

SMART LINK #9

NUEVAS APROXIMACIONES ANALÍTICAS EN LA EVOLUCIÓN DE LA ESTABILIDAD PROTEICA DEL VINO

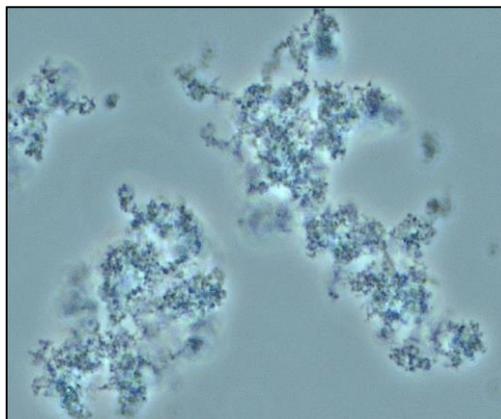
Roland Clémentine*, Nicolato Tommaso*, Renouf Vincent*, Aguado Andrea**, Borinaga Ixone**, Carrillo David** y Palacios Antonio Tomás**

*Laboratoire Excell France, **Laboratorios Excell Ibérica, S.L. – C/Planillo N°12, 26006 Logroño, La Rioja.

En los vinos blancos y rosados la quiebra proteica (*Figura 1*) es un fenómeno asociado a un cambio irreversible en la estructura tridimensional de las proteínas durante el calentamiento del vino que hará que estas proteínas sean insolubles cuando se enfríe. Esta insolubilización forma entonces una neblina primero que da un aspecto velado al vino y posteriormente un precipitado fácilmente observable a simple vista y que puede ser caracterizado bajo la observación al microscopio de una manera sencilla.

En los laboratorios Excell durante un estudio analítico realizado con vinos tomados en góndolas de la distribución masiva, se ha demostrado que el 17% de los vinos eran potencialmente inestables desde el punto de vista proteico (34% de blancos analizados y 2% de rosados).

Figura 1: Observación de un precipitado proteico al microscopio (x400) – (Fuente Laboratorios EF).



En los últimos años, varios fenómenos han contribuido ciertamente a aumentar la frecuencia del problema. Entre estos fenómenos o hipótesis de fenómenos, se deben apuntar los siguientes:

1. Interacciones con otros tratamientos de estabilización, como el uso de goma de celulosa (CMC) o poliaspartato, ambos usados con fines de estabilización tartárica que, sin duda, interactúan con proteínas residuales que no habían mostrado previamente inestabilidad térmica si no se hubieran puesto en contacto con estos productos. Por lo tanto, esto requiere un trabajo de anticipación y, a veces, esfuerzos adicionales de estabilización (dosis más elevadas de bentonita de las habituales).
2. El contenido proteico inicial e intrínseco de las uvas, en particular originado por el estrés hídrico y criptogámico. Está bien establecido científicamente en plantas y bayas en particular que muchas vías de resistencia al estrés involucran agentes proteicos.
3. Protocolos de limpieza del vino y su estabilización cada vez realizados de forma más temprana, lo que reduce las vías de estabilidad adquiridas de forma autónoma y gradualmente durante las rutas enológicas más clásicas (crianza sobre lías, estabilización al frío "natural" que promueve la sedimentación, gestión de las fases de exposición del vino al aire promoviendo la reactividad de ciertos componentes...).
4. Cambios en ciertos parámetros físico-químicos de los vinos, como el pH (cuanto mayor es el pH, menos proteínas cargadas eléctricamente y menos efectivos son los tratamientos de estabilización con bentonita), el contenido de cobre (que interactúa con los grupos -SH- de los aminoácidos azufrados presentes en las proteínas, lo que también ayuda a reducir los fenómenos de precipitación).

En este contexto global, permanecer atrapados detrás de la única prueba analítica tradicional de aplicar calor, no es la mejor forma de dar un servicio adecuado a los clientes de un laboratorio y se deben explorar otras propuestas técnicas más adecuadas. Para este propósito durante el año 2020 hemos realizado un importante estudio de nuevos enfoques analíticos destinados a analizar exhaustivamente la cantidad total de proteínas presentes en las uvas, mostos y vinos y caracterizar los perfiles proteicos para evaluar más finamente los riesgos de inestabilidad en todas las situaciones posibles.

Este artículo detalla este tipo de trabajo y propone diferentes enfoques analíticos según objetivos técnicos y según las prácticas enológicas aplicadas. La primera parte está dedicada a la validación de un método analítico de proteínas; la segunda al desarrollo de un método de caracterización de perfiles proteicos de vinos y finalmente la tercera parte de este escrito evoca a casos concretos con el uso de estos ensayos. Estas posibilidades analíticas proporcionan métodos de gestión preventiva particularmente interesantes (especialmente en el contexto de las acciones que anticipan los tratamientos de estabilización tartárica a seguir en el proceso completo).

Análisis de proteínas

Para medir las proteínas totales del vino se han considerado varios enfoques: el método KDS/Smith (D. Ga-zzola, 2017) y el método Bradford. El método KDS/Smith se basa en la determinación de complejos proteicos por reducción de ácido bicinónico, mientras que el método Bradford se basa en el cambio de color del azul de Coomassie tras la unión con ciertos aminoácidos presentes en las proteínas. Tras numerosas pruebas basadas en adiciones dosificadas de proteínas de referencia en diferentes vinos, se eligió el método Bradford para la realización de este trabajo. El método Bradford es una técnica colorimétrica utilizada para la cuantificación de proteínas que usa el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250. El método se basa en el cambio diferencial del color de este colorante en respuesta a distintas concentraciones de proteínas y fue publicado en 1976 por Marion M. Bradford. El método ha sido adaptado aquí proviniendo de los trabajos de la Tesis de P. Lui (2018).

Se realizaron inicialmente pruebas para definir un rango de calibración. Para ello se trabajó en base a la proteína BSA (proteína extraída del suero bovino, *Figura 2*), pero la proteína BSA no es una proteína presente en el vino, por ello se hizo un segundo rango a partir de la taumatina (*Figura 3*) con una dosis bien precisa que va de 1 mg/L a 20 mg/L.

Figura 2: Rango de calibrado realizado a partir de la proteína BSA.

| DO (nm) | Rango BSA (mg/L) | Concentración en BSA (mg/L) |
|---------|------------------|-----------------------------|
| 0,133 | 5 | 4,04 |
| 0,231 | 10 | 10,4 |
| 0,318 | 15 | 15,4 |
| 0,383 | 20 | 20,27 |

Figura 3: Rango de calibrado realizado a partir de la proteína taumatina.

| DO (nm) | Rango taumatina (mg/L) | Concentración en taumatina (mg/L) |
|---------|------------------------|-----------------------------------|
| 0,02 | 1 | 0,25 |
| 0,085 | 5 | 5,25 |
| 0,159 | 10 | 10,94 |
| 0,217 | 15 | 15,4 |
| 0,268 | 20 | 19,32 |

Más cerca de la realidad de las muestras vínicas, se validó el rango elaborado a partir de la taumatina. En ambos casos se observó una saturación de señal a partir de 20 mg/L de taumatina (o BSA).

Posteriormente se realizaron ensayos en los vinos (ver *Figura 4*) y se ha observado que para muestras consideradas inestables, la concentración total de proteínas varía de 11 a 17 mg/L en equivalente de taumatina. Como las densidades ópticas estaban en rango, no fue necesario diluir las muestras de antemano.

Figura 4: Tabla de recapitulación de concentración de proteínas en los vinos.

| Muestras | Δ D.O. 395nm | Concentración en BSA (mg/L) |
|----------|---------------------|-----------------------------|
| 1 | 0,237 | 16,9 |
| 2 | 0,163 | 11,2 |
| 3 | 0,197 | 13,9 |
| 4 | 0,201 | 14,2 |
| 5 | 0,222 | 15,8 |
| 6 | 0,22 | 15,6 |
| 7 | 0,229 | 16,3 |
| 8 | 0,234 | 16,7 |
| 9 | 0,232 | 16,6 |

Los resultados obtenidos con el ensayo del método Bradford y las diversas pruebas al calor realizadas en el laboratorio en los últimos meses, han permitido evaluar un contenido "crítico" de 10 mg/L en concentración equivalente en taumatina. Por lo tanto, este contenido de 10 mg/L se considera como un umbral de aceptabilidad al evaluar la estabilidad futura de las proteínas. Por ejemplo, si un vino blanco es naturalmente estable con la prueba de calor, pero contiene una

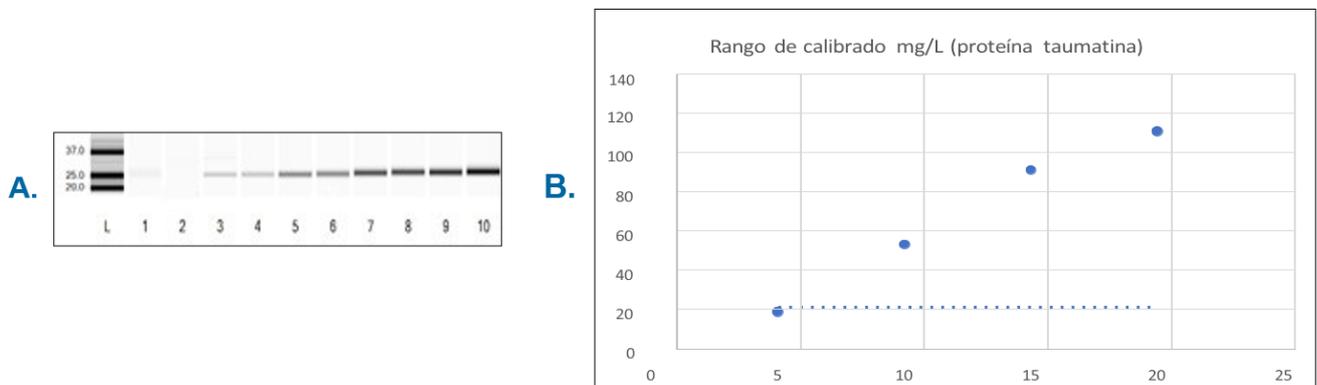
concentración de proteínas a este nivel de concentración (lo que puede significar que las proteínas inherentemente termoestables todavía están presentes en una concentración significativa), entonces aún es recomendable un esfuerzo para reducir este contenido de proteínas en un posible tratamiento de CMC y así conseguir la estabilización tartárica.

Perfil proteico

Una vez que la cuantificación de las proteínas totales es posible mediante la prueba mencionada anteriormente, lo ideal es desarrollar una vía analítica que proporcione una descripción del tipo de proteínas presentes. Probando diferentes tipos de sistemas electroforéticos, el elegido fue el sistema BioanalyZer[®] propuesto por Agilent. La *Figura 5* ilustra el potencial de finura de este sistema analítico en un rango establecido y llevado a cabo con la taumatina.

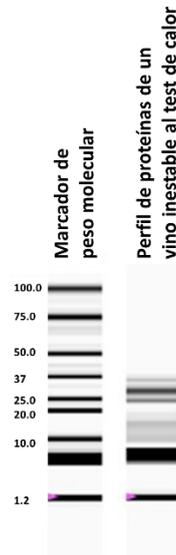
Figura 5A: Gel de electroforesis con los puntos de calibración en un rango que va desde 5 hasta 20 mg/L de taumatina.

Figura 5B: Representación de la curva de calibración.



Después de diferentes etapas de preparación de las muestras, se pueden establecer perfiles de proteínas similares a los que aparecen en la *Figura 6* con la finalidad de caracterizar las proteínas presentes según su peso molecular. La literatura, relativamente bien detallada, permite identificar estas proteínas (Sluyter, 2015).

Figura 6: Ilustración de un perfil proteico de un vino inestable al test del calor obtenido por electroforesis capilar.



En la gran mayoría de los vinos, las proteínas que se encuentran en las muestras son quitinasas y glucanasas. La *figura 6* ilustra por ejemplo el perfil de un vino inestable al calor. El número de bandas y la intensidad de estas se utilizan para sobreestimar los resultados de la prueba de estabilidad al calor y para proponer una dosis más efectiva de bentonita.

Conclusiones y proposiciones analíticas

Para determinar la dosis de bentonita necesaria con el objetivo de obtener la estabilización proteica de un vino blanco o rosado, la prueba de calor sigue siendo, en nuestra opinión, la referencia, siempre que se respeten ciertos elementos esenciales (preparación de la muestra, tiempo y temperatura aplicada, enfriamiento de la misma, control de la dosis de bentonita determinada por la primera prueba, etc.). Con frecuencia se ha probado y comparado esta prueba con otras alternativas, pero por nuestra parte permanecemos fijos en esta opción.

Sin embargo, dada la creciente sensibilidad del problema en vista de las nuevas tecnologías enológicas empleadas en bodega, hemos tratado de asociar complementos analíticos con esta prueba para anticipar mejor los procesos de estabilización en su conjunto. Para ello, Laboratorios Excell ha desarrollado dos elementos analíticos adicionales: la determinación de proteínas totales y la caracterización del perfil proteico del vino. En las especificaciones de estos desarrollos, se han fijado como objetivos que estos análisis fueran rápidos, económicos y fácilmente interpretables en

comparación con referencias bien establecidas (equivalencia en proteínas de referencia, por ejemplo...). La cuantificación de las proteínas totales parece un punto esencial. En un momento determinado en un vino, puede que no todas las proteínas sean termoestables, entonces el tratamiento de bentonita determinado por la prueba de calor eliminará solo estas últimas. Por lo tanto, si inicialmente el contenido de proteínas es elevado, se debe anticipar un posible riesgo si otras operaciones a realizar posteriormente pueden interactuar con las proteínas residuales.

El perfil proteico permite además caracterizar las proteínas presentes en un vino. Este análisis puede intervenir particularmente en el caso de encontrar dificultades recurrentes en la estabilización proteica de un lote o de un vino determinado con el fin de conocer las proteínas que lo componen. La prueba también se puede realizar en varias etapas del desarrollo durante la elaboración del vino para especificar la interacción de esta o aquella técnica sobre el contenido de proteínas. Esta prueba también podría convertirse pronto en un elemento clave para objetivar los tratamientos basados en proteasa que se están validando en su empleo en bodega por parte de la OIV (Resolución OIV-OENO 541B-2021 y 625-2021), siendo una futura nueva opción en estos procesos de estabilización, lo que permitiría comparar los perfiles obtenidos antes y después del tratamiento.

Basándonos en estos desarrollos, se ofrecen ahora 3 posibles fórmulas analíticas en el análisis de la estabilidad proteica de los vinos blancos y rosados (cada análisis, por supuesto, se puede realizar de forma aislada):

- El paquete **StabProt S**: prueba al calor para determinar la dosis de bentonita y posterior control de la eficacia de esta dosis.
- El paquete **StabProt M**: prueba al calor para la determinación de la dosis de bentonita + determinación de proteínas totales y control de la efectividad de la dosis determinada por la prueba al calor y de esta dosis aumentada en caso de cuantificación significativa de proteínas totales (>10 mg/L equivalente en Taumatina).
- El paquete **StabProt L**: prueba al calor para determinar la dosis de bentonita + determinación de proteínas totales y posterior control de la efectividad de la dosis determinada por la prueba al calor y este aumento de la dosis en caso de cuantificación significativa de proteínas totales (>10 mg/L equivalente en Taumatina) + perfiles proteicos antes y después de los tratamientos con bentonita.

Estas 3 fórmulas están disponibles en dos versiones, la versión clásica anteriormente mencionada, realizada en la muestra de vino tal y como la recibimos en el laboratorio y una versión para la que se realizan las pruebas sobre el vino tal y como está y también sobre el vino con la adición del tratamiento de estabilización tartárica que probablemente se utilizase más adelante (CMC, poliaspartato, etc...) con el fin de anticipar también la posible interacción de estos tratamientos con la estabilidad proteica que se habría estudiado y así evitar tener que evaluar una vez más la dosis de bentonita (y todos los inconvenientes relacionados con este tipo de situaciones: nueva filtración, pérdida de tiempo, vino, disolución de oxígeno...).

Figura 7: Tabla de fórmulas analíticas en el análisis de la estabilidad proteica de los vinos blancos y rosados.

| | Pack StabProt S | Pack StabProt M | Pack StabProt L |
|-------------------------------------|---|---|---|
| Test al calor | X | X | X |
| Análisis de proteínas toatales | | X | X |
| Perfil electroforético de proteínas | | | X |
| Bajo demanda | Con o sin la adición de CMC o poliasparto | Con o sin la adición de CMC o poliasparto | Con o sin la adición de CMC o poliasparto |

Bibliografía

- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.
- Gazzola D, Vincenzi S, Marangon M, Pasini G, Curioni A. (2017). Grape seed extract: the first protein-based fining agent endogenous to grapes. Aust. J Grape Wine R.; 23: 215-225.
- Steven C. Van Sluyter, Jacqui M. McRae, Robert J. Falconer, Paul A. Smith, Antony Bacic, Elizabeth J. Waters, and Matteo Marangon, (2025). Wine Protein Haze: Mechanisms of Formation and Advances in Prevention. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63 (16), 4020-4030.