



**“ESTABILIZACIÓN PROTEICA EN VINOS BLANCOS: ESTUDIO Y
COMPARACIÓN DE DISTINTAS ALTERNATIVAS PARA SAUVIGNON
BLANC”**

ING. AGR. CAROLINA PEREIRA

Tesis presentada para optar al grado de

MAGISTER SCIENTAE

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
MAESTRÍA EN VITICULTURA Y ENOLOGÍA

2014

Director de tesis:

ING. AGR. MSc. HUGO GALIOTTI

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Agrarias y a la Maestría en Viticultura y Enología por la beca otorgada para la realización de este estudio.

Al Dr. Juan Carlos Formento y al Ing. Agr. Ms Sc. Hugo Galiotti por haberme impulsado y apoyado para realizar la maestría.

Al Ing. Agr. Ms Sc. Hugo Galiotti por haber dirigido mi tesis.

A mi colega y amigo Lic. Santiago Palero por su constante apoyo y colaboración.

A mi amigo Dr. Diego Lijavetzky quien colaboró en un momento clave en la realización de esta tesis.

Al Ing. Agr. Santiago Sari de INTA por su colaboración en la elaboración del vino.

A la Lic. María Laura Sanchez, a la Dra. Sandra García Lampasona y al Dr. Sebastián Gomez Talquenca por su desinteresada colaboración y ayuda en la técnica de electroforesis.

A la Ing. Agr. Silvia Paladino por sus constantes palabras de apoyo y colaboración.

A mis colegas de las Cátedras de Enología I y II.

RESUMEN

Los enturbiamientos causados por las proteínas que se producen durante el almacenamiento y transporte de los vinos blancos es una constante preocupación de los enólogos. La brillantez de estos vinos es una de los principales aspectos de calidad y estos enturbiamientos pueden producirse fácilmente en vinos embotellados con leves cambios de la temperatura.

Las uvas Sauvignon blanc desarrollan durante su maduración los aromas típicos de la variedad. En ese momento también aumenta el contenido de proteínas que influye en las futuras características organolépticas y estabilidad del vino.

Debido a las condiciones climáticas del oasis vitícola cuyano (sobre todo radiación solar y temperatura) lograr un buen contenido de aromas en Sauvignon blanc no es tarea fácil. Por eso resulta importante encontrar métodos que logren estabilidad proteica sin modificar, o al menos no en forma significativa, el perfil aromático de estos vinos. Los vinos elaborados en estas regiones tienen una alta cantidad de proteínas derivadas de la uva lo que requiere mayores dosis de bentonita para su estabilización en comparación con otras variedades.

Para evitar los problemas de enturbiamientos los vinos se clarifican con elevadas dosis de bentonita lo que lleva la pérdida de gran parte de los aromas varietales.

En este trabajo se estudió la aplicación de tratamientos alternativos a la bentonita con el objetivo de reemplazar su uso para la eliminación de las proteínas. Se utilizaron manoproteínas, agregadas o liberadas de las paredes celulares de las levaduras y taninos enológicos.

Se hicieron estudios de la estabilidad de los vinos con el test de calor, técnica muy utilizada por la industria. Además se estudiaron los pesos moleculares de las proteínas encontradas por electroforesis en gel de poliacrilamida, después de los diferentes tratamientos.

Se observó que el único tratamiento eficaz para estabilizar los vinos respecto de las proteínas fue la bentonita. La aplicación de otros productos no elimina por

completo las proteínas causantes de los enturbiamientos. Sin embargo, en combinación con bajas dosis de bentonita, se obtienen vinos estables, lo que haría que los vinos Sauvignon blanc conserven la mayoría de los aromas provenientes de la uva.

ABSTRACT

The formation of protein haze in white wines during storage and transportation is a constant concern of the winemakers. Clarity of these wines is one of the prior quality aspects. This type of haze can occur easily with in bottled wines which are exposed to changes of temperatures.

Sauvignon blanc grapes develop during ripening the characteristic aromas of the variety. At this time also increases the content of proteins that influence in the future stability and organoleptic characteristics of the wine.

Due to the climate conditions of the viticulture oasis of Cuyo (solar radiation and temperature) achieve a proper content of aromas in Sauvignon blanc is not an easy task. This leads to find fining methods that respect the majority aromatics compounds of these wines. The wines produced in this region have a lot amount of protein derived from grapes, they requires higher doses of bentonite in comparison to other varieties.

To avoid these problems, the wines are clarified with high doses of bentonite which leads to the loss of the majority varietal aromas.

In this paper the application of alternative treatments to bentonite was studied with the objective of replacing its use for the removal of proteins. Mannoproteins, added or released from the cell walls of yeasts were used and oenological tannins.

The study of stability in wines was the heat test, technique widely used by the wine industry. Also the estimation of the molecular weights of the proteins by polyacrylamide gel electrophoresis technique was made.

It was observed that the only effective treatment for preventing the protein haze was the use of bentonite. The application of other products does not remove completely the proteins that cause the haze. However, in combination with low doses of bentonite, stables wines were obtained. It would make Sauvignon blanc wines keep the aromas coming from the grape.

ÍNDICE

1. Introducción	9
1.1. Las proteínas del vino	
1.2. Tipos de proteínas del vino	9
1.3. Efecto de las condiciones del viñedo en la concentración de proteínas de la uva	15
1.4. Proteínas de la uva al vino.....	17
1.5. Características de las proteínas del vino	18
1.6. Características físico-químicas del vino que afectan la estabilidad de las proteínas.....	20
1.7. Tratamientos con clarificantes para la estabilización proteica.....	21
1.7.1. Clarificación con bentonita	21
1.7.2. Determinación de la dosis de bentonita	23
1.8. Otros tratamientos para el control de la inestabilidad proteica.....	24
1.8.1. Manoproteínas liberadas de las paredes celulares de las levaduras.....	24
1.8.2. Taninos enológicos. Interacción taninos-proteínas.....	25
2. Hipótesis y Objetivos.....	26
2.1. Hipótesis.....	26
2.2. Objetivos.....	27
3. Materiales y métodos.....	28
3.1. Elaboración del vino	28
3.2. Tratamientos.....	29
3.3. Diseño experimental.....	29
3.4. Estimación del peso molecular de las proteínas.....	30
3.4.1. Reactivos para SDS-PAGE.....	30
3.4.2. Preparación de los geles.....	32
3.4.3. Preparación de las muestras y realización de SDS-PAGE	33
3.4.4. Condiciones para la electroforesis.....	33

4. Resultados	34
4.1. La bentonita produce la estabilización proteica de los vinos Sauvignon blanc.....	34
4.2. Análisis de los tratamientos con manoproteínas, β-glucanasas y taninos.....	35
4.2.1. La utilización de tratamientos alternativos a la bentonita no producen la estabilización proteica de vinos Sauvignon blanc	35
4.2.2. La combinación de tratamientos alternativos con bajas dosis de bentonita estabiliza el vino Sauvignon blanc	37
4.3 Análisis del contenido de proteínas por SDS-PAGE	38
4.3.1. El tratamiento con bentonita elimina las proteínas del vino Sauvignon blanc	38
4.3.2. Las proteínas que producen inestabilidad son las de peso molecular bajo	39
5. Discusión	40
6. Conclusiones	42
7. Bibliografía	43
8. Anexo	51
8.1. Relación de la variación de turbidez con diferentes dosis de Bentonita	51
8.1.1. Tabla de datos y modelo ajustado	51
8.1.2. Procesamiento con Regresión No Lineal en Infostat	51

8.2. Ensayos de los distintos tratamientos con variable respuesta dado por la variación de turbidez	52
8.2.1. Tabla de Datos	52
8.2.2- Análisis exploratorio de datos	52
8.3- Diseño de Parcelas Completamente al Azar con tres repeticiones	53
8.4. Análisis Factorial 3x6 en una estructura de Parcelas Completamente al Azar con 3 repeticiones.....	54
8.4.1. Tabla de Datos	54
8.4.2. Análisis exploratorio de datos	56
8.5. Diseño de Parcelas Completamente al Azar con tres repeticiones en un arreglo factorial de 3x6	56

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Unidad básica proteica conformada por amino-ácidos a partir de grupos amino (NH ₂), carboxilos (COOH) y cadena lateral	9
Figura 2. Ejemplo de enturbiamiento proteico en vino blanco	11
Figura 3. Cuba Mini-PROTEAN ® durante la electroforesis	34
Figura 4. Dosis de bentonita necesaria para la estabilización proteica del vino Sauvignon blanc en relación a la variación de turbidez	35
Figura 5. Promedios de ΔNTU según el tratamiento empleado.....	37
Figura 6. Dosis de bentonita necesaria para lograr la estabilización del vino Sauvignom blanc en combinación con los distintos tratamientos	38
Figura 7. SDS PAGE de las proteínas del vino tratadas con bentonita	39
Figura 8. SDS PAGE de las proteínas del vino tratadas con manoproteínas, enzimas β-glucanasas y taninos.....	40
Tabla 1. Contenido en proteínas de los mostos y vinos de diferentes variedades expresados en mg/L	14

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las proteínas del vino

Las proteínas, también llamadas polipéptidos, son moléculas grandes con pesos moleculares mayores a 10 kDa. Son estructuras complejas definidas como polímeros lineares de aminoácidos ligados por puentes peptídicos. Las proteínas están constituidas por un grupo de 5 átomos, carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), y azufre (S).

La subunidad principal de la proteína son los aminoácidos. Un aminoácido consiste en un átomo de carbono central ($C\alpha$) y un grupo amino (NH_2), un átomo de hidrógeno (H) y un grupo carboxilo ($COOH$) y una cadena lateral (R) que están unidas al carbono central. Las proteínas son macromoléculas estructurales y funcionales de los organismos vivos. Las funciones de las proteínas son catalíticas, de almacenamiento, transporte de otras moléculas como oxígeno, de soporte mecánico y funciones inmunológicas.

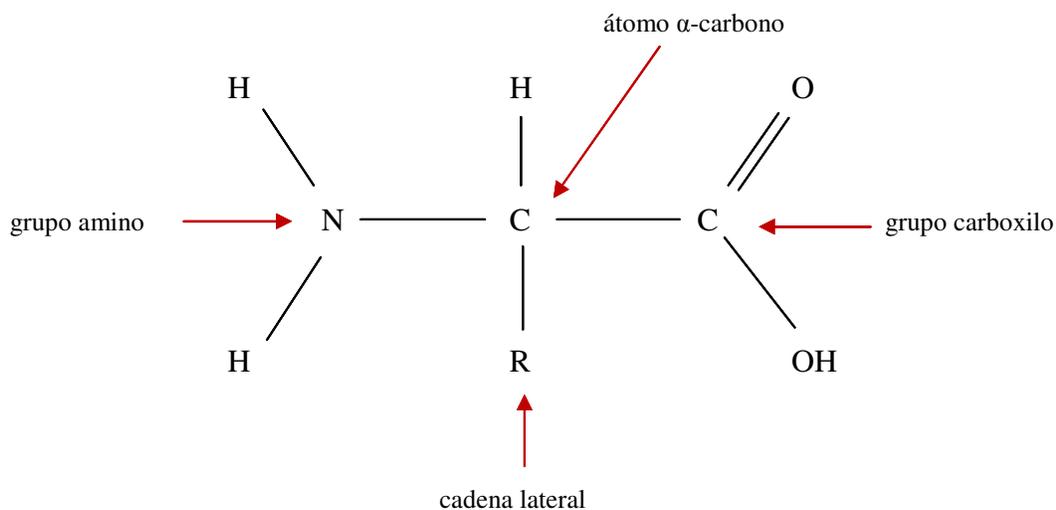


Figura 1. Unidad básica proteica conformada por amino-ácidos a partir de grupos amino (NH_2), carboxilos ($COOH$) y cadena lateral

Las proteínas en general son moléculas anfóteras, ya que contienen fracciones ácidas y básicas, además contienen también fracciones hidrofílicas e hidrofóbicas. El grupo aminoácido hidrofílico reside predominantemente en la superficie, y el hidrofóbico en el núcleo de la estructura. Esta particularidad química permite que la proteína pueda ser adsorbida en un amplio rango de superficies (Martin, 2003; Engel, 2004; Rezwan, 2005).

Durante mucho tiempo las proteínas del vino fueron consideradas como una mezcla de proteínas de la uva y proteínas provenientes de la autólisis de levaduras presentes en bajas concentraciones. Aunque las proteínas sean el componente minoritario de las fracciones nitrogenadas de mostos y vinos, cumplen un papel fundamental en diferentes operaciones llevadas a cabo por las bodegas (filtración, clarificación y estabilización) y en diferentes aspectos relacionados a la estabilidad del vino (Moreno-Arribas et al., 2002; Ferreira et al. 2002).

Los enturbiamientos causados por proteínas insolubles en vinos blancos y rosados, embotellados en condiciones normales de almacenamiento, han sido y son en la actualidad un problema para los enólogos, ya que la brillantez en este tipo de vinos es un requisito importante para el consumidor. El proceso de enturbiamiento proteico se produce por la desnaturalización, unión y posterior floculación de las proteínas con otros compuestos del vino en suspensión, llevando finalmente a la precipitación en vinos embotellados (Waters et al. 2005). Esto puede producirse durante el transporte y/o almacenamiento de vinos en condiciones inadecuadas de temperatura.

La medida de la brillantez está relacionada a la turbidez, que responde a un fenómeno óptico conocido como efecto Tindal, causado por la presencia de partículas en suspensión que desvían la luz de su recorrido normal. (Ribéreau-Gayon et al., 2000)

Si bien hay otros fenómenos que pueden causar enturbiamientos en botella (microbiológicos, metálicos, cristalinos) los más comunes son debido a la precipitación de proteínas inestables (Waters et al., 2005).

La figura 2 muestra la turbidez generada por las proteínas de los vinos que no son removidas y por lo tanto provocan el enturbiamiento de los vinos embotellados.



Figura 2. Ejemplo de enturbiamiento proteico en vino blanco. A la izquierda se observa un vino inestable y a la derecha un vino clarificado y estabilizado. (Fotografía extraída de la Tesis doctoral de Fernando Noé Salazar González, 2007)

Las uvas Sauvignon blanc desarrollan durante su maduración los precursores de los aromas característicos de la variedad. En este momento también aumenta el contenido de proteínas que influirán en las futuras características organolépticas y estabilidad del vino. Debido a las condiciones climáticas de la provincia de Mendoza y a las altas temperaturas en la época del crecimiento y maduración del fruto, es que se cosecha con altos contenidos de proteínas. Esto hace necesario la utilización de dosis elevadas de bentonita para lograr la estabilidad proteica. La utilización de este clarificante conlleva a la pérdida de gran parte de estos aromas, situación que no se presenta en regiones donde la época de cosecha presenta temperaturas templadas.

Esto hace que los vinos Sauvignon blanc de la provincia, presenten menor cantidad de aromas en relación a los vinos provenientes de regiones vitícolas con influencia marítima.

En la actualidad en la Argentina, el Sauvignon blanc representa el 5% de la superficie implantada de variedades blancas con 2.295,8 ha. En la provincia de Mendoza representa el 6% con 1843,8 ha. Se ha evidenciado un aumento con respecto a la última década del 191,7%, de acuerdo a información encontrada en el sitio de internet del INV (www.inv.gov.ar). Es decir que la producción de vinos Sauvignon blanc ha tenido un incremento importante.

1.2. Tipos de proteínas del vino

Se ha demostrado que los enturbiamientos proteicos no se correlacionan con la cantidad total de proteínas presentes (Bayly & Berg, 1967; Hsu & Heatherbell, 1987a), pero depende de la presencia de proteínas específicas, identificadas principalmente como proteínas relacionadas a patógenos (PR), por ejemplo proteínas tipo thaumatin y quitinasas (Waters, Peng, Pocock & Williams, 1995a; Waters, Haysaka, Tattersall, Adams, & Williams 1998), que están presentes en el vino en alta proporción. Además, junto a estas proteínas, que parecerían ser un prerrequisito para la formación de enturbiamiento y precipitado, hay un compuesto o factor desconocido del vino que también debe estar presente (Pocock et al. 2007, Batista et al. 2009)

Éstas proteínas tienen en general un peso molecular mayor a 10 kDa y un punto isoeléctrico (pI) menor a 6 (Hsu y Heatherbell 1987b).

Además se encontró que proteínas con 24, 28 y 32 kDa son las que participan en mayor proporción en los enturbiamientos proteicos y consecuentemente se demostró por los mismos autores que son proteínas PR (Waters et al. 1996). Las fracciones de peso molecular de 24 kDa son tipo thaumatin, las de 28 kDa son quitinasas y las de 32 kDa son péptidos. Recientemente se demostró que éstos péptidos de 32 kDa serían la β -1,3 glucanasa, también proteína PR (Esteruelas et al. 2009)

En otros estudios (Ferreira et al. 2002, Waters et al. 2005) se encontró que las proteínas del vino originadas de proteínas PR de la uva, de peso molecular entre 20

y 30 kDa y pI menores a 6, se encuentran en mayor proporción en los precipitados proteicos.

Aunque es bien conocido que la cantidad de proteínas del vino no se correlaciona con su susceptibilidad a presentar una quebradura proteica, se indican valores referenciales de los contenidos proteicos de algunos los vinos. Su conocimiento puede ser orientativo al momento de establecer la naturaleza de las proteínas y posterior estabilización (Flanzy, 2000)

La cantidad de proteínas presentes en vinos que no han sido estabilizados fluctúa entre los 15 y 230 mg/L (Ferreira et al. 2002) y puede llegar hasta unos 300 mg/L (Waters et al. 2005). El contenido de proteínas está significativamente influenciado por la variedad (Duncan 1992, Dorrestein et al. 1995, Fukui y Yokotsuka 2003). Se encontró que sólo el 25% del contenido inicial de proteínas del mosto quedó remanente en un vino espumante (Lugera et al. 1997) y alrededor del 60% de proteínas PR permanecieron en un vino Sauvignon blanc (Pocock y Waters 1998).

En la tabla 1 se presentan los contenidos proteicos en mostos y vinos de algunas variedades de uva. Son datos orientativos y dependen del método de determinación utilizado por cada autor.

VARIEDAD	MOSTO	VINO	AUTOR
Chardonnay	85,1		Leleu (1993)
		108,0	Leleu (1993)
		89,0-105,0	Bayly & Berg (1967)
Sauvignon blanc	8,7		Anelli (1977)
		27,0	Hsu y Heatherbell (1987b)
	80,0	72,0	Bayly & Berg (1967)
Semillón			Leleu (1993)
	10,6		Anelli (1977)
	55,0	30,0	Bayly & Berg (1967)
Riesling	1,5		Yokotsuka <i>et al.</i> (1977)
	8,6		Anelli (1977)
	40		Yokotsuka <i>et al.</i> (1978)
	39,2-40,2	30,1-30,5	Hsu <i>et al.</i> (1987)
	41,7-49,0	27,6-33,8	Hsu <i>et al.</i> (1987)
	68,0-110,0	39,0-80,0	Murphey <i>et al.</i> (1989)
		30,0	Flores <i>et al.</i> (1990)
		28,0-36,1	Hsu y Heatherbell (1987b)
		52,0-60,0	Flores <i>et al.</i> (1990)
		54,5-55,0	Hsu <i>et al.</i> (1987)
	60,8-61,5	Hsu <i>et al.</i> (1987)	
Pinot blanc		95,0	Bayly & Berg (1967)
Sylvaner	90,0	70,0	Bayly & Berg (1967)
Colombard	90,0		Bayly & Berg (1967)
Higgins	32,7		Lamikanra (1987)
Carlos	79,5	14,2	Lamikanra <i>et al.</i> (1988)
Canelli	80,0	72,0	Bayly & Berg (1967)
Welder	133,4	30,3	Lamikanra <i>et al.</i> (1988)
D'Alexandrie		113,0	Waters <i>et al.</i> (1992)
	260,0	233,0	Bayly & Berg (1967)
		269,0	Sommers y Ziemelis (1973)

Tabla 1. Contenido en proteínas de los mostos y vinos de diferentes variedades expresados en mg/L. Extraído de Flanzky, 2000

La variedad Sauvignon blanc tiene una alta cantidad de proteínas derivadas de la uva lo que requiere mayores dosis de bentonita para su estabilización en comparación con otras variedades (Hsu and Heatherbell 1987b, Duncan 1992, Pocock and Waters 2006). Por lo tanto el conocimiento de la naturaleza proteica, y de las condiciones de cultivo y vinificación ayudarán a determinar de qué manera puede eliminarse el problema de los enturbiamientos con las menores dosis posibles de bentonita, y así ayudar a un mejoramiento en la calidad de los vinos.

1.3. Efecto de las condiciones del viñedo en la concentración de proteínas de la uva

Las proteínas de la uva relacionadas a patógenos (PR), las quitinasas y las proteínas tipo thaumatin, son las proteínas más solubles del vino y ha sido demostrado que son las que participan de los enturbiamientos (Waters, 2011)

En la uva, la síntesis de las proteínas PR, ocurre principalmente en el hollejo (Hung, 2010) y es regulada de forma específica en los tejidos en desarrollo. En *Vitis vinifera* cv. Muscat Gordo Blanco los niveles de proteínas tipo thaumatin crecen notablemente después del envero y continúa durante la maduración (Tattersall et al. 1997). Se encontraron patrones de expresión similares para algunas quitinasas, las cuales son idénticas a las encontradas en los enturbiamientos proteicos (Waters, 2005)

En todos los cultivares de *Vitis vinifera* estudiados hasta ahora, la proteína tipo thaumatin, y las quitinasas son el componente mayoritario de las proteínas solubles de las uvas (Peng et al. 1997, Tattersall et al. 1997, Pocock et al. 1998, 2000)

Mientras que la síntesis de proteínas PR en uvas sanas parece ser desencadenada en el envero, no significa que los clásicos inductores de proteínas PR como el estrés, heridas y ataques de patógenos no son condicionantes en los niveles de este tipo de proteínas (Waters et al. 2005).

Es importante destacar que la concentración de proteínas extraíbles de la uva aumenta continuamente durante la maduración, por lo que se presume que el

potencial enturbiamiento proteico es mayor a medida que la madurez de la uva es mayor (Murphey et al.1989, Tattersall et al. 1997, Pocock et al. 2000)

Aunque esas proteínas son el mayor constituyente del enturbiamiento, varios artículos en la literatura sugieren que otros componentes del vino están involucrados en su formación (Siebert, 1999).

Se ha evidenciado un aumento de las proteínas PR en hojas y bayas en viñedos afectados por patógenos (Derckel et al. 1998, Jacobs et al. 1999, Bezier et al. 2002, Robert et al. 2002). Monteiro et al. (2003) observó en un ensayo en invernáculo, que los niveles de la proteína tipo thaumatin en uvas infectadas por *Uncinula necator* fueron mayores que en uvas sanas. Jacob et al. (1999) demostraron que las quitinasas y la actividad 1,3 β -glucanasa aumentó bayas en respuesta a la infección por oidio. Un estudio reciente (Girbau et al. 2004) demostró que con más del 30% de infección por oidio en racimos de Chardonnay hay un fuerte impacto en los niveles de enturbiamiento proteico detectado por test de calor.

Marchal et al. (1998) observó, que contrariamente a lo estudiado por otros autores, las bayas infectadas por *Botrytis cinerea* presentan bajos niveles de proteínas, lo que sugiere un efecto proteolítico por enzimas generadas por el hongo.

La disminución del nivel de proteínas en mostos provenientes de uvas infectadas por *Botrytis cinerea* no parecería ser debido a la poca extracción de jugo que se produce por marchitamiento y desecación, sino, como fue sugerido por Marchal et al. (1998), por una degradación de las proteínas PR causada por enzimas proteolíticas producidas por botritis. Los niveles de proteínas también se ven disminuidos si *B. cinerea* se desarrolla en el mosto (Girbau et al. 2004). Esto indica que la acción de enzimas proteolíticas producidas por este hongo pueden ser una alternativa potencial para reemplazar a la bentonita, un objetivo en desarrollo de numerosas investigaciones en todo el mundo (Waters et al. 2005).

También se ha demostrado que las heridas inducen la formación de proteínas PR y aumenta la actividad de la quitinasa en hojas de *Vitis vinifera* (Derckel et al. 1996) y en bayas de esta planta (Derckel et al. 1998). Los efectos que producen la cosecha

mecánica con respecto a las heridas, es por consiguiente, una causa de estudio. Paetzold et al. (1990) observaron que la uva cosechada en forma mecánica producía mostos con mayor contenido de proteínas en comparación con aquellas uvas cosechadas a mano. Los autores postulan que hay menor combinación de proteínas con compuestos fenólicos durante la molienda debido a la ausencia de escobajos en uvas cosechadas mecánicamente. Los taninos de los escobajos tienen por lo tanto una aptitud particular para fijar las proteínas del mosto durante el prensado de la uva. Estos mostos se ven enriquecidos de proteínas en comparación con aquellos que se cosechan a mano. Dubordieu y Canal-Llaubères (1990) demostraron que vinos elaborados luego de una maceración de 18 horas de uvas descobajadas tenían mayor cantidad de proteínas que uno elaborado con prensa directa de racimos enteros. No se pudo demostrar si el incremento proteico se debió a las heridas ocasionadas por el descobajado o a la ausencia de escobajo.

1.4. Proteínas de la uva al vino

Normalmente el contenido de proteínas en vinos no clarificados está en el rango de 15 a 230 mg/L (Waters et al. 2005). Igualmente se han determinado concentraciones de alrededor 300 mg/L en mostos y vinos (Santoro 1995, Vincenzi et al. 2005a). La cantidad de proteínas que posee un vino depende mucho del cepaje (Duncan 1992, Dorrestein et al. 1995, Fukui y Yokotsuka 2003), y del método de elaboración. Por otra parte pueden encontrarse variaciones en el contenido proteico también dependiendo del método de extracción y su determinación (Vincenzi et al. 2005a). Se encontró que sólo el 25% de las proteínas presentes en el mosto permanecieron luego de la elaboración en un vino Champagne (Luguera et al. 1998) y alrededor del 60% de proteínas PR en un vino Sauvignon blanc (Pocock y Waters 1998).

Durante el proceso de vinificación se observa una disminución progresiva del contenido de proteínas desde la uva hasta el vino obtenido. Hsu y Heatherbell (1987a) determinaron hasta 41 fracciones de proteínas en extractos de uvas con

pesos moleculares de 11,2 a 190 kDa y sólo 25 fracciones de proteínas en mostos y vinos con pesos moleculares de 11,2 a 65 kDa. Pueyro et al. (1993) también observaron una reducción general de proteínas luego de la fermentación. Esto coincide con la desaparición o reducción de algunas bandas electroforéticas, y parece ser una modificación del pI de las proteínas durante la vinificación, con valores de pI varían entre 3,6 a 4,5 en mostos principalmente, y entre 4,6 y 5 en vinos.

También se observó una modificación de las proteínas durante la fermentación en base al método analítico utilizado. El comportamiento de los perfiles proteicos obtenidos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de mostos y vinos resultaron ser levemente diferentes para bandas con pI de 3,6 a 4,8. Para bandas con pI 5 a 9, se observó una disminución o desaparición de las mismas (Santoro, 1995). Se encontraron numerosos patrones proteicos por métodos inmunológicos entre el mosto y el vino resultante, esto indica la modificación de las proteínas durante la vinificación (Ferreira et al, 2000).

1.5. Características de las proteínas del vino

El peso molecular y el pI de las proteínas del vino son las características mayormente estudiadas ya que de ellas depende en mayor o menor medida la producción de los enturbiamientos. Hsu y Heatherbell (1987b) observaron que la mayoría de las proteínas del vino tienen pesos moleculares entre 11,2 y 65 kDa y un pI entre 4,1 y 5,8. Estos rangos fueron confirmados por otros investigadores (Waters et al. 1991, Pueyro et al. 1993, Santoro 1995, Ferreira et al. 2000, Yokotsuka et al. 2007) para las proteínas predominantes en los enturbiamientos inducidos por calor. La fracción de 24 kDa (tipo thaumatin) tienen el doble de influencia en la aparición de enturbiamiento que las que están en la fracción de los 32 kDa (quitinasas). Las de peso molecular mayor (63 kDa), con polisacáridos, son estables al calor (Waters et al.1991, 1992, Pocock et al. 2007).

Hsu y Heatherbell (1987a, 1987b) aislaron proteínas inestables al calor por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con pesos moleculares entre 12,5 y 30 kDa, en vinos Gewüstraminer y Riesling. Paetzold et al. (1990) obtuvieron resultados similares con vinos Sauvignon blanc encontrando proteínas entre 13 y 67 kDa y pI entre 4 a más de 7. Waters et al (1991, 1992) demostraron en Moscato de Alejandría, que las proteínas inestables al calor presentes en los vinos tienen un peso molecular entre 24 y 32 kDa. Sin embargo, algunas proteínas del vino provocan mayor enturbiamiento que otras, en realidad, estas son las de bajo peso molecular y bajo pI (Waters et al, 1991; Waters et al, 1992)

También se observó un efecto de interacción entre el pI y el pH del vino en la formación de enturbiamientos. Para pH bajos se formaron partículas de menor tamaño y hubo mayor enturbiamiento cuando el pH del vino se acerca al pI de las proteínas (Batista et al. 2009). Además, se han encontrado algunos casos con proteínas del vino con pI menores al pH del vino (Murphey et al. 1989, Marchal et al. 1996) y los pesos moleculares de las mismas proteínas pueden diferir de acuerdo al método de detección utilizado. Por ejemplo, el peso molecular de las proteínas tipo thaumatin y las quitinasas determinados por SDS-PAGE es algunos kDa mayores de aquellas determinadas por espectrometría de masa (Pocock et al. 2000).

Otras observaciones demostraron que las glicoproteínas del vino (12-30 kDa), fueron las responsables de la inestabilidad proteica, por lo que su eliminación se hace necesaria para lograr estabilidad (Hsu y Heatherbell 1987b).

Igualmente las proteínas responsables de los enturbiamientos provienen exclusivamente de la uva y tienen relativamente bajo peso molecular, entre 12 y 35 kDa, y de acuerdo de la variedad puede diferir el tipo de proteína, al igual que su pI y su grado de glicolisación.

La mayoría de las proteínas derivadas de la uva (24 y 32 kDa) son resistentes a la proteólisis. En condiciones de vinificación parecería ser una característica intrínseca de las proteínas PR y no debido a una asociación fenólica o

glucosilación (Waters et al. 1995b). Se observó que la vinificación podría ser un proceso de purificación de estas proteínas (Ferreira et al. 2004).

Peng et al. (1997) evaluaron las características sensoriales de las proteínas tipo thaumatin del Sauvignon blanc ya que son las que predominan (70%) y son homólogas a las auténticas thaumatin. Es más, su remoción durante la vinificación para lograr estabilidad puede impactar negativamente en la calidad del vino.

1.6. Características físico-químicas del vino que afectan la estabilidad de las proteínas

La interacción proteína-polifenol es el mecanismo más común y que más influye en la inestabilidad del vino y la formación de los enturbiamientos (Somers y Ziemelis 1973, Yokotsuka et al. 1991, Dawes et al. 1994). Waters et al. (1995a) demostraron que la presencia de procianidinas era necesaria para la formación de enturbiamiento ya que las proteínas solas no causaban turbidez. El análisis de un precipitado natural de Sauvignon blanc también reveló que las proteínas (principalmente tipo thaumatin) y compuestos fenólicos, sólo contribuían un 10% y 7% respectivamente, del peso seco del precipitado, siendo el resto polisacáridos (4%) y componentes desconocidos (Esteruelas et al. 2009b).

Para la formación de enturbiamientos con polifenoles, un aumento de la polimerización de taninos y la interacción con las proteínas, provocan un aumento de la turbidez (Yokotsuka et al. 1983). Otros dos factores que influyen fuertemente en los enturbiamientos son el pH y el etanol del vino. La turbidez causada por el complejo proteína-polifenol generalmente aumenta con pH crecientes de 2,7 a 3,7 en soluciones de vino modelo con 10% v/v (Yokotsuka y Singleton 1995). Se observó la máxima reflexión de luz a pH 4 (2,5 a 4,5) para una solución modelo siendo indiferente su contenido en etanol (0-12% v/v) (Siebert et al. 1996b). Proteínas aisladas de la variedad Arinto, y disueltas en agua y en soluciones modelo de vino con varios valores de pH, mostraron un pico de inestabilidad alrededor del

valor de pH 4, el cual coincide con el punto isoeléctrico de las proteínas del mosto de esa variedad (Batista et al. 2009). Esto demostró un mecanismo isoeléctrico de precipitación proteica. Es más, adiciones mayores de etanol (50% v/v), no causaron turbidez cuando se utilizó el alcohol como inductor de precipitaciones proteicas (Esteruelas et al. 2009a). Se encontró que en un vino de 12,1% v/v de etanol con pequeños agregados (hasta 2% v/v), no interfiere en la formación de enturbiamientos mediante el test de calor (Mesquita et al. 2001). Esto se confirma en otro estudio en el cual la concentración de etanol muestra un efecto no significativo en el desarrollo de enturbiamientos en vinos (Sarmiento et al. 2000a).

Pocock et al. (2007) señaló que el sulfato es un factor, anteriormente desconocido, esencial para la formación de enturbiamientos en ausencia de compuestos fenólicos en un vino modelo. Por lo tanto la presencia de sulfatos junto a las proteínas participan de los enturbiamientos proteicos (Pocock. 2007).

1.7. Tratamientos con clarificantes para la estabilización proteica

Los mecanismos de estabilización de vinos están basados en la neutralización de cargas entre las partículas en suspensión y las del agente clarificante. Esto permite al coloide en suspensión su aglomeración y posterior floculación por gravedad. Otros mecanismos pueden ser la absorción de las partículas en suspensión por el clarificante.

1.7.1. Clarificación con bentonita

En la industria del vino, todavía y en forma generalizada sigue utilizándose la bentonita para evitar la quebradura proteica de los vinos blancos. Es un material derivado de la arcilla montmorillonita la cual contiene cationes intercambiables. La adsorción de las proteínas del vino en la bentonita es debido a la capacidad de intercambio catiónico de esta arcilla la cual depende de la cantidad de desplazamiento de los iones aluminio por el sodio, calcio o magnesio. Las proteínas

del vino son cargadas positivamente a los pH del vino, y por eso es que son intercambiadas por la bentonita, la que adquiere carga neta negativa (Blade y Boulton, 1988; Ferreira et al, 2000). Las bentonitas sódicas presentan una mayor efectividad en la absorción en relación a las cálcicas (Blade y Boulton, 1988).

La bentonita tiende a extraer del vino las proteínas de alto pI (5,8-8) y pesos moleculares intermedios (35-42 kDa) preferentemente. Aunque podrían presentarse resultados un tanto contradictorios en base al método de determinación de proteínas utilizado (Hsu y Heatherbell 1987b) (Dawes et al. 1994) (Duncan 1992).

La interacción bentonita-proteína es rápida, y la adsorción es independiente de la temperatura, pero varía levemente respecto a la cantidad de proteínas, la concentración de etanol y el pH del vino, y se ve muy afectada por el tipo de bentonita utilizado (Blade y Boulton 1988). El pH y el pI del vino tienen una gran influencia de la efectividad en la remoción de proteínas por parte de la bentonita debido al mecanismo de intercambio catiónico (Ferreira et al, 2002).

A pesar de que se han estudiado numerosas técnicas para reemplazar a la bentonita, este resulta ser el tratamiento más efectivo para la remoción de proteínas, con la consecuente pérdida de las características sensoriales provocada.

Muchos estudios muestran que la bentonita afecta las cualidades organolépticas de los vinos. Así, Miller y otros (1985) mostraron una significativa reducción de los aromas del mosto y vino. Otros estudios sobre estabilización con bentonita en vinos espumantes encontraron una disminución en los caracteres sensoriales y calidad de la espuma (Martinez-Rodriguez y Polo, 2003; Vanrell et al, 2007). Por lo tanto, se puede asegurar que un agregado excesivo de bentonita puede causar efectos negativos en las características sensoriales de los vinos. Esto lleva a desarrollar tecnologías que mejoren el uso de la bentonita o alternativas a ella, que sean económicamente viables, que mantengan la calidad del vino y que permitan al enólogo obtener un producto aceptable para el consumidor.

En oposición a esto, algunas investigaciones postulan que la clarificación de vinos blancos con bentonita no tienen efecto negativo en el aroma y sabor del vino (Leske et al, 1995; Pocock et al, 2003).

Según su origen o su tratamiento industrial, las diferentes bentonitas son más o menos eficaces, con una velocidad de sedimentación y un volumen de depósito variables. La suspensión debe prepararse en una concentración limitada ya que las cantidades de agua que se pueden agregar al vino son limitadas.

Por otra parte las pérdidas de vino en volumen de borra representa entre el 3% al 10% del vino. No forma sedimentos compactos y además no es reciclable lo que la hace un importante residuo (Waters et al., 2005). Sumado a esto hay una gran pérdida de valor económico asociado al recuso humano utilizado para realizar esta práctica (Hoj et al. 2000).

1.7.2. Determinación de la dosis de bentonita

Las dosis de bentonita necesarias para lograr la estabilidad proteica en las bodegas, normalmente se determinan mediante ensayos de laboratorio induciendo el enturbiamiento. El método más utilizado es mediante el calentamiento de las muestras ya que es el que mejor imita las condiciones de almacenamiento de los vinos. Pocock y Rankine (1973) hicieron comparaciones combinando diferentes temperaturas y tiempos, concluyendo que a 80°C durante 6 horas se producían las mejores condiciones quebrantes de los vinos. Luego Pocock y Waters (2006) observaron que en condiciones menos severas, 80°C durante 2 horas, se podían predecir las condiciones de enturbiamientos durante cortos y medianos plazos de almacenamiento, que es el caso de la mayoría de los vinos blancos.

Sarmiento et al. (2000a) vieron que el test de calor era un buen indicador del contenido total de proteínas y es el menos afectado por otros componentes comparado con otros como el test de etanol y el de taninos, procedimientos también utilizados para determinar la inestabilidad proteica. Esteruelas et al (2009a) vieron además que el test a una temperatura superior (90°C por 1 hora) produce el

enturbiamiento en condiciones similares a lo que sería una quiebra proteica natural comparado con test de bajas temperatura, tanino, sulfato de amonio, ácido tricloroacético, etanol y test Prostab[®]. El comportamiento de la quiebra proteica producida por calentamiento tiene una buena correlación con la eliminación de las proteínas por la clarificación con bentonita. Son necesarias temperaturas mayores (> 60°C por 30 minutos) para precipitar las proteínas tipo thaumatin y las quitinasas, proteínas mayoritariamente inestables en el vino. (Sauvage et al. 2010).

Mientras que las proteínas PR son intrínsecamente resistentes a la proteólisis debida a tratamientos enzimáticos durante la fermentación (Waters et al. 1992, 1995b), las quitinasas presentan una degradación proteolítica limitada (Waters et al. 1998). Una desaparición gradual de las quitinasas y proteínas tipo thaumatin se produce con una actividad proteasa durante la elaboración de un vino espumante, y fragmentos de bajo peso molecular fueron ligados a quitinasas, lo que indica una proteólisis de éstas (Manteau et al. 2003). Tratamientos de calor con altas temperaturas (90°C, 1 minuto) produjo un reducido contenido de quitinasas pero tuvo poco efecto en las proteínas tipo thaumatin, mientras que un tratamiento combinado de calor y enzimas proteolíticas tuvieron poco efecto tanto para las quitinasas como las para las proteínas tipo thaumatin (Pocock et al. 2003). A una menor temperatura (45°C), el tratamiento proteolítico requirió hasta más de 7 horas para la desnaturalización de las proteínas PR (Pocock et al. 2003). Para clarificar los vinos con bentonita se requieren dosis entre 1 y 2 g/L (Hung, 2010), dependiendo el test utilizado.

1.8. Otros tratamientos para el control de la inestabilidad proteica

1.8.1. Manoproteínas liberadas de las paredes celulares de las levaduras

En numerosos vinos estudiados se encontraron glicoproteínas originadas en la uva y manoproteinas provenientes de las levaduras (Yokotsuka et al. 1991, Waters et al. 1994b). Por un lado, las manoproteínas provenientes de la lisis de las levaduras (420 y 31.8 kDa) podrían producir un efecto estabilizador en las proteínas del vino,

disminuyendo los enturbiamientos (Waters et al. 1994b, Moine-Ledoux y Dubordieu 1999). Por otra parte las manoproteínas (10 a 30 kDa), por poseer composición hidrolítica e hidrofóbica, contribuyen a la mejora de la formación de espuma en los vinos espumantes (Núñez et al. 2006).

Ledoux y otros (1992), comprobaron el mejoramiento de la estabilidad proteica de vinos blancos durante su crianza sobre lías en cubas. Estos vinos tienden a tener una menor inestabilidad proteica potencial probablemente debido a un componente de 32 kDa que se identifica como fragmentos de enzimas invertasas y periplásmicas extraídas de las paredes celulares de las levaduras. Por esta razón es que los vinos con crianza sobre borras pueden ser estabilizados con dosis menores de bentonita.

Mantenidos sobre las borras, los vinos nuevos son menos susceptibles a la inestabilidad bajo el efecto del calor; de acuerdo a esto, su estabilidad proteica requiere dosis menores de bentonita. De tal manera, un vino Sauvignon, trasegado después de la fermentación, exige un tratamiento con 120 g/HL de bentonita para evitar la quiebra proteica, pero está prácticamente estabilizado después de 10 meses de crianza sobre lías, requiriendo bajas dosis de bentonita (30-40 g/HL). Las proteínas de la uva responsables de la quiebra proteica de los vinos blancos no están digeridas ni absorbidas por las borras de levaduras durante la crianza, sino que las mismas se vuelven termoestables en presencia de ciertos coloides cedidos al vino por la pared de las levaduras. Esta observación permite suponer que ciertas manoproteínas de las paredes de las levaduras, liberadas en los vinos en contacto con borras, podrían disminuir la inestabilidad térmica de las proteínas. Esta hipótesis concuerda con el efecto estabilizante de una manoproteína de alto peso molecular (420 kDa), purificado de un vino Moscato por Waters y otros (1993). Este compuesto proteico termoestable no es adsorbido por la bentonita y puede ser extraído de las paredes de las levaduras con una enzima comercial que posee diferentes actividades β -glucanasas y una proteasa. El uso de esta enzima está autorizado en vinos. Digeridas por esta enzima, las paredes de las levaduras liberan una mezcla de manoproteínas que encierran el mismo compuesto termoestabilizante que aquel que aparece en los vinos durante su conservación sobre borras.

Estas manoproteínas, en dosis de 25 g/HL, son capaces de disminuir a la mitad la dosis de bentonita necesaria para la estabilización proteica de un vino muy sensible (Ribereau-Gayon, 2003).

1.8.2. Taninos enológicos. Interacciones taninos-proteínas

Numerosos trabajos han mostrado que los taninos se asocian con las proteínas mediante interacciones hidrófobas dependiendo de las características de los taninos, de las proteínas, y de las condiciones del medio (Martin y otros, 1990). Las interacciones son por atracciones de Van de Waals entre los taninos y las regiones no polares de las proteínas. Estas interacciones parecen ser la causa del complejo que es forzado por uniones hidrógeno y son fenómenos que dependen de numerosos grupos fenoles. Además, tratándose de una baja concentración en proteínas los polifenoles se unen en la superficie de la proteína, luego se producen fenómenos de agregación y de precipitación. Cuando la concentración en proteínas es elevada se produce un fenómeno idéntico, esto explica la no estequiométrica de la reacción taninos-proteínas observada por numerosos autores (Ribereau-Gayon, 2003). Estos fenómenos se han estudiado para la eliminación de algunos taninos en vinos con un clarificante proteico como la gelatina.

Por otra parte, la interacción de las proteínas de la uva con los taninos fue sugerida hace más de 40 años (Koch, 1959). Somers y Ziemelis (1973) postularon que más del 50% de las proteínas del vino blanco estaban ligadas a compuestos flavonoides. Yokotsuka y colegas (1983) hallaron que taninos aislados de vinos interactuaban con proteínas aisladas de los mostos para formar enturbiamientos, y que proteínas aisladas de mostos no producían enturbiamientos en presencia de compuestos no fenólicos del vino. Estos estudios, sin embargo, no fueron llevados a cabo bajo idénticas condiciones de aquellos vinos comúnmente encontrados en el comercio.

El agregado de taninos puede precipitar las proteínas, pero las dosis necesarias para obtener su eliminación más o menos completa son muy elevadas (2 g/L), lo que deja al vino duro. Un tanizado en dosis más bajas podría llegar a estabilizar el vino,

siempre y cuando el complejo tanino-proteína formado no sea sensible al calor. Por lo tanto depende de la naturaleza proteica del vino (Ribereau-Gayon, 2003).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Para la estabilización proteica en vinos Sauvignon blanc, es posible reemplazar la bentonita utilizando en su lugar manoproteínas (liberadas de las paredes celulares de las levaduras o agregadas) o taninos enológicos.

2.2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es encontrar alternativas al empleo de bentonita para la estabilización proteica de vinos Sauvignon blanc.

Por otra parte se establece un objetivo específico que es evaluar la influencia de las manoproteínas y la adición de taninos enológicos como factor de prevención en la quebradura proteica de estos vinos. La utilización de alguna de estas tecnologías podría disminuir los efectos negativos de la bentonita sobre las propiedades sensoriales del vino debido a que ésta principalmente remueve componentes aromáticos o gustativos. Por otra parte la merma de vino, debido al gran aumento de volumen y poder de sedimentación de la bentonita es otro problema que se presenta sumado al recurso humano necesario para llevar a cabo todo el proceso.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Elaboración del vino.

Para la realización del experimento se partió de una uva Sauvignon blanc cosechada en el mes de febrero. Su madurez fue de 22% ss determinada por refractometría. Para la obtención del mosto a fermentar, se realizó un despalillado de los racimos seguido de un escurrido por gravedad. Se adicionaron 5 g/qm de dióxido de azufre y se corrigió la acidez con ácido tartárico hasta a pH 3,3. Con el objetivo de no despojar el mosto de todos los componentes nutricionales para una correcta fermentación, se colocó en un tanque a 6°C durante 24 horas para permitir el desborre y llegar a una turbidez de 200 NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez). Luego se trasegó y se inoculó con levadura QA 23® (Lallemand) hidratada adicionando el nutriente Go Ferm Protec® (Lallemand). La fermentación del mosto se llevó a cabo a 18°C, temperatura que permite conservar los aromas provenientes de la uva.

Para asegurar en el ensayo un exceso de proteínas, se hizo un agregado adicional de 50 g/L de nitrógeno prontamente asimilable, cuando la densidad fue de 1050. La fermentación alcohólica se dio por finalizada cuando el vino quedó en menos de 1,8 g/L de azúcares reductores. El vino se trasegó a 15 tanques de 50 L donde se realizaron cinco tratamientos con un Diseño de Parcelas Completamente al Azar con tres repeticiones. El análisis de los resultados se realizó con el software estadístico Infostat®.

3.2. Tratamientos

3.2.1. Testigo (T): el vino obtenido permaneció en los tanques sin agregados.

3.2.2. Tanino (TA): se agregaron taninos gálicos marca Tanin Galalcool® de Laffort Oenologie en dosis recomendadas por marbete de 10 g/HL. El origen de los mismos son diferentes especies vegetales. Son ampliamente utilizados para la elaboración de vinos.

3.2.3. Manoproteínas (M): se agregaron manoproteínas comerciales en dosis recomendadas por marbete de 50 g/HL. Se trata de un preparado específico de cortezas de levaduras marca Biolees® de Laffort Oenologie.

3.2.4. Enzimas (E): agregado de enzimas β -glucanasas. Las mismas, se encuentran en una preparación enzimática de actividades pectolíticas y β -glucanasas marca Extralyse® de Laffort Oenologie. Se aplicó en dosis recomendadas por marbete de 10 g/HL.

3.2.5. Bentonita (B): agregado de bentonita granulada de alta pureza marca Microcol® de Laffort Oenologie en dosis de 90 g/HL. La bentonita es una arcilla perteneciente al grupo de las montmorillonitas.

3.2.5.1. Determinación de la dosis de Bentonita

Se investigó la menor dosis necesaria de bentonita que permitiera la estabilización proteica de los vinos. Esto se realizó mediante un ensayo de laboratorio donde se utilizaron 6 botellas de 750 mL y se agregaron al vino dosis crecientes de bentonita. La dosis menor fue de 30 g/HL y la mayor de 130 g/HL.

3.3. Diseño experimental

El vino se mantuvo en tanques durante tres meses en contacto con los diferentes tratamientos para lograr su acción estabilizante. Una vez transcurrido este tiempo se determinó la estabilidad proteica de cada uno de los tratamientos según el test de calor. En este ensayo el test de calor consistió primeramente en una centrifugación de las muestras a 3000 rpm durante 5 minutos. Luego se filtraron por membranas de acetato de celulosa de 0,45 μ m y posterior lectura con nefelómetro (2100P Turbidimeter HACH). Se registró el dato de la turbidez en NTU (antes del calentamiento). Posteriormente se llevó a baño maría a 80°C (BM termostatzado) durante 1 hora, se enfrió a 20°C y se volvió a tomar la lectura con nefelómetro. Se registró así el dato de la turbidez en NTU posterior al calentamiento. Se consideró que el vino era estable con respecto a la

quebradura proteica, cuando la diferencia de NTU fue inferior a 1. Consecutivamente fueron inestables los vinos cuya variación de NTU fue mayor o igual a 1.

Se hicieron parcelas aleatorizadas con 3 repeticiones y se analizó con ANOVA.

3.4. Estimación del peso molecular de las proteínas

Para el estudio de la naturaleza proteica de los distintos vinos se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) según Laemmli (1970).

3.4.1. Reactivos para SDS-PAGE

Acrilamida/Bis acrilamida (30% T; 2,67% C)

-87,6 g acrilamida (29,2 g/100 mL); 2,4 g bis-acrilamida (0,8 g/100 mL)

Preparación de 300 mL en agua bidestilada. Filtración y conservación en frasco color caramelo por un máximo de 30 días a 4°C.

Buffer del gel separador 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8

-27,23 g tris base (18,15 g/100 mL)

Disolución en aproximadamente 80 mL de agua bidestilada, ajuste a pH 8,8 con HCl 1 N. Preparación de 150 mL y conservación a 4°C.

Buffer del gel compactador 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8

-6 g tris base

Disolución en aproximadamente 60 mL de agua bidestilada. Ajuste a pH 6,8 con HCl 1 N. Preparación de 100 mL con agua bidestilada y conservación a 4°C.

Solución de Sodio Dodecil Sulfato (SDS) 10%

Disolución de 10 g de SDS en aproximadamente 60 mL de agua bidestilada, seguido de una agitación suave. Llevar a 100 mL. Conservación en botella de vidrio a temperatura ambiente.

Solución de APS 10%

Disolución de 100 mg de APS (persulfato de amonio) en 1 mL de agua bidestilada. Preparado en el día.

Buffer muestra (SDS reductor).

- Agua destilada: 4 mL; Buffer 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8: 1 mL; Glicerol: 0,8 mL; SDS 10%: 1,6 mL; Mercaptoetanol: 0,4 mL; Azul de bromofenol (0,05%): 0,2 mL. Mezcla de los componentes en ese orden.

Buffer de cámara 5x pH 8,3

TRIS Base: 9 g (15g/L); Glicina: 43,2 g (72 g/L); SDS: 3 g (5 g/L)

Disolución en 600 mL de agua bidestilada. Conservación a temperatura ambiente. Al momento del uso se hizo una dilución de 120 mL de la solución 5x con 480 mL de agua bidestilada para una corrida electroforética. La dilución se realiza para que tenga la misma fuerza iónica el buffer y el gel.

3.4.2. Preparación de los geles: para 10 mL de gel

Componentes del Gel separador. Mini gel 10% :

- Agua destilada	4,0 mL
- 1,5 M TRIS-HCl	2,5 mL
- SDS 10%	100,0 μ L
- acrilamida/bisacrilamida	3,4 mL
- APS 10%	50,0 μ L
- TEMED	5,0 μ L

El monómero total formado se agregó en el molde formado por los vidrios y dejó polimerizar al menos una hora. Una vez formado el polímero se procedió a la preparación del gel compactador.

Componentes del Gel compactador 0,125 M TRIS, pH 6,8. Mini gel 4%.

- Agua destilada	6,1 mL
- 0,5 M TRIS-HCl	2,5 mL
- SDS 10%	100,0 μ L
- acrilamida/bisacrilamida	1,3 mL
- 10% APS	50,0 μ L
- TEMED	10,0 μ L

El monómero total formado se vertió sobre el gel separador hasta el borde del molde y se agregó el peine para formar las calles.

3.4.3. Preparación de la muestra y realización de SDS-PAGE

Para poder llevar a cabo la electroforesis, se dializaron las muestras de los distintos tratamientos. Los mismos se mantuvieron durante 24 horas en tubos de diálisis de 35 kDa de porosidad (Spectra/Por®). De esta manera, se concentró la mayor cantidad de proteínas en el rango de peso molecular estimado.

Por otra parte, se tomaron 10 mL de todos los tratamientos sin dializar y fueron calentados a 80°C durante 30 min para provocar una desnaturalización de las proteínas e inducir el enturbiamiento. Luego fueron centrifugados durante 10 min a 1200g, obteniendo un precipitado y un sobrenadante de todos los tratamientos.

Las muestras dializadas, precipitadas y sobrenadante obtenidas se diluyeron 1:4 con el buffer muestra preparado y fueron colocadas en baño maría a 100°C por 10 minutos. El estándar o patrón utilizado llevó el mismo procedimiento (SM0431 de Fermentas). Se hizo la siembra con 15 µL de la preparación.

3.4.4. Condiciones para la electroforesis

Se utilizó para realizar la electroforesis una cuba Mini-PROTEAN® BioRad. Para lograr una óptima resolución con una mínima distorsión de la banda se hizo con una potencia de 185 V (voltaje constante). El tiempo aproximado de la corrida fue de 45 min no excediendo un máximo de 60 min. No hizo falta hacer ajuste de la potencia por el grosor del gel o número de geles. Una vez finalizada la corrida, se marcó y retiró el gel separándolo de los vidrios.

El revelado se hizo sumergiendo el gel en una solución de Coomassie blue al 0,2% (0,2 g de colorante en 100 mL de agua bidestilada) en constante agitación durante una noche. Posteriormente se realizó el desteñido hasta la decoloración total del gel, utilizándose una solución de 100 mL de metanol y 75 mL de ácido acético. El gel permaneció en esta solución en agitación continua realizando cambios de la solución para acelerar el proceso.

La figura 3 muestra una cuba de electroforesis completa donde puede observarse el frente de la corrida marcada con una línea azul.



Figura 3. Cuba Mini-PROTEAN® durante la electroforesis.

4. RESULTADOS

4.1. Estabilización proteica de los vinos Sauvignon blanc por agregado de bentonita

Una vez finalizada la etapa de elaboración y estabilización del vino mediante el agregado de dosis crecientes de bentonita, se pudo comprobar a través del test de calor, que la utilización de 90 g/HL del clarificante produjo la eliminación de las proteínas que ocasionan el enturbiamiento. En la figura 4 se presenta un modelo ajustado de la variación de turbidez arrojadas a partir del test de calor de las diferentes dosis empleadas. Se observa en esta figura que con la aplicación de 90 g/HL y superiores, el vino quedó completamente estable a los enturbiamientos generados por proteínas.

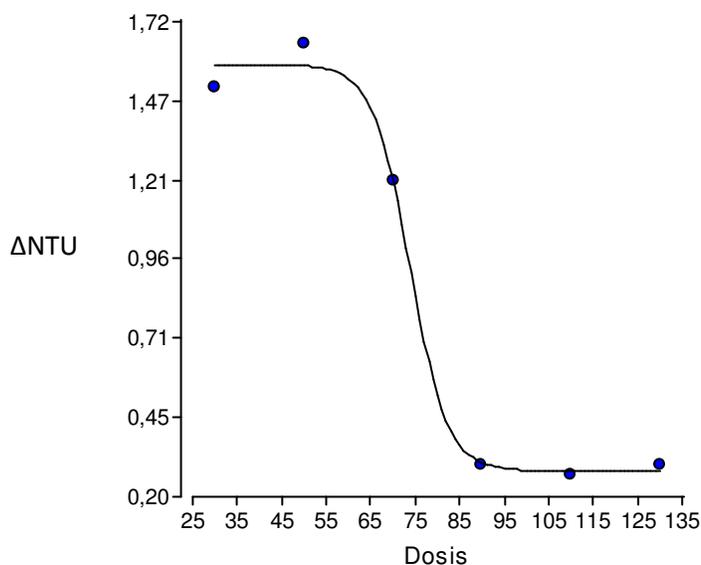


Figura 4. Dosis de bentonita necesaria para la estabilización proteica del vino Sauvignon blanc en relación a la variación de turbidez

4.2. Análisis de los tratamientos con manoproteínas, β -glucanasas y taninos

4.2.1. La utilización de tratamientos alternativos a la bentonita no producen la estabilización proteica de los vinos Sauvignon blanc

En esta primera parte del ensayo, se pudo corroborar mediante la prueba del calor, que aquellos vinos a los cuales se adicionaron manoproteínas, β -glucanasas y taninos resultaron inestables, mientras que los tratados con bentonita resultaron estables. El testigo también se comportó como inestable en la prueba de calor.

En la Figura 5 se presenta un Diseño de Parcelas Completamente al Azar con tres repeticiones con las medias de los tratamientos.

Estos resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas para el efecto de los tratamientos realizados al vino ($p < 0.0001$). La media del tratamiento con bentonita (B90) fue la menor de todas y difiere estadísticamente del resto de las medias de los tratamientos. Por el contrario la media del testigo (T) fue la más elevada y también difiere estadísticamente con las demás medias de los tratamientos.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con enzimas β - glucanasas (E) y taninos (TA), al igual que entre TA y manoproteínas (M)

Esto mostró que el único tratamiento eficaz para eliminar las proteínas que producen el enturbiamiento y dejar al vino estable, fue la bentonita. En base a la variación de turbidez presentada, se pudo afirmar que los demás tratamientos extrajeron una proporción de proteínas del vino en relación al testigo pero no lo suficiente como para lograr su completa estabilización.

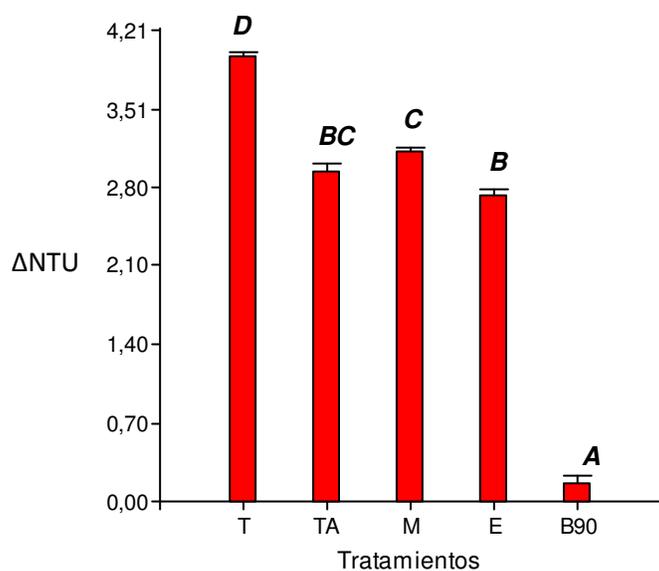


Figura 5. Promedios de Δ NTU según el tratamiento empleado. T: testigo, TA: tanino, M: manoproteínas, E: enzimas β -glucanasas. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (Test de Tukey; $p > 0,05$)

4.2.2. La combinación de tratamientos alternativos con bajas dosis de bentonita estabiliza el vino Sauvignon blanc

En base a los resultados obtenidos en la primera etapa del ensayo, donde se observó que el único tratamiento verdaderamente eficaz para evitar los enturbiamientos generados por proteínas era la bentonita, se realizó un segundo ensayo. Para ello se adicionaron dosis crecientes de bentonita de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 g/HL a los vinos previamente tratados con manoproteínas, β -glucanasas y taninos con el objetivo de lograr su completa estabilización.

La Figura 6 representa un Diseño de Parcelas Completamente al Azar con tres repeticiones en un arreglo factorial de 3x6. Puede observarse que para todos los tratamientos, con el agregado de dosis de bentonita de 40 g/HL (o superiores) se logró la estabilización proteica de vinos Sauvignon blanc.

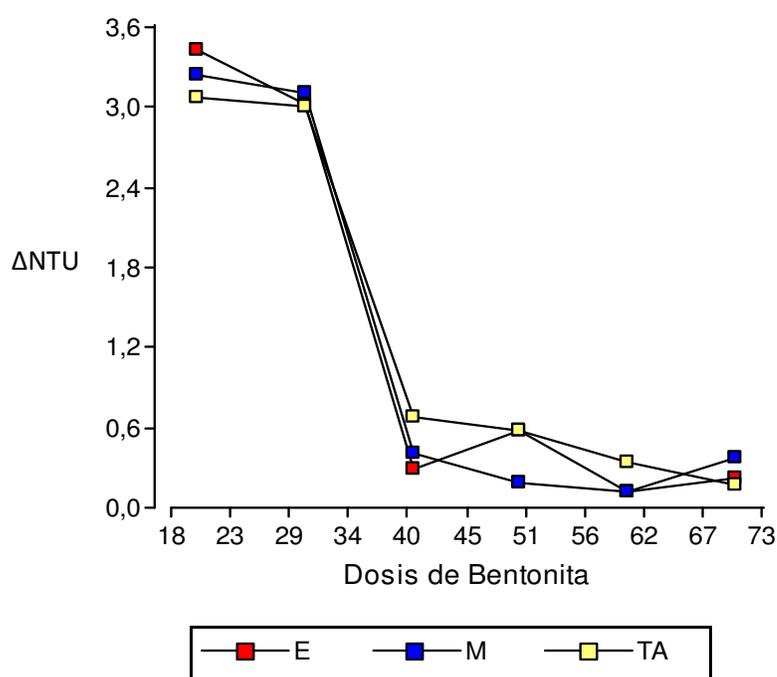


Figura 6. Dosis de bentonita necesaria para lograr la estabilización del vino Sauvignon blanc en combinación con los distintos tratamientos. E: enzimas β -glucanasas , M: manoproteínas, TA: tanino

4.3. Análisis del contenido de proteínas por SDS-PAGE

4.3.1. El tratamiento con bentonita elimina las proteínas del vino Sauvignon blanc

En la Figura 7 se muestran los perfiles de los pesos moleculares de las proteínas del vino tratado con bentonita y del vino testigo. No se observaron bandas correspondientes a las proteínas esperadas luego de la tinción con el Coomassie Blue en los vinos clarificados con bentonita. Se confirmó que este producto eliminó las proteínas que ocasionan la quebradura proteica, como se indicó primeramente con la prueba del calor.

En el vino testigo dializado, precipitado y sobrenadante se observaron bandas para aquellas proteínas de pesos moleculares bajos, entre 14,4 y 18,4 kDa. No se observaron bandas de pesos moleculares superiores a estos valores.

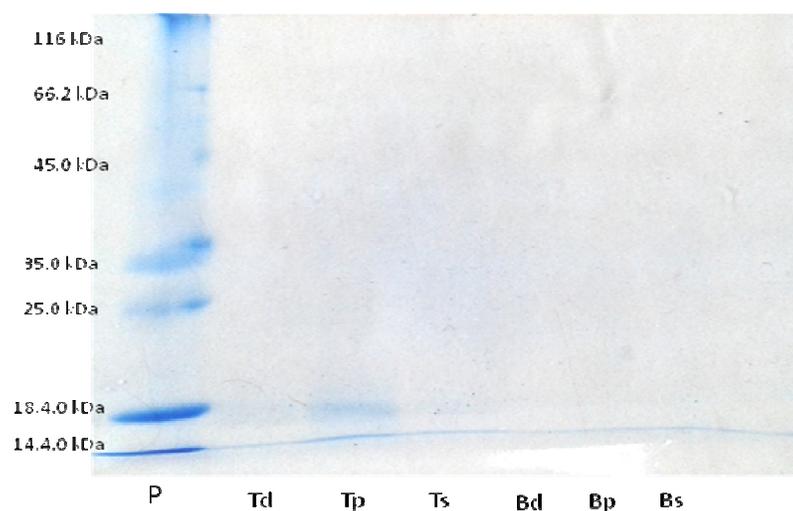


Figura 7. SDS PAGE de las proteínas del vino tratadas con bentonita. P: patrón; Td: testigo dializado; Tp: testigo precipitado; Ts: testigo sobrenadante; Bd: bentonita dializado; Bp: bentonita precipitado; Bs: bentonita sobrenadante

4.3.2. Las proteínas que producen inestabilidad son las de peso molecular bajo

En la Figura 8 se observaron bandas para proteínas de bajo peso molecular, aquellas que se encuentran en el rango de 14,4 a 18,4 kDa. Se confirmó lo expuesto para los vinos que fueron dializados y precipitados, no así para el sobrenadante que no presentó ningún tipo de proteínas. Además se corroboró que las proteínas de pesos moleculares superiores a este rango fueron eliminadas con estos tratamientos.

La eliminación de una parte de las proteínas presentes del vino con los tratamientos alternativos a la bentonita concuerda con los resultados encontrados mediante el test de calor.

En base al ancho de bandas se observó una mayor proporción de proteínas de bajo peso molecular a los vinos que se les indujo la formación de precipitado, siendo mayor para aquellos vinos tratados con taninos enológicos.

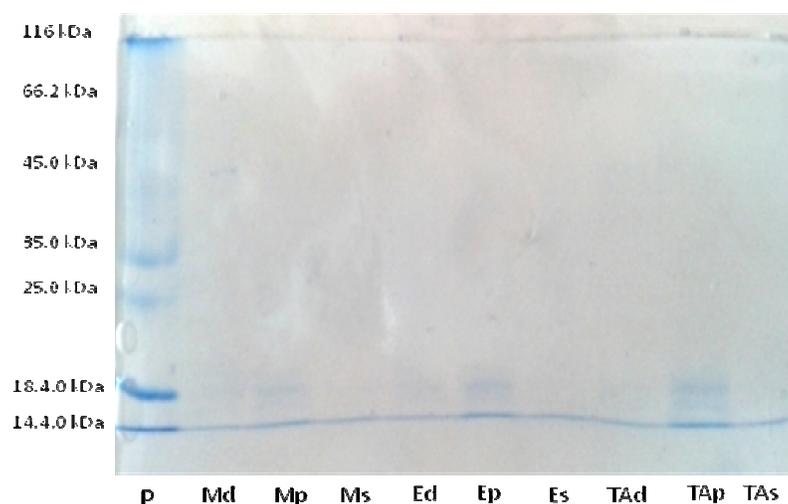


Figura 8. SDS PAGE de las proteínas del vino tratadas con manoproteínas, enzimas β -glucanasas y taninos. P: patrón; Md: manoprot. dializado; Mp: manoprot. precipitado; Ms: manoprot. sobrenadante; Ed: enzima dializado; Ep: enzima precipitado; Es: enzima sobrenadante; TAd: tanino dializado; TAp: tanino precipitado; TAs: tanino sobrenadante.

5. DISCUSIÓN

Se determinó que la bentonita elimina todas proteínas termolábiles causales de la inestabilidad proteica de los vinos Sauvignon blanc, coincidente con los trabajos realizados por Sauvage et al, 2010. Además se confirmó que estas proteínas se encuentran en el rango de peso molecular entre 13 y 30 kDa, de acuerdo a lo encontrado por Hsu y Heatherbell (1987b). También Wen-Fen Hung (2010) observó que los pesos moleculares de las proteínas encontradas por SDS-PAGE en Sauvignon blanc se encontraban entre 13 y 67 kDa.

Según Esteruelas (2009) las proteínas con peso molecular ente 18 y 26 kDa participan de la mayoría de los enturbiamientos proteicos, pero algunas proteínas de 14, 41, 53 y 69 kDa también se encuentran presentes. Esto coincide con lo observado en los geles en el vino precipitado de todos los tratamientos que fueron proteínas de bajo peso molecular. A partir de lo observado por Hsu y Heatherbell (1987b), estos pesos moleculares pueden deberse a glicoproteínas del vino.

Si bien entre los tratamientos con manoproteínas y enzimas β - glucanasas existe una diferencia estadísticamente significativa, resulta indistinto el uso de cualquiera de los dos al momento de establecer la estabilidad proteica, ya que ninguno deja al vino estable.

El hecho de haber hallado proteínas en las muestras dializadas y precipitadas, pero no en el sobrenadante del vino posterior al calentamiento, indicaría que las proteínas que ocasionan los enturbiamientos son termolábiles, lo que concuerda lo observado por Hsu y Heatherbell (1987a, 1987b) y Waters (2011).

Sobre la base de los resultados encontrados en relación a la combinación de tratamientos alternativos con bajas dosis de bentonita, se postula que si bien los tratamientos alternativos a la bentonita no impiden que los vinos presenten enturbiamientos proteicos, en combinación con bajas dosis de bentonita logran eliminar las proteínas que producen la inestabilidad. Esto también fue observado por Waters y otros (1993). La disminución

del uso de este clarificante ayudaría a respetar los aromas característicos del Sauvignon blanc ya que la bentonita es la que produce la eliminación de la mayoría de estos aromas (Waters, 2005).

La mayor proporción de proteínas encontradas en el vino tratado con taninos puede explicarse debido a que el complejo tanino-proteína soluble formado es netamente más sensible al calor y menos fácil de adsorber por la bentonita (Ribéreau Gayon, 2003). Sin embargo, se logró estabilizar con la misma dosis de bentonita de 40 g/HL, al igual que los demás tratamientos.

6. CONCLUSIONES

Pese a los conocidos inconvenientes de la utilización de bentonita, este tratamiento sigue siendo el más eficaz para la eliminación de proteínas causantes de los enturbiamientos.

El empleo de manoproteínas, enzimas β -glucanasas y taninos disminuye la proporción de proteínas presentes en el vino, pero no lo suficiente como para impedir la quebradura proteica. Por lo tanto no es posible reemplazar a la bentonita con estos productos.

Bajas dosis de bentonita en combinación con tratamientos alternativos estabilizan los vinos Sauvignon blanc. De esta manera podría preservarse los aromas característicos de la variedad para zonas de climas cálidos.

Los tiempos de procesamiento y la descarga de residuos al ambiente de la bentonita sigue siendo una gran preocupación, debido a los significativos costos asociados a la salud y seguridad laboral, como así también a las responsabilidades y obligaciones legales de la industria en materia de impacto ambiental. Por lo tanto la utilización de productos que ayuden a disminuir su uso puede llegar a ser una alternativa valiosa en la industria vitivinícola.

7. Bibliografía

BATISTA, L., MONTEIRO, S., LOUREIRO, V.B., TEIXEIRA, A.R. AND FERREIRA, R.B. (2009). The complexity of protein haze formation in wines. *Food Chemistry* 112: 169-177.

BATISTA, L., MONTEIRO, S., LOUREIRO, V.B., TEIXEIRA, A.R. AND FERREIRA, R.B. (2010). Protein haze formation in wines revisited. The stabilizing effect of organic acids. *Food Chemistry*, doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.076

BAYLY, F. C., & BERG, H. W. (1967). Grape and wine proteins of white wine varieties. *Am. Journal of Enology and Viticulture* 24: 18-32

BEZIER, A., LAMBERT, B. AND BAILLIEUL, F. (2002). Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 111-120.

BLADE, W.H.; BOULTON, R. (1988). Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 193–199.

CANALS, J.M., AROLA, L. AND ZAMORA, F. (1998). Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *American Journal of Enology and Viticulture* 49: 383-388.

DAWES, H., BOYES, S., KEENE, J. AND D., H. (1994). Protein instability of wines: influence of protein isoelectric point. *American Journal of Enology and Viticulture* 45: 319-326.

DERCKEL, J.P., LEGENDRE, L., AUDRAN, J.C., HAYE, B. AND LAMBERT, B. (1996) Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science* 119: 31-37.

DERCKEL, J. –P, AUDRAN, J.-C, HAYE, B, LAMBERT, B, LEGENDRE, L. (1998) Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and β -1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiology Plant* 104: 56-64

DORRESTEIN, E., FERREIRA, R.B., LAUREANO, O. AND TEIXEIRA, A.R. (1995) Electrophoretic and FPLC analysis of soluble proteins in four Portuguese wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46: 235-242.

DUNCAN, B. (1992) Varietal differences in white grape protein: Implications for bentonite fining. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 7: 189-193.

ENGEL, M.F.M. (2004) Detailed characterization of adsorption-induced protein unfolding. Tesis doctoral, Wageningen University, 123 p.

ESTERUELAS, M., POINSAUT, P., SIECZKOWSKI, N., MANTEAU, S., FORT, M.F., CANALS, J.M. AND ZAMORA, F. (2009a) Comparison of methods for estimating protein stability in white wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 60: 302-311.

ESTERUELAS M., POINSAUT P. , SIECZKOWSKI N., MANTEAU S., FORT M.F., CANALS J.M., ZAMORA F. (2009b) Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine. *Food Chemistry* 113: 28–35

ESTERUELAS M., KONTOUDAKIS, N., GIL, M., FORT, M. F., CANALS, J., M., ZAMORA, F. (2011) Phenolic compounds present in natural haze white wine. *Food Research International* 44; 77-83

FERREIRA, R. B., PIÇARRA-PEREIRA, M. A., TANGANHO, M.C., LOUREIRO, V. B., & TEXEIRA, A. R. (2000) Characterization of the proteins from grapes and wines by immunological methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 51: 22-28

FERREIRA, R.B.; PIÇARRA-PEREIRA, M.A.; MONTEIRO, S.; LOUREIRO, V.B.; TEIXEIRA, A.R. (2002) The wine proteins. *Trends Food Sci. Technol.* 12: 230–239.

FERREIRA, R.B., MONTEIRO, S., PIÇARRA-PEREIRA, M.A. AND TEIXEIRA, A.R. (2004) Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *Trends in Biotechnology* 22: 168-173.

FLANZY, C. (2000) *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV ediciones. Ediciones Mundi-Prensa; 1º edición, 783 p.

FUKUI M., YOKOTSUKA K.(2003) Content and origin of protein in white and red wines: changes during fermentation and maturation. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 178-188.

GIRBAU, T., STUMMER, B.E., POCOCK, K.F., BALDOCK, G.A., SCOTT, E.S. AND WATERS, E.J. (2004) The effect of *Uncinula necator* (powdery mildew) and *Botrytis cinerea* infection of grapes on the levels of haze-forming pathogenesis-related proteins in grape juice and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10: 125-133.

HØJ, P.B.; TATTERSALL, D.B.; ADAMS, K.; POCOCK, K.F.; HAYASAKA, Y., VAN HEESWIJCK, R.; WATERS, E. (2000) The ‘haze proteins’ of wine – a summary of properties, factors affecting their accumulation in grapes, and the amount of bentonite required for their removal from wine. *Proceedings of ASEV 50th Anniversary Meeting, Seattle, Washington, USA (American Society of Enology and Viticulture: Davis, California) pp. 149–154.*

HSU, J. C., & HEATHERBELL, D. A. (1987a). Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice, and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38:6-10.

HSU, J. C., & HEATHERBELL, D. A. (1987b). Heat unstable proteins in wine. I. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment. *American Journal of Enology and Viticulture* 38:11-16.

HUNG W. (2010). Protein stabilization of New Zealand Sauvignon blanc. Tesis doctoral en la Universidad de Lincoln, Nueva Zelanda, 153 p.

ISABELLE V. S. DUPIN, BRETT M. MCKINNON, COREY RYAN, MURYEL BOULAY, ANDREW J. MARKIDES, GRAHAM P. JONES, PATRICK J. WILLIAMS, AND ELIZABETH J. WATERS (2000) Saccharomyces cerevisiae Mannoproteins That Protect Wine from Protein Haze: Their Release during Fermentation and Lees Contact and a Proposal for Their Mechanism of Action. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3098-3105.

JACOBS, A.K., DRY, I.B. AND ROBINSON, S.P. (1999) Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology* 48: 325-336.

KOCH, J. AND SAJAK, E. (1959) A review and some studies on grape protein. *American Journal of Enology and Viticulture* 10: 114-123.

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

LEDOUX, V.; DULAU, L.; DUBORDIEU, D. (1992) Interprétation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'évelage sur lies. (An explanation for the improvement of protein stability of wine during aging lees). *J. Inter. Sci. Vigne Vin.* 26: 239-251.

LESKE, P.A.; BRUER, N.G.C.; CAPDEBOSCQ, V. (1995) An evaluation of some characteristic of commercial bentonites. *Aust. New Zealand Wine Ind. J.* 10:73-77.

LUGUERA, C., MORENO-ARRIBAS, V., PUEYO, E. AND POLO, M.C. (1997) Capillary electrophoretic analysis of wine proteins. Modifications during the manufacture of sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3766-3770.

MANTEAU, S., LAMBERT, B., JEANDET, P. AND LEGENDRE, L. (2003) Changes in chitinase and thaumatin-like pathogenesis-related proteins of grape berries during the Champagne winemaking process. *American Journal of Enology and Viticulture* 54:267-272.

MARCHAL, R., BOUQUELET, S. AND MAUJEAN, A. (1996) Purification and partial biochemical characterization of glycoproteins in a Champenois Chardonnay wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1716-1722.

MARCHAL, R., BERTHIER, L., LEGENDRE, L., MARCHAL-DELAHAUT, L., JEANDET, P. AND MAUJEAN, A. (1998) Effects of *Botrytis cinerea* infection on the must protein electrophoretic characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4945-4949.

MARTIN, R., CAI Y., SPENCER C. M., LILLEY T. H., HASLAM E. (1990), *Bull. du Groupe Polyphenols*.

MARTIN, A.H. (2003) Mechanical and conformational aspects of protein layers on waters. Tesis doctoral, Wageningen University, 132 p.

MARTINEZ-RODRIGUEZ, A.J.; POLO, M.C. (2003) Effect of the addition of bentonite to the triage solution on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chem.* 81: 383-388.

MESQUITA, P.R., PIÇARRA-PEREIRA, M.A., MONTEIRO, S., LOUREIRO, V.B., TEIXEIRA, A.R. AND FERREIRA, R.B. (2001) Effect of wine composition on protein stability. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 324-330.

MILLER, G.C.; AMON, J.M.; GIBSON, R.L.; SIMPSON, R.F. (1985) Loss of wine aroma attribute to protein stabilization with bentonite or ultrafiltration. *Aust. Grapegrower Winemaker* 256: 46, 49-50.

MOINE-LEDOUX, V. AND DUBOURDIEU, D. (1999) An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 537-543.

MONTEIRO, S., PIÇARRA-PEREIRA, M.A., TEIXEIRA, A.R., LOUREIRO, V.B. AND FERREIRA, R.B. (2003a) Environmental conditions during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4046-4053.

MONTEIRO, S., BARAKAT, M., PIÇARRA-PEREIRA, M.A., TEIXEIRA, A.R. AND FERREIRA, R.B. (2003b) Osmotin and thaumatin from grape: A putative general defence mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology* 93: 1505-1512.

MORENO-ARRIBAS, M. V, POLO, M. C., PUEYRO, E. (2002) Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines. *Analytica Chimica Acta*, 458: 63-75

MURPHEY, J.M., SPAYD, S.E. AND POWERS, J.R. (1989) Effect of grape maturation on soluble protein characteristics of Gewurztraminer and White Riesling juice and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 40: 199-207.

NÚÑEZ, Y.P., CARRASCOSA, A.V., GONZÁLEZ, R., POLO, M.C. AND

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. (2006) Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:7898-7903.

PAETZOLD, M., DULAU, L.; DUBOURDIEU, D. (1990). Fractionnement et caractérisation des glycoprotéines dans les moûts de raisins blanc. *J. Int. Sci. Vigne et Vin* 24: 13-18.

PENG, Z., POCOCK, K.F., WATERS, E.J., FRANCIS, I.L. AND WILLIAMS, P.J. (1997) Taste properties of grape (*Vitis vinifera*) pathogenesis-related proteins isolated from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4639-4643.

POCOCK, K.F. AND RANKINE, B.C. (1973) Heat test for detecting protein instability in wine. *Australian Wine, Brewing and Spirit Review* 91: 42-43.

POCOCK, K.F., HAYASAKA, Y., PENG, Z., WILLIAMS, P.J. AND WATERS, E.J. (1998) The effect of mechanical harvesting and long-distance transport on the concentration of haze-forming proteins in grape juice. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 23-29.

POCOCK, K.F., YOJI HAYASAKA, MICHAEL G. MCCARTHY, AND ELIZABETH J. WATERS (2000) Thaumatin-like Proteins and Chitinases, the Haze-Forming Proteins of Wine, accumulate during Ripening of Grape (*Vitis vinifera*) Berries and Drought Stress Does Not Affect the Final Levels per Berry at Maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1637-1643.

POCOCK, K.F.; HØJ, P.B.; ADAMS, K.S.; KWIATKOWSKI, M.J.; WATERS, E.J. (2003) Combined heat and proteolytic enzyme treatment of white wines reduce haze forming protein content without detrimental effect. *Aust. J. Grape Wine Res.* 9: 56–63.

POCOCK, K. F., & WATERS, E. J. (2006). Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12: 212-220.

POCOCK, K. F., ALEXANDER, G. M. HAYASAKA, Y. JONES, P. R. & WATERS, E. J. (2007). Sulfate-a candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1799-1807.

PUEYO, E., DIZY, M. AND POLO, M.C. (1993) Varietal differentiation of must and wine by means of protein fraction. *American Journal of Enology and Viticulture* 44: 255-260.

REZWAN K. (2005) Protein treated aqueous colloidal oxide particle suspensions: driving forces for protein adsorption and conformational changes. Tesis doctoral, Swiss Federal Institute of Technology, 122 p.

RIBÉREAU-GAYON P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. (2003) Tratado de enología: química del vino estabilización y tratamientos. v 2, Ediciones Mundi-prensa, 537 p.

ROBERT, N., ROCHE, K., LEBEAU, Y., BREDÁ, C., BOULAY, M., ESNAULT, R. AND BUFFARD, D. (2002) Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Science* 162.

SALAZAR GONZALEZ, F. N. (2007). White wine continuous protein stabilization. Industrial viability. Tesis doctoral, Universitat of Rovira I Virgili. Taragona, España, 100 p.

SANTORO, M. (1995) Fractionation and characterization of must and wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture* 46: 250-254.

SARMENTO, M.R., OLIVEIRA, J.C., SLATNER, M. AND BOULTON, R.B. (2000a) Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability tests. *Food Control* 11: 423-432.

SIEBERT, K.J., CARRASCO, A. AND LYNN, P.Y. (1996b) Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1997-2005.

SIEBERT, K. J. (1999). Protein-polyphenol haze in beverages. *Food Technology* 53: 54-57.

SOMERS, T.C. AND ZIEMELIS, G. (1973) The use of gel column analysis in evaluation of bentonite fining procedures. *American Journal of Enology and Viticulture* 24: 51-55.

TATTERSALL, D.B., VAN HEESWIJCK, R. AND HØJ, P.B. (1997) Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiology* 114: 759-769.

VANRELL, G.; CANALS, R.; ESTERUELAS, M.; FORT, F.; CANALS, J.M.; ZAMORA, F. (2007) Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (cava). *Food Chem.* 104: 148-155.

VINCENZI, S., MOSCONI, S., ZOCCATELLI, G., PELLEGRINA, C.D., VENERI, G., CHIGNOLA, R., PERUFFO, A., CURIONI, A. AND RIZZI, C. (2005a) Development of a new procedure for protein recovery and quantification in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 56: 182-187.

VINCENZI, S., POLESANI, M. AND CURIONI, A. (2005b) Removal of specific

protein components by chitin enhances protein stability in a white wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 56: 246-254.

WATERS, E. J. SHIRLEY, N. J., & WILLIAMS, P. J. (1991). Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture* 42: 123-127.

WATERS, E.J.; WALLACE, W.; WILLIAMS, P.J. (1992) Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1514–1519.

WATERS, E.J., PELLERIN, P. AND BRILLOUET, J.-M. (1994b) A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydrate Polymers* 23: 185-191.

WATERS, E. J.; PENG Z.; POCOCK, K. F. & WILLIAMS, P. J. (1995a). Proteins in white wine. I. Procyanidin occurrence in soluble proteins and insoluble protein haze and its relationship to protein instability. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1: 86-93.

WATERS, E.J., PENG, Z., K.F., P. AND WILLIAMS, P.J. (1995b) Proteins in white wine, II: Their resistance to proteolysis is not due to either phenolic association or glycosylation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 94-99.

WATERS, E. J. SHIRLEY, N. J., & WILLIAMS, P. J. (1996). Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis related proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 3-5.

WATERS, E. J.; HAYASAKA, Y.; TATTERSHALL, D. B.; ADAMS, K. S.; & WILLIAMS, P. J. (1998). Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4950-4957

WATERS, E.J., ALEXANDER, G., MUHLACK, R., POCOCK, K.F., COLBY, C., O'NEILL, B.K., HØJ, P.B. AND JONES, P. (2005) Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11: 215-225.

WATERS, E. J., FALCONER, R. J., MARANGON M., VAN SLUYTER, S., NEILSON, K., A., CHAN C.(2010) Thermal Stability of Thaumatin- Like Protein, Chitinase, and Invertase Isolated from Sauvignon blanc and Semillos Juice and Their Role in Haze Formation in Wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58: 975-980

WATERS, E. J., FALCONER, R. J., MARANGON M., VAN SLUYTER, S., NEILSON, K., A., CHAN C. (2011) Roles of Grape Thaumatin like Protein and Chitinase in White Wine Haze Formation. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 59: 733-740

YOKOTSUKA, K., NOZAKI, K. AND KUSHIDA, T. (1983) Turbidity formation caused by interaction of must proteins with wine tannins *Journal of Fermentation Technology* 61: 413-416.

YOKOTSUKA, K., EBIHARA, T. AND SATO, T. (1991) Comparison of soluble proteins in juice and wine from Koshu grapes. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71: 248-253.

YOKOTSUKA, K. AND SINGLETON, V.L. (1995) Interactive precipitation between phenolic fractions and peptides in wine-like model solutions: turbidity, particle size, and residual content as influenced by pH, temperature and peptide concentration. *American Journal of Enology and Viticulture* 46: 329-338.

YOKOTSUKA, K., FUKUI, M., OKUDA, T. AND HISAMOTO, M. (2007) Changes in proteins during storage of wines produced from 1993 to 2003. *Journal of ASEV Japan* 18: 3-14.

ANEXO

8.1. Relación de la variación de turbidez con diferentes dosis de Bentonita

8.1.1. Tabla de datos y modelo ajustado:

Dosis	Δ NTU	Modelo
30	1,51	1,58
50	1,65	1,58
70	1,21	1,21
90	0,30	0,30
110	0,27	0,29
130	0,30	0,29

Tabla 1. Ensayo de diferentes dosis de bentonita aplicadas al vino

8.1.2. Procesamiento con Regresión No Lineal en Infostat.

Análisis de regresión no lineal

Modelo VT $\alpha / (1 + \beta \cdot \exp(-\gamma \cdot \text{Dosis})) + \delta$

Variable	N	CMError	Sigma	AIC	BIC	Iteración
VNT	6	0,01	0,07	-11,07	-12,11	2

Parámetros	Cota inf.	Cota sup.	Val.Ini.	Estimación	E.E.	T	p-valor
ALFA	-1E30	1E30	1,30	1,29	0,08	15,30	0,0042
BETA	-1E30	1E30	2,0E-08	3,1E-10	1,1E-073,0E-03	0,9979	
GAMMA	-1E30	1E30	-0,24	-0,30	0,01	-54,58	0,0003
DELTA	-1E30	1E30	0,28	0,29	0,04	6,88	0,0205

Matriz de correlación de las estimaciones

	ALFA	BETA	GAMMA	DELTA
ALFA	1,00	0,62	0,22	-0,50
BETA	0,62	1,00	0,59	-0,01
GAMA	0,22	0,59	1,00	-0,15
DELTA	-0,50	-0,01	-0,15	1,00

8.2. Ensayos de los distintos tratamientos con variable respuesta dado por la variación de turbidez

8.2.1. Tabla de Datos

<i>Tratamientos</i>	<i>Repeticiones</i>	<i>ΔNTU</i>
T	1	4,03
T	2	3,98
T	3	3,94
TA	1	3,07
TA	2	2,92
TA	3	2,83
M	1	3,19
M	2	3,03
M	3	3,14
E	1	2,83
E	2	2,67
E	3	2,69
B90	1	0,29
B90	2	0,15
B90	3	0,03

Tabla 2. Diseño de Parcelas al Azar (k=5 y r=3)

8.2.2- Análisis exploratorio de datos

Medidas resumen

Trat	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
B90	VNT	3	0,16	0,13	83,06	0,03	0,29
E	VNT	3	2,73	0,09	3,19	2,67	2,83
M	VNT	3	3,12	0,08	2,62	3,03	3,19
T	VNT	3	3,98	0,05	1,13	3,94	4,03
TA	VNT	3	2,94	0,12	4,12	2,83	3,07

8.3- Diseño de Parcelas Completamente al Azar con tres repeticiones

Hipótesis: Existe un efecto en la variación de turbidez del vino según el tratamiento que se emplea

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VNT	15	1,00	0,99	3,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	24,86	4	6,21	647,75	<0,0001
Trat	24,86	4	6,21	647,75	<0,0001
Error	0,10	10	0,01		
Total	24,95	14			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,26320

Error: 0,0096 gl: 10

Trat	Medias	n	E.E.			
B90	0,16	3	0,06	A		
E	2,73	3	0,06		B	
TA	2,94	3	0,06		B	C
M	3,12	3	0,06			C
T	3,98	3	0,06			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

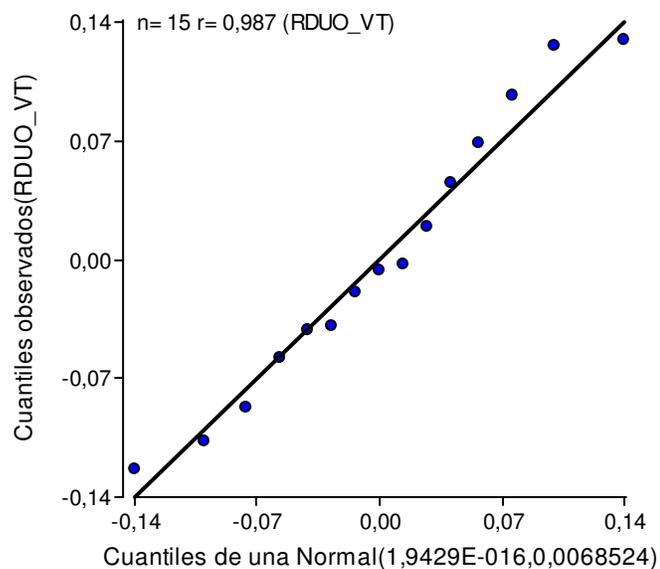


Figura 1. QQ-plot de los residuos del modelo.

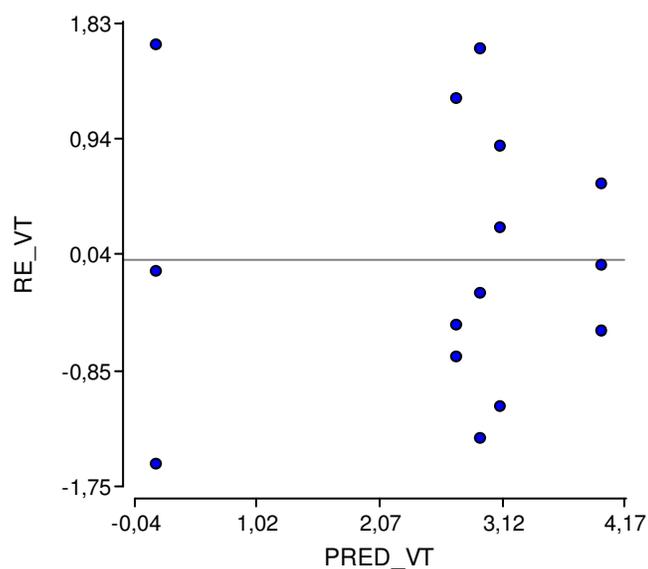


Figura 2. Residuos Estudentizados según predichos de ΔNTU

8.4. Análisis Factorial 3x6 en una estructura de Parcelas Completamente al Azar con 3 repeticiones

8.4.1. Tabla de Datos

<i>A</i>	<i>B</i>	<i>REP</i>	<i>ΔNTU</i>
TA	20	1	3,12
TA	20	2	3,07
TA	20	3	3,02
TA	30	1	3,08
TA	30	2	2,99
TA	30	3	2,97
TA	40	1	0,60
TA	40	2	0,63
TA	40	3	0,79
TA	50	1	0,51
TA	50	2	0,64
TA	50	3	0,57
TA	60	1	0,37
TA	60	2	0,33
TA	60	3	0,31
TA	70	1	0,14
TA	70	2	0,20
TA	70	3	0,18
M	20	1	3,23
M	20	2	3,20

M	20	3	3,30
M	30	1	3,14
M	30	2	3,12
M	30	3	3,08
M	40	1	0,31
M	40	2	0,53
M	40	3	0,39
M	50	1	0,25
M	50	2	0,21
M	50	3	0,11
M	60	1	0,21
M	60	2	0,14
M	60	3	0,00
M	70	1	0,44
M	70	2	0,27
M	70	3	0,43
E	20	1	3,52
E	20	2	3,33
E	20	3	3,45
E	30	1	2,96
E	30	2	2,96
E	30	3	3,13
E	40	1	0,26
E	40	2	0,31
E	40	3	0,31
E	50	1	0,18
E	50	2	0,24
E	50	3	1,32
E	60	1	0,14
E	60	2	0,13
E	60	3	0,09
E	70	1	0,14
E	70	2	0,20
E	70	3	0,33

8.4.2. Análisis exploratorio de datos

Medidas resumen

A	B	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
E	20	VNT	3	3,43	0,10	2,80	3,33	3,52
E	30	VNT	3	3,02	0,10	3,25	2,96	3,13
E	40	VNT	3	0,29	0,03	9,84	0,26	0,31
E	50	VNT	3	0,58	0,64	110,61	0,18	1,32
E	60	VNT	3	0,12	0,03	22,05	0,09	0,14
E	70	VNT	3	0,22	0,10	43,49	0,14	0,33
M	20	VNT	3	3,24	0,05	1,58	3,20	3,30
M	30	VNT	3	3,11	0,03	0,98	3,08	3,14
M	40	VNT	3	0,41	0,11	27,16	0,31	0,53
M	50	VNT	3	0,19	0,07	37,95	0,11	0,25
M	60	VNT	3	0,12	0,11	91,65	0,00	0,21
M	70	VNT	3	0,38	0,10	25,10	0,27	0,44
TA	20	VNT	3	3,07	0,05	1,63	3,02	3,12
TA	30	VNT	3	3,01	0,06	1,94	2,97	3,08
TA	40	VNT	3	0,67	0,10	15,17	0,60	0,79
TA	50	VNT	3	0,57	0,07	11,35	0,51	0,64
TA	60	VNT	3	0,34	0,03	9,07	0,31	0,37
TA	70	VNT	3	0,17	0,03	17,63	0,14	0,20

8.5. Diseño de Parcelas Completamente al Azar con tres repeticiones en un arreglo factorial de 3x6

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VNT	54	0,99	0,98	13,14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	96,28	17	5,66	201,63	<0,0001
A	0,04	2	0,02	0,67	0,5191
B	95,37	5	19,07	679,05	<0,0001
A*B	0,87	10	0,09	3,10	0,0060
Error	1,01	36	0,03		
Total	97,29	53			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13655

Error: 0,0281 gl: 36

A	Medias	n	E.E.	
M	1,24	18	0,04	A
E	1,28	18	0,04	A
TA	1,31	18	0,04	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,23770

Error: 0,0281 gl: 36

B	Medias	n	E.E.		
60	0,19	9	0,06	A	
70	0,26	9	0,06	A	B
50	0,45	9	0,06		B
40	0,46	9	0,06		B
30	3,05	9	0,06		C
20	3,25	9	0,06		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,51321**

Error: 0,0281 gl: 36

A	B	Medias	n	E.E.		
M	60	0,12	3	0,10	A	
E	60	0,12	3	0,10	A	
TA	70	0,17	3	0,10	A	B
M	50	0,19	3	0,10	A	B
E	70	0,22	3	0,10	A	B
E	40	0,29	3	0,10	A	B
TA	60	0,34	3	0,10	A	B
M	70	0,38	3	0,10	A	B
M	40	0,41	3	0,10	A	B
TA	50	0,57	3	0,10	A	B
E	50	0,58	3	0,10	A	B
TA	40	0,67	3	0,10		B
TA	30	3,01	3	0,10		C
E	30	3,02	3	0,10		C
TA	20	3,07	3	0,10		C
M	30	3,11	3	0,10		C
M	20	3,24	3	0,10		C
E	20	3,43	3	0,10		C

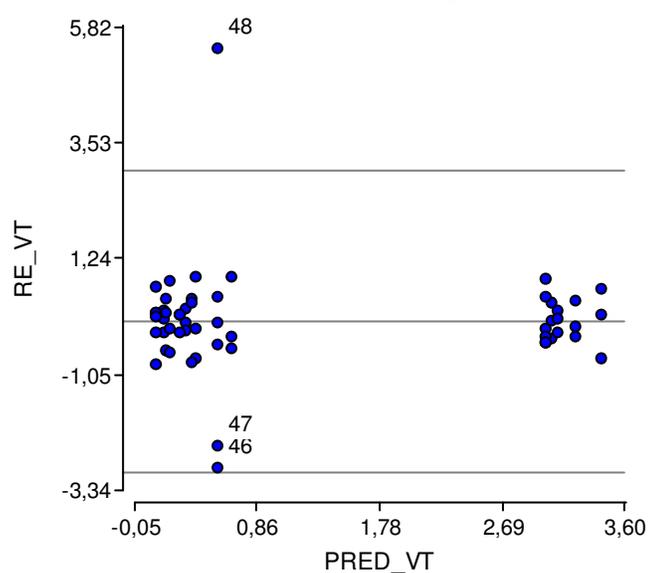
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 3. Residuos Estudentizados según predichos de ANTU

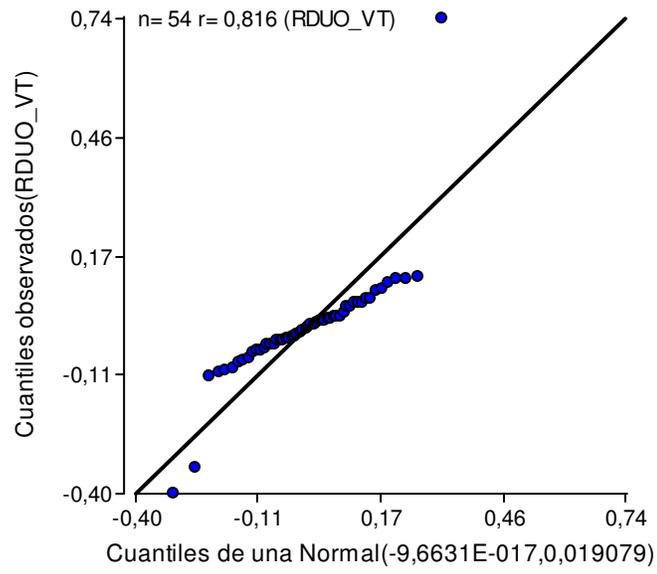


Figura 4. QQ-plot de los residuos del modelo.