



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Estudio sobre las características de la formación de turbidez proteica en vinos y nuevas alternativas para su estabilización.

Autor/es

ELBA BONILLA EGUIZABAL

Director/es

MARTA M<sup>a</sup> INÉS DIZY SOTO

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

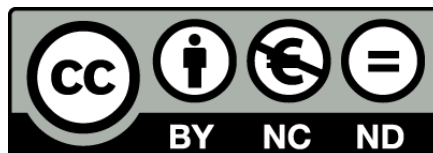
Grado en Enología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2020-21



***Estudio sobre las características de la formación de turbidez proteica en vinos y nuevas alternativas para su estabilización., de ELBA BONILLA EGUIZABAL***

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Facultad de Ciencia y Tecnología

## TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Enología

Estudio sobre las características de la formación de turbidez proteica en vinos y nuevas alternativas para su estabilización.

Realizado por:

Elba Bonilla Eguizábal

Tutelado por:

Marta M<sup>a</sup> Inés Dizy Soto

**Logroño, julio, 2021**

## RESUMEN

Los vinos contienen cantidades variables de sustancias nitrogenadas, siendo las proteínas las más relevantes a pesar de estar presentes en una baja concentración. La importancia de las proteínas en el vino radica en su capacidad para producir turbidez, generalmente una vez ha sido el vino embotellado, produciendo una depreciación del producto por parte del consumidor .

Durante muchos años la generación de turbidez proteica solo se relacionaba con la cantidad de proteínas y a pesar de que es dependiente de estas, existen una serie de factores no proteicos que influyen significativamente en la generación de este tipo de turbidez. Además, son muchas las investigaciones que tratan de encontrar una alternativa eficaz a la bentonita, ya que, a pesar de ser el tratamiento más común para evitar la generación de la turbidez proteica, presenta una serie de desventajas relacionadas con la cantidad de sedimento que genera y las pérdidas económicas que esto conlleva.

Para llevar a cabo la investigación, se ha realizado una revisión sistemática de artículos científicos consultando las bases de datos Elsevier, GoogleAcademy, Pumbed y Scopus, teniendo en cuenta el año de publicación y el número de citas. Siendo seleccionados 34 artículos.

Se ha observado que la turbidez proteica presente en los vinos todavía no ha sido descrita claramente y que existen factores que actualmente se desconocen, pero son relevantes para la formación de turbidez, además se han encontrado numerosas alternativas eficaces a la bentonita, aunque la bentonita sigue siendo la técnica más utilizada actualmente.

### PALABRAS CLAVE:

Proteínas, Turbidez, Inestabilidad proteica, Bentonita.

## ABSTRACT

Wine contains variable amounts of nitrogenous substances, with proteins being the most relevant despite being present in low concentration. The importance of proteins in wine lies in their capacity to produce turbidity, generally once the wine has been bottled, producing a depreciation of the product by the consumer.

For many years, the generation of protein turbidity was only related to the amount of proteins and although it is dependent on these, there are a series of non-protein factors that significantly influence the generation of this type of turbidity. In addition, there are many investigations that try to find an effective alternative to bentonite, since, in spite of being the most common treatment to avoid the generation of protein turbidity, it presents a series of disadvantages related to the amount of sediment that it generates and the economic losses that this entails.

In order to carry out the research, a systematic review of scientific articles was carried out by consulting the Elsevier, GoogleAcademy, Pumbed and Scopus databases, taking into account the year of publication and the number of citations. Thirty-four articles were selected.

It has been observed that the protein turbidity present in wines have not yet been clearly described and there are factors that are currently unknown, but are relevant to the formation of turbidity. Besides many effective alternatives to bentonite have been found, although bentonite still the most widely used technique at present.

## KEY WORDS:

Proteins, Turbidity, Protein instability, Bentonite.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
2.1. DISEÑO.....	7
2.2. ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA.....	7
2.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXTRACCIÓN DE DATOS.....	7
2.4. ANÁLISIS DE DATOS.....	7
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
3.1. PROTEÍNAS DEL VINO.....	8
3.2. ORIGEN DE LAS PROTEÍNAS DEL VINO.....	10
3.2.1. Uva.....	10
3.2.2. Levaduras.....	11
3.4. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	13
3.5. PRUEBAS PARA LA PREDICCIÓN DE LA ESTABILIDAD PROTEICA.....	15
3.5.1. Prueba de estabilidad por calor.....	15
3.5.2. Prueba TCA.....	16
3.5.3. Prueba de etanol.....	17
3.5.4. Bentotest.....	17
3.5.5. Prueba con taninos.....	17
3.5.6. Electroneutralización.....	17
3.5.7. Infrarrojo.....	18
3.5.8. Método inmunológico de inmunopresión.....	18
3.6. FACTORES NO PROTEICOS INFLUYENTES EN LA INESTABILIDAD.....	19
3.6.1. pH.....	19
3.6.2. Compuestos fenólicos.....	20
3.6.3. Sulfuroso.....	20
3.7. CLARIFICACIÓN CON BENTONITA.....	21
3.8. ALTERNATIVAS A LA BENTONITA.....	24
3.8.1. Ácidos orgánicos.....	24
3.8.2. Enzimas proteolíticas.....	24
3.8.3. Manoproteínas.....	25
3.8.4. Alta presión hidrostática.....	26

3.8.5.	Nanotecnología.....	26
3.8.6.	Quitosano .....	28
3.8.7.	Semillas de uva.....	28
4.	CONCLUSIONES.....	30
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	31
6.	ANEXO I.....	32

## 1. INTRODUCCIÓN

La turbidez causada por proteínas insolubles en vinos blancos, embotellados en condiciones normales de almacenamiento, ha sido y sigue siendo actualmente un problema para los enólogos, ya que la limpidez en este tipo de vinos es requerida por el consumidor, en la Figura 1 se muestra esa falta de limpidez, a la izquierda se observa un vino con turbidez proteica y a la derecha un vino clarificado y estabilizado.



**Figura 1.** Ejemplo de enturbiamiento proteico en vino blanco. Tomado de *White wine continuous protein stabilization*. por Salazar Gonzalez F. N. (2007).

El proceso de enturbiamiento proteico se produce por la desnaturalización, agregación 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).

Estas proteínas formadoras de turbidez son principalmente proteínas relacionadas con la patogénesis de la uva y son muy estables durante el proceso de vinificación, pero algunas de ellas pueden precipitar con el paso del tiempo y con unas condiciones favorables como el aumento de temperatura, la presencia de taninos...etc.

Actualmente la práctica más extendida para la estabilización de las proteínas consiste en la adición de un clarificante, generalmente se emplea bentonita que es un clarificante mineral que procede de la descomposición de cenizas volcánicas.



La importancia de este estudio se debe a que la precipitación de proteínas insolubles produce consecuencias considerables, en primer lugar, la utilización de bentonita para la estabilización genera cuantiosas pérdidas económicas a nivel global llegando a los mil millones de dólares anuales (Majewski *et al.*, 2011), otro inconveniente de la utilización de bentonita es que no es realmente específica, de manera que con la eliminación de proteínas también se produce la eliminación de otros compuestos beneficiosos y compuestos aromáticos, reduciendo por tanto la calidad del vino (Esteruelas *et al.*, 2009; Jaeckels *et al.*, 2017; Lambri, *et al.* 2013).

Además, esta preocupación por la inestabilidad de las proteínas se va a ver incrementada en los últimos años con la presencia del cambio climático, ya que el aumento de las temperaturas y disminución de las precipitaciones potencia el riesgo de inestabilización de las proteínas presentes en el vino (Pasquier *et al.* 2021).

La estabilización proteica ha sido un tema de gran interés para numerosos investigadores, el mecanismo de formación de turbidez (Van Sluyter *et al.*, 2015), así como la identificación de las proteínas que intervienen en ella ha sido durante décadas objeto de estudio, además durante los últimos años también se han desarrollado estudios para encontrar una alternativa eficaz a la bentonita (Batista *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2014; Colangelo, *et al.*, 2018; Dumitriu, *et al.*, 2018), por los problemas que genera comentados anteriormente, al igual que estudios que evidencian la presencia de factores no proteicos que influyen de manera considerable en la formación de turbidez proteica y que hasta ahora no habían sido tenidos en cuenta (Ferreira *et al.* 2002; Batista *et al.*, 2010; Tabilo-Munizaga *et al.*, 2014).

De manera que mediante esta revisión bibliográfica se ha recogido información sobre la turbidez proteica de los vinos blancos, todos los factores influyentes en su aparición, los métodos existentes para la cuantificación de proteínas y determinación de la dosis de bentonita, así como nuevas alternativas a la bentonita.

El objetivo de esta investigación es, por tanto, analizar aquellos factores influyentes en la formación de turbidez proteica de vinos, así como nuevas tecnologías que permiten una mejora de la estabilidad proteica.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.DISEÑO

Para el desarrollo de este trabajo se ha realizado una revisión sistemática de artículos y documentos científicos relacionados con las proteínas en los vinos. También se han consultado libros para establecer un concepto general del tema a tratar.

### 2.2. ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA

Las bases de datos utilizadas para la realización de la búsqueda han sido: Elsevier, GoogleAcademy, Pumbed y Scopus. Las palabras clave utilizadas para la búsqueda han sido: “wine protein”, “wine haze”, “protein instability”, “bentonite”, “proteins stability”, “wine turbidity”.

### 2.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXTRACCIÓN DE DATOS

Tras la primera búsqueda el número de artículos relacionados con el tema fue de 87, se realizó una selección en función del año de publicación, y la disponibilidad del texto completo. Para proceder a la selección también se revisaron los abstracts y en caso necesario los artículos completos con el fin de decidir si la información que contenían estaba o no relacionada con el tema a desarrollar. Además, se tuvo en cuenta el número de citas que presentaba cada uno de los artículos extraídos.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriores, el número de artículos total que han sido utilizados para la realización de esta revisión bibliográfica son 34.

### 2.4. ANÁLISIS DE DATOS

De los artículos se extrajo información sobre los autores, el año de publicación, la fuente, el número de citas, la finalidad y resultados, y se elaboró una tabla (Anexo I) de los artículos más importantes, la cual facilitó tanto el desarrollo del trabajo, como las búsquedas para referenciarlos y la obtención de una idea generalizada sobre el tema.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. PROTEÍNAS DEL VINO

Las proteínas son biomoléculas formadas principalmente por carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, además algunas de ellas también están compuestas por azufre, fósforo, cobre, hierro y zinc.

Existen dos principales tipos de proteínas atendiendo a su composición. Las proteínas simples u holoproteínas que son aquellas que están compuestas exclusivamente por aminoácidos, y las proteínas conjugadas o heteroproteínas que son aquellas compuestas por aminoácidos y otras sustancias de naturaleza no proteica como lípidos (lipoproteínas), glúcidos (glicoproteínas), o grupos fosfato (fosfatoproteínas). Siendo las glicoproteínas las principales proteínas termolábiles presentes en los vinos.

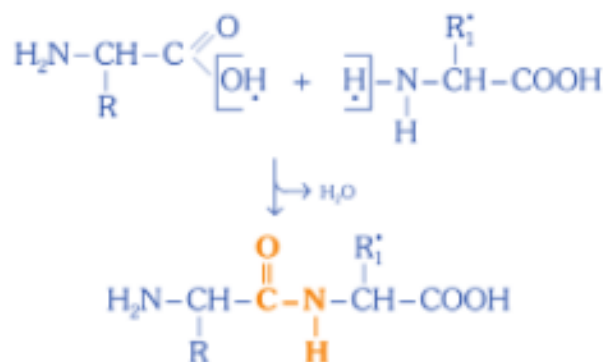
Se ha probado la existencia de una correlación directa entre la tendencia a la formación de turbidez y la concentración de proteínas y glicoproteínas, presentando ambos perfiles electroforéticos casi superponibles (Fusi *et al.* 2010).

Atendiendo a su estructura tridimensional las proteínas también se pueden clasificar en dos grupos: proteínas fibrosas cuya función principal es estructural y son insolubles en agua, y las proteínas globulares las cuales tienen funciones de naturaleza dinámica (de transporte, catalíticas...).

Las proteínas son consideradas polímeros lineales de  $\alpha$ -L-aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Los péptidos son los compuestos formados por la unión de varios aminoácidos mediante el enlace peptídico, y por tanto en función del número de aminoácidos, los péptidos se pueden clasificar en:

- Oligopéptidos: número de aminoácidos implicados es menor que 10.
- Polipéptidos: número de aminoácidos implicados es mayor que 10.
- Proteína: número de aminoácidos implicados es grande (entre 100 y 300), con pesos moleculares mayores a 10 kDa.

Los enlaces peptídicos son enlaces covalentes de tipo amida estables, que surgen de la condensación del grupo  $\alpha$ -carboxilo de un aminoácido y el  $\alpha$ -amino de otro aminoácido (Figura 2).



**Figura 2.** Formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos. Tomado de *Fundamentos de bioquímica estructural* (p. 92), por J.M.Teijón, 2006, Editorial Tébar.

En cuanto a la estructura de las proteínas, estas presentan un elevado peso molecular que les confiere una estructura química compleja, han sido definidos cuatro niveles de organización de las proteínas: estructura primaria, estructura secundaria, estructura terciaria y estructura cuaternaria.

La estructura primaria es la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica, la estructura secundaria corresponde con plegamientos de la cadena polipeptídica sobre si misma a lo largo de un eje, pudiendo formar el denominado hélice  $\alpha$  o conformación  $\beta$ . La estructura terciaria hace referencia al modo que tiene una cadena polipeptídica de plegarse para formar un arrollamiento globular compacto. La estructura cuaternaria corresponde con la disposición tridimensional de las diferentes unidades polipeptídicas que conforman una proteína.

Las proteínas son moléculas anfóteras, en el punto isoelectrico (pI) de una proteína las cargas positivas y negativas son iguales, este factor es relevante ya que el pH del vino está muy cerca del punto isoelectrico de muchas de las fracciones proteicas del vino, punto en el que dichas proteínas son menos solubles; por lo que dependiendo del pH del vino la carga de la fracción proteica será positiva o negativa. Proteínas 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 de un pH de 4, el cual coincide con el punto isoelectrico de las proteínas del mosto de esa variedad (Batista *et al.* 2009). Esto demostró un mecanismo isoelectrico de precipitación proteica.

### 3.2.ORIGEN DE LAS PROTEÍNAS DEL VINO

Las proteínas del vino se han considerado durante mucho tiempo como una mezcla de proteínas de uva y proteínas provenientes de la autólisis de levaduras (Ferreira *et al.* 2002).

#### 3.2.1. Uva

En el hollejo de la uva como mecanismo de autodefensa se sintetizan una serie de proteínas conocidas como “proteínas de defensa” o “proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) que son capaces de inhibir el desarrollo de ciertos organismos patógenos, destacando las quitinasas y similares a la taumatina (TLM). Serán este tipo de proteínas las principales relacionadas con la turbidez del vino (Ferrerira *et al.*,2002).

En la pulpa los compuestos nitrogenados representan el 25% del nitrógeno total del grano de uva, en cantidades de 40 mM/L hasta 220 mM/L. El nitrógeno presente en la pulpa podemos encontrarlo de dos formas: forma mineral o amoniacal que es la forma fácilmente asimilable por las levaduras y la forma orgánica compuesta de proteínas y aminoácidos, con una baja concentración de proteínas de 1,5 a 100 mg/L. Durante la maduración se produce un aumento de aminoácidos libres en la pulpa debido a un descenso de proteosíntesis o de formación de proteínas (Hidalgo, J., 2010).

La cantidad de aminoácidos libres se verá incrementada por los tratamientos físicos de la vendimia (cosecha mecánica, despallado, estrujado), ya que aumentará la proporción de proteasas solubles (Ribéreau-Gayón, P *et al.* 2003).

Las proteínas contenidas en la uva presentan un peso molecular de 15 a 25 kDa para vendimias poco maduras y de 35 a 40 kDa para las más maduras (Hidalgo, J., 2010). Es importante destacar este aumento de proteínas extraíbles relacionado con un aumento de la madurez de la uva ya que esto supondrá un aumento del potencial de enturbiamiento.

Las variaciones de contenido en proteínas que presentan los mostos son debidas principalmente a aquellos factores que influyen en la acumulación de nitrógeno total en las uvas como son el clima, el suelo, las operaciones prefermentativas y la propia variedad (Ferreira *et al.* 2002, Hidalgo, J., 2010). El cambio climático es un nuevo factor que se suma al aumento de la inestabilidad proteica, así lo demuestra un estudio realizado por Pasquier y colaboradores (2021) en el que se confirma que, con el aumento de las

temperaturas y la disminución de las precipitaciones durante la fase de maduración de la uva, tiende a potenciar el riesgo de inestabilidad proteica en los vinos.

### 3.2.2. Levaduras

Las levaduras afectan a la concentración de proteínas de dos maneras: mediante la transferencia de proteínas al vino por la autólisis de la levadura y/o debido a la presencia de proteasas exocelulares en las levaduras que puede contribuir a la hidrólisis de las proteínas de mosto.

### 3.3. FORMACIÓN DE TURBIDEZ PROTEICA

La precipitación de proteínas es un problema de turbidez en los vinos que se puede prevenir eliminando aquellas proteínas de la uva que permanecen solubles tras el proceso de vinificación y eventualmente generan turbidez en vinos terminados.

Las proteínas sintetizadas durante la maduración como mecanismo de defensa, es decir las proteínas relacionadas con la patogénesis de la uva (PR), son capaces de persistir durante todo el proceso de elaboración siendo las principales causantes de la inestabilidad coloidal en el vino. La importancia de la presencia de proteínas en el vino radica en su capacidad de precipitación y formación de lo que se conoce como turbidez o quiebra proteica.

Las precipitaciones proteicas son principalmente de vinos blancos, puesto que el contenido en taninos de los vinos tintos y rosados por la maceración con los hollejos permite la eliminación de las proteínas inestables en las etapas de elaboración del vino (Hidalgo, J., 2010).

La precipitación es consecuencia de la presencia de proteínas inestables, la concentración de este tipo de proteínas es mayor cuando se produce un sulfitado en la maceración prefermentativa y cuando se produce despalillado (si no se despalilla, los taninos presentes en el raspón son capaces de eliminar proteínas). Durante la etapa prefermentativa de mostos estrujados la concentración de proteínas se ve disminuida, gracias a la acción de enzimas proteolíticas, que son capaces de hidrolizar las proteínas y dar lugar a aminoácidos y péptidos que son asimilables por las levaduras.

Pero las proteínas inestables que proceden del mosto no son asimilables por las levaduras, de manera que pasarán al vino terminado pudiendo producir una precipitación

o quiebra proteica. Las proteínas inestables presentan una masa molecular de 10000 a 30000 Dalton y sus puntos isoeléctricos están comprendidos entre valores de 4,1 a 5,8 (Hidalgo, J., 2010).

El mecanismo de formación de turbidez todavía no ha conseguido explicarse de una manera clara. De manera general, suele ser descrito en dos etapas, en la primera etapa las proteínas se despliegan como respuesta a un estímulo, este estímulo generalmente se describe como un aumento de la temperatura de almacenamiento (35-50°C) que puede suponer la desnaturalización de las proteínas por eliminación del agua, pero también puede deberse a la presencia de taninos añadidos o aportados por una crianza o por contacto con el corcho de las botellas. La segunda etapa corresponde a la agregación de estas proteínas previamente desplegadas, y posterior floculación, provocando una turbidez visible. En la figura 3 se observa un esquema típico de formación de la quiebra proteica en vinos.

Pero actualmente tras numerosas investigaciones de las proteínas formadoras de turbidez, se propone la intervención de tres etapas, que son el despliegue de las proteínas, la autoagregación de estas y la tercera etapa que correspondería con la reticulación de los agregados. (Van Sluyter *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Esquema de formación de quiebra proteica en el vino. Tomado de *Enología Práctica* (p. 231), por J. Blouin, & Peynaud, 2004, Editorial Mundi-Prensa.

### 3.4. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

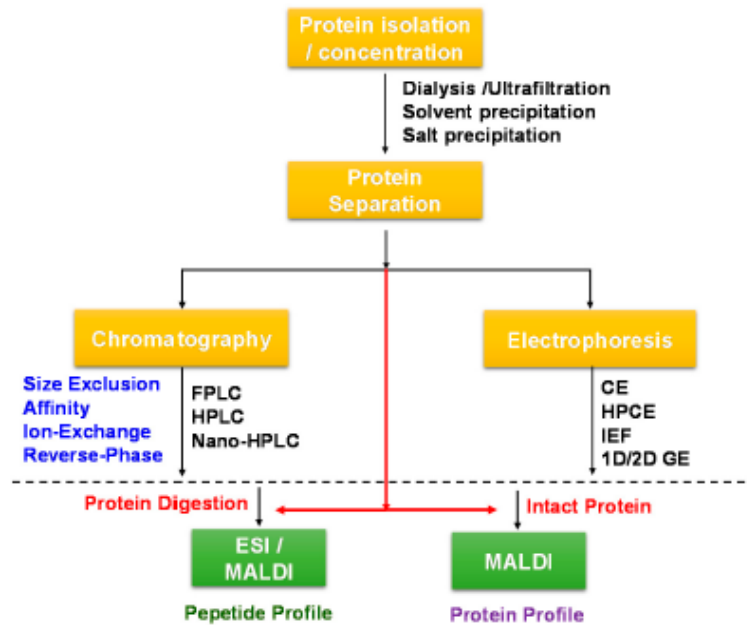
El aislamiento, separación y caracterización de las proteínas de mostos y vinos resulta una tarea difícil debido a su baja concentración y a su fuerte interacción con polifenoles endógenos y otros compuestos no proteicos.

El primer paso para la caracterización de proteínas es la purificación por diálisis o por columnas, en la mayoría de las técnicas. Las técnicas utilizadas son: la Cromatografía líquida de la proteína rápida (FPLC) de intercambio iónico, cromatoenfoco en FPLC, Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Mierczynska-Vasilev, *et al.*, 2017; Marangon *et al.*, 2012; Romanini *et al.*, 2021; Di Gaspero *et al.*, 2017), cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, electroforesis capilar (Dizy, M., y Bisson, L. F. 1999), enfoque isoelectrico, transferencia de proteínas y métodos inmunológicos.

Además, las proteínas del vino se pueden caracterizar aún más utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida nativa (PAGE) y PAGE en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE (Jaeckels *et al.*, 2017; Lambri *et al.* 2013), electroforesis en gel bidimensional (2D-GE), nanocromatografía líquida de alta resolución o nano-HPLC y cromatografía líquida a nanoescala acoplada a espectrometría de masas en tándem o nano-LCMS/MS (Colangelo, *et al.*, 2018).

En el siguiente esquema se observa un flujo de trabajo habitual para la caracterización de las proteínas, en el que están incluidos las distintas técnicas comentadas.

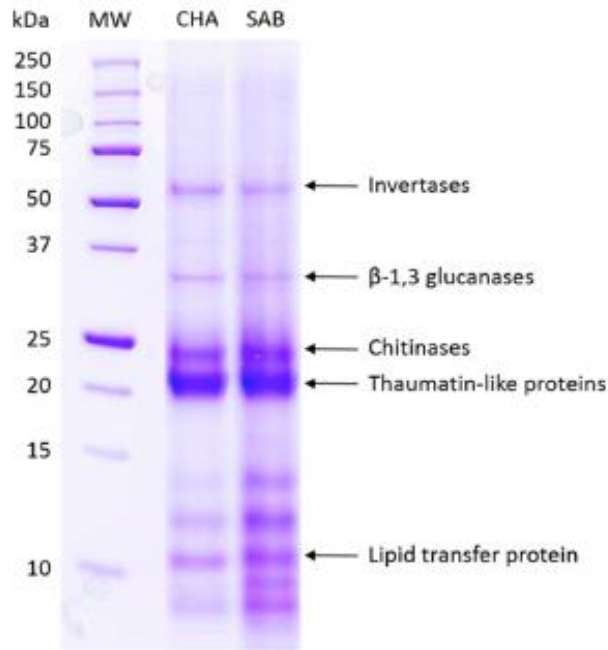




**Figura 4.** Flujo de trabajo típico para la caracterización de las proteínas del vino . Tomado de *White Wine Protein Instability: Mechanism, Quality Control and Technological Alternatives for Wine Stabilisation* (p. 3), por Cosme *et al.*, 2020.

Con los métodos citados anteriormente se ha llegado a la conclusión de que las clases más abundantes de proteínas causantes de turbidez son quitinasas y las proteínas similares a la taumatina (TLP), estas presentan un tamaño pequeño (< 35 kDa), son compactas, y están cargadas positivamente al pH del vino (Van Sluyter *et al.*, 2015).

También se han identificado como formadoras de turbidez las proteínas de tipo  $\beta$ -glucanasas, aunque son mucho menos abundantes que las quitinasas y las TLP y no se ha investigado su función ampliamente todavía. La presencia de estas proteínas de forma mayoritaria lo podemos observar en la siguiente figura, además de sus pesos moleculares (Figura 5).



**Figura 5.** Perfil electroforético típico de dos mostos de uva (CHA, chardonnay; SAB, Sauvignon blanc). Tomado de Wine Protein Haze: Mechanisms of Formation and Advances in Prevention (p. 4021), por Van Sluyter *et al.*, 2015.

### 3.5. PRUEBAS PARA LA PREDICCIÓN DE LA ESTABILIDAD PROTEICA

Para disminuir el riesgo de turbidez proteica una vez el vino ha sido embotellado, se han desarrollado una serie de pruebas que permiten identificar el potencial de formación de turbidez que presenta el vino, además conocer este potencial permitirá un correcto ajuste en la dosis del tratamiento que evitará que se produzca la posterior precipitación de proteínas.

Existen varios tipos de pruebas que nos permiten evaluar la inestabilidad proteica del vino, además de periódicas investigaciones que aportan nuevas metodologías de evaluación. Para todos los casos el vino se considera estable si el incremento de la turbidez tras la realización de la prueba es inferior a 2 NTU.

#### 3.5.1. Prueba de estabilidad por calor

Es el método más utilizado en la industria vitivinícola para evaluar la inestabilidad proteica, por ser considerado el más fiable. No existe un método exacto de realización, son diferentes los tiempos y temperaturas empleados para cada investigación.

El método se basa en el calentamiento del vino a una alta temperatura, produciendo una desnaturalización de las proteínas y provocando por tanto su precipitación, formándose un precipitado con una composición similar al precipitado natural.

La técnica más utilizada es la descrita por Pocock y Rankine (1973), que consiste en calentar la muestra de vino durante 6 horas a 80°C, después enfriarlo durante 16 horas a 4°C y posteriormente dejarlo a temperatura ambiente, necesitando un tiempo total para la interpretación de los resultados cercano a las 24 horas. Aunque también existen otras técnicas como la del calentamiento durante 2 horas a 80°C y posterior enfriamiento en hielo durante otras 2 horas (Marangon *et al.*, 2012).

Además, el tiempo de enfriamiento es también un factor clave para la formación de la turbidez, ya que cuanto mayor sea el tiempo de enfriamiento, mayor será la turbidez formada (McRae *et al.*, 2018).

Los ensayos comparativos indican que una prueba con dos horas de calentamiento y tres horas de enfriamiento produce una turbidez similar o mayor que la prueba de calor comúnmente utilizada en la industria. (McRae *et al.*, 2018).

Existe una variabilidad significativa en cómo se realiza la prueba y cómo se interpretan los resultados, que afecta la confiabilidad de los resultados, por lo que a pesar de ser una de las pruebas más utilizadas en la industria del vino y ser considerada una de las más fiables, no es realmente específica y requiere de una generalización de los tiempos.

### **3.5.2. Prueba TCA**

La prueba del ácido tricloroacético (TCA) se basa en la capacidad de este ácido para producir una precipitación de las proteínas, consiste en la adición de 1mL de una solución de TCA al 55% a 10 ml de vino, y a continuación calentar la muestra a 100°C durante 5 minutos y dejar reposar durante 15 minutos antes de la medición de turbidez. (Hidalgo, J., 2010).

Esta prueba no permite una interpretación de los resultados de forma satisfactoria, ya que produce una sobreestimación de la dosis de clarificante necesario, puesto que no sólo las proteínas inestables precipitan.

### **3.5.3. Prueba de etanol**

Esta prueba está basada en la reducción de la constante dieléctrica, lo que provoca una reducción de la solubilidad de las proteínas.

Consiste en la adición del mismo volumen de etanol absoluto a un vino, pudiéndose formar turbidez, que será medida por nefelometría. Esta prueba, está influenciada por la concentración de proteínas, pH, ácido tartárico, y contenido en calcio, lo que puede provocar diferencias en la formación de turbidez en el vino (Esteruelas *et al.*, 2009; Cosme *et al.*, 2020). Por lo tanto, se vuelve a sobreestimar el clarificante necesario para la estabilización de las proteínas.

### **3.5.4. Bentotest**

Se utiliza una solución de ácido fosfomolibdico en HCL que precipita la proteína del vino al neutralizar la carga, lo que lleva a la agregación con el ion molibdeno.

Se produce una precipitación de la totalidad de las proteínas del vino, de manera que al igual que las dos pruebas comentadas anteriormente, se sobrevalora la cantidad de clarificante a utilizar.

### **3.5.5. Prueba con taninos**

Consiste en la adición de 1 mL de una solución de taninos al 10% a 10 mL de vino, la mezcla se calentará al baño maría a 100 °C durante 2 minutos, observándose o no turbidez al permanecer 15 minutos a temperatura ambiente.

Esta prueba se ve influenciada por otros factores como el pH, presencia de cobre, hierro y potasio (Esteruelas *et al.*, 2009). Por lo tanto, se trata de una prueba bastante imprecisa y no permite una buena interpretación de la dosis de clarificante a utilizar.

### **3.5.6. Electroneutralización**

Los métodos tradicionales para evaluar la estabilidad proteica comentados anteriormente, en su mayoría presentan tiempos de análisis muy largos, además de presentar cierta imprecisión puesto que en algunos no solo se provoca la precipitación de

proteínas, sino también de otros compuestos, produciéndose una sobreestimación del problema.

De manera que las desventajas que presentan los métodos tradicionales han impulsado la búsqueda de nuevos métodos de estabilización.

Uno de estos nuevos métodos está basado en el análisis de la inestabilidad proteica utilizando las características de electro positividad de las proteínas al pH del vino. El test (ProtoCheck) realiza la electroneutralización de las proteínas, una vez llegadas al punto isoeléctrico se vuelven insolubles y determinan una turbidez medible. La muestra no necesita ser filtrada ya que solo se evalúa la turbidez antes y después de añadir el reactivo que provoca la electroneutralización (Celotti, 2005).

Así pues, esta prueba presenta unos tiempos de análisis más cortos, pero a pesar de presentar una mayor especificidad, también existen interferencias que provocarían una sobreestimación de la dosis de clarificante.

### **3.5.7. Infrarrojo**

Otra nueva metodología para la medición de inestabilidad proteica es la espectroscopía infrarroja (Versari, *et al.*, 2011). Para el desarrollo de este método se utilizaron ciento once vinos blancos, a los que se les midieron los espectros del infrarrojo cercano(NIR) y medio y se les realizaron pruebas de estabilidad térmica y coloidal (adición de etanol).

Este estudio demostró que la turbidez de los vinos resultante de la adición de etanol podía predecirse a partir de los espectros de infrarrojo cercano de onda corta.

### **3.5.8. Método inmunológico de inmunopresión**

Las pruebas que se utilizan generalmente para la detección de las proteínas inestables están basadas en la aplicación de calor o en la utilización de precipitantes, como ya se ha comentado anteriormente muchas de estas pruebas aportan resultados poco fiables.

La Organización Internacional de la Viña y el Vino en el año 2017 (OIV-OENO 529-2017) aprobó la utilización de un método de inmunopresión que permite la detección

de las proteínas inestables del vino, concretamente las proteínas como la taumatina y la quitinasa en el vino a partir de una concentración global de 1 mg/L.

La técnica consiste en la introducción de la muestra de vino en una membrana de nitrocelulosa, tras esta etapa se produce la detección de las proteínas inestables y por último el revelado de la presencia de proteínas inestables, la intensidad de las manchas coloreadas observadas en la membrana es proporcional a la cantidad de proteínas inestables y al riesgo de quiebra proteica del vino.

### 3.6. FACTORES NO PROTEICOS INFLUYENTES EN LA INESTABILIDAD

Aunque existe una gran diversidad la mayoría de las proteínas del vino están relacionadas estructuralmente y han sido identificadas como proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), estas derivan de la uva como se ha comentado anteriormente y son capaces de resistir a los procesos de vinificación, debido a su resistencia a la proteólisis y al pH de los vinos.

A pesar de esto, y aunque es dependiente de las proteínas, la formación de turbidez en el vino también depende de una serie de factores no proteicos, que a menudo son considerados como “Factor X” (Ferreira *et al.* 2002; Batista *et al.* 2010; Tabilo-Munizaga *et al.*, 2014), algunos de los más relevantes son definidos a continuación.

#### 3.6.1. pH

Varias investigaciones que han utilizado tanto vinos naturales, como soluciones modelo sugieren que el pH del vino juega un papel fundamental en la formación de neblina del vino dependiente de las proteínas (Batista *et al.*, 2009; Lambri *et al.* 2013).

Lambri *et al.*, (2013) estudiaron la tendencia a la formación de turbidez en un vino blanco afectado por un pH que oscilaba entre 3,00 y 3,6 y se concluyó que los vinos con un pH más bajo presentan una mayor estabilidad térmica, ya que no se produjo formación de turbidez aun superando los 70°C. Además, el aumento de pH se caracterizó por un cambio progresivo en la temperatura de formación de turbidez de 50-60 °C a 70-80 °C. De manera que se demostró que el valor del pH juega un papel fundamental en la formación o no de turbidez proteica.

Se observó también que la mayoría de las proteínas estaban glicosiladas, una característica que se ha especulado que tiene una influencia en la solubilidad diferencial de las proteínas del vino en respuesta al pH (Lambri *et al.* 2013).

### **3.6.2. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son considerados otro de los factores no proteicos potencialmente implicados en la formación de turbidez.

El objetivo de alguna investigación ha sido el de la identificación y cuantificación de polifenoles presentes en el precipitado natural de un vino blanco. (Esteruelas *et al.*, 2011).

En la investigación de Esteruelas y colaboradores (2011) se utilizaron tanto la cromatografía de alta resolución (HPLC) como cromatografía de gases (CG) para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos, y se concluyó que a pesar la difícil identificación de estos compuestos sí que están presentes en una concentración bastante significativa en el precipitado natural de un vino, por lo que se sugiere que estén involucrados en el mecanismo de aparición de la turbidez proteica.

### **3.6.3. Sulfuroso**

La utilización de dióxido de azufre ha sido también relacionada con la formación de turbidez proteica.

Diferentes investigaciones han comprobado esta relación (Chagas *et al.* 2016; Chagas, *et al.*, 2018). En ambos casos los resultados indican un papel modulador del SO<sub>2</sub> en la formación de la precipitación proteica del vino blanco. Dado su rango de concentraciones efectivas, muy por debajo de la concentración máxima permitida en los vinos, el SO<sub>2</sub> puede considerarse como un candidato para el factor no proteico que induce la agregación proteica del vino blanco.

De manera que se demuestra la existencia de factores no proteicos influyentes en la formación de turbidez, algunos de ellos ya han sido claramente identificados, como los comentados anteriormente.

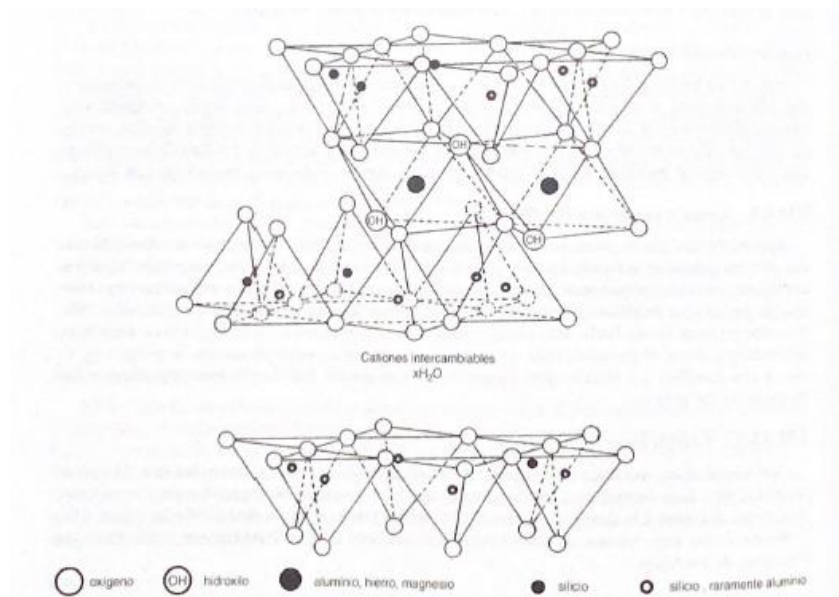
### 3.7. CLARIFICACIÓN CON BENTONITA

El tratamiento más utilizado en la industria vitivinícola para conseguir la estabilización del vino y prevenir la formación de turbidez proteica después del embotellado es el tratamiento con bentonita.

La bentonita es un clarificante mineral que procede de la descomposición de cenizas volcánicas, fue descubierta en el año 1888 en el estado de Wyoming (U.S.A).

Se trata de una arcilla perteneciente a la familia de las montmorillonitas. Las arcillas presentan la siguiente fórmula:  $Al_2O_3 \cdot SiO_2 \cdot nH_2O$ , aunque las montmorillonitas presentan la siguiente:  $Na,Ca)_{0,3}(Al,Mg)_2Si_4O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O^1$ , donde se observa la presencia de magnesio.

La bentonita se compone de al menos un 75 % de montmorillonita (Jaeckels *et al.*, 2017) y presenta estructura dioctaédrica, presentando cada hoja dos series de tetraedros, donde se intercalan octaedros, como podemos observar en la Figura 6. Presenta una carga negativa en toda su superficie, excepto en el borde que es positiva.



**Figura 6.** Estructura laminar de la bentonita. Adaptado de *Tratado de Enología Tomo II* (p.1312), Hidalgo, J. (2010) Editorial Mundi-Prensa.



Existen diferentes tipos de bentonita: ácidas, sódicas, cálcicas y magnésicas. Todas ellas presentan la capacidad de expandirse en ambientes húmedos y disminuir por tanto la permeabilidad de la superficie.

La clarificación de bentonita implica la dispersión del adsorbente y la adsorción de los solutos y la sedimentación del complejo formado entre el adsorbente y el adsorbato. La bentonita elimina las proteínas por interacción electrostática, formando complejos que pueden eliminarse por filtración.

La adsorción de las proteínas por la bentonita es dependiente del punto isoelectrico(pI) de las proteínas y del pH del vino. Generalmente el pH del vino está cerca del punto isoelectrico de la mayoría de las proteínas, pero si el pH del vino está por encima del punto isoelectrico, la carga neta de la fracción será negativa por lo que las proteínas se unirán electrostáticamente a aquellos clarificantes que estén cargados positivamente; de la misma forma cuando el pH del vino es más bajo que el pI, la carga neta de la fracción será positiva, y las proteínas reaccionaran con los clarificantes cargados negativamente como la bentonita. Esta relación explica el por qué algunos vinos se estabilizan fácilmente con una dosis específica de bentonita, mientras que otros vinos no. (Zoecklein *et al.*, 2005)

Generalmente en la industria vitivinícola se utiliza bentonita sódica con mayor frecuencia que la cálcica, por su mayor potencial de hinchazón.

El tratamiento en bodegas con bentonita para prevenir la precipitación de proteínas es el más extendido, las dosis son variables, pero para aquellas proteínas que presenten un peso de entre 15000 y 35000 Dalton (principales causantes de la turbidez en vino), la adición de 40-60 gramos/Hl sería suficiente, y para eliminar aquellas proteínas que presenten un peso molecular de entre 40000 y 100000 Dalton, las dosis de bentonita deberían ser superiores a 80 g/Hl. (Hidalgo, J., 2010).

La aplicación de la bentonita es sencilla, el primer paso es la hidratación de la bentonita en diez veces su volumen en agua, se deja reposar de doce a veinticuatro horas y tras una agitación previa se introduce al mosto o vino a tratar y se deja asentar. (Blouin, J., y Peynaud, E. 2004).

El asentamiento es lento pudiendo ser superior a una semana, por lo que es considerado un tratamiento largo, suponiendo esto uno de los principales inconvenientes de su utilización, además otro inconveniente de la bentonita es que su sedimento o “lías”

supone entre un 5 y un 10% del vino tratado, provocando por tanto pérdidas bastante significativas, se ha estimado que la clarificación con bentonita supone unas pérdidas para la industria vitivinícola global de mil millones de dólares. (Marangon *et al.*, 2012; Jaeckels *et al.*, 2017; Mierczynska-Vasilev *et al.*, 2017).

Otro inconveniente de la utilización de bentonita es que no presenta especificidad de adsorción, de manera que no solo serán eliminadas las proteínas causantes de turbidez, sino que también serán eliminados otra serie de compuestos beneficiosos, reduciendo por tanto la calidad del vino (Esteruelas *et al.*, 2009; Jaeckels *et al.*, 2017).

Una investigación realizada por Jaeckels y colaboradores (2017) sobre la eliminación de proteínas mediante el tratamiento con NaCa-bentonita, demostró empleando la electroforesis de SDS\_PAGE que las quitinasas fueron adsorbidas satisfactoriamente (96%), pero diferentes isoformas de TLP mostraron un comportamiento de adsorción variable, desde ninguna reducción hasta un 98%. Por lo que es importante comprender las características individuales de las posibles proteínas relacionadas con la turbidez porque no todas son eliminadas con la misma eficacia. Además, la utilización de bentonita puede eliminar directamente algunos compuestos aromáticos, afectando directamente a las propiedades organolépticas del vino (Lambri, *et al.*, 2013).

Un estudio realizado por Di Gaspero y colaboradores (2017) confirmó esta hipótesis, observando que una proteína principal del vino, la VVTL1 (similar a la taumatina), es capaz de unirse a diferentes ésteres etílicos, siendo estos contribuyentes sustanciales al aroma del vino. De manera que, al interactuar con las proteínas, la utilización de la bentonita para eliminarlas supondría una alteración negativa del aroma del vino. Por lo que sería más favorable la utilización de la bentonita antes de la producción de compuestos aromáticos en la fermentación, es decir la utilización de bentonita en mostos sería más recomendada para evitar la eliminación de compuestos aromáticos.

### 3.8. ALTERNATIVAS A LA BENTONITA

Actualmente son muchas las investigaciones que estudian técnicas alternativas a la bentonita, por las desventajas asociadas a la utilización de esta comentadas anteriormente.

#### 3.8.1. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son capaces de formar enlaces con otros compuestos del vino, incluidas las proteínas. El efecto de los ácidos tartárico, málico, succínico, cítrico y glucónico sobre la estabilidad proteica ha sido estudiado, obteniéndose resultados favorables. (Batista *et al*, 2010).

Los resultados obtenidos por Batista y colaboradores (2010) de la aplicación de los cinco ácidos diferentes concluyen que sí que tienen un efecto estabilizador sobre el potencial de turbidez, esto puede deberse a dos causas, la primera es la de que los ácidos orgánicos presentan una carga negativa al pH del vino, de manera que interactúan con las proteínas cargadas positivamente, y esto impide la interacción de las proteínas con el denominado “Factor X”, es decir, la interacción con los ácidos orgánicos, impide que las proteínas interactúen con los compuestos que realmente provocan su precipitación ; la otra posible causa es la de que los ácidos orgánicos que permanecen en forma libre, también son capaces de interactuar con el “Factor X” eliminándolo de la solución en forma de precipitado.

Por tanto, se concluye que los ácidos orgánicos pueden ser considerados como un factor modulador del potencial de turbidez, además de apoyar al mismo tiempo la hipótesis de la existencia de un Factor X.

#### 3.8.2. Enzimas proteolíticas

La utilización de enzimas proteolíticas como alternativa a la bentonita ha sido investigada en numerosas ocasiones, debido a su capacidad para la degradación de las proteínas inestables, pero ninguna de las investigaciones anteriores consiguió eliminar eficazmente las proteínas relacionadas con la patogénesis del vino debido a su alta resistencia a la proteólisis y a las desfavorables condiciones de temperatura en vinificación para la actividad enzimática.

No obstante, una proteasa de grado alimenticio fue probada por Marangon y colaboradores (2012) como tratamiento eficaz contra la degradación de proteínas, se trata de una mezcla de Aspergillopepsina I y II (AGP), activa al pH del vino y a altas temperaturas.

En el estudio de Marangon y colaboradores (2012) se utilizaron dos mostos de uva de diferentes variedades (Chardonnay y Sauvignon blanc) clarificados, a los que se les añadió AGP, con y sin tratamiento térmico (75°C durante 1 minuto), se utilizó una bentonita de sodio-calcio para el tratamiento control y la concentración de proteínas fue determinada mediante HPLC.

La adición de AGP durante la fermentación supuso una disminución de la concentración de proteínas de hasta un 20%, pero además la combinación de AGP y tratamiento térmico eliminó casi por completo la cantidad de proteínas (quitinasa y taumatina). Fue evaluado también el perfil sensorial del vino resultante, obteniendo resultados positivos para el ensayo con AGP y pasteurización instantánea.

De manera que la utilización de AGP combinado con un tratamiento térmico a corto plazo obtuvo un resultado ventajoso frente a la bentonita, además se evaluó también un posible ahorro económico de la utilización de la técnica estudiada, por consiguiente, mediante este estudio quedó manifestada una alternativa prometedora a la bentonita.

### **3.8.3. Manoproteínas**

El tratamiento de los vinos con manoproteínas de levadura fue autorizado por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) en 2005.

El uso de manoproteínas para mejorar la estabilidad de las proteínas del vino, así como su calidad sensorial y sensación en boca ha sido también evaluado como alternativa a la bentonita (Ribeiro *et al.*, 2014).

Mediante esa investigación se valoró la efectividad de 11 manoproteínas comerciales con diferente composición química de azúcares y contenido proteico para la estabilización de proteínas de un vino blanco, mediante prueba de calor y prueba de TCA. Se observó que aquellas manoproteínas que presentaban una mayor proporción de manosa y glucosa resultaron más eficientes para la estabilización del vino blanco.

Además, el uso de manoproteínas mantuvo las características sensoriales del vino, e incluso mejorándolas. (Ribeiro *et al.*, 2014).

De manera que el uso de manoproteínas puede considerarse una alternativa eficaz para la estabilización.

#### **3.8.4. Alta presión hidrostática**

La utilización de altas presiones hidrostáticas (HHP) es ya algo común en industrias agroalimentarias para la conservación y esterilización de los alimentos. En la industria vitivinícola también ha sido estudiado el uso de altas presiones hidrostáticas para aumentar la estabilidad proteica. (Tabilo-Munizaga *et al.*, 2014).

El vino tratado con HHP presentó una disminución del dióxido de azufre libre y total, además a 450 MPa la estructura  $\alpha$ -hélice de las proteínas se vió disminuida, lo que podría estar relacionado con las interacciones intermoleculares de las proteínas y otros compuestos no proteicos (Factor X). (Tabilo-Munizaga *et al.*, 2014). Además, un aumento de la entalpia de fusión y de temperatura de fusión podrían mejorar la estabilidad térmica y retrasar la turbidez.

Por lo que se concluye que la utilización de una alta presión hidrostática podría ser una alternativa a la bentonita, aunque serían necesarios más estudios para valorar que intensidad de tratamiento sería la óptima.

#### **3.8.5. Nanotecnología**

La nanotecnología es considerada una ciencia con muchas aplicaciones potenciales en los campos de la medicina, industria alimentaria y de bebidas. En la industria vitivinícola son varias las investigaciones que han utilizado este tipo de tecnología para la prevención de la turbidez proteica en vinos blancos.

Una técnica investigada para la eliminación de las proteínas relacionadas con la patogénesis de los vinos ha sido la de la utilización de nanopartículas magnéticas recubiertas con plasma de ácido acrílico (Mierczynska-Vasilev *et al.*, 2017), esta técnica evaluó el contenido de proteínas en nueve vinos de diferentes variedades, antes y después del tratamiento con nanopartículas magnéticas recubiertas y no recubiertas de ácido acrílico, además se evaluó también el contenido fenólico antes y después del tratamiento

con nanopartículas magnéticas recubiertas, así como los tiempos de acondicionamiento del vino y deposición del plasma.

Tras la realización de la investigación se concluyó que la utilización de un poder de disposición del plasma de 10 W durante un tiempo de diez minutos y otros diez minutos de acondicionamiento en vino suponen la condición óptima para la eliminación de las proteínas, además de no verse afectado el contenido fenólico de los vinos.

De manera que la utilización de esta técnica fue considerada rápida puesto que recorta enormemente los tiempos de tratamiento con respecto a la bentonita, además de ser más selectiva. Por lo tanto, esta investigación mostró con contundencia los beneficios de la utilización de nanopartículas magnéticas recubiertas de ácido acrílico con respecto a los beneficios de la utilización de bentonita.

La utilización de nanomateriales mesoporosos también ha sido evaluada para la prevención de la turbidez proteica (Dumitriu, *et al.*, 2018).

Fueron estudiados dos nanomateriales mesoporosos por Dumitriu y colaboradores (2018), uno de composición móvil de materia (MCM) y otro con el tamaño de poro más grande (SBA-15), ambos nanomateriales fueron agregados a los vinos (Pedro Ximenez y Muscat Ottonel) los cuales no habían sido sometidos todavía a fermentación maloláctica, tras la adición se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y se procedió al análisis, además se utilizó bentonita de sodio como método control.

Los tratamientos con nanomateriales produjeron una disminución de la turbidez mayor que con la utilización de bentonita y previnieron la formación de turbidez. El tratamiento con bentonita presentó la mayor reducción de polifenoles totales y de ésteres etílicos, y la concentración final de volátiles no pudo ser comparada ya que parecía depender del vino en cuestión y no del tratamiento utilizado.

De manera que esta investigación aportó otra alternativa eficaz a la bentonita, aunque se requerirían más estudios para comprender el origen de las proteínas involucradas en la asociación con nanomateriales.

### **3.8.6. Quitosano**

El quitosano permitido en la industria vitivinícola es el extraído del micelio del hongo *Aspergillus niger*, utilizado principalmente para el control de *Brettanomyces* y para la eliminación ocratoxina A.

La utilización de quitosano como alternativa a la bentonita también ha sido probada en los últimos años (Colangelo, *et al.*, 2018). La adición de 1 g/L de quitosano al vino, supuso un agotamiento de las quitinasas y una reducción significativa de las proteínas mas estables, las similares a la taumatina, además se observó también una reducción de la turbidez tras el tratamiento con quitosano.

De manera que el quitosano podría ser una manera eficaz para la eliminación de quitinasas, como alternativa a la bentonita, además los compuestos aromáticos fermentativos no fueron reducidos por la adición de quitosano.

### **3.8.7. Semillas de uva**

La interacción tanino – proteína puede tener como resultado la precipitación, los taninos hidrolizables se unen a las proteínas por interacciones hidrófobas, mientras que los taninos condensados se unen mediante enlaces de hidrogeno. El grado de precipitación depende de la variedad de uva y el momento de aplicación , por lo que algunos enólogos realizan adiciones durante la fermentación , pudiendo ayudar a la estabilización de proteínas

La utilización de semillas de uva para reducir la formación de turbidez en vinos blancos ha sido estudiada por Romanini y colaboradores (2021), a pesar de que los resultados no fueron tan favorables como la alternativa anterior sí que fueron observados ciertos beneficios con respecto a la bentonita.

Las semillas de uva contienen cantidades significativas de taninos condensados. Fueron evaluados dos vinos blancos (Semillon y Sauvignon blanc) a los que se añadieron polvo de semillas de orujo de uva Chardonnay sin fermentar (GSP), en dos concentraciones 7,5 g/L y 15 g/L, se realizó una maceración durante 1 h y posteriormente ambos vinos fueron trasegados y fermentados. Se utilizó bentonita activada con sodio para los vinos control.

Fueron cuantificadas las proteínas formadoras de turbidez mediante UHPLC, además de la composición y el color del vino utilizando un analizador infrarrojo (FOSS), polisacáridos y ácidos orgánicos mediante HPLC, además de una evaluación sensorial por expertos.

Los resultados demostraron una eficacia de los tratamiento con GSP para reducir las proteínas relacionadas con la patogénesis del vino hasta en un 57 %, además de una reducción de la inestabilidad térmica de hasta un 80%, a pesar de esto la concentración de proteínas para ambos casos fue la suficiente para la generación de turbidez, también se vieron incrementados aspectos sensoriales negativos como un aumento de viscosidad, astringencia, amargor e intensidad de color amarillento, aunque favorablemente se vieron incrementados los aromas tropicales.

De manera que esta alternativa requiere más ensayos para posicionarla como una buena alternativa a la bentonita, o para poder utilizarlo simultáneamente y poder obtener los beneficios de ambos tratamientos.

Actualmente la OIV aprueba la utilización de los siguientes tratamientos para la estabilización proteica: bentonita, quitosano, utilización glucano-quitina. (Resolución OENO 06/2016).



#### 4. CONCLUSIONES

En definitiva, la revisión sistemática pone de manifiesto que la turbidez proteica presente en los vinos, a pesar de haber sido uno de los mayores problemas en la industria vitivinícola durante muchos años, sigue siéndolo al no determinarse con claridad los factores y mecanismos de su origen.

La presencia del denominado “Factor X” o factores no proteicos influyentes ha sido demostrada en numerosos estudios, aunque requiere de una mayor investigación para definir con exactitud todos los parámetros que contribuyen a la precipitación proteica y así poder evitar que esto suceda.

Actualmente no existe una alternativa a la bentonita que sea igual de eficaz y barata, sin embargo, el uso de taninos, manoproteínas y enzimas combinados con bentonita puede ayudar a reducir su dosis y minimizar los efectos negativos relacionados con su aplicación.

Se siguen realizando investigaciones para descubrir una alternativa a la bentonita que sin duda son prometedoras, como la nanotecnología, las manoproteínas, la alta presión hidrostática o la utilización de semillas de uva, por lo que en un futuro cercano la reducción de uso de bentonita será una realidad.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Batista, L., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2010). Protein haze formation in wines revisited. The stabilising effect of organic acids. *Food Chemistry*, 122, 1067–1075.

Batista, L., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2009). The complexity of protein haze formation in wine. *Food Chemistry*, 112, 169–177.

Blouin, J., & Peynaud, E. (2004). *Enología práctica: Conocimiento y elaboración del vino: conocimiento y elaboración del vino*. Mundi-Prensa Libros.

Celotti, E. (2005). Nuevo método para la evaluación de la inestabilidad proteica potencial de los vinos. *Revista Internet De Viticultura Y enología*, (11/2).

Chagas, R., Ferreira, L. M., Laia, C., Monteiro, S., & Ferreira, R. B. (2016). The challenging SO<sub>2</sub>-mediated chemical build-up of protein aggregates in wines. *Food Chemistry*, 192, 460–469.

Chagas, R., Laia, C. A., Ferreira, R. B., & Ferreira, L. M. (2018). Sulfur dioxide induced aggregation of wine thaumatin-like proteins: Role of disulfide bonds. *Food Chemistry*, 259, 166–174.

Colangelo, D., Torchio, F., Marco de Faveri, D., & Lambri, M. (2018). The use of chitosan as alternative to bentonite for wine fining: Effects on heat-stability, proteins, organic acids, colour, and volatile compounds in an aromatic white wine. *Food Chemistry*, 264, 301–309.

Cosme, F., Fernandes, C., Ribeiro, T., Filipe-Ribeiro, L., & Nunes, F. M. (2020). White Wine Protein Instability: Mechanism, Quality Control and Technological Alternatives for Wine Stabilisation, 6,1-19.

Di Gaspero, M., Ruzza, P., Hussain, R., Vincenzi, S., Biondi, B., Gazzola, D., Siligardi, G., & Curioni, A. (2017). Spectroscopy reveals that ethyl esters interact with proteins in wine. *Food Chemistry*, 217, 373–378.

Dizy, M., & Bisson, L. F. (1999). White Wine Protein Analysis by Capillary Zone Electrophoresis. *American Journal Enology and Viticulture*, 50, 120–127.

Dumitriu, G.-D., López de Lerma, N., Luchian, C. E., Cotea, V. V., & Peinado, R. A. (2018). Study of the potential use of mesoporous nanomaterials as fining agent to prevent protein haze in white wines and its impact in major volatile aroma compounds and polyols. *Food Chemistry*, 240, 751–758.

Esteruelas, M., Kontoudakis, N., Gil, M., Fort, M. F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2011). Phenolic compounds present in natural haze protein of Sauvignon white wine. *Food Research International*, 44, 77–83.

Esteruelas, M., Poinssaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M., Canals, J., & Zamora, F. (2009). Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine. *Food Chemistry*, 113, 28–35.

Ferreira, R. B., Picarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., & Teixeira, A. R. (2002). The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 230–239.

FLANZY, C. (2000) *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV ediciones. Ediciones Mundi-Prensa.

Fusi, M., Mainente, F., Rizzi, C., Zoccatelli, C., & Simonato, B. (2010). Wine hazing: A predictive assay based on protein and glycoprotein independent recovery and quantification. *Food Control*, 21, 830–834.

Hidalgo Togorés, J. (2003). *Tratado de Enología Tomos I y II*. Ediciones Mundi- Prensa: Madrid, España.

Jaeckels, N., Tenzer, S., Meier, M., Will, F., Dietrich, H., Decker, H., & Fronk, P. (2017). Influence of bentonite fining on protein composition in wine. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 335–343.

Lambri, M., Dordoni, R., Giribaldi, M., Violetta, M. R., & Giuffrida, M. G. (2013). Effect of pH on the protein profile and heat stability of an Italian white wine. *Food Research International*, 54, 1781–1786.

Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Robinson, E. M., Muhlack, R. A., Holt, H. E., Haynes, P. A., Godden, P. W., Smith, P. A., & Waters, E. J. (2012). Degradation of white wine haze proteins by Aspergillopepsin I and II during juice flash pasteurization. *Food Chemistry*, 135, 1157–1165.

Marangon, M., Vincenzi, S., Lucchetta, M., & Curioni, A. (2010). Heating and reduction affect the reaction with tannins of wine protein fractions differing in hydrophobicity. *Analytica Chimica Acta*, 660, 110–118.

Majewski, P., Barbalet, A., & Waters, E. (2011). \$1 billion hidden cost of bentonite fining. *Australian and New Zealand grapegrower and winemaker*, 569, 58-62.

McRae, J., Barricklow, V., Pocock, K., & Smith, P. (2018). A new heat test for more accurate prediction of bentonite additions to avoid protein haze. *Technical Review*, 235, 10–18.

Mierczynska-Vasilev, A., Boyer, P., Vasilev, K., & Smith, P. A. (2017). A novel technology for the rapid, selective, magnetic removal of pathogenesis-related proteins from wines. *Food Chemistry*, 232, 508–514.

Pasquier, G., Feilhes, C., Dufourcq, T., & Geffroy, O. (2021). Potential Contribution of Climate Change to the Protein Haze of White Wines from the French Southwest Region. *Foods*, 10, 1–14.

Resolución OIV- OENO 06/2016

Resolución OIV-OENO 529-2017

Ribereau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P., & Ribéreau-Gayon, P. (2003). *Tratado de enología: química del vino estabilización y tratamientos*. Ediciones Mundi-prensa.

Ribeiro, T., Fernandes, C., Nunes, F., Filipe-Ribeiro, L., & Cosme, F. (2014). Influence of the structural features of commercial mannoproteins in white wine protein stabilization and chemical and sensory properties. *Food Chemistry*, 159, 47–54.

Romanini, E., McRae, J. M., Bilogrevic, E., Colangelo, D., Gabrielli, M., & Lambri, M. (2021). Use of grape seeds to reduce haze formation in white wines. *Food Chemistry*, 341.

Salazar Gonzalez, F. N. (2007). *White wine continuous protein stabilization. Industrial viability*. Tesis doctoral, Universitat of Rovira I Virgili. Taragona, España.

Tabilo-Munizaga, G., Gordon, T. A., Villalobos-Carvajal, R., Moreno-Osorio, L., Salazar, F. N., Pérez-Won, M., & Acuña, S. (2014). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry*, 155, 214–220 .

Teijón, J. M. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural*. Editorial Tébar.

Van Sluyter, S. C., McRae, J. M., Falconer, R. J., Smith, P. A., Bacic, A., Waters, E. J., & Marangon, M. (2015). Wine Protein Haze: Mechanisms of Formation and Advances in Prevention. *Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4020–4030.

Versari, A., Laghi, L., Thorngate, J. H., & Boulton, R. B. (2011). Prediction of colloidal stability in white wines using infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 104, 239–245.

Waters, E.J., Alexander, G., Muhlack, R., Pocock, K.F., Colby, C., O'neill, B.K., Hoj, P.B. & Jones, P. (2005) Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 215-225.

Zoecklein, B. W., & Latorre Macarrón, E. (2000). *Análisis y producción de vino*.

Zoecklein, B.W., K.C. Fugelsang, B.H. Gump, and F.S. Nury. (2005). *Wine analysis and production*. Kluwer Academic/Plenum Publishers,

## 6. ANEXO I

En la siguiente tabla están recogidos por orden cronológico los artículos más relevantes utilizados en la realización de la revisión bibliográfica

Tabla 1. Resumen bibliográfico por orden cronológico.

TÍTULO	AUTORES	AÑO	CITA	PALABRAS CLAVE	RESUMEN	REVISTA
White Wine Protein Analysis by Capillary Zone Electrophoresis	Dizy, M., & Bisson, L. F	1999	46	Protein análisis Haze Capillary electrophoresis	In this study, capillary zone electrophoresis was evaluated as a method for the analysis of wine proteins.  Protein peaks were found to be sensitive to proteases, suggesting that wine proteins are not intrinsically resistant to degradation by proteases. Staining induced by heat/cooling treatment stripped the wines of their protein content. Capillary zone electrophoresis represents an excellent tool in the analysis of wine proteins and has the potential to differentiate wine varieties.	American Journal Enology and Viticulture
The wine proteins	Ferreira, R. B., Picarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., & Teixeira, A. R.	2002	261	Proteins Turbidity Factors of non-protein origin Bentonite	Wine proteins are structurally related and have been identified as pathogenesis-related proteins (PR), which are derived from the pulp and survive after vinification due to their resistance to low pH and proteolysis. Wine turbidity is protein-dependent, but is also related to factors of non-protein origin such as polyphenols, pH and polysaccharides.	Food Science & Technology

Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine.	Esteruelas, M., Poinaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M., Canals, J., & Zamora, F.	2009	87	Haze proteins Electrophoresis FPLC MALDI-TOF/TOF	In a study where the natural precipitate of a Sauvignon Blanc was analyzed by FPLC, electrophoresis and MALDI TOF/TOF, the thaumatin-like protein and two new proteins that had not been described before as components of haze were described: b-(1-3)-glucanase and ripening-related protein grip22 precursor.	Food Chemistry
The complexity of protein haze formation in wine.	Batista, L., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B.	2009	74	Wine proteins Haze Turbidity pH Factor X	Using an Arinto wine with a natural composition of 280 mg/L of proteins, several heat stability tests were performed at pH 2.8 to 3.6. The presence of factor X (one or more low molecular weight components that sensitize proteins to heat-induced denaturation) was observed.  Minimal turbidity was also observed at pH 7, but this increases at higher and lower pHs.	Food Chemistry
Wine hazing: A predictive assay based on protein and glycoprotein independent recovery and quantification.	Fusi, M., Mainente, F., Rizzi, C., Zoccatelli, C., & Simonato, B.	2010	27	Wine proteins and glycoproteins KDS Electrophoresis Protein quantification Wine haziness	This study presented a two-step method for separate recovery of proteins and glycoproteins from wine, useful for their quantification and analysis, and showed a direct correlation between turbidity and protein concentration and protein/glycoprotein relation.	Food Control

Protein haze formation in wines revisited. The stabilising effect of organic acids	Batista, L., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B.	2010	45	Organic acids Haze X factor Wine proteins Tartaric acid	In this study, the effect of five common organic acids in wine on protein turbidity potential was evaluated. The acids used for the study were tartaric, malic, citric, succinic and gluconic acids. Overall, the results obtained indicated that organic acids exhibit a stabilizing effect on the turbidity potential of wine proteins.	Food Chemistry
Heating and reduction affect the reaction with tannins of wine protein fractions differing in hydrophobicity	Marangon, M., Vincenzi, S., Lucchetta, M., & Curioni, A.	2010	56	Protein Tannin Hydrophobicity Thaumatococcus-like proteins Chitinases	In this study, proteins and tannins were separated from the same unrefined Pinot grigio wine. The wine proteins were fractionated by hydrophobic interaction chromatography (HIC). A significant correlation was observed between the hydrophobicity of the wine protein fractions and the turbidity formed after reacting with the wine tannins.	Analytica Chimica Acta
Phenolic compounds present in natural haze protein of Sauvignon white wine	Esteruelas, M., Kontoudakis, N., Gil, M., Fort, M. F., Canals, J. M., & Zamora, F.	2011	40	Phenolic compounds Haze protein Natural precipitation White wine	Phenolic compounds may be one of the non-protein factors involved in the formation of protein turbidity. The objective of this study was to identify and quantify the polyphenols present in the natural precipitate of a Sauvignon wine, before and after natural precipitation. The results indicated that several phenolic compounds were present in the protein haze.	Food Research International
Degradation of white wine haze proteins by Aspergillopepsin I and II during juice flash pasteurization.	Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Robinson, E. M., Muhlack, R.	2012	80	Protein stability Wine Proteasas AGP Heat treatment	Proteases are an alternative to bentonite, but until now they were not effective in winemaking. AGP is a mixture of Aspergillopepsin I and II, an inexpensive protease that is active at wine pH and at high temperatures.	Food Chemistry



	A., Holt, H. E., Haynes, P. A., Godden, P. W., Smith, P. A., & Waters, E. J.			Aspergillopepsin	In this study, AGP was added to clarified grape must prior to fermentation. At common fermentation temperature there was a 20% decrease in protein, and a 90% decrease on heating. There were no significant sensory changes.	
Effect of pH on the protein profile and heat stability of an Italian white wine	Lambri, M., Dordoni, R., Giribaldi, M., Violetta, M. R., & Giuffrida, M. G.	2013	18	pH Proteins Stability White wine Haze Glycoproteins	In this study, an Italian white wine with a pH ranging from 3 to 3.6 was analyzed. The results indicate a higher thermal stability of the wine with lower pH, since turbidity did not occur even above 70°. Electrophoresis was performed, most of the proteins involved in turbidity were glycosylated (influence on protein solubility in response to pH changes).	Food Research International
Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon blanc wine	Tabilo-Munizaga, G., Gordon, T. A., Villalobos-Carvajal, R., Moreno-Osorio, L., Salazar, F. N., Pérez-Won, M., & Acuña, S.	2014	49	Protein Stability High hydrostatic pressure Secondary structure protein	In this study, the effects of high hydrostatic pressure on wine stability were evaluated, and an improvement in the thermal stability of proteins was observed, delaying turbidity during bottling.	Food Chemistry

Influence of the structural features of commercial mannoproteins in white wine protein stabilization and chemical and sensory properties.	Ribeiro, T., Fernandes, C., Nunes, F., Filipe-Ribeiro, L., & Cosme, F	2014	23	Protein instability Bentonite Mannoproteins Sensory attributes White wine	In this study, the effect of bentonite was compared with that of eleven commercial mannoproteins. The stabilization efficiency of the proteins was related to their chemical composition, specifically to their high mannose/glucose relationship. In addition, some mannoproteins decreased the browning potential.	Food Chemistry
A novel technology for the rapid, selective, magnetic removal of pathogenesis-related proteins from wines	Mierczynska- Vasilev, A., Boyer, P., Vasilev, K., & Smith, P. A.	2017	27	Magnetic Nanoparticles Acrylic acid White wine Pathogenesis related proteins	In this study, a new technology was developed for the removal of pathogenesis-related proteins using magnetic nanoparticles coated with acrylic acid plasma, after analysis of 9 different white wines showed that the proteins were effectively removed and the phenolic composition did not change significantly.	Food Chemistry
Influence of bentonite fining on protein composition in wine	Jaeckels, N., Tenzer, S., Meier, M., Will, F., Dietrich, H., Decker, H., & Fronk, P.	2017	27	Bentonite Haze-related protein Mass spectroscopy	In this study, the influence of a bentonite combined with NaCa on protein content was evaluated, a relationship between surface hydrophobicity and turbidity was observed, thus demonstrating the importance of considering protein isoforms for good adsorption with bentonite.	Food Science and Technology
Spectroscopy reveals that ethyl esters interact with proteins in wine.	Di Gaspero, M., Ruzza, P., Hussain, R., Vincenzi, S., Biondi, B., Gazzola, D.,	2017	14	Aroma Ethyl esters Bentonite Proteins Spectroscopy VVTL1	To evaluate the existence of an interaction between wine proteins and ethyl esters, the effects induced by these compounds on the secondary structure and stability of VVTL1, a thaumatin-like protein, were analyzed. The secondary structure of wine VVTL1 was not strongly affected by the presence of ethyl stress,	Food Chemistry

	Siligardi, G., & Curioni, A.				but the stability of VVTL1 was slightly increased by the addition of ethyl-octanoate, decanoate and -dodecanoate, but decreased by ethyl hexanoate. The data suggest that the removal of proteins from wine by bentonite may result in the indirect removal of at least some aromatic compounds associated with them.	
Study of the potential use of mesoporous nanomaterials as fining agent to prevent protein haze in white wines and its impact in major volatile aroma compounds and polyols.	Dumitriu, G.-D., López de Lerma, N., Luchian, C. E., Cotea, V. V., & Peinado, R. A.	2018	4	Bentonite Nanomaterials SBA-15 MCM-41 Protein haze	In this study, two mesoporous nanomaterials (SBA-15 and MCM-41) were used to prevent protein turbidity in Miscat Ottonel and Pedro Ximenez wines.  They provided a reduction in turbidity and prevented turbidity formation as demonstrated by thermal stability tests.  Those treated with SBA-15 were nearer to the control in terms of volatile compounds.	Food Chemistry
Sulfur dioxide induced aggregation of wine thaumatin-like proteins: Role of disulfide bonds	Chagas, R., Laia, C. A., Ferreira, R. B., & Ferreira, L. M.	2018	11	Wine Haze Sulfur dioxide Protein aggregation	The influence of SO <sub>2</sub> on protein precipitation was studied by isolating the wine proteins and identifying the thaumatins.  The results showed that the protein after exposure to 70 °C showed no differences in the presence or absence of SO <sub>2</sub> , but when the protein solution was cooled to 15 °C, significant changes were observed in the presence or absence of SO <sub>2</sub> .	Food Chemistry
White Wine Protein Instability: Mechanism, Quality	Cosme, F., Fernandes, C., Ribeiro, T., Filipe-Ribeiro,	2020	8	wine protein; wine haze;pathogenesis-related proteins;protein	This overview resumes and discusses the different aspects involved in wine protein instability, from the wine protein instability mechanisms,	Beverages

Control and Technological Alternatives for Wine Stabilisation	L., & Nunes, F. M.			stability tests, protein stability treatments	the protein stability tests used, and technological alternatives available to stabilise wines with protein instability problems	
Use of grape seeds to reduce haze formation in white wines	Romanini, E., McRae, J. M., Bilogrevic, E., Colangelo, D., Gabrielli, M., & Lambri, M	2021	1	Grape sedes Bentonite alternative Haze Protein White wine	<p>Grape seed powder (GSP) has previously been shown to remove PR proteins and reduce turbidity formation on a laboratory scale, in this study using Semillon and Sauvignon Blanc juices.</p> <p>In this study GSP treatment reduced the PR protein concentration of the wine by up to 57% and 37% for Semillon and Sauvignon respectively, and reduced the amount of haze formed in a heat test by up to 75% and 80%, respectively.</p> <p>It was demonstrated that the use of GSP can reduce the amount of bentonite needed to stabilize wines and can provide a sustainable and effective alternative to bentonite, especially for textured white wine styles.</p>	Food Chemistry

