
Influencia de la clarificación sobre la fracción proteica del vino blanco; Efecto preventivo sobre la quiebra proteica y consecuencias organolépticas (aroma, espuma,...)

**Guillem Vanrell, Roser Canals, Joan Miquel Canals y
Fernando Zamora**

Unidad de Enología del Centro de Referencia en Tecnología de Alimentos de la Generalidad de Cataluña (CeRTA). Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Facultad de Enología de Tarragona. Universidad *Rovira i Virgili*.

La presente ponencia pretende hacer algunas reflexiones sobre la clarificación del vino blanco a la luz de los conocimientos actuales que existen sobre el tema, analizando las razones por las cuales se clarifica el vino y cuales son sus consecuencias organolépticas.

Existen de hecho diferentes razones por las cuales la clarificación del vino blanco es imprescindible [1], si bien la necesidad de evitar la quiebra proteica es quizás la más obvia (Figura 1). Ahora bien, el único sistema realmente eficaz para evitar la quiebra proteica es la eliminación de las proteína inestables, lo que únicamente se puede conseguir con el tratamiento con bentonita o mediante ultrafiltración (Figura 2) [2,3]. Otros productos pueden ser excelentes clarificantes pero no protegen contra la quiebra proteica [2].

No obstante, la clarificación con bentonita es un proceso que afecta la calidad sensorial del vino (Figura 3) . Al eliminar gran parte de los proteínas, el vino pierde estructura y untuosidad [4]. Además la bentonita afecta seriamente el aroma del vino, ya absorbe directamente aromas [5] o indirectamente ya que las proteínas son fijadores de aromas y al ser eliminadas del vino arrastran con ellas parte de los aromas [6,7]. Además, las proteínas son moléculas tensoactivas y se ha comprobado que son factores muy positivos para la espumabilidad y la persistencia de la espuma de los vinos espumosos [8,9]. La alternativa de la ultrafiltración también afecta significativamente el aroma y la untuosidad del vino [1,10].

El origen de las proteínas del vino es múltiple, ya que pueden proceder de la misma uva, de las levaduras por autólisis y de los productos de clarificación o de los coadyuvantes de tiraje de naturaleza proteica (Figura 4). Por todo ello, la fracción proteica de un vino estará condicionada por aspectos tales como la variedad vinífera, el grado de madurez, el sistema de vinificación, la cepa de levadura, el tiempo de contacto con las lías, la dosis y el tipo de clarificante empleado, y el en el caso de los

vinos espumosos, por el tiempo de crianza y por el tipo y la dosis del coadyuvante de tirage empleado.

La metodología más utilizada para el estudio de las proteínas del vino blanco es la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS). Esta metodología permite separar las proteínas en función de su masa molecular. En la figura 5 se muestra la separación habitual mediante este método de las proteínas de un vino blanco. En ella se distinguen dos bandas. Una correspondiente a una masa molecular de 60 Kda y otra correspondiente a una banda de 30 Kda. No obstante esta técnica es solo válida para un análisis semicuantitativo, ya que la determinación de la concentración mediante técnicas de análisis de imagen son complejas y poco repetitivas. Además estas técnicas son destructivas y no permiten recuperar las proteínas para futuros análisis complementarios.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado durante los últimos años una metodología para el análisis de la fracción proteica de los vinos blancos mediante FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de exclusión molecular, que permite la separación, recuperación y análisis de las proteínas del vino [11]. Este método permite obtener cuatro picos bien definidos, los cuales pueden ser cuantificados y recuperados. El posterior análisis por PAGE-SDS de dichos picos muestra que el pico F2 corresponde a la banda de 60 Kda, mientras que el pico F3 corresponde a la banda de 30 Kda. El pico F1 corresponde a una masa molecular superior a los 100 Kda y como veremos corresponde a polisacáridos y manoproteínas que no dan lugar a ninguna señal por el sistema de tinción de la PAGE-SDS. Por su parte el pico F4 es masa molecular muy baja y su espectro sugiere que probablemente corresponda a compuestos fenólicos.

El análisis posterior de los picos F1, F2 y F3 por FPLC de intercambio catiónico dio lugar a los resultados indicados en la Figura 6. En ella se puede comprobar que el pico F1 no fue retenido por la columna. El pico F2 dio lugar a un solo pico, por lo que podemos afirmar que se trata de una única proteína. Por su parte el pico F3 dio lugar a múltiples picos, por lo que se trata de un conjunto de proteínas de una masa molecular similar y de diferente carga eléctrica. Estos datos quedan confirmados por el posterior análisis mediante PAGE-SDS de dichos picos.

El análisis mediante cromatografía de afinidad en una columna de Concanavalina A, indica claramente que el pico F1 es de naturaleza glucídica (polisacáridos y manoproteínas), mientras que los otros dos picos parecen no serlo (Figura 7).

Las proteínas inestables (Figura 8) son, según algunos autores [12], aquellas de baja masa molecular (12,6-30 Kda) y de bajo punto isoeléctrico (4,1-5,8). Ahora bien, la bentonita elimina proteínas actuando por interacción electrostática [11]. Por esta razón elimina preferentemente aquellas proteínas que presentan mayor carga eléctrica positiva en el vino, es decir aquellas proteínas de mayor punto isoeléctrico, que serán aquellas que queden más tiempo retenidas por la columna de intercambio catiónico

(Figura 9). Por todo ello, para estabilizar un vino se necesitan normalmente dosis altas de bentonita [1,11].

Durante la vinificación, las proteínas siguen una evolución como la indicada en la Figura 10 [13]. En ella se puede observar que desde el mosto al vino estabilizado hay una continua disminución, debida a la desnaturalización de las proteínas por acción del etanol y de los compuestos fenólicos, así como por su floculación con la bentonita durante el proceso de estabilización. Más concretamente, el análisis de las proteínas inestables por FPLC de intercambio catiónico muestra todo lo dicho anteriormente. Como se puede ver en la Figura 11, en las cinco variedades estudiadas [11,13], se constata que las proteínas que desaparecen preferentemente son aquellas que poseen mayor carga positiva en el vino, mientras que las inestables, las de menor punto isoeléctrico, se ven menos afectadas por los tratamientos de estabilización. Por esta razón en ocasiones hace falta una dosis de bentonita realmente elevada para estabilizar el vino. Ahora bien, ¿cómo podemos saber la dosis más adecuada?

Para determinar la dosis de bentonita necesaria para estabilizar un vino, se utilizan diversos criterios o tests de estabilidad (Figura 12) [14,15]. Se prepara un banco de clarificación en el que a diferentes tubos se añaden dosis crecientes de bentonita o de bentonita asociada a otros clarificantes. El posterior análisis de la turbidez, del color, del índice de colmatación y de la estabilidad proteica deberán ser los criterios de decisión de la dosis más adecuada (Figura 13). El problema es que según el test elegido, la dosis de bentonita necesaria puede variar [14,15].

Un estudio de Dubourdiou et al (1988) [14], muestra el análisis de las proteínas del vino en rama, comparado con las que restan en disolución después de la realización de los diferentes tests de estabilidad (Figura 14). Este estudio constata que el bentotest y el test del ácido tricloroacético (TCA) dan lugar a una eliminación prácticamente total de las proteínas del vino. Por el contrario, el test del tanino enológico apenas afecta a las proteínas del vino. El test del calor por el contrario, hace disminuir la concentración de proteínas bastante pero menos que el bentotest o el test del TCA.

Otro trabajo [15] que estudia comparativamente los diferentes métodos existentes muestra que efectivamente, el bentotest y el test del TCA dan lugar a una sobreestimación de la dosis de bentonita [1,14]. Por todo ello algunos autores [1,14] postulan que el test del calor es el más adecuado. Este método consiste en calentar el vino a 80 °C durante 30 minutos y después enfriar. Si el incremento de la turbidez es inferior a 2 NTU, podemos considerar el vino estable. [1,14].

La decisión sobre la dosis a emplear de bentonita es muy importante, ya que como ya se ha comentado afecta a los aromas, a la untuosidad y a la calidad de la espuma.

Según algunos trabajos [5], la bentonita a dosis de 50 g/hl puede eliminar el 7 % de acetatos de alcoholes superiores, el 10 % del linalol, el 18 % del 2-fenil-etanol, y porcentajes aun mayores de ésteres de ácidos grasos y etanol (Figura 16).

Otro aspecto a tener en cuenta, según algunos autores [6,7], el tipo de bentonita puede actuar eliminando un mayor o menor porcentaje de ciertas sustancias aromáticas [7]. Así en solución sintética tratada con 100 g/hl de diferentes bentonitas se observa que el grado de fijación de beta-Ionona puede variar entre el 5 % y el 25 % (Figura 17). Por esta razón, un criterio de selección de la bentonita, tendría que ser una baja fijación de aromas.

Por otra parte, la acción fijadora de aromas de la bentonita parece ser mayor en presencia de azúcares (Figura 18), por lo que siempre será mejor tratar vinos que mostos. El mismo trabajo [7] confirma que la acción fijadora de aromas de la bentonita se ve incrementada en presencia de proteínas, debido a que estas son fijadoras de aromas y por tanto al eliminarlas se arrastra un mayor porcentaje de sustancias volátiles [6].

Otro aspecto que afecta a la clarificación con bentonita y que es especialmente importante en la elaboración de vinos espumosos es la calidad de la espuma [9]. Nuestro equipo de investigación lleva ya varios años estudiando la fracción proteica del vino y su relación con la calidad de la espuma del Cava.

La medida objetiva de la calidad de la espuma se puede realizar mediante la utilización del Mosalux [16]. Este equipo permite, mediante la detección de la altura de la espuma generada en un vino/cava por el burbujeo de gas carbónico determinar varios parámetros que se correlacionan con la calidad de la espuma (Figura 19). Los parámetros que se determina son tres:

- HM:** Es la altura máxima alcanzada por la espuma, que se asimila a la altura que alcanzará la espuma en la copa al servir el cava.
- HS:** Es la altura en la que se estabiliza la espuma mientras se mantiene el burbujeo. Se asimila a la persistencia de la corona y/o a la capacidad del vino de producir una espuma estable.
- TS:** Es el tiempo que transcurre desde que se detiene el burbujeo hasta que desaparece completamente la espuma. Se asimila a la estabilidad de la espuma cuando la efervescencia decrece.

El estudio de la influencia de los clarificantes más ampliamente utilizados en vino blanco (Figura 20) nos muestra lo siguiente: La gelatina (3 g/hl) provoca un ligero enriquecimiento en proteína que corresponde a la fracción más ligera (F3), lo cual prueba que su utilización en solitario da lugar a un sobreencolado. El gel de sílice (3 cl/hl), los alginatos (2 g/hl) y el tanino enológico (2 g/hl) dan lugar a pequeñas disminuciones de la concentración de proteínas. Por el contrario la bentonita (30 g/hl) dio lugar a una drástica disminución de la concentración de proteínas, especialmente marcada en las fracciones de 60 Kda (F2) y de 30 Kda (F3).

El análisis de la calidad de la espuma (Figura 21), muestra que la gelatina, el gel de sílice y el tanino enológico apenas afectan la espumabilidad (HM) y la persistencia de la espuma (HS). Los alginatos no modifican la espumabilidad (HM) pero en cambio sí que afecta la persistencia de la espuma (HS). Por último, la drástica reducción de la concentración de proteínas que provoca la clarificación con bentonita se traduce en una clara disminución de la espumabilidad (HM) i de la persistencia de la espuma (HS).

La utilización conjunta de gelatina y bentonita, muy utilizada para clarificar los vinos blancos, parece presentar un resultado interesante. La adición previa de gelatina parece ejercer un efecto protector sobre las proteínas naturales del vino (Figura 22). Aparentemente, la presencia de las fracciones de la gelatina que no flocculan inmediatamente actúa reaccionando con la bentonita y disminuyendo parte de su efecto eliminador de proteínas. Todo ello se traduce en que si comparamos el efecto de la clarificación con bentonita exclusivamente con la clarificación conjunta con gelatina y bentonita, se observa que esta última es mucho más respetuosa con la calidad de la espuma (Figura 23), dando lugar incluso a niveles de HM significativamente más altos. Este efecto probablemente este relacionado con el hecho de que la bentonita también elimina lípidos por adsorción, los cuales ejercen un efecto negativo sobre la espumabilidad [17].

De todo lo expuesto parece confirmarse la importancia de las proteínas para la calidad de la espuma. Un experimento que confirma esta relación se muestra en la Figura 24. Un vino en rama, fue clarificado con una dosis muy alta de bentonita con el propósito de eliminar la mayor parte de sus proteínas. Paralelamente, el vino en rama fue utilizado para purificar su fracción proteica, la cual se utilizó para reconstituir la composición proteica del vino clarificado. Como se puede ver en la Figura 24, esto fue perfectamente posible. Pues bien, al analizar los parámetros de la espuma de estos tres vinos (Figura 25), se confirmó que la bentonita, al eliminar las proteínas, afectaba tremendamente a la espuma. Por el contrario el vino al que reconstituíamos su fracción proteica, recuperaba e incluso mejoraba la calidad de su espuma.

En el caso concreto de la elaboración del cava hay que tener también en cuenta otros aspectos que afectan a la fracción proteica y a la calidad de la espuma. Concretamente se trata de la autólisis de las levaduras, que tiene lugar durante el tiempo de permanencia de las lías en la botella. En la Figura 26 se muestra el análisis de la fracción proteica de un vino en rama, del vino clarificado con gelatina y bentonita y del correspondiente Cava obtenido sin la adición de coadyuvante alguno tras 9 meses de crianza. En dicha figura se puede comprobar que entre el vino base y su correspondiente Cava se produce una pequeña disminución del conjunto de proteínas. Esta disminución puede ser atribuida al incremento de la concentración de etanol que tiene lugar durante la toma de espuma y que puede desnaturalizar parte de

las proteínas presentes. Es de destacar que no se detectó un incremento claro de ninguna de las fracciones que pudiera ser atribuido a la autólisis de las levaduras.

En lo que respecta a la calidad de la espuma (Figura 27), si que se observó que la persistencia (HS) y en mayor grado la espumabilidad (HM) se incrementaban claramente entre el vino clarificado y su correspondiente Cava. Esta mejora de la calidad de la espuma tiene lugar a pesar del incremento de la concentración en etanol, negativo para la calidad de la espuma [16], y sin que aparentemente se incremente la concentración en proteínas.

Para poder comprobar la importancia de la autólisis de las levaduras sobre la liberación de coloides nos planteamos el siguiente experimento. En un medio sintético que reproducía el mosto, sin la presencia de coloide alguno, se inocularon levaduras y se mantuvieron en contacto con el medio durante 100 días. Periódicamente se extrajeron muestras para el análisis de la fracción proteica. La Figura 28 muestra los resultados obtenidos. Como se puede ver, las levaduras liberan paulatinamente al medio coloides de masa molecular superior a 100 Kda (F1). El análisis posterior de la fracción F1 de este autolisado por electroforesis capilar dio lugar también a la aparición de dos picos mayoritarios (Figura 29) que se incrementan con el tiempo de contacto con las levaduras. Finalmente, la Figura 30 muestra la comparación de los correspondientes electroforegramas del la Fracción F1 de un vino base y su correspondiente Cava. En ella se confirma que la toma de espuma y la crianza con lías dan lugar a una liberación de coloides procedentes de las levaduras.

Ahora bien, ¿como afecta la autólisis de las levaduras al conjunto de la fracción proteica del vino y a la calidad de la espuma?. La Figura 31 muestra la comparación entre la fracción proteica de un vino en rama, del mismo vino clarificado con una alta dosis de bentonita a fin de empobrecerlo en proteínas, y del mismo vino clarificado después de enriquecerlo con un autolisado de levaduras obtenido en un medio sintético. Como se puede ver la adición de autolisado únicamente incrementa las fracciones de alta masa molecular. Por su parte, la Figura 32 muestra los parámetros de la espuma de los vinos precedentes. Los resultados son claros y se constata que la adición del autolisado incrementa la espumabilidad (HM) y la persistencia de la espuma (HS).

De todo lo expuesto se puede deducir que durante la toma de espuma y crianza del cava, la autólisis de las levaduras libera al medio coloides de alta masa molecular, que detectamos en la fracción F1 y que son positivas para la calidad de la espuma. No obstante, el aumento de la concentración de etanol comporta probablemente la precipitación por desnaturalización de algunas proteínas del vino, haciendo que en el balance global no se observe un incremento de la concentración de proteínas.

Otro aspecto a tener en cuenta en la elaboración de vino espumosos mediante el método tradicional, es que la utilización de coadyuvantes de tirage destinados a facilitar el removido de las botellas antes del degüello, también afecta a las proteínas

y a la espuma. Nuestros trabajos muestran que la utilización de bentonita exclusivamente, comporta una disminución drástica de las proteínas (Figura 33). Así mismo, la utilización de bentonita como coadyuvante de tiraje disminuye enormemente la espumabilidad (HM) y la persistencia de la espuma (HS) (Figura 34). Por el contrario, las combinaciones de bentonita con alginatos, parece ser mucho más respetuosas tanto con la fracción proteica como con la calidad de la espuma.

De todo lo expuesto se vuelve a confirmar que las proteínas, tanto las de origen vegetal, como las liberadas por las levaduras participan en la calidad de la espuma. Para confirmar esto las Figuras 35 y 36, muestran que existe una muy buena correlación estadística entre la concentración de proteínas y la espumabilidad (HM) y la persistencia de la espuma (HS) tanto en vinos base como en Cavas. Esta correlación es especialmente significativa en el caso de la fracción de 30 Kda (F3).

Finalmente, la conservación del vino blanco con las lías, parece ejercer también un efecto muy positivo sobre la estabilidad proteica del vino. Tal y como muestran algunos estudios [1,18], al conservar un vino en contacto con las lías, se incrementa la estabilidad frente a la quiebra proteica. Concretamente la Figura 37 muestra que la conservación de un vino durante 11 meses en contacto con las lías dio lugar a que la dosis necesaria de bentonita para estabilizar el vino disminuyera a la mitad [1] si se utiliza como criterio el test del calor. No obstante se debe tener en cuenta que el bentotest reacciona con las manoproteínas dando lugar a resultados erróneos en este tipo de vinos [1], debido a que el ácido fosfomolibdico reacciona con las manoproteínas de las levaduras originando una sobreestimación de la dosis necesaria.

Parece que son precisamente las manoproteínas liberadas por las levaduras las que ejercen este efecto estabilizador, ya que actúan como coloides protectores e incrementan la estabilidad del vino [1,19]. La Figura 38 muestra un ejemplo de dicho efecto. Un vino enriquecido con 250 mg/l de manoproteínas necesita una dosis muy inferior de bentonita para ser estabilizado.

AGRADECIMIENTOS: Gran parte de los resultados mostrados en esta presentación corresponden a las Tesis doctorales de Guillem Vanrell, la cual ha estado financiada por Martin Vialatte-Station Œnoetchnique de Champagne.

BIBLIOGRAFÍA:

- [1] Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. Y Dubourdieu (1999) Nitrogen compounds. En "Handbook of enology, Vol 2 "The chemistry of wine, Stabilization and treatmets".John Wiley & sons, Ltd, Chichester, pp 99-128.
- [2] Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. Y Dubourdieu (1999) Clarification and stabilization treatments: Finig wine. En "Handbook of enology, Vol 2 The chemistry of wine, Stabilization and treatmets".John Wiley & sons, Ltd, Chichester, pp 271-299.

- [3] Hsu, J.C., Heatherbell, D.A., Flores, J.H. y Watson, B.T. (1987) heat-Unstable proteins in grape juice and wine. II. Charecterization and removal by ultrafiltration. . *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 17-22.
- [4] Ledoux, V. Y Dubourdieu, D. (1994) Stabilisation proteique des vins blancs. *Rev. Œnolog.* **73S**, 41-42.
- [5] Guillou, C., Aleixandre, J.L., Garcia, M.J. y Lizama, V (1998) Clarification influence upon sensorial and analytical characteristics of Muscat dry wine. *J. Internat. Sci. Vigne Vin*, **32**, 111-119.
- [6] Lubbers, S., Voilley, A., Charpentier, C. y Feuillat, M. (1993) Mise en evidence d'interactions entre les macromolecules et les aromes du vin. *Rev. Fran. Œnologie*, **144**, 12-18.
- [7] Lubbers, S., Charpentier, C. y Feuillat, M. (1996) Étude de la rétention des composés d'arôme par les bentonites en moût et milieux modèles. *Vitis*, **35**, 59-62.
- [8] Pueyo E, Martín-Alvarez PJ, Polo MC. 1995. Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cavas (sparkling wines). *Am. J. Enol. Vitic.* 46(4):518-524.
- [9] Brissonet F, Maujean A. 1993. Characterization of foaming proteins in a champagne base wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:297-301
- [10] Flores, J.H., Heatherbell, D.A., Henderson, L.A. y McDaniel, M.R. (1991) Ultrafiltration of wine: effect of ultrafiltration on the aroma and flavor characteristics of white Riesling and Gewurztraminer wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 91-96
- [11] Canals, J.M.; Arola, Ll.; Zamora, F. (1998) Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *Am. J. Enol. Vitic.*, **49**, 383-388.
- [12] Hsu, J.C. y Heatherbell, D.A. (1987) Heat-Unstable proteins wine. I. Charecterization and removal by bentonite fining and heat treatment. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 11-16.
- [13] Canals, J.M. (1997) Aplicación de técnicas de cromatografía líquida de proteínas (FPLC) al estudio de los vinos blancos. Tesis Doctoral. Universidad Rovira i Virgili.
- [14] Dubourdieu, D., Serrano, M., Vannier, A.C. y Ribéreau-gayon, P. (1988) Étude comparée des tests de stabilité protéique. *Conn. Vigne Vin*, **22**, 261-273.
- [15] Toland, T.M., Fugeslsang, K.C. and Muller, C.J. (1996) Methods for estimating protein instability in white wines: A comparison. *Am. J. Enol. Vitic.* **47**, 111-112.
- [16] Maujean, A. Poinsaut, P., Dantan, H., Brissonet, F. y Cossiez, E. (1990) Étude de la tenue et

de la qualité de mousse des vins effervescents. II. Mise au point d'une technique de mesure de la moussabilité, de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bull. OIV*, **63**, 405-427.

- [17] Dussaud, A., Robillard, B., Carles, B., Duteurtre, B. y Vignes-Adler, M (1994) Exogenous lipids and ethanol influences on the foam behavior of sparkling base wines. *J. Food Sci.*, **59**, 148-151.

- [18] Waters, E., Dupin, I. y Stockdale, V. (2000) A review of current knowledge on polysaccharides which 'protect' against protein haze in white wine. *Australian Grapegrower-&-Winemaker*, **438a**, 15-16.

- [19] Waters, E., Pellerin, P. Y Brillouet, J:M. (1994) A Saccharomyces mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydrate Pol.*, **23**, 185-191.