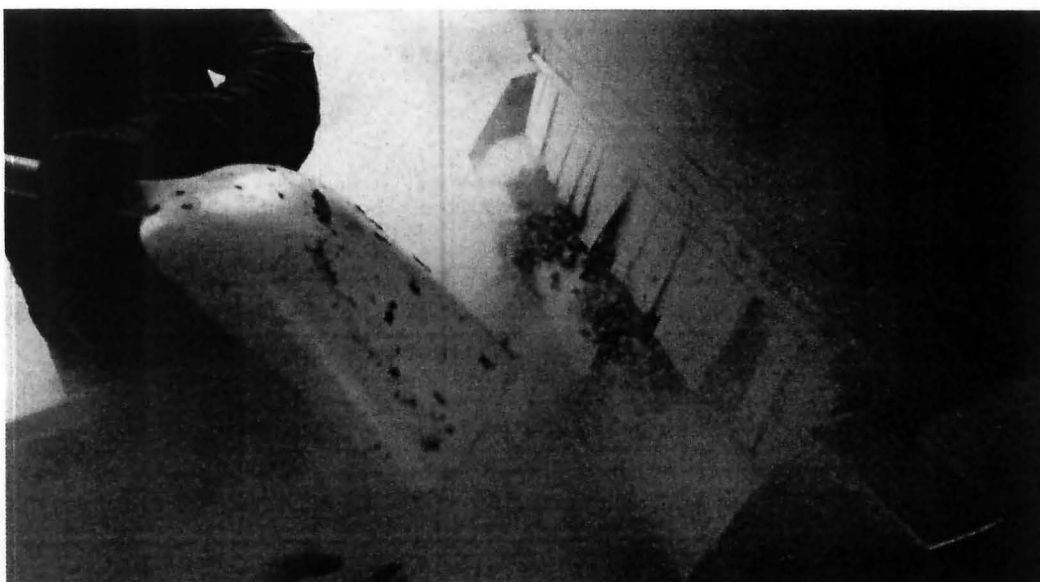


FIGURE 20 – FREEZING TREATMENT LEAVING THE CO₂ DISPENSER EQUIPMENT AND FALLING INTO A RECEPTION BINS.

The raw material of both treatments passed along inside of the machine, but the CO₂ dispenser equipment was only activated during the freezing treatment. At a velocity of 18 Hz, the grapes were inside of the CO₂ dispenser equipment during 3.5 minutes. The portacryo

tank was connected with tubes to the CO₂ dispenser equipment and with the help of the valves the entrance of CO₂ was regulated (Figure 21).

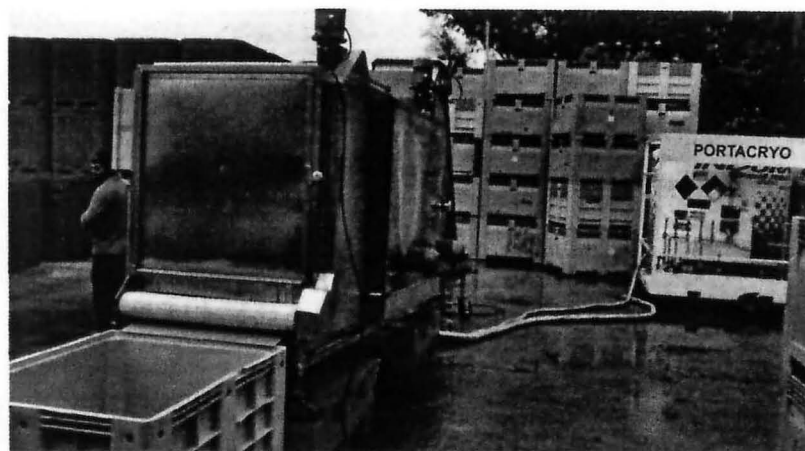


FIGURE 21 - PORTACRYO TANK CONNECTED TO THE CO₂ DISPENSER EQUIPMENT BY TUBES.

8.3.1. WINEMAKING

The vinification of wines was carried out at Concha y Toro's Center for Research and Innovation in Talca, Chile. Sauvignon Blanc grapes were manual harvested in the day before and kept safe inside plastic bins in cold cameras at 12°C until the beginning of the trial. 4 g of metabisulfite per h/kg, and 2 mL/hL of pectolytic enzymes Rapidase XXL were added to the grapes. When the experiment started, a crane fork transported the bins to a balance to measure the weight and then shed it into the Bucher Vaslin destemmer. The grapes moved through the CO₂ dispenser equipment and after leaving it, they were received in a 500 kg bins. During the Sauvignon Blanc trial, the inlet temperatures of the berries before enter in the CO₂ dispenser equipment and the outlet temperatures of the berries after going out of the equipment were measured with two instruments, a thermocouple and an infrared thermometer (Figure 11). The infrared thermometer measured the surface temperature of grapes while the sensor of the thermocouple was inserted in each berry to measure the temperature immediately under the skin of the other side. Temperature measurements were made every 5 minutes. Five berries were measured with the thermocouple and one sample of whole grapes were measured each time.

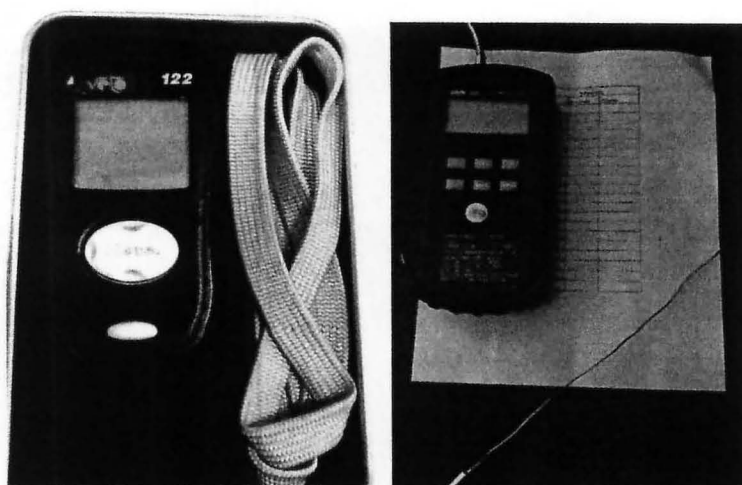


FIGURE 22 - INFRARED THERMOMETER ON LEFT AND THERMOCOUPLE ON RIGHT.

Control must was protected with a small quantity of carbon dry ice, while the bins was being filled. When each experimental unit was finished the bins was weighted in a balance and directly pressed by a Bucher Vaslin pneumatic press. The freezing must was also weighted and covered with plastic film until defrosted before being pressed. The must of both treatments was obtained in the Bucher Vaslin pneumatic press in about 1h15min at a programme 7 which consisting in 4 cycles at different pressures (Table 1).

TABLE 1 – PRESSING PROGRAMME 7.

Cycle	P1 (bar)	P2 (bar)	Maintenance time (min)
Cycle 1	0,1	1	1
Cycle 2	0,2	1,4	1
Cycle 3	0,2	2	1
Cycle 4	1,2	2	1

From the press, the juice obtained was transferred with a 100 – 120 NTU to stainless steel tanks (200 L capacity) (Figure 12), to ensure reductive conditions lines were sparged

with CO₂. Pectolytic enzymes Rapidase XXL (4 cm³/hL) were added again and SO₂ was corrected to 30 mg/L. Juice was clarified by cold decantation for approximately 48h at 8°C – 10°C. Before fermentation a chemical analysis of the must was done, Brix, volatile acidity, total acidity, pH, SO₂, malic acid, YAN (Yeast Assimilable Nitrogen), optic density at 420 and 520 were determined. The necessary corrections of acidity to pH 3.20 was done by adding different amounts of tartaric acid to each experimental unit. 15 g/hL of PVPP was added to each experimental unit, which it could cause the removal of some low molecular weight phenols.

20g/hL of active dry EC 118 yeast was inoculated to start must fermentation which was carried out at 15 to 17°C until dry, the temperature control was achieved automatically through cooling jackets wrapped around the fermentation tanks. The entire fermentation lasted 22 days, and every day the specific gravity and the temperature were measured four times for controlling the fermentation. At a specific gravity of 1060, O₂ (8mg/L), Biovin Nut (60g/hL) and DAP (diammonium phosphate) (30g/hL) were applied.

After fermentation, the wine was sulphited (4g/hL) and cold stabilised at 12°C for 40 days and then bottled in 75 cl screw caps bottles (Figure 13).



FIGURE 23 - STAINLESS STEEL TANKS (200 L OF CAPACITY).

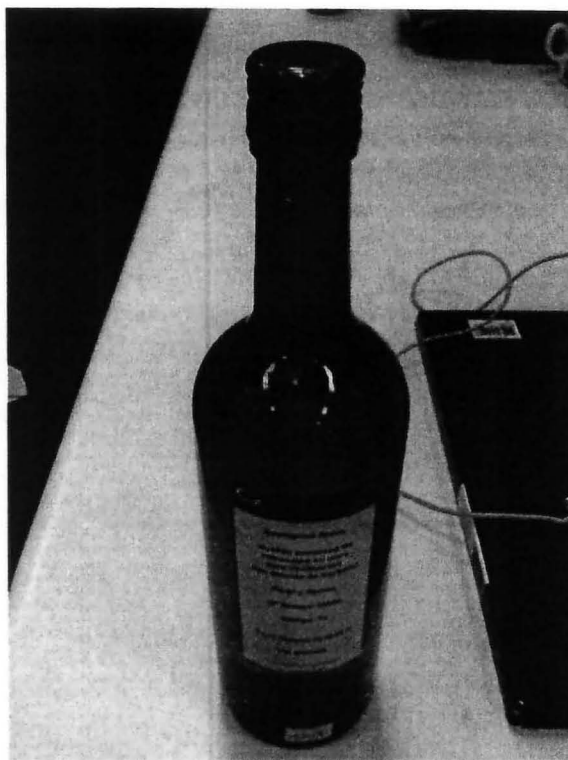


FIGURE 24 – SAUVIGNON BLANC WINE BOTTLED IN 75 CL BOTTLES CLOSED WITH SCREWCAPS.

8.4. Chemical analysis of wine

8.4.1. BASIC OENOLOGICAL PARAMETERS OF THE FINISHED WINE

The basic analyses of finished Sauvignon Blanc wine were carried out following the protocols described in “Análisis Químico del Vino” (Bordeu and Scarpa, 1998). The following analyses were made:

- pH by potentiometric determination;
- Total acidity by potentiometric determination expressed as g/L of H_2SO_4 ;
- Alcohol content by distillation and aerometry;
- Residual sugars by the Luff method;
- Free sulphur dioxide (SO_2) by the Ripper method;

- Total sulphur dioxide (mg/L) by the Ripper method;
- Combined sulphur dioxide (SO₂);
- Volatile acidity by Blarez method;
- Malic acid (g/L) by enzymatic method;
- Turbidity using a turbidity meter (Figure 14).



FIGURE 25 – TURBIDITY METER.

8.4.2. WHITE WINE SPECTRAL MEASURES

The spectral measures for describing the phenolic composition of white wines are expressed as absorbance units (a.u.) and were measured according to the protocols of “Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts” by Iland et al. (2004) except the 520 nm spectral measure.

Total phenolics (a.u.) = ($A_{280} - 4$) gives a measure of the concentration of all the phenolic material present in the wine. The subtraction of the value of 4 allows for absorbance of non-phenolic material. The absorbance value was adjusted to take into account the dilution 1:20.

Total hydroxycinnamates (a.u.) = ($A_{320} - 1.4$) gives a measure of the concentration of hydroxycinnamates, the major non-flavonoid component of white wines. The subtraction of

the value of 1.4 allows for the absorbance of non-phenolic material. The absorbance value was adjusted to take into account the dilution 1:10.

Total flavonoids (a.u.) = $[A_{280} - 4] - \{(0.66) \cdot [A_{320} - 1.4]\}$ gives an estimate of the concentration of flavonoid components in the wine. The factors are correction factors allowing for the contribution of hydroxycinnamates to the absorbance at 280 nm. The absorbance values were adjusted to take into account the dilutions 1:10 and 1:20.

Estimate of brown pigments (a.u.) = A_{420} gives an estimate of the concentration of brown pigments in the wine according to Somers (1998) and Iland (2004).

In addition to that estimation of brown pigments an estimation of browning using A_{520} according Skouroumounis et al. (2005) was done because it would give a better estimation of the concentration of brown pigments in wine.

8.4.3. THIOLS AND PYRAZINES DETERMINATION BY GAS CHROMATOGRAPHY

To determinate thiols and pyrazines compounds, the wine samples were analysed at the Aroma and Flavours Center of DICTUC S.A.

To determinate the thiols present in Sauvignon Blanc wine it was subjected to microextraction in solid phase (SPME) and injection on a gas chromatograph with mass spectrometer (GCMS QP 2010/GC 2010 Ultra). Quantification was done by gas isotope dilution. Each of the thiols was quantified using a calibration curve made within expected ranges.

The concentration of IBMP (2-methoxy-3-isobutylpyrazine) and IPMP (2-methoxy-3-isopropylpyrazine) compounds present in Sauvignon Blanc wine were determined by microextraction in solid phase (SPME) and subsequent desorption in a gas chromatograph with mass spectrometer (GCMS 5975C).

8.4.4. ANALYSIS OF LOW MOLECULAR WEIGHT POLYPHENOLS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

The protocol of the analysis of low molecular weight polyphenols by HPLC was based on Bengoechea et al. (1995), Peña-Neira et al. (2000) and Peña-Neira et al. (2007).

Wine samples preparation:

- Concentrate 25% of 100ml of wine;
- Put the samples into a 250 ml decanting funnel;
- Perform 3 extractions with ethyl ether (25ml each one), stirring for 1 minute each time;
- Perform 3 extractions with ethyl acetate (25ml each one), stirring for 1 minute each time;
- Discard the aqueous residue;
- Dry the 6 combined organic extracts with a small portion of sodium sulphate (Na_2SO_4) anhydride;
- Stir and let rest during 30 min;
- Drain the organic extract and wash the Na_2SO_4 3 times with small portions of ethyl ether;
- Rotary evaporate < 35°C until dry in the 100 ml flask;
- Redissolve into 2ml of a blend of methanol and water 1:1;
- Filtrate the substances with a membrane of 0.2 – 0.45 μm .

The standards used were (+)-catechin, (-)-epicatechin, gallic acid, p-coumaric acid and caffeic acid. The solutions were filtered with a PVDF membrane of 0.45 μm . The column used was the Nova-Pak (Waters) column of reverse phase C-18, 4 μm 3.9*300 mm (Part n° WAT011695).

The mobile phase consists in a binary gradient of the solution A (acetic acid 2% aqueous), of the solution B (acetonitrile, acetic acid and water, 20:2:78 respectively) and methanol.

HPLC programming:

- Restrict the pump pressure at 6000 psi (405 bar);
- Temperature at 20°C;

- Injection volume 30 µl;
- UV spectra detection in a range of 250 – 600 nm;
- Chromatographs recorded at 280 nm.

8.5. Sensory evaluation

8 students of Agricultural Engineering specialized in Oenology (5th year) participated in a sensory training course twice a week for one month. Meetings of 45 minutes occurred in the Oenology laboratory and training was provided with the following objectives:

- Recognize and evaluate odour intensity of different substances, floral, vegetal, condiments, fruits aromas;
- Taste acid, sweet, salty, bitter and astringent samples at different concentrations;
- Recognize and evaluate odour intensity of only floral fragrances;
- Determine by sensory evaluation samples with faults;
- Recognize and evaluate odour intensity of only condiments samples;
- Compare by sensory evaluation Chardonnay, Sauvignon Blanc and Pinot Blanc wines;
- Determine by sensory evaluation typical aromas of Sauvignon Blanc wine;
- Compare control and freezing treatments of Sauvignon Blanc wines from 2014 trials.

The descriptors of the sensory evaluation form (Annexes 2) were chosen with the help of Dr. Edmundo Bordeu and some literature review based on typical aroma of Sauvignon Blanc wines.

The sensory evaluation of wines took place at the tasting booths of the oenology laboratory, Faculty of Agronomy at Pontificia Universidad Católica de Chile. According to Lesschaeve (2007), a tasting room must be a quiet environment, free from noise, odour or visual disturbances, must also have individual tables set up to minimize panellist interactions. Teachers of oenology, trained students and other senior students from the oenology laboratory took part in the tasting, which took place in 3 different dates: June 25th, 26th and July 3rd of 2015. 19 assessors, male and female, with ages between 20 and 66 years old, took part on the wine tasting.

The sensory evaluation consisted in 6 Sauvignon Blanc wines (3 wines from control treatment and other 3 wines from freezing treatment) presented in a random way at the same time. The wines were presented on ISO glasses with a different code generated randomly and the position of wines were also random for each assessor. Wines were presented at temperatures around 16-18°C. The light of the individuals tasting rooms was a normal light. The tasting had a duration of 30 - 45 min per person.

8.6. Statistical analysis

For chemical analyses a statistical analysis of variance using one-way ANOVA with a 95% confidence level was applied using the program STATGRAPHICS Centurion XVI.

For the sensory evaluation, the results of the two treatments were analysed using a multifactor ANOVA at 90 and 95% confidence level considering treatments and tasters as factors, using the program STATGRAPHICS Centurion XVI and also the XLSTAT Software. Version 2015.1.03.15473.

IX. RESULTS AND DISCUSSION

9.1. Evolution of temperatures during the industrial experiment

Table 2 shows the inlet and outlet temperatures measured during the trial for each repetition of each treatment. With the thermocouple five temperatures were measured within 5 minutes, the value presented in the table is the average.

TABLE 2 - INLET AND OUTLET TEMPERATURE AVERAGES MEASURED WITH THERMOCOUPLE AND THE INFRARED THERMOMETER DURING THE SAUVIGNON BLANC TRIAL.

Treatment	Average Temperature (°C)				Residence time (min)
	inlet thermocouple	outlet thermocouple	inlet infrared	outlet infrared	
Control 1	22,7	21,8	23,3	23,4	3,5
Control 2	20,7	20,8	20,5	20,7	
Control 3	19,1	19,8	20,1	20,6	
Freezing 1	19,1	-2,16	19,5	4,7	3,5
Freezing 2	19,7	-0,81	20,4	-0,08	
Freezing 3A	18,3	2,12	18,8	2,25	
Freezing 3B	8,23	-0,85	9,15	-0,75	

The inlet and outlet temperatures in the control treatment are similar. The outlet temperatures in the freezing treatment were most of the times negative, showing the freezing effect. There are two repetitions from freezing treatment 3 because in the first time grapes were processed (3A), no freezing was achieved because of rain that strongly affected the equipment performance. Based on that result, grapes were passed through the equipment for a second time (3B). Figure 26 shows the evolution of temperature of the freezing treatment. The freezing treatment 1 is longer than the others repetitions because we achieved to measure more temperatures during the process time.

Thermocouple temperatures from freezing treatment

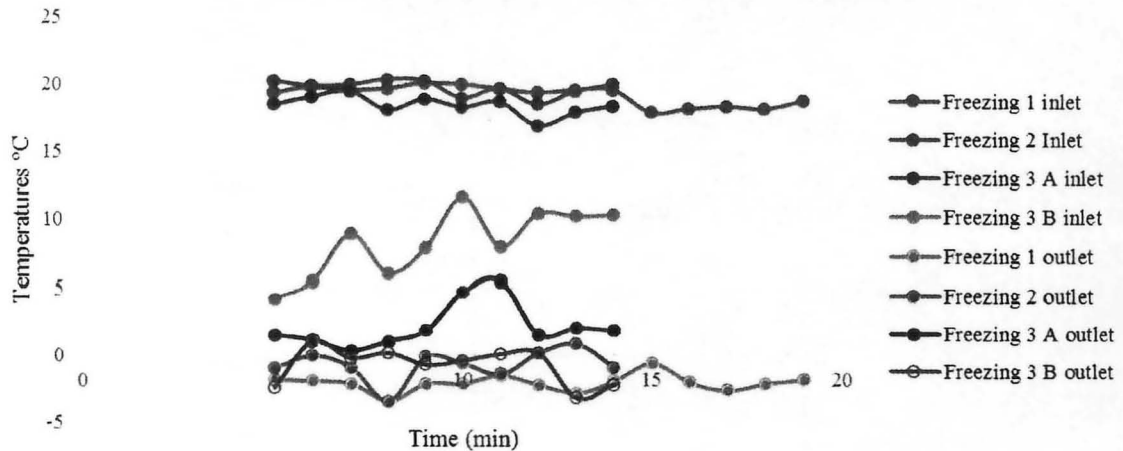


FIGURE 26 – EVOLUTION OF FREEZING TREATMENT TEMPERATURES MEASURED WITH A THERMOCOUPLE.

Table 3 shows the statistical analysis of the inlet and outlet temperatures by treatment. It is possible to observe significant difference between the control and freezing treatment in the temperatures measured in the exit of the CO₂ dispenser equipment. The freezing treatment only includes the results from repetition 1, 2 and 3B.

TABLE 3 – STATISTICAL ANALYSIS FOR THE INLET AND OUTLET TEMPERATURES BY TREATMENT USING ONE-WAY ANOVA AT 95%CONFIDENCE LEVEL.

Treatment	T°C inlet thermocouple	T°C outlet thermocouple	T°C inlet infrared	T°C outlet infrared
Control	16,3 a	20,8 a	21,3 a	21,6 a
Freezing	20,8 a	-0,425 b	16,9 a	1,53 b
p-value	0,233	0,00	0,235	0,0001

*treatments followed by the same letter in a column are not different according to Tukey (p:0,05).

9.2. Must composition before the alcoholic fermentation

Must samples of each repetition of both treatments were taken. Table 4 shows the must composition when must was decanting, after pressing and before alcoholic fermentation. Corrections of pH to 3,20 in control and freezing treatments, correction of titrable acidity to 4,6 g/L in freezing treatment and correction of 30g/L SO₂ in control and freezing treatments. The potential alcohol was measured taking in account the table of Blouin and Guimberteau (2000) (Annexes 2).

TABLE 4 – MUST COMPOSITION OF SAUVIGNON BLANC GRAPES FROZEN AND A CONTROL BEFORE THE ALCOHOLIC FERMENTATION.

Treatment	Potential alcohol % v/v	Titrable acidity H₂SO₄ (g/L)	Free SO₂ (mg/L)	Total SO₂ (mg/L)	pH	YAN
Control	13,9 a	3,85 a	31,1 a	86,4 a	3,44 a	185 a
Freezing	14,2 a	3,5 a	37,5 a	104 a	3,52 a	181 a
p-value	0,628	0,17	0,537	0,434	0,191	0,832

*treatments followed by the same letter in a column are not different according to Tukey (p:0,05).

As we can see, the values of the treatments are very similar, it means that the raw material is homogenous. Sauvignon Blanc grapes were in an advanced state of maturity which we could observe in the beginning of the trial when we found a little rottenness in grapes. These last factors influence negatively on aroma and flavour quality.

Table 5 shows the calculation of the Bucher Vaslin pneumatic press yield in percentage for both treatments, which consists volume of press juice (L) per weight of destemmed grapes processed (kg).

TABLE 5 – PRESS YIELD OF SAUVIGNON BLANC GRAPES FROZEN AND A CONTROL.

Treatment	Volume of press juice (L)	Weight of destemmed grapes (kg)	Press yield (%)
Control	200 a	311 a	64,3 a
Freezing	180 a	265 a	68,9 a
p-value	0,197	0,219	0,389

*treatments followed by the same letter in a column are not different according to Tukey (p:0,05).

The freezing treatment has a higher press yield than the control treatment due to the rupture of berry skin with the formation of ice crystals by supra-extraction technique. This allows a better and an easier pressing of grapes.

Table 6 shows the must turbidity measured by turbidity meter before and after inoculation for both treatments.

TABLE 6 - MUST TURBIDITY OF SAUVIGNON BLANC GRAPES FROZEN AND A CONTROL BEFORE THE ALCOHOLIC FERMENTATION MEASURED BY TURBIDITY METER.

Treatment	Must turbidity before inoculation (NTU)	Must turbidity after inoculation (NTU)
Control	114 a	109 a
Freezing	107 a	101 a
p-value	0,299	0,311

*treatments followed by the same letter in a column are not different according to Tukey (p:0,05).

9.2.1. ALCOHOLIC FERMENTATION

During the Sauvignon Blanc alcoholic fermentation (22days) control of density and temperature were made 3 times a day, the figure 27 shows the average evolution of density and temperature of the control and the freezing treatments.

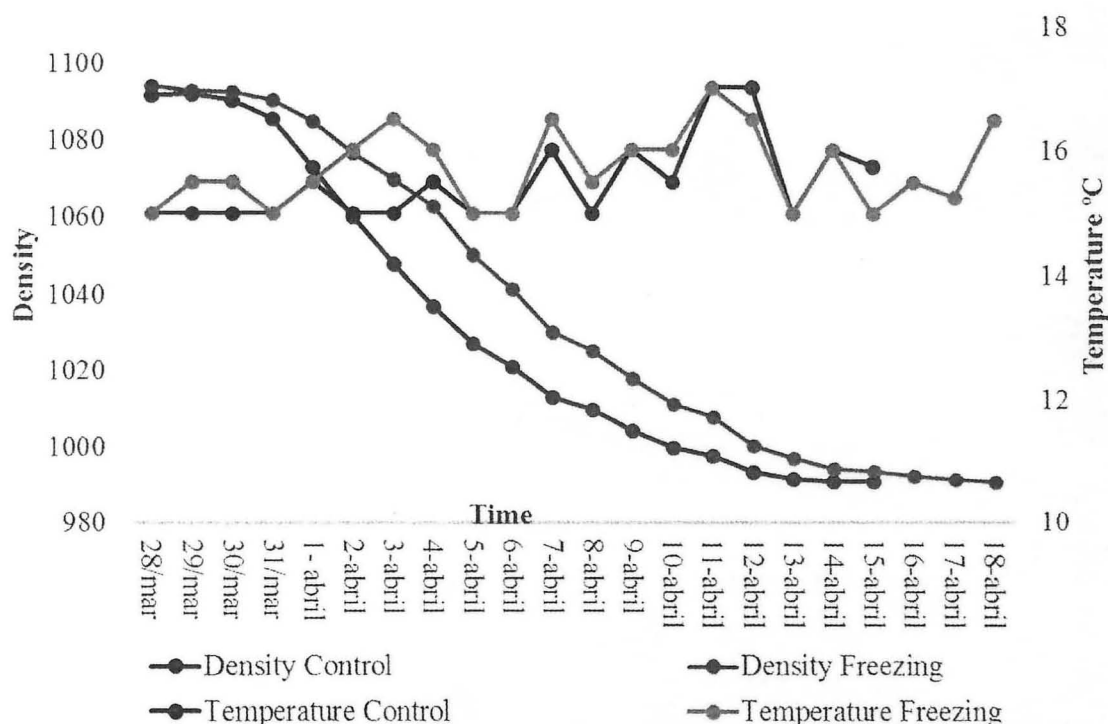


FIGURE 27 - EVOLUTION OF DENSITY AND TEMPERATURE OF THE CONTROL AND FREEZING TREATMENTS DURING THE ALCOHOLIC FERMENTATION OF SAUVIGNON BLANC GRAPES.

The fermentation of the freezing treatment was slower than the control treatment. This cannot be explain by the temperatures because they were also higher in the freezing treatment. A probable explanation could be differences in sanitary conditions of grapes. Visually, the tanks of the freezing treatment contained more botrytized grapes compared with the tanks of the control treatment, this could result in a slower fermentation (Loinger et al., 1977).

9.3. Wine composition at the end of alcoholic fermentation

Table 7 presents the main oenological parameters such as alcohol content, pH, residual sugar, titrable acidity and volatile acidity, when Sauvignon Blanc wines finished the alcoholic fermentation.

TABLE 7 – WINE COMPOSITION OF SAUVIGNON BLANC GRAPES OF CONTROL AND FREEZING TREATMENTS.

Treatment	Alcohol % v/v	pH	Residual Sugar g/L	Volatile acidity (g/L)	Titrable acidity H₂SO₄ (g/L)
Control	13,5 ±0,3 a	3,16 ±0,04 a	1,86 ±0,3 a	0,313 ±0,03 b	4,91 ±0,07 a
Freezing	13,9 ±0,5 a	3,15 ±0,01 a	1,88 ±0,2 a	0,396 ±0,02 a	4,86 ±0,2 a
p-value	0,34	0,81	0,91	0,03	0,73

*treatments followed by the same letter in a column are not different according to Tukey (p:0,05).

Wines obtained are very similar, with no significant differences in both structures except for volatile acidity. Acidity is higher and pH lower due to the corrections made before the fermentation. The freezing treatment wines have a significantly higher volatile acidity than control wines, even though the freezing treatment wines were better protected with CO₂. The state of sanitary condition of grapes in this treatment, i.e. botrytized grapes, could explain this small increase in volatile acidity.

Table 8 shows the sulphur dioxide contents of both treatments; the freezing treatment wines have a significantly higher content of free SO₂. This relatively important difference, close to 8 mg/L could also be a negative impact on aroma of the freezing treatment wines.

TABLE 8 – SULPHUR DIOXIDE CONTENTS OF THE CONTROL AND THE FREEZING TREATMENTS.

Treatment	Free SO₂ (mg/L)	Total SO₂ (mg/L)	Combined SO₂
Control	33,5 ±0,9 b	104 ±10,6 a	70,9 ±9,8 a
Freezing	41,4 ±2,6 a	117 ±18,7 a	76,6 ±17,4 a
p-value	0,008	0,334	0,643

*treatments followed by the same letter in a column are not different according to Tukey (p:0,05).

9.4. Colour and phenolic composition of must and wine

The phenolic compounds of white juices and wines fall into two broad categories, the flavonoids and the hydroxycinnamates. The concentrations of these categories can be estimated spectrophotometrically at 280 and 320 nm, respectively. During processing, maturation and ageing in the bottle, white wine can undergo oxidative changes. Along with other compositional changes, the intensity of the brown colour can increase. The change in the intensity of the brown colour with time can be monitored by measuring the absorbance of the wine at 420 nm, i.e. A_{420} , which gives an estimate of the concentration of brown pigments in the wine (Ilund, 2004).

Table 9 shows the absorbance at 420 nm measured during the laboratory experiment of Sauvignon Blanc must. The control treatment presents a higher browning than the freezing treatment, because is protected from oxidation.

TABLE 9 - COLOUR OF MUST OF LABORATORY EXPERIMENT IN THE CONTROL AND THE FREEZING TREATMENTS.

Treatment	DO₄₂₀ must (a.u.)
Control	0,309 a
Freezing	0,295 a
p-value	0,761

*treatments followed by the same letter in a column are not different according to Tukey (p:0,05).

Table 10 shows the absorbances at 420 and 520 nm of Sauvignon Blanc must and wine. Freezing treatment wines should be better protected from oxidation, as indicated by a lower content of brown pigments in wine (DO₅₂₀) (Skouroumounis et al., 2005).

TABLE 10 - COLOUR OF MUST AND WINE IN THE CONTROL AND THE FREEZING TREATMENTS.

Treatment	DO₄₂₀ must (a.u.)	DO₅₂₀ must (a.u.)	DO₄₂₀ wine (a.u.)	DO₅₂₀ wine (a.u.)
Control	0,084 ±0,008 a	0,018 ±0,006 a	0,105 ±0,0 a	0,055 ±0,003 a
Freezing	0,100 ±0,033 a	0,034 ±0,024 a	0,093 ±0,007 a	0,034 ±0,008 b
p-value	0,458	0,333	0,151	0,012

*treatments followed by the same letter in a column are not different according to Tukey (p:0,05).

Although Somers (1998) and Iland (2004) propose A₄₂₀ to estimate the concentration of brown pigments in the wine; Skouroumounis et al., (2005) states that results more clears are obtained, measuring at 500 nm wavelength. Therefore, it was performed measures at both wavelengths. There is no significant differences in must although there are higher values in DO₄₂₀ brown pigments and DO₅₂₀ browning in the freezing treatment. This is reversed in

wine, showing higher values of DO₅₂₀ browning in the control treatment. This case could be explained by the better protection by CO₂ from oxidation in the freezing treatment.

Table 11 presents the spectral measures for phenolic composition of white wines proposed by Iland (2004). Higher values are seen in the freezing treatment wines with a significant difference in total hydroxycinnamates, the major non-flavonoid component of white wines. These higher values can be explained by the freezing of the berry skin, the ice crystals will cause the rupture of the berry skin cell walls, causing a cellular disorganization, thereby promoting the release of phenolic compounds and aroma precursors.

TABLE 11 – PHENOLIC COMPOSITION OF MUST AND WINE IN THE CONTROL AND THE FREEZING TREATMENTS.

Treatment	Total Phenolics (a.u.)	Total Flavonoids (a.u.)	Total Hydroxycinnamates (a.u.)	Brown Pigments (A₄₂₀) (a.u.)
Normal	4,95 ±0,5 a	1,83 ±0,6 a	4,74 ±0,3 b	0,089 ±0,009 a
Freezing	6,06 ±0,5 a	1,94 ±0,2 a	6,25 ±0,6 a	0,096 ±0,006 a
p-value	0,062	0,767	0,021	0,380

*treatments followed by the same letter in a column are not different according to Tukey (p:0,05).

According to Izquierdo (2003), the use of SO₂ before pressing aims to avoid the enzymatic browning of the must, inhibiting PPO action (polyphenol oxidase, enzyme responsible for oxidative degradation of phenolic compounds), although promoting a higher phenolic extraction from the berry skin, causing the cell walls death and increasing the cellular permeability (Singleton et al., 1980; Singleton and Trousdale, 1983). The enrichment of must in phenolic compounds resulting from the supra-extraction technique can promote browning. Despite initially the brown pigments of the freezing treatment were lower (table 10). One month later by the time of the sensory evaluation of wines, no significant differences in DO₄₂₀ were found and averages are even higher in the freezing treatment. This higher oxidability can be related to the higher phenols content. According to Simpson (1982) and Cheynier et al. (1989), the colour maintenance observed on rich musts in glutathione

(tripeptide abundant in grapes), is a temporary phenomenon; the sensitivity of white wines to browning is related with the flavanones content (catechins and procyanidins) which were not different in this experiment (Total flavonoids). These compounds in the absence of air, they polymerize during storage, helping to develop additional colour in the wines. The maintenance of high contents of flavanones in rich musts in glutathione or protected against oxidation, it can lead to a more intense browning wines. Also the GRP accumulate in musts could consist a reservation in oxidized compounds in the long-term, during wine conservation. This phenomenon is particularly found in wines originated from botrytized vintages (Dubernet, 1974; Salgues et al., 1986).

9.5. Concentration of low molecular weight polyphenols by HPLC

Freezing treatment wines have higher values of low molecular weight polyphenols concentration than control treatment wines (table 12), demonstrating the efficacy of phenols extraction when using the supra-extraction technique. P-coumaric acid concentrations shows significant differences between both treatments.

TABLE 12 – LOW MOLECULAR WEIGHT POLYPHENOLS OF SAUVIGNON BLANC WINES COMING FROM FROZEN GRAPES AND A CONTROL.

Treatment	Gallic acid (mg/L)	(+)-catechin (mg/L)	Caffeic acid (mg/L)	(-)-epicatechin (mg/L)	p- coumaric acid (mg/L)
Control 1	3,93	3,98	28,4	40,8	0,54
Control 2	7,24	7,02	44,2	80,3	0,94
Control 3	7,99	9,91	37,7	-	0,66
Freezing 1	8,90	11,9	42,6	91,8	1,13
Freezing 2	18,6	14,4	44,8	75,9	1,62
Freezing 3	6,81	9,71	43,4	-	1,14
Control Mean	6,39 a	6,97 a	36,8 a	236 a	0,71 b
Freezing Mean	11,4 a	12,0 a	43,6 a	95,7 a	1,30 a

p-value	0,259	0,082	0,214	0,471	0,044
----------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

*Treatments followed by the same letter in a column are not different according to Tukey (p:0,05).

9.6. Thiol contents

Thiols have been identified as responsible for the typicity of Sauvignon Blanc aroma (Fretz, 2005). Table 13 shows the thiols compounds and typical descriptors that we can find in Sauvignon Blanc wines, exotic fruits, passion fruit, guava, cat urine, tomato leaves, grapefruit and others. According to the reference DICTUC S.A., these are the expected ranges in grapes and wines, the perception threshold and the odour activity value of thiols compounds.

TABLE 13 – THIOLS COMPOUNDS DESCRIPTORS AND THRESHOLDS.

Compound	Perception threshold	Range in grapes (ppt)	Range in wine (ppt)	OAV in wine	Descriptors
Thiols					
4-Mercapto-4-methyl-2-pentanone (4MMP)	0,8	65-1580	4-92	5-115	Cat urine, rue, tomato leaf
3-mercaptohexyl acetate (Ac3MH)	4	-	20-2500	5-625	Exotic fruits, passion fruit, guava
3-mercaptohexanol (3MH)	60	1800-58500	100-19000	2-320	grapefruit
Benzene methane thiol (BMT)	0,3	29-440	2,5-25	8,3-83	Stone rifle, gunpowder, mineral
Furfuryl thiol (FFT)	0,4	-	0-50	0,4	Coffee, smoke, wood

Table 14 shows the quantification in concentration (ng/L) and OAV (odour activity value units: concentration divided by the perception threshold) of thiols for the control and the freezing treatments.

TABLE 14 – AVERAGE CONCENTRATION IN NG/L (ppt) AND OAV OF EACH THIOLS QUANTIFIED IN SAUVIGNON BLANC WINES FROM FROZEN GRAPES AND CONTROL.

Treatment	FFT		BMT		4MMP		3MH		Ac3MH	
	ng/L	OAV	ng/L	OAV	ng/L	OAV	ng/L	OAV	ng/L	OAV
Control 1	1,1	2,75	115	385	11,8	14,7	1183	19,7	3621	905
Control 2	1,1	2,75	105	350	12,3	15,4	914	15,2	3085	771
Control 3	0,8	2,00	101	337	10	12,5	833	13,9	3417	854
Freezing 1	ND	ND	114	380	ND	ND	3320	55,3	2737	684
Freezing 2	ND	ND	102	341	4,1	5,1	1727	28,8	2431	608
Freezing 3	ND	ND	55,8	186	5	6,2	1601	26,7	2599	650
Control Mean	1,1	2,75	107 a	357 a	11,4 a	14,2 a	977 a	16,3 a	3374 a	843 a
Freezing Mean	ND	ND	90,6 a	302 a	4,55 a	5,69 a	2216 a	36,9 a	2589 b	647 b
p-value	ND		0,419		0,085		0,093		0,012	

*ND not detected; treatments followed by the same letter in a column are not different according to Tukey (p:0,05).

The control treatment wines have higher concentrations of most thiols than the freezing treatment wines. Furfural thiols (FFT) at concentrations around two times their threshold with coffee and wood aromas were only found in the control. Benzene methane thiol (BMT) with gunpowder, stone rifle and mineral aromas was found in both treatments strongly above threshold but with higher concentrations in the control. Something similar applies to 4-mercaptohexanol (4MMP) with cat urine, tomato leaf, box tree, passion fruit and black current bud aromas. The acetate of 3-mercaptohexanol (Ac3MH) with exotic fruit, passion fruit and guava aromas was the thiol where a significant difference was found with higher values in the control. The only thiol where the frozen treatment had clearly higher levels was 3-mercaptohexanol (3MH), which it is the most abundant of thiols on Sauvignon

Blanc variety according to Fretz (2005). It is known that wines obtained from botrytized grapes contain a significant amounts of 3MH (Coetzee and du Toit, 2011). Better results were expected, i.e. the freezing treatment wines having higher concentrations of the others thiols. The explanation may persist on the poor sanitary conditions of the grapes. In the other hand, the repetition 1 of the freezing treatment was analysed separately considering it was the only replicate that was correctly frozen. A big difference in thiols quantified in this replicate, compared with the others two replicates, would indicate a positive effect of the freezing treatment. As shown in table 14, freezing replicate 1 has the higher concentration of 3-mercaptohexanol (3MH) with grapefruit and yellow passion fruit aromas, and acetate of 3-mercaptohexanol (Ac3MH) with exotic fruit aromas. It also shows an elevated mineralogy content (benzene methane thiol, BMT).

9.7. Pyrazines contents

Pyrazines with their green pepper aromas described sometimes as green chili in white wines can be considered positive in Sauvignon Blanc wines. Table 15 shows the typical descriptors of Sauvignon Blanc, green pepper, asparagus and green beans, the expected ranges in grapes and wines, the threshold perception and odour activity value of these compounds.

TABLE 15 – PYRAZINES COMPOUNDS DESCRIPTORS AND THRESHOLDS.

Compound	Perception Threshold (ppt)	Range in wines (ppt)	OAV in wines	Descriptors
Pyrazines				
2-methoxy-3-isobutylpyrazine (IBMP)	2	0-35	0-18	green pepper
2-methoxy-3-isopropylpyrazine (IPMP)	2	0-6	0-3	Asparagus, green beans

Table 16 shows the average concentration (ng/L) and OAV of pyrazines in both treatments. As shown, the methoxypyrazine 2-methoxy-3-isobutylpyrazine (IBMP) important in Sauvignon Blanc wine aroma is in higher concentration in freezing treatment wines, with green pepper-like aromas typical of IBMP. The differences are however non-significant. In other hand, in both treatments no pea and asparagus-like aromas typical of IPMP was detected. The importance of this higher concentration of IBMP in the freezing treatment is limited because concentrations found are lower than threshold values.

TABLE 16 – AVERAGE CONCENTRATION IN NG/L (ppt) AND OAV OF PYRAZINES QUANTIFIED IN SAUVIGNON BLANC WINES FROM FROZEN GRAPES AND CONTROL.

Treatment	IPMP		IBMP	
	Concentrations ng/L (ppt)	OAV	Concentrations ng/L (ppt)	OAV
Control 1	ND	ND	0,9	0,5
Control 2	ND	ND	0,6	0,3
Control 3	ND	ND	0,7	0,4
Freezing 1	ND	ND	0,8	0,4
Freezing 2	ND	ND	1,0	0,5
Freezing 3	ND	ND	1,6	0,8
Control Mean	ND	ND	0,7 a	0,4 a
Freezing Mean	ND	ND	1,1 a	0,6 a
p-value	ND		0,193	

*ND not detected; treatments followed by the same letter in a column are not different according to Tukey (p:0,05).

9.8. Sensory Evaluation

19 assessors tasted the 6 wines of Sauvignon Blanc. The 3 repetitions of each treatment: control and freezing. The statistical analysis of the complete set of data of the tasting is described in the table 17.

TABLE 17 –SENSORIAL EVALUATION OF SAUVIGNON BLANC WINES OBTAINED FROM PARTIALLY FROZEN GRAPES AND A CONTROL. RESULTS OF THE WHOLE PANEL.

	Treatment	Control	Freezing	p-value
Visual characteristics	Browning	2,74 b	3,25 a	0,026
	Colour intensity	4,84 a	5,09 a	0,240
	viscosity	3,93 a	4,23 a	0,155
Olfactory characteristics	General aromatic intensity	5,70 a	5,60 a	0,637
	Ripe fruits	4,02 a	4,16 a	0,580
	Tropical fruits	5,40 a	5,0 a	0,148
	Citrus fruits	4,89 a	5,02 a	0,617
	Floral	3,72 a	3,26 b	0,059
	Pyrazines (vegetal aromas)	2,56 b	3,14 a	0,007
	Reduction	1,46 a	1,77 a	0,076
Gustatory characteristics	Alcohol	4,86 a	4,84 a	0,929
	Acidity	5,65 a	5,32 a	0,146
	Bitterness	4,26 a	4,26 a	1,0
	Minerality	3,58 a	3,44 a	0,536
	Volume in mouth	4,74 a	4,98 a	0,186

*treatments followed by the same letter in a line are not different according to Tukey (p:0,05).

Just as in spectral measures previously discussed, the assessors found significantly more browning in the freezing treatment and higher but not significant values on colour intensity and viscosity. The freezing treatment wines have a significantly higher intensity in pirazine/ vegetal aromas while at lower significances but close to 5%, the control should have more floral aroma and the freezing treatment a more reduced character.

No significant differences between treatments in mouth were found. In the case of volume in mouth, the freezing treatment wines have higher values but non-significant, what should be due to the greater extraction of phenolic compounds.

Figure 28 shows the olfactory characteristics in a Principal Components Analysis (PCA), where is possible to separate the control replicates (symbol T) from the freezing replicates (symbol F). The assessors characterized the control replicates beneath the axe “x”, where floral and tropical fruits aromas predominate; the freezing replicates are located above the axe “x”, where pyrazines/vegetal aromas, reduction and ripe fruits predominate.

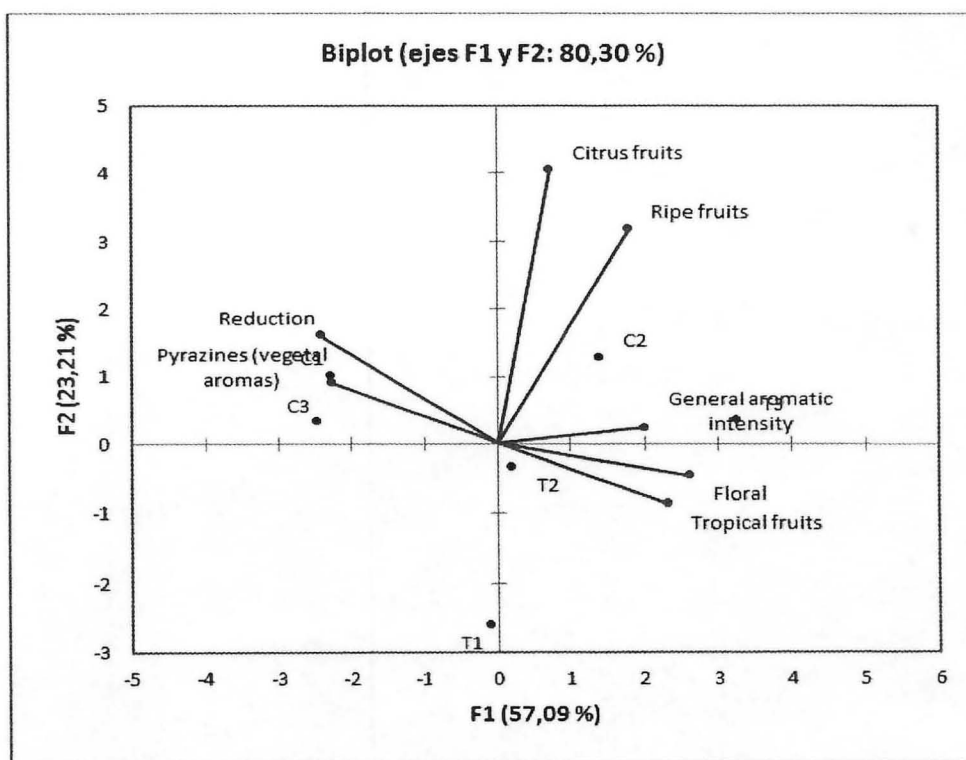


FIGURE 28 – PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS OF OLFACTORY CHARACTERISTICS OF THE CONTROL AND THE FREEZING TREATMENTS.

An attempt to analyse separately the results from freezing treatment repetition 1 was done, because it was the only repetition successfully frozen but results are not better.

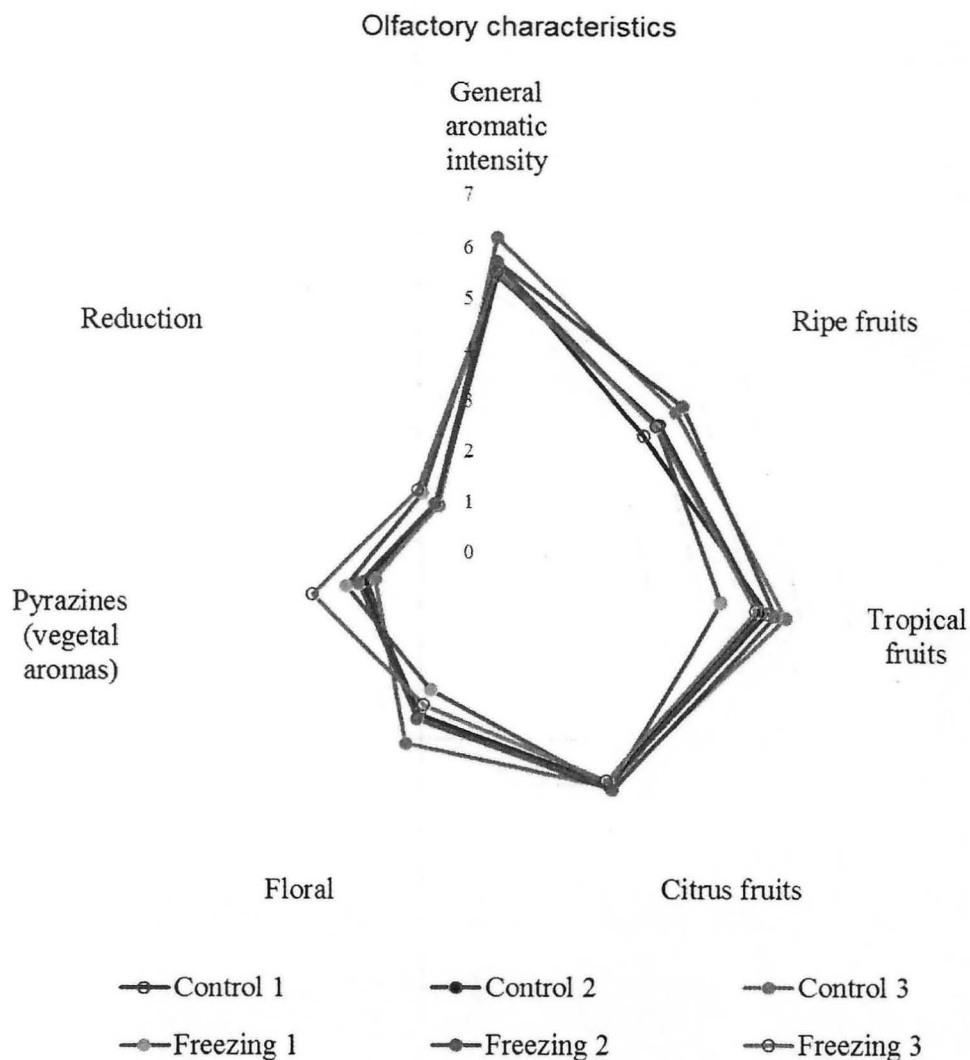


FIGURE 29 - SPIDERWEB CHART OF OLFACTORY CHARACTERISTICS OF THE THREE REPLICATES OF THE CONTROL AND THE FREEZING TREATMENTS.

Figure 29 presents the spiderweb chart of olfactory characteristics of both treatments. The freezing treatment replicate 2 and 3 are distinguished by higher value of pyrazines or

vegetal aromas. The control 3 presents better characteristics as Sauvignon Blanc wine with floral, citrus fruit, tropical fruit and ripe fruit aromas for the whole panel.

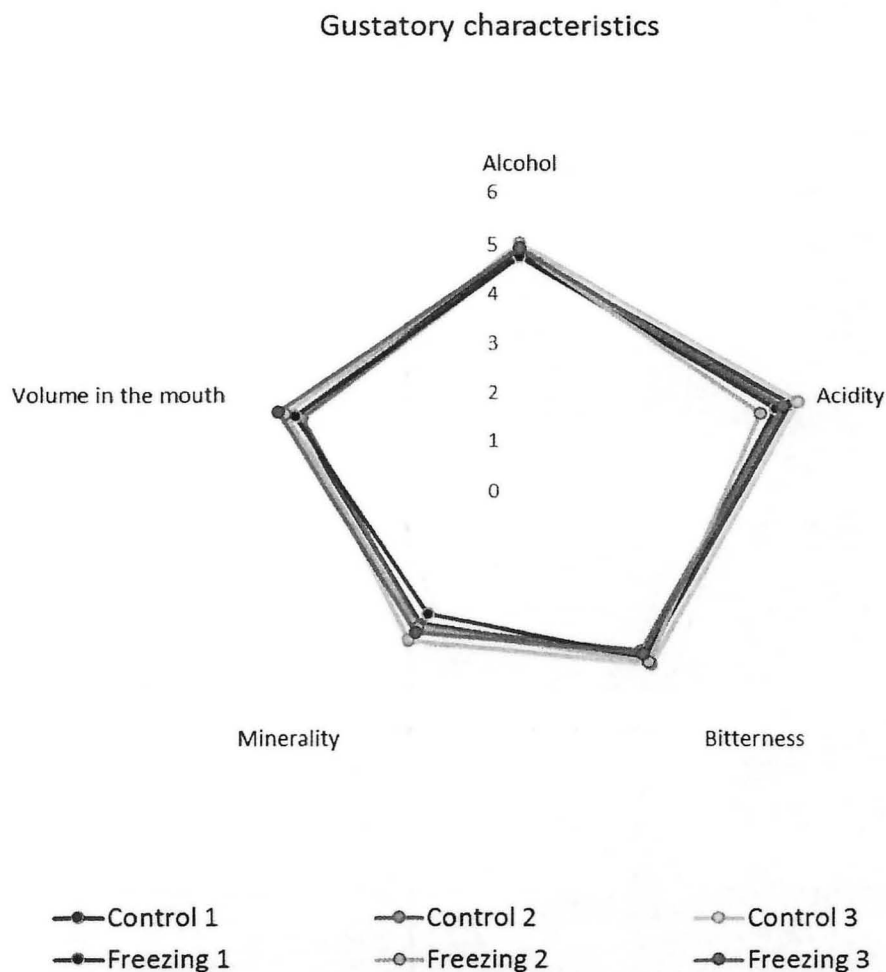


FIGURE 30 - SPIDERWEB CHART OF GUSTATORY CHARACTERISTICS OF THE CONTROL AND THE FREEZING TREATMENTS.

Figure 30 presents the spiderweb chart of gustatory characteristics of both treatments. The freezing treatment stands out by the higher volume in mouth and slightly higher bitterness and by a lower acidity in wine.

A cluster analysis of the panel behaviour showed a different behaviour of two groups of tasters (figure 31). When analysing tasters involved, one group corresponds mostly to the younger tasters that were specifically trained (represented with a red colour) and the other

group to people with more experience but not trained before the tasting that could be considered as experts (represented with a green colour).

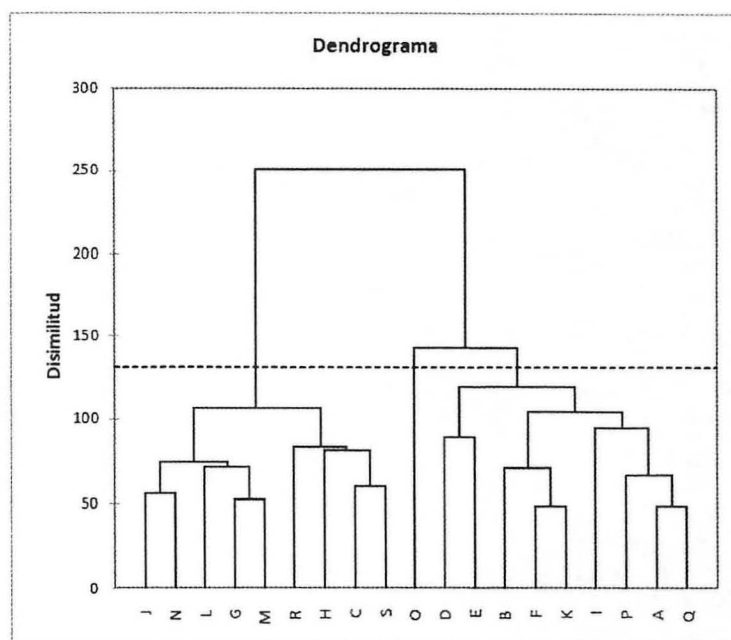


FIGURE 31 – CLUSTER ANALYSIS OF THE PANEL BEHAVIOUR.

Results obtained with these 2 groups apart do not improve in terms of significant differences, probably due to the decreasing number of repetitions. However, the principal component analysis of aromatic attributes in the case of the trained panel shows a clearer discrimination of the control and freezing replicates (figure 32) with similar associations with attributes.

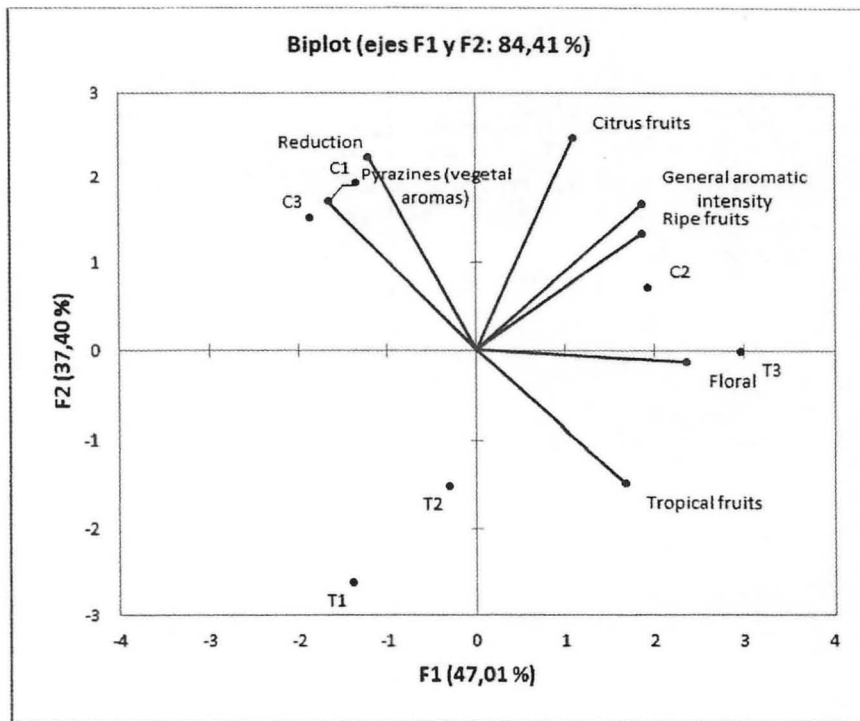


FIGURE 32 – THE PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS OF AROMATIC ATTRIBUTES IN THE CASE OF THE TRAINED PANEL OF THE CONTROL AND THE FREEZING TREATMENTS.

9.9. Analysis of CO₂ use and equipment performance

To answer to hypothesis 2, “The CO₂ dispenser equipment designed by Indura is efficient in freezing grape skins of different varieties”, it is important to analyse the three trials made in 2015 year with white (Sauvignon Blanc) and red wines (Pinot Noir and Cabernet Sauvignon) and also the trials from vintage 2014 with the same varieties (Sauvignon Blanc, Pinot Noir and Cabernet Sauvignon).

A theoretical optimal efficiency, $\eta = 0.14$, was calculated from the total theoretical heat flow at optimal conditions of trial.

Calculation of total theoretical heat flow, Q_{total} (Formula 2).

$$Q_{total} = Q_f + Q_{respiration} + Q_{ventillators} + Q_{conduction} \quad (2)$$

- Heat flow of cold, Qf (Formulas 3, 4, 5 and 6):

$$Qf = mf * Cpf * (Tin - T_{ext}) \quad (3)$$

Where Tin = interior temperature; Tex = exterior temperature; Cpf = specific heat; mf = mass cold flow per unit time.

$$Qf = 2000 \frac{kg}{h} * 3900 \frac{J}{kg.K} * (17^{\circ}C - (-2^{\circ}C)) \quad (4)$$

$$Qf = 148200000 \frac{J}{h} * \frac{1h}{3600 s} = 41166,66 \frac{J}{s} = W \quad (5)$$

$$Qf = 41166,66 W * \frac{1kW}{1000W} = 41,166 kW \quad (6)$$

Grape parameters:

Respiration rate: $2,8 \frac{mW}{kg}$

Freezing point: $-2^{\circ}C$

Specific Heat: $3900 \frac{J}{kg.^{\circ}C}$

Conductivity: $0,548 \frac{W}{m.K}$

Latent Heat of sublimation: $23 \frac{mW}{kg}$

- Heat flow by grape respiration during residence time, Qgrape respiration (Formulas 7, 8):

Residence time = 3 min

Mass of grapes, mf = 2000 kg

2000 kg ————— 60 min

mgrape ————— 3 min

$$m_{grape} = 100 \text{ kg}$$

$$Q_{grape \text{ resp.}} = \text{mass of grapes} * \text{Latent Heat of sublimation}(\text{grape}) \quad (7)$$

$$Q_{grape \text{ resp.}} = 100 \text{ kg} * 23 \frac{\text{mW}}{\text{kg}} = 2300 \text{ mW} * \frac{1\text{W}}{1000\text{mW}} * \frac{1\text{kW}}{1000\text{W}} = 0,023\text{kW} \quad (8)$$

- Heat flow of ventilators, $Q_{vent.}$ (Formulas 9 and 10):

Efficiency of ventilators, $\eta = 80 \%$

$$Q_{vent.} = P * (1 - \eta) \quad (9)$$

$$P = 4 \text{ ventilators} * \left(1 \text{ hp} * \frac{0,746 \text{ kW}}{1 \text{ hp}} \right) = 2,984 \text{ kW} \quad (10)$$

$$Q_{vent.} = 2,984 \text{ kW} * (1 - 0,8) = 0,5968 \text{ kW}$$

Where p= potency; hp = horse power.

- Conduction heat flow, Q_{cond} (Formulas 11, 12 and 13):

External temperature of the equipment = 17°C

Internal temperature of the equipment = -27°C

$$Q_{cond.} = A_{ext.} * \frac{k * (T_{ext} - T_{int})}{l} \quad (11)$$

$$A_{ext. \text{ of machine}} = A_{\text{parallelepiped}} = 2ab + 2ac + 2bc$$

$$A_{ext.} = 2 * 1,2 * 3,3 + 2 * 1,2 * 1,3 + 2 * 3,3 * 1,3 = 19,62 \text{ m}^2 \quad (12)$$

$$Q_{cond.} = 19,62 \text{ m}^2 * \frac{0,03 \frac{\text{W}}{\text{m.K}} * (17^{\circ}\text{C} - (-27^{\circ}\text{C}))}{0,015\text{m}} = 1726,56\text{W} = 1,72656 \text{ kW} \quad (13)$$

Where A_{ext} = external area; l = thickness of equipment.

- Total theoretical heat flow, Q_{total} (Formula 14):

$$Q_{total} = 41,166 \text{ kW} + 0,023 \text{ kW} + 0,5968 \text{ kW} + 1,72656 \text{ kW} \cong 43,512\text{kW} \quad (14)$$

$$Latent\ Heat = 573 \frac{kJ}{kg} * \frac{1}{h} * \frac{1h}{36000\ s} = 0,159 \frac{kJ}{kg.s} = 0,159 \frac{kW}{kg} \quad (15)$$

- Theoretical efficient, η (Formulas 16 and 17):

$$mCO_2 = \frac{Q_{total}}{Latent\ Heat\ CO_2} = \frac{43,512\ kW}{0,159 \frac{kW}{kg}} = 273,6626\ kg\ de\ CO_2 \quad (16)$$

$$\eta = \frac{mCO_2}{m_{grape}} = \frac{273,6626\ kg}{2000\ kg} = 0,1368 \cong 0,14 \quad (17)$$

Where mCO_2 = mass in kilogram of carbon dry ice; m_{grape} = mass in kilogram of grapes processed; Q_{total} = total theoretical heat flow.

Table 18 shows the calculation of the yield of CO_2 for Sauvignon Blanc supra-extraction treatment during the vintage 2015. Due to technical problems and the change of climate conditions at the moment of the freezing treatment replicate 2, this yield presents a poor efficient compared with the others. The rain prevented a proper freezing of the grape skin. The third replicate was repeated because at the first time the grapes did not go out of the equipment properly frozen. FT3 is the average from freezing treatment replicates A and B. The freezing treatment 3 had in this case two trial times, 19 min for replicate 3A and 13.32 min for replicate 3B. The efficiency value of FT3 is from replicate 3B only.

TABLE 18 – CO_2 CONSUMPTION (KG CO_2 /KG GRAPE) TO FREEZE SAUVIGNON BLANC GRAPES DURING THE VINTAGE 2015.

SAUVIGNON BLANC 2015				
Treatment	Grape weight (kg)	CO_2 used (kg)	η , Yield CO_2 (kg CO_2 / kg grapes)	Trial time (min)
Freezing 1	403	155	0,38	18,44
Freezing 2	383	467	1,22	17,52
Freezing 3	356	204	0,57	19 A; 13, 32 B

Tables 19 and 20 show the yields of CO₂ for Pinot Noir and Cabernet Sauvignon supra-extraction treatments during the vintage 2015, a study carried out by other PUC student. The efficiency values are more stable and close to the theoretical efficiency, in particular in Pinot Noir. This reflects better operation of the equipment and the strong influence that rain can have on the freezing capacity of the machine.

TABLE 19 – CO₂ CONSUMPTION (KG CO₂/KG GRAPE) TO FREEZE PINOT NOIR GRAPES DURING THE VINTAGE 2015.

PINOT NOIR 2015				
Treatment	Grape weight (kg)	CO₂ used (kg)	η, Yield CO₂ (kg CO₂/ kg grapes)	Trial time (min)
Freezing 1	373	58	0,155	10,3
Freezing 2	373	71	0,190	10,3
Freezing 3	373	75	0,201	10,3

TABLE 20 - CO₂ CONSUMPTION (KG CO₂/KG GRAPE) TO FREEZE CABERNET SAUVIGNON GRAPES DURING THE VINTAGE 2015.

CABERNET SAUVIGNON 2015				
Treatment	Grape weight (kg)	CO₂ used (kg)	η, Yield CO₂ (kg CO₂/ kg grapes)	Trial time (min)
Freezing 1	330	108	0,327	12
Freezing 2	330	73	0,221	12
Freezing 3	330	78	0,236	12

Tables 21, 22 and 23 show the yields of CO₂ for Sauvignon Blanc, Pinot Noir and Cabernet Sauvignon supra-extraction treatments during the vintage 2014, a study carried out by other students.

TABLE 21 - CO₂ CONSUMPTION (KG CO₂/KG GRAPE) TO FREEZE SAUVIGNON BLANC GRAPES DURING THE VINTAGE 2014.

SAUVIGNON BLANC 2014			
Treatment	CO₂ used (kg)	η, Yield CO₂ (kg CO₂/ kg grapes)	Trial time (min)
Freezing 1	363	0,4	62
Freezing 2	363	0,4	60
Freezing 3	174	0,2	45

In Sauvignon Blanc season 2014 was 15% more efficient than 2015; but comparing the freezing treatment replicate 1 of 2015 vintage with the average of the freezing treatment of 2014 vintage, we can conclude that there are no differences, with an efficiency of around 0.3.

TABLE 22 - CO₂ CONSUMPTION (KG CO₂/KG GRAPE) TO FREEZE PINOT NOIR GRAPES DURING THE VINTAGE 2014.

PINOT NOIR 2014		
Treatment	Used CO₂ (kg)	η, Yield CO₂ (kg CO₂/ kg grapes)
Freezing 1	176	0,440
Freezing 2	134	0,268
Freezing 3	191	0,293

In Pinot Noir season, there are improvements in the efficiency of the trial. 15% more efficient 2015 than 2014.

TABLE 23 - CO₂ CONSUMPTION (KG CO₂/KG GRAPE) TO FREEZE CABERNET SAUVIGNON GRAPES DURING THE VINTAGE 2014.

CABERNET SAUVIGNON 2014		
Treatment	Used CO₂ (kg)	η, Yield CO₂ (kg CO₂/ kg grapes)
Freezing 1	187	0,405
Freezing 2	146	0,316
Freezing 3	96	0,208

In Cabernet Sauvignon season, there are no significant improvements, however the efficiencies from 2015 are better than 2014.

The efficiency progressively improved through seasons, in the case of red wines experiments. The red wines experiments from 2015 took place in Undurraga winery and show a better performance than the experiments of 2014, which took place in Ventisquero winery. The difference of efficiencies could be due to the conditions of the experiments, if it was a continuous or a discontinuous process and also due to the improvements made to the equipment in 2015

The red wines, with an efficiency between 0.2 and 0.4, show a better performance than the white wines, with an efficiency between 0.2 and 0.5, with the exception of the rain problem on the experiment of 2015. This difference has nothing to do with the grapes colour but it is due to the way the experiment was carried out and the conditions of the process. In red varieties, the process was continuous while in white grapes it had to be discontinuous. The continuous process helps to have a better performance of the CO₂ dispenser equipment and consequently a better efficiency value.

9.10. Supra-extraction treatment costs

Considering a yield of 0.2 kg CO₂/kg grapes; something possible to obtain based on 2015 results. Table 24 presents the calculation of total cost of CO₂ required to freeze 100 000

kg of grapes. The cost of CO₂ per kilogram is 400 chilean pesos or 0.52 euros; a price estimated for 10 000 – 100 000 kg of grapes by Indura, but negotiable for higher volumes of CO₂.

TABLE 24 – PARAMETERS TO CALCULATE THE TOTAL CO₂ COST IN CHILEAN PESOS AND EUROS.

Grapes to process	100 000 Kg	
Wine obtained	70 000 L	
η, Yield CO₂	0.2	
CO₂ weight	20 000 Kg	
\$/kg CO₂	\$ 400	€ 0.52
CO₂ cost	\$ 8 000 000	€ 11 764

Knowing the quantity of grapes to process (kg), considering that 70% will be converted in wine and considering an optimal efficient of the CO₂ dispenser equipment as 0.2, we can calculate the quantity of CO₂ required (kg). Knowing that costs 0.52 euros per kg of CO₂, the cost of CO₂ to process 100 000 kg of grapes is around 12000 euros.

Now to calculate the total cost of the supra-extraction treatment (table 25) we have to consider the cost of transporting the CO₂ dispenser equipment from Santiago to Talca, the cost of installation of the equipment in the spot, the daily cost which includes operational costs and rent costs of the equipment per day, these figures were provided by Indura (Formula 18).

$$\text{Total cost of the trial} = ((\text{days} * \text{daily cost}) + \text{Equip. transport} + \text{Equip. installation} + \text{CO}_2 \text{ cost}) \quad (18)$$

TABLE 25 – SAUVIGNON BLANC SUPRA-EXTRACTION TREATMENT COSTS FOR 100 000KG IN CHILEAN PESOS AND EUROS.

Equipment transport		500 000 \$	\$ 750 000	€ 1 102
Equipment installation		250 000 \$		
Daily Cost	Operational costs	108 000 \$	\$ 164 240	€ 241
	Daily equipment rent	56 240 \$		
CO2 cost		8 000 000 \$		€ 11 764
days		6,25		
Total cost of treatment		\$ 9 776 500		€ 14 377

Considering equipment transport and equipment installation as fixed costs, the estimation performed with 100 000kg of grapes; they represent in a 7.7% of the total cost.

If we process only 50 000 kg of grapes (table 26), the estimation of fixed costs increases to 13% of total cost. The higher of the quantity of grapes processed, the lower significantly the fixed costs are.

TABLE 26 – SAUVIGNON BLANC SUPRA-EXTRACTION TREATMENT COSTS FOR 50 000KG IN CHILEAN PESOS AND EUROS.

Grapes to process	50 000 Kg	
η, Yield CO₂	0,2	
CO₂ weight	10 000 Kg	
\$/kg CO₂	\$ 400	€ 0,52
CO₂ cost	\$ 4 000 000	€ 5882
Total cost of the trial	\$ 5 776 500	€ 8495

Based on this analysis, and with an estimation of 0.7 L of wine produced from 1 kg of grapes, the cost of the supra extraction treatment per L would be 0.2 euros if 100 000 kg are processed or 0.24 euros if only 50 000 kg are processed.

Considering the market price of a normal box of premium wine as 50€. Increasing only 2 euros to the price of our box of premium wine (with supra extraction technique used);

it is possible to pay the cost of the supra extraction trial and still have a profit of 3.6% (table 27).

TABLE 27 – PROFIT MARGIN BETWEEN A NORMAL BOX OF PREMIUM WINE AND A SUPRA EXTRACTION BOX.

Wine volume	70 000 L	
Number of boxes	7777.7	
Box price	\$ 34 000	€ 50
Box price with supra extraction technique	\$ 35 360	€ 52
Difference of price	\$ 1360	€ 2
Cost	0.2	
Margin	1.8%	

X. LIMITS/ CRITICS

Criticizing the Sauvignon Blanc trial during the 2015 season, some technical problems that could not be avoided, affected results. During the freezing treatment repetition 2 it started to rain, damaging the results of the repetition 2 and 3. Between the repetitions of the freezing treatment there was also a dead time of 15 minutes where the CO₂ dispenser equipment was still working, wasting CO₂. Because of these 'pauses', the conveyor belts of the CO₂ dispenser equipment got frozen in the end of repetition 2, not allowing the grapes to move. The only solution was to stop the trial, shutting down the CO₂ dispenser equipment and defrosting the conveyors belts. When repetition 3 of the freezing treatment was restarted later and because of the shutdown of the equipment, the temperatures never achieved values below zero. Repetition 3 of the freezing treatment had to be repeated to guarantee the freezing of berries at the exit of the CO₂ dispenser equipment.

The CO₂ dispenser equipment, despite of the constants updates during three years of the project, still need more updates like the design of the exit of the equipment. Because frozen grapes get stuck in the exit, having difficulties to fall in the bins.

One of the limits connected to the implementation of supra-extraction technique is the higher cost of exploitation, refrigeration and freezing grapes.

Another limit is the sanitary conditions and quality of grapes, it must have the best conditions to see some effect in the final product. The Sauvignon Blanc experiment was planned with Premium quality grapes and due to an insect infection (*Lobesia botrana*) it was used blend quality grapes (lower quality) which they were also slightly affected by botrytis, due to the time waste to find another provider.

Comparing the Sauvignon Blanc results of 2014 and 2015, the results of 2015 were slightly better; the sensory evaluation present significant differences, an interesting increasing of pyrazine character. Which is attractive for some tasters and consumers, giving a green chili character like some of the most popular Sauvignon Blancs from Chile and New Zealand.

XI. CONCLUSIONS

Sauvignon Blanc grapes submitted to the CO₂ dispenser equipment reached average temperatures of berry skin between 0 and -3°C in 3.5 minutes. The consumption of CO₂ was estimated between 0.38 and 0.57 kg CO₂/kg berries due to rain.

The basic oenological parameters were similar for both treatments.

There were higher values of browning (DO₅₂₀) in the control treatment wine at the end of fermentation, this could be explained by the better protection by CO₂ from oxidation in the freezing treatment. One month later by the time of the sensory evaluation of wines, no significant differences in DO₄₂₀ were found and averages are even higher in the freezing treatment. This higher oxidability can be related to a higher phenols content.

Higher values of phenols are seen in the freezing treatment wines with a significant difference in total hydroxycinnamates, the major non-flavonoid component of white wines. These higher values can be explained by the freezing of the berry skin that cause the rupture of cell walls, promoting the release of phenolic compounds. Freezing treatment wines have higher values of low molecular weight polyphenols concentration with a significant difference in P-coumaric acid.

The only thiol where the frozen treatment had clearly higher levels was 3-mercaptohexanol (3MH). The methoxypyrazine IBMP important in Sauvignon Blanc wine aroma was in higher concentration in freezing treatment wines, with green chili-like aromas, attractive in some new world style Sauvignon Blancs.

Just as in spectral measures, the assessors in the sensory evaluation found significantly more browning in the freezing treatment and higher but not significant values on colour intensity and viscosity. The freezing treatment wines also had a significantly higher intensity in pirazine/ vegetal aromas.

The cost of the supra extraction treatment per L would be 0.2 euros if 100 000 kg are processed. Increasing only 2 euros the price per box of premium wine (with the supra extraction technique used); it is possible to pay the cost of the supra extraction trial and still have a profit of 3.6%.

XII. REFERENCES

Articles

Allen, M.S., 1993. *Viticultural effects on methoxypyrazine grape flavour: Current research directions*. Australia Grapegrower & Winemaker 354,10-12.

Allen et al., 1994. *Determination of Methoxypyrazines in Red Wines by Stable Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Australia Grapegrower & Winemaker.

Álvarez I., Aleixandre J.L., García M.J., Lizama V., 2005. *Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines*. Analytica Chimica Acta. Spain.

Bavcar D. et al., 2011. *Impact of alternative skin contact procedures on the aroma composition of white wine*. South African Journal Enology and Viticulture, vol 32, no2.

Belancic A. and Agosín E., 2002. *Aromas varietales: influencia de ciertas prácticas vitícolas y enológicas*. Tópicos de actualización en viticultura y Enología, Chile.

Bengoechea, L., et al., 1995. *Structure of hydroxycinnamic acid derivatives established by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection*. Chromatography, 41(1): p. 94-98.

Blouin, J. and Guimberteau G., 2000. *Maturation et maturité de raisins*. Éditions Féret, Bordeaux, France. 151 pp.

Carrillo M., Formato A., Fabiani A., Scaglione G., Pucillo G.P., 2010. *An inertizing and cooling process for grapes cryomaceration*. Sprim International and the office of the italian Scientific Research, Italy.

Coetzee C. and du Toit W. J., 2012. *A comprehensive review on Sauvignon Blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols*. Food Research International, South Africa.

Dubordieu D., Tominaga T., Masneuf I., Peyrot des Gachons C., Murat M-L., 2006. *The role of yeast in grape flavour development during fermentation: the example of Sauvignon Blanc*. American Journal Enology Viticulture, California.

- Duncan, B.; Sefton, M.A.; Waters, E.J., 2005. *The influence of ascorbic acid on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage*. Australian Journal of Grape and Wine Research, Volume 11, 355–368 Pages.
- Du Toit W.J., Coetzee C., Klemen Lisjak, Laura Nicolau, 2009. *Different oxygen and sulphur dioxide concentrations in Sauvignon Blanc must: Effect on the composition of the must and wine*, Auckland, New Zealand. Quad. Viticulture and Enology University Torino.
- Francesca V., Zinnai Angela et al., 2008. *Prefermentative cryomaceration to produce high quality wines from Sangiovese grapes*. Bollettino della Comunità Scientifica in Australasia. Italy.
- Georgiev V. et al., 2014. *Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals*. National Institute of Health, USA.
- Holtzen, D.A., 1991. *Plastics Compounding, Polyolefin Discoloration*, pp.38-44, November-December.
- Lampir L., 2013. *Varietal Differentiation of White Wines on the Basis of Phenolic Compounds profile*. Czech J. Food Sciences Prague, Czech Republic, 31: 172-179.
- Lan Y.Y., Tao Y.S., Tian T., Hu Z. H., Peng C.T., 2014. *The effect of pre-fermentative freezing treatment on the sensory quality of Meili Rosé wine*. South African Journal Enology Viticulture, vol. 35, no 2.
- Lesschaeve, 2007. *Sensory evaluation of wine and commercial realities: Review of current practices and perspectives*. American Journal of Oenology and Viticulture.
- Maga, J.A., 1989. *Sensory and stability properties of added methoxypyrazines to model and authentic wines*. In: CHARALAMBOUS, G. (ed.). Flavors and Off-flavors. Proc. 6th. Int. Flavor Conf.. 5-7 July 1989, Rethymnon, Crete, Greece, pp. 61-70.
- Marais J., 1994. *Sauvignon Blanc cultivar aroma*. Nietvoorbij Institute for Viticulture and Oenology, Agricultural Research Council, South Africa.
- Parenti A., Spugnoli P., Calamai L., Ferrari S., 2004. *Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grapes*. European Food Research and Technology Journal, Italy.

Peña-Neira A., A. Caceres, and C. Pastenes, 2007. *Low Molecular Weight Phenolic and Anthocyanin Composition of Grape Skins from cv. Syrah (Vitis vinifera L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of Clusters Thinning and Vineyard Yield*. Food Science and Technology International. 13(2): p.153-158.

Peña-Neira et al., 2000. *A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin*. European Food Research and Technology, 210(6): p.445-448.

Roussis I.G. et al., 2013. *Protection of Aroma Volatiles in a Red Wine with Low Sulphur Dioxide by a Mixture of Glutathione, Caffeic Acid and Gallic Acid*, Greece.

Salgues, M.; Cheynier, V.; Gunata, Z. and Wylde, R., 1986. *Oxidation of grape juice 2-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid by Botrytis cinerea laccase and characterization of a new substance: 2,5-di-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid*. J. Food Sci., 51 (5): 1191-1194.

Saucier C., Glories Y., 2002. *General phenomena during grape maturation*, Bordeaux. Tópicos de Actualización en Viticultura y Enología, 192-195 Pages.

Simpson, R.F.; Miller, G.C.; Orr, G.L., 1982. *Oxidative pinking of white wines: recent observations*. Food Technology in Australia, volume 34, Issue (1), 44, 46-47 Pages.

Simpson, R.F., 1982. *Factors affecting oxidative browning of white wine*. Vitis, 233-239.

Singleton, V.L. and Trousdale, E., 1983. *White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC*. Am. J. Enol. Vitic., 34 (1): 27-34.

Singleton, V.L.; Zaya, J. and Trousdale, E., 1980. *White table wine quality and polyphenol composition as affected by must SO₂ content and pomace contact time*. Am. J. Enol. Vitic., 31: 14-23.

Skouroumounis G.K., Kwiatkowski M.J., Francis I.L., Dambergs R., Oakey H., Capone D.L., Kleining A., 2005. *The effect of ascorbic acid, closure type and storage conditions on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and wooded Chardonnay wine*. The Australian Wine Research Institute, Australia.

Skouroumounis G.K., Kwiatkowski M.J., Selftan M. A., Waters E.J. and Dambergs R.G., (2005). *The use of chemometrics to select optimum wavelength for the spectrophotometric determination of browning in white wines*. The Australian Wine Research Institute, Australia.

Skouroumounis G.K., Kwiatkowski M.J., Francis I.L., Oakey H., Capone D.L., Peng Z., Somers T.C., 1998. *The wine spectrum: an approach towards objective definition of wine quality*, Adelaide, Australia.

Tominaga T., 2000. *Recherches sur l'arôme variétal des vins de Vitis vinifera L. cv. Sauvignon Blanc et sa genèse à partir de précurseurs inodores du raisin*. Faculté d'œnologie, Bordeaux, France.

Williams, P.J., Francis, I.L. & Sefton, M.A., 1992. *Sensory and chemical analysis of hydrolysed flavour precursors from Sauvignon blanc grapes*. In: SCHREIER, P. & WINTERHALTER, P. (eds.). *Flavour Precursors. Analysis-Generation-Biotechnology*. Proc. Int. Symp. 30 Sept. -2 Oct. 1992, Wurzburg, Germany, pp. 235-242.

Thesis

Cáceres Marcelo H. J., 2014. *Efecto de la supra extracción en la calidad del vino Sauvignon Blanc*, proyecto para optar al título de Ingeniero Agronomo en Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.

Coetzee C., 2011. *Oxygen and sulphur dioxide additions to Sauvignon Blanc: effect on must and wine composition*. Thesis for the degree of Master of Agricultural Science at Stellenbosch University, South Africa.

Dubernet, M. (1974). *Recherches sur la tyrosinase de Vitis vinifera et la laccase de Botrytis cinerea*. Applications technologiques. Thèse de doctorat ès sciences. Université de Bordeaux II.

Fretz C., 2005. *Aroma active sulphur compounds and their precursors in Petite Arvine wine*, a dissertation for the degree of Doctor of Technical Sciences at Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.

González Rodolfo A. M., 2012. *Estudio de los efectos de distintos manejos de cosecha y maceración prefermentativa en la composición química del mosto del cv. Sauvignon Blanc*, memoria para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo de la Universidad de Chile, Chile.

Ruiz Maria C. H., 2008. *Efecto de la congelacion parcial de bayas de Sauvignon Blanc sobre la cualidad del vino*, proyecto de titulo de Ingeniero Agronomo de Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.

Books

Bordeu, E., Scarpa, J., 1998. *Análisis químico del vino*, Ediciones Universidad Católica de Chile.

Hidalgo Togores J., 2003. *Tratado de Enologia*, Editorial S.A. MUNDI-PRENSA LIBROS.

Iland P., 2004. *Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts*, Australia.

Navarre C. et Langlade F., 2010. *L'œnologie*, 7^o edition. Editions TEC and DOC, Paris.

Pszczółkowski P. and Ceppi de Leco C., 2011. *Manual de Vinificación – Guía práctica para la elaboración de vinos*, Chile.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B. et Lonvaud A., 2006. *Handbook of Enology Volume 1, Microbiology of wine and vinifications*, 2nd edition, France.

XIII. ANNEXES

Annexe 1. Sensory evaluation form.

25 de junio de 2015

Ficha de Degustación Sauvignon Blanc 2015



Nombre:

Edad:

Ocupación:

Nº de copa:

Atención: La escala va desde el 1 al 9, donde 1 es menor o sin percepción y 9 mayor percepción.

Características visuales

Describe el color:

1 2 3 4 5 6 7 8 9	Pardeamiento
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Intensidad de color
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Viscosidad del vino

Características olfativas

1 2 3 4 5 6 7 8 9	Intensidad aromática global
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Frutas maduras
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Frutas tropicales
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Frutas cítricas
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Floral
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Piracinas – aromas vegetales
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Reducción

Características gustativas

1 2 3 4 5 6 7 8 9	Alcohol
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Acidez
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Amargor
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Mineralidad
1 2 3 4 5 6 7 8 9	Volumen en la boca

Annexe 2. Different expressions of sugars levels and correspondence to potential alcohol v/v (%) (Blouin, J. and Guimberteau G., 2000).

Annexe - Différentes expressions des teneurs en sucres et correspondance avec le titre alcoométrique probable

Saccharose g/100g	Indice de Réfraction	Masse Volumique g/L	Degré Oechsle	Degré Kloster- neuburg (KMW)	Sucres g/L	Titre Alcoométrique % vol. à 20 °C				
						16,83 g/%	16 g/%	17 g/%	18 g/%	19 g/%
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
14,0	1,35407	1,0557	55,7	10,9	125,1	7,43	7,82	7,36	6,95	6,58
14,1	1,35424	1,0561	56,1	11,0	126,2	7,50	7,89	7,42	7,01	6,64
14,2	1,35440	1,0565	56,5	11,1	127,3	7,56	7,96	7,49	7,07	6,70
14,3	1,35456	1,0569	56,9	11,2	128,4	7,63	8,03	7,55	7,13	6,76
14,4	1,35472	1,0574	57,4	11,4	129,5	7,69	8,09	7,62	7,19	6,82
14,5	1,35488	1,0578	57,8	11,5	130,6	7,76	8,16	7,68	7,26	6,87
14,6	1,35503	1,0582	58,2	11,6	131,6	7,82	8,23	7,74	7,31	6,93
14,7	1,35519	1,0586	58,6	11,7	132,7	7,88	8,29	7,81	7,37	6,98
14,8	1,35535	1,0591	59,1	11,8	133,8	7,95	8,36	7,87	7,43	7,04
14,9	1,35551	1,0595	59,5	11,9	134,9	8,01	8,43	7,94	7,49	7,10
15,0	1,35567	1,0599	59,9	12,0	136,0	8,08	8,50	8,00	7,56	7,16
15,1	1,35583	1,0603	60,3	12,1	137,1	8,15	8,57	8,06	7,62	7,22
15,2	1,35599	1,0608	60,8	12,2	138,2	8,21	8,64	8,13	7,68	7,27
15,3	1,35615	1,0612	61,2	12,3	139,3	8,27	8,71	8,19	7,74	7,33
15,4	1,35631	1,0616	61,6	12,4	140,4	8,34	8,78	8,26	7,80	7,39
15,5	1,35648	1,0621	62,1	12,5	141,5	8,41	8,84	8,32	7,86	7,45
15,6	1,35664	1,0625	62,5	12,6	142,6	8,47	8,91	8,39	7,92	7,51
15,7	1,35680	1,0629	62,9	12,7	143,7	8,54	8,98	8,45	7,98	7,56
15,8	1,35696	1,0633	63,3	12,8	144,8	8,60	9,05	8,52	8,04	7,62
15,9	1,35712	1,0638	63,8	13,0	145,9	8,67	9,12	8,58	8,11	7,68
16,0	1,35728	1,0642	64,2	13,1	147,0	8,73	9,19	8,65	8,17	7,74
16,1	1,35744	1,0646	64,6	13,2	148,1	8,80	9,26	8,71	8,23	7,79
16,2	1,35760	1,0651	65,1	13,3	149,2	8,86	9,33	8,78	8,29	7,85
16,3	1,35776	1,0655	65,5	13,4	150,3	8,93	9,39	8,84	8,35	7,91
16,4	1,35793	1,0660	66,0	13,5	151,5	9,00	9,47	8,91	8,42	7,97
16,5	1,35809	1,0664	66,4	13,6	152,6	9,06	9,54	8,98	8,48	8,03
16,6	1,35825	1,0668	66,8	13,7	153,7	9,13	9,61	9,04	8,54	8,09
16,7	1,35842	1,0672	67,2	13,8	154,8	9,20	9,68	9,11	8,60	8,15
16,8	1,35858	1,0677	67,7	13,9	155,9	9,26	9,74	9,17	8,66	8,21
16,9	1,35874	1,0681	68,1	14,0	157,0	9,33	9,81	9,24	8,72	8,26
17,0	1,35890	1,0685	68,5	14,1	158,1	9,39	9,88	9,30	8,78	8,32
17,1	1,35907	1,0690	69,0	14,3	159,3	9,46	9,96	9,37	8,85	8,38
17,2	1,35923	1,0694	69,4	14,4	160,4	9,53	10,03	9,44	8,91	8,44
17,3	1,35939	1,0699	69,9	14,5	161,5	9,59	10,09	9,50	8,97	8,50
17,4	1,35955	1,0703	70,3	14,6	162,6	9,66	10,16	9,56	9,03	8,56
17,5	1,35972	1,0707	70,7	14,7	163,7	9,73	10,23	9,63	9,09	8,62
17,6	1,35988	1,0711	71,1	14,8	164,8	9,79	10,30	9,69	9,16	8,67
17,7	1,36004	1,0716	71,6	14,9	165,9	9,86	10,37	9,76	9,22	8,73
17,8	1,36020	1,0720	72,0	15,0	167,0	9,92	10,44	9,82	9,28	8,79
17,9	1,36036	1,0724	72,4	15,1	168,1	9,99	10,51	9,89	9,34	8,85
18,0	1,36053	1,0729	72,9	15,2	169,3	10,06	10,58	9,96	9,41	8,91
18,1	1,36070	1,0733	73,3	15,3	170,4	10,12	10,65	10,02	9,47	8,97