



Universitat Rovira i Virgili

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Química

Departament d'Enginyeria Química

Estabilización proteica de vinos blancos mediante adsorción
en columnas de relleno

Memoria presentada por

Vesselina Petrova Pachova

para optar al Título de Doctor en Ingeniería Química

Tarragona, 2002

El Dr. Francisco López Bonillo, Catedrático de Escuela Universitaria del Departament d' Enginyeria Química de la Universitat Rovira i Virgili, director del trabajo de investigación realizado por la Sra. Vesselina Petrova Pachova titulado:

Estabilización proteica de vinos blancos mediante adsorción en columnas de relleno

para optar al grado de Doctor en Ingeniería Química por la Universidad Rovira i Virgili,

HACE CONSTAR:

Que el citado trabajo es original y que todos los resultados presentados y los análisis realizados son fruto de su investigación.

Y para vuestro conocimiento y los efectos que correspondan, firma este documento.

Tarragona, 7 de junio de 2002

Francisco López Bonillo

RESUMEN

La estabilización proteica del vino blanco es una etapa importante en su elaboración, y tiene una relación muy estrecha con la comercialización del producto final. Los métodos tradicionales utilizados en la mayoría de las bodegas consisten en operaciones discontinuas con adición de material adsorbente, que requieren mucha mano de obra, hay pérdida de producto y se generan residuos que tienen un impacto ambiental elevado.

En este trabajo se ha estudiado la alternativa de utilizar materiales adsorbentes que permitan disminuir o eliminar las desventajas existentes.

Después de una revisión bibliográfica detallada se eligieron el óxido de zirconio y el óxido de aluminio, en diferentes granulometrías y grados de acidez, para estudiar la posibilidad de transformar el proceso de estabilización proteica tradicional discontinuo, en un proceso continuo mediante adsorción con óxidos metálicos empacados en una columna.

Los resultados obtenidos muestran que dicha transformación es posible, y que el óxido de zirconio es un adsorbente que muestra una selectividad con las fracciones proteicas del vino, se puede regenerar, se puede empacar en una columna sin causar problemas técnicos y no modifica las características fisicoquímicas del vino tratado, cumpliéndose así todos los requisitos buscados, obteniendo finalmente un vino blanco estabilizado.

Me gustaría ofrecer mis agradecimientos a todas las personas y entidades que me han ayudado con el desarrollo del presente trabajo.

En primer lugar, al presidente y a los otros miembros del tribunal por aceptar ser miembros de éste.

Al Dr. Francisco López Bonillo, director del presente trabajo, por su constante dedicación, por el soporte que me ha manifestado en todo momento y por sus valiosas orientaciones y sugerencias.

A la Cooperativa de Vila-Rodona y en especial al Sr. Joan Rabadà por el suministro de muestras de vino blanco.

Al MEL Chemicals y especialmente a Gary Monks por el suministro de muestras de óxido de zirconio.

Al Ministerio Español de Educación, Cultura y Deporte por el soporte financiero.

Al Departament d'Enginyeria Química y la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili, por poner en mi disposición sus instalaciones.

A los miembros del Grupo de Investigación en Tecnología de Alimentos (GITA) por su apoyo y amistad durante todo el tiempo y especialmente a la Dra. Carme Güell Saperas por sus consejos y sugerencias.

A los compañeros del programa de doctorado del Departament d'Enginyeria Química.

A Jorge Velásquez por su permanente apoyo.

A mi familia y a todos los amigos.

ÍNDICE

RELACIÓN DE TABLAS	IV
RELACIÓN DE FIGURAS	V
I. Introducción y Objetivos	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Objetivos.....	2
II. Antecedentes	3
2.1. Definición y clasificación del vino.....	3
2.2. Proteínas del vino	4
2.3. Métodos de estabilización proteica	6
2.4. Adsorción de proteínas sobre óxidos metálicos	9
2.5. Adsorción en columna de relleno	11
III. Metodología.....	13
3.1. Materiales	13
3.2. Equipos	15
3.2.1. Equipo para analizar la superficie específica	15
3.2.2. Equipo para la experimentación en discontinuo.....	16
3.2.3. Equipo para la experimentación en continuo	17
3.3. Procedimiento experimental.....	20
3.3.1. Preparación de soluciones modelo	20
3.3.2. Preparación y realización de la experimentación	22

3.3.3.	Análisis de las muestras.....	24
3.3.3.1.	Proteínas	24
3.3.3.2.	Test de estabilidad proteica	26
3.3.3.3.	pH	27
3.3.3.4.	Acidez total.....	27
3.3.3.5.	Acidez volátil.....	27
3.3.3.6.	Acidez fija	28
3.3.3.7.	Azúcares reductores.....	28
3.3.3.8.	Grado alcohólico volumétrico	29
3.3.3.9.	Extracto seco total	29
3.3.3.10.	Cenizas	30
3.3.3.11.	Cloruros	30
3.3.3.12.	Sulfatos	31
3.3.3.13.	Fenoles totales	31
3.3.3.14.	Características cromáticas	32
3.3.4.	Regeneración de los adsorbentes.....	32
IV.	Resultados y discusiones	35
4.1.	Isotermas de adsorción	35
4.2.	Curvas de adsorción operando en continuo con soluciones modelo	41
4.3.	Efecto de la regeneración sobre la capacidad adsorbente del óxido zirconio después de un tratamiento con soluciones modelo.....	43
4.4.	Estudios de estabilización proteica en continuo con un vino blanco	45
4.4.1.	Experimentación en escala pequeña.....	45

4.4.2. Experimentación en escala media.....	52
4.5. Efecto de la regeneración sobre la capacidad adsorbente del ZrO ₂ -(po) ^{□□} y ZrO ₂ -(pe) en escala media.....	59
4.6. Estabilidad proteica y caracterización de los vinos.....	64
4.6.1. Estabilidad de los vinos obtenidos.....	64
4.6.2. Características físico-químicas de los vinos obtenidos.....	70
V. Conclusiones.....	77
5.1. Isotermas de adsorción.....	77
5.2. Adsorción en continuo con solución modelo.....	77
5.3. Estabilización proteica en continuo para el vino blanco.....	77
5.4. Regeneración de los adsorbentes.....	78
VI. Bibliografía.....	80

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla I. Propiedades físicas de los adsorbentes estudiados.....	14
Tabla II. Propiedades de las proteínas usadas	14
Tabla III. Condiciones de los experimentos en escala pequeña.....	46
Tabla IV. Estabilidad proteica del vino blanco Chardonnay (2000).....	51
Tabla V. Condiciones de los experimentos en escala media	52
Tabla VI. Estabilidad proteica del vino blanco Chardonnay (2001), tratado con óxido de zirconio en polvo nuevo.....	65
Tabla VII. Estabilidad proteica del vino blanco Chardonnay (2001), tratado con óxido de zirconio en polvo regenerado.....	65
Tabla VIII. Estabilidad proteica del vino blanco Chardonnay (2001), tratado con óxido de zirconio en partículas nuevo	66
Tabla IX. Estabilidad proteica del vino blanco Chardonnay (2001), tratado con óxido de zirconio en partículas regenerado	66
Tabla X. Características físico – químicas de las fracciones acumuladas del vino blanco tratado con $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ regenerado	73
Tabla XI. Características físico – químicos de las fracciones acumuladas del vino blanco tratado con $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ nuevo	74
Tabla XII. Características físico – químicos de las fracciones acumuladas del vino blanco tratado con $ZrO_2-(pe)$ nuevo.....	75
Tabla XIII. Características físico – químicos de las fracciones acumuladas del vino blanco tratado con $ZrO_2-(pe)$ regenerado.....	76

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de concentración a la salida de una columna empacada en forma de “S” (<i>Breakthrough curve</i>).....	12
Figura 2. Equipo de análisis BET.....	16
Figura 3. Esquema del equipo para la experimentación en discontinuo.....	17
Figura 4. Equipo para los experimentos en continuo en escala pequeña.....	18
Figura 5. Equipo para los experimentos en continuo en escala media.....	19
Figura 6. Procedimiento experimental general.....	20
Figura 7. Procedimiento de preparación de soluciones modelo de proteínas.....	21
Figura 8. Tipos de isotermas de adsorción.....	35
Figura 9. Isotermas de adsorción de BSA en óxido de zirconio.....	37
Figura 10. Isotermas de adsorción de OVAL en óxido de zirconio.....	38
Figura 11. Isotermas de adsorción de LYS en óxido de zirconio.....	39
Figura 12. Curva de saturación de BSA en $ZrO_2-(po)^{\square}$, caudal 0.2 mL/min.....	42
Figura 13. Curva de saturación de BSA en $ZrO_2-(pe)$, caudal 2.0 mL/min.....	42
Figura 14. Comparación de la regeneración del sistema BSA – $ZrO_2-(po)^{\square}$ en condiciones discontinuas.....	44
Figura 15. Comparación de la regeneración del sistema BSA – $ZrO_2-(po)^{\square}$ en condiciones continuas.....	44
Figura 16. Curvas de saturación de proteínas totales del vino blanco (2000).....	47
Figura 17. Curvas de saturación de las fracciones proteicas del vino blanco (2000) en $ZrO_2-(po)^{\square}$	48

Figura 18. Curvas de saturación de las fracciones proteicas del vino blanco (2000) en una mezcla de $ZrO_2-(po)^{\square}$ y $ZrO_2-(pe)$	50
Figura 19. Curvas de saturación de vino blanco (2001) en $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ nuevo	53
Figura 20. Curvas de saturación de vino blanco (2001) en $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ regenerado	55
Figura 21. Curvas de saturación de vino blanco (2001) en $ZrO_2-(pe)$ nuevo.....	57
Figura 22. Curvas de saturación de vino blanco (2001) en $ZrO_2-(pe)$ regenerado.....	58
Figura 23. Comportamiento de proteínas totales del vino blanco (2001) a través de una columna empacada en escala media.....	60
Figura 24. Comportamiento de la fracción proteica (> 70 kDa) del vino blanco (2001) a través de una columna empacada en escala media.....	60
Figura 25. Comportamiento de la fracción proteica (de 50 a 70 kDa) del vino blanco (2001) a través de una columna empacada en escala media.....	62
Figura 26. Comportamiento de la fracción proteica (de 20 a 30 kDa) del vino blanco (2001) a través de una columna empacada en escala media.....	62
Figura 27. Comportamiento de la fracción proteica (de 15 kDa) del vino blanco (2001) a través de una columna empacada en escala media.....	63
Figura 28. Relación entre la estabilidad proteica y la eliminación de las fracciones proteicas presentes en el vino analizado después del tratamiento con $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ nuevo	67
Figura 29. Relación entre la estabilidad proteica y la eliminación de las fracciones proteicas presentes en el vino analizado después del tratamiento con $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ regenerado.....	68

Figura 30. Relación entre la estabilidad proteica y la eliminación de las fracciones proteicas presentes en el vino analizado después del tratamiento con ZrO ₂ -(pe) nuevo.....	68
Figura 31. Relación entre la estabilidad proteica y la eliminación de las fracciones proteicas presentes en el vino analizado después del tratamiento con ZrO ₂ -(pe) regenerado.....	69
Figura 32. Medida del color: <i>Luminosidad</i> (Intensidad).....	70
Figura 33. Medida del color: <i>Tonalidad</i>	71

I. Introducción y Objetivos

1.1. Introducción

El vino es una de las bebidas de baja graduación alcohólica que presenta un interés comercial elevado, por ello se realizan investigaciones sobre todo en los aspectos que están relacionados con la posibilidad de mejorar o facilitar la elaboración de este producto.

El interés de este trabajo está enfocado en las fracciones coloidales del vino, especialmente en las proteínas que tienen una influencia considerable sobre algunas de las operaciones básicas como la filtración, clarificación y estabilización en frío. La presencia de estas macromoléculas en el vino puede formar precipitados o causar turbidez que afectan su estabilidad y aspecto.

Aunque existen diferentes formas de reducir el nivel de proteínas presentes en el vino, todavía se está investigando la manera más adecuada para eliminarlas. Esto proviene del hecho de que no todas las proteínas son indeseables, puesto que algunas de ellas forman enlaces con componentes volátiles, estabilizándose el aroma del vino, otras afectan sus propiedades organolépticas, confiriendo cuerpo y volumen. En los cavas y vinos espumosos contribuyen en la estabilización de la espuma.

Algunos de los métodos empleados para estabilizar proteicamente el vino son la clarificación con ácido tánico, el tratamiento con enzimas proteolíticas, la adsorción con bentonita, la adsorción con gel de sílice, la adsorción con resinas o la ultrafiltración.

Entre ellos, el método más usual es la adición de bentonita, que es un excelente adsorbente pero no es selectivo. La bentonita elimina tanto las proteínas inestables del vino como las que convendría conservar. Otros inconvenientes que presenta desde el punto de vista de

operación es que su aplicación es mediante un proceso discontinuo y simultáneamente genera residuos.

La estabilización proteica mediante la ultrafiltración, que utilizan membranas tanto orgánicas como minerales, las cuales son regenerables del ensuciamiento por proteínas, causan una disminución notable de la calidad del vino.

Siguiendo este orden de ideas últimamente, en el proceso de eliminación de las proteínas inestables del vino se están estudiando nuevos adsorbentes que permitan resolver los problemas anteriores, y que se puedan regenerar fácilmente sin producir residuos. Unos adsorbentes que cumplen estos requisitos son los óxidos metálicos.

1.2. Objetivos

El **objetivo general** de este trabajo es sustituir el proceso de eliminación de las proteínas inestables del vino blanco con bentonita mediante una operación continua, que utilice la capacidad de adsorción de óxidos metálicos empacados en una columna de relleno.

El **primer objetivo** es estudiar el proceso de adsorción con óxidos metálicos de diferentes proteínas presentes en una solución modelo.

El **segundo objetivo** es estudiar el proceso de la eliminación de proteínas, tanto en solución modelo, como en un vino blanco joven en continuo, mediante la adsorción en una columna de relleno.

II. Antecedentes

2.1. Definición y clasificación del vino

La primera definición del vino existe desde siglo XIX cuando Louis Pasteur lo definió como “la más sana e higiénica de las bebidas”. Aunque esta es una buena definición, la Oficina Internacional de la Vid y del Vino (O.I.V.) da una definición oficial:

“El vino es la bebida resultante de la fermentación alcohólica total o parcial de la uva fresca o del mosto”.

En particular, el vino blanco es procedente de uva blanca o de uva tinta con pulpa no coloreada y elaborado por fermentación única del jugo de uva sin las partes sólidas del racimo.

Existen varios criterios para caracterizar un vino. Además de la clasificación más trivial por el color, también se puede definir una por el contenido de los azúcares reductores, la cual en el caso del vino blanco es:

- **Secos:** si no contienen una cantidad de azúcar residual perceptible en la degustación (menos de 5 g/L de azúcares reductores).
- **Abocados:** si contienen una pequeña cantidad de azúcar perceptible en la degustación, por no haber fermentado en su totalidad (5-15 g/L de azúcares reductores).
- **Semisecos:** 15-30 g/L de azúcares reductores.
- **Semidulces:** 30-50 g/L de azúcares reductores.
- **Dulces:** si el contenido en azúcares residuales es mayor que 50 g/L en azúcares reductores.

El vino es un líquido complejo que está formado por más de 800 compuestos, algunos de ellos aún hoy no identificados o al menos no totalmente (Mijares y Sáez, 2000). Una parte, aunque no muy grande, pero con importancia, de estos compuestos presentes en el vino, son las proteínas.

2.2. Proteínas del vino

El conocimiento de la fracción proteica del mosto de uva o del vino, tiene gran interés debido a que puede causar turbidez y aparición de sedimentos en el producto final después de embotellarlo. Las proteínas son responsables también de la ralentización de la precipitación del bitartrato potásico. Estos problemas tecnológicos están más relacionados con la naturaleza de las proteínas y sus interacciones con el medio, que con la concentración en que se encuentran en el mosto o en el vino, por lo que es importante caracterizarlas.

Las proteínas del vino muestran una variabilidad muy amplia. Su perfil es resultado de la influencia de diferentes factores como el clima (Colby, 1986), el terreno (Colby, 1986), las condiciones de crecimiento de las viñas, la madurez de la uva (Murphy y otros, 1989), las condiciones de la vinificación, etc. Las proteínas que provienen de las uvas constituyen el porcentaje más alto de las proteínas totales del vino. La mayoría de ellas tienen un peso molecular menor de 70 kDa (Sarmiento y otros, 2000), aunque existen algunas entre 11 y 160 kDa, y con un punto isoeléctrico (pI) entre 3.1 y 9.2 (Moio y Addeo, 1989). Santoro, (1995) en su estudio de varios tipos de vinos y mostos producidos de distintas variedades de uva, encuentra diferentes fracciones proteicas con un peso molecular entre 6 y 200 kDa y pI entre 3.6 y 4.8. Marchal y otros, (1996) también muestran la existencia de dos grandes

grupos de proteínas. El primer grupo contiene proteínas con un peso molecular de 14, 17, 27 y 30 kDa y pI de 2.5. El otro grupo contiene dos fracciones proteicas con un peso molecular de 24-25 y 60-64 kDa y su pI es de 3.9. Dawes y otros, (1994), han mostrado la presencia de cinco grupos de proteínas de diferentes pI. También han concluido que el grupo proteico con mayor pI (≥ 7) precipita en una manera compacta. Las proteínas de pI entre 4.65-5.94 precipitan 4-5 veces más que las anteriores, formando flóculos. Finalmente el grupo de menor pI (< 4.65) provoca turbidez en el vino.

Las fracciones proteicas de menor peso molecular (13 y 20 hasta 30 kDa) y menor pI (4.1-5.8) son las proteínas que contribuyen mayoritariamente a la inestabilidad del vino (Waters y otros, 1991; Hsu y Heatherbell, 1987; Mesrob y otros, 1983). Además Waters y otros, (1992) han encontrado que las proteínas con peso molecular de 24 kDa producen alrededor de un 50 % de turbidez más que las proteínas de 32 kDa.

Dependiendo del tipo del vino las proteínas totales pueden variar entre 14.2 y 275 mg/L (Sarmiento y otros, 2000) o entre 15 y 230 mg/L (Monteiro y otros, 2001). Algunos estudios indican que la estabilidad proteica tiene relación con el contenido total de las proteínas (Anelli, 1977; Moretti y Berg, 1965; Koch y Sajak, 1959). Otros al contrario - que no tiene (Mesquita y otros, 1999; Somers y Ziemelis, 1973; Bayly y Berg, 1967).

En el vino español el nivel de las proteínas es del orden de 15– 45.2 mg/L (González-Lara y otros, 1989). Los mismos autores detectan bandas de pesos moleculares comprendidos entre 11.5 y 70 kDa, estando las mayoritarias en la zona entre 20 y 35 kDa. Los pI de las proteínas están entre 3.8 y 8.5, agrupándose la mayoría en las zonas de pH más ácidas.

La precipitación de las macromoléculas, depende no solo de su naturaleza sino de las interacciones con el medio. Las interacciones con fenoles (Waters y otros, 1992; Yokotsuka

y otros, 1983), taninos (Mesrob y otros, 1983), o cationes - básicamente de cobre (Kean y Marsh, 1956), el pH (Mesquita y otros, 1999), la fuerza iónica, la concentración alcohólica o la temperatura (Mesquita y otros, 1999) son las más importantes. Vernhet y otros, (1996) han concluido que los polisacáridos estudiados tienen una carga negativa la cual les permite interactuar con otros componentes, partículas o medios porosos, mientras que los polifenoles encontrados tienen una carga despreciable y por esta razón ellos no interactúan con el medio. Correa-Gorospe y otros, (1991), han estudiado otro fenómeno - el efecto de la coprecipitación de las proteínas y los fenoles del vino con el bitartrato potásico. Las fracciones proteicas encontradas en este precipitado del bitartrato potásico tienen un peso molecular menor de 20 kDa o mayor de 50 kDa y un pI entre 4.3 y 5.1.

2.3. Métodos de estabilización proteica

La transparencia de un vino es de una importancia vital que el consumidor valora y exige. La aparición de turbidez o sedimentos, en la mayoría de los casos, es equivalente a signos de degradación. Las proteínas inestables del vino se pueden reducir o eliminar completamente aplicando diferentes métodos.

El método más usual en la industria enológica es la adsorción de las proteínas con bentonita, que se suele emplear tanto en forma sódica como cálcica. En diferentes estudios (Lubbers y otros, 1995; Blade y Boulton, 1988), la bentonita sódica ha presentado mayor capacidad de adsorción que la bentonita cálcica. La eliminación de las diferentes fracciones de proteínas, tanto desde un punto de vista de su peso molecular como su punto isoeléctrico es un aspecto aún contradictorio y no bien establecido. Según han supuesto Hsu y Heatherbell, (1987), las primeras fracciones proteicas que se adsorben en la bentonita

tienen un punto isoeléctrico entre 5.8 y 8, y un peso molecular intermedio, 32-45 kDa. Las fracciones proteicas estudiadas por Santoro, (1995) están afectadas en distinta manera en el proceso de clarificación con bentonita – las proteínas con alto peso molecular no son completamente eliminadas. Achaerandio y otros, (2001) en estudios, utilizando soluciones modelo de vino, sobre la capacidad de adsorción de la bentonita, indican la importancia del volumen de las proteínas y el efecto que tiene sobre el proceso de adsorción. En el mismo trabajo los autores concluyen que la presencia del etanol aumenta la separación entre las capas de bentonita, favoreciendo la adsorción de las proteínas de mayor peso molecular debido a su mayor accesibilidad a los centros activos. Murphy y otros, (1989) concluyen que las fracciones proteicas con un pI menor de 3.5 pueden ser muy resistentes y además, la dificultad en eliminarlas aumenta con el pH, que está relacionado con la madurez de la uva. Al contrario, Dawes y otros, (1994), encontraron que la bentonita no es selectiva para las proteínas con diferente punto isoeléctrico. Además de las ventajas que tiene este método, sus dificultades - destacando las implicaciones ecológicas, el tratamiento de los residuos y la mejora en las condiciones de trabajo - son las que motivan las nuevas investigaciones en este campo.

Para sustituir total o parcialmente el tratamiento con bentonita se puede adicionar goma arábica (Giacomini y Giacomini, 1991). Este estabilizante actúa como coloide protector e impide el engrosamiento de los coloides inestables y por tanto su floculación y sedimentación.

Otro método utilizado para la estabilización proteica es el tratamiento con enzimas proteolíticas (Waters y otros, 1990; Nagaba-Mbiakop, 1981). Sin embargo, por debajo de 15-18 °C, temperatura óptima para elaborar buenos vinos blancos, estas enzimas no han sido eficaces.

El vino, también se puede estabilizar haciéndolo pasar a través de ácido tánico inmovilizado (Weetall y otros, 1984). Según este artículo las proteínas y los taninos del vino se pueden eliminar sin afectar el nivel de los péptidos ni la acidez del vino. En este mismo campo han trabajado Chibata y otros, (1986) y concluyeron que el tanino inmovilizado es un adsorbente mejor para las proteínas y los metales iónicos, comparado con los adsorbentes convencionales. Además este adsorbente es química y físicamente estable y seguro. El mayor inconveniente de este método es su elevado costo.

Powers y otros, (1988) han ensayado la eliminación de las proteínas del vino a través de una columna con proantocianidina de la uva inmovilizada en una pequeña escala. La estabilidad proteica se logra después de eliminar un mínimo de 43 % de las proteínas. La baja capacidad, de tan solo 17 volúmenes de lecho (BV), de la eliminación de las proteínas no justifica la aplicación de este método en la industria enológica. Igualmente la regeneración con 0.1 M NaOH y la equilibración posteriormente con 0.1 M acetato de sodio, pH 4, disminuye la capacidad de adsorción a 15 BV.

Se ha investigado (Waters y otros, 1993) el efecto de disminuir la turbidez visible en el vino, añadiendo diferentes cantidades del denominado “Factor de protección de turbidez” (Haze Protection Factor, HPF). El HPF es una combinación de 96 % de polisacáridos y 4 % de proteínas, aunque la parte proteica no es la responsable de la preservación del enturbiamiento visible. Se supone que este factor reduce el tamaño de las partículas y así decrece la opacidad.

La ultrafiltración es otro método muy usado para estabilizar el vino. Flores y otros, (1990) han utilizado esta técnica y han encontrado que la reducción del color, de los polifenoles totales, de las proteínas y de la inestabilidad en general ha sido significativa. Los inconvenientes principales de la aplicación de este método en la industria enológica son los

bajos rendimientos del caudal de filtración, y la retención por parte de las membranas de determinados compuestos, lo que podría ocasionar una pérdida de calidad en el producto (Güell y otros, 1999; López y otros, 1992).

Últimamente Gump y Huang, (1999) han realizado estudios para eliminar las proteínas inestables del vino utilizando como adsorbente diferentes tipos de resinas. Los resultados obtenidos son los siguientes: la adsorción en las resinas no cambia el pH, ni la acidez ni los cationes contenidos en el vino, elimina algunos metales pesados, reduce el nivel de los polifenoles y las proteínas, pero por otro lado afecta el color y el aroma del vino.

2.4. Adsorción de proteínas sobre óxidos metálicos

El interés del comportamiento de las proteínas sobre una superficie de los óxidos metálicos proviene desde el comienzo del uso de las membranas cerámicas para la ultra- o microfiltración de las bebidas en la industria alimentaria y en particular para la clarificación y estabilización del vino. Se han estudiado los efectos de los polisacáridos en el microfiltración de varios vinos con membranas microporosas de óxido de zirconio y de alúmina (Belleville y otros, 1992; Brillouet y otros, 1989). La reducción del flujo y la retención de los coloides no están relacionadas con la concentración de los polisacáridos del vino, sino más probablemente con su naturaleza y con la distribución relativa de cada vino específico.

En la literatura existen diferentes estudios sobre la posibilidad de adsorción de algunas proteínas sobre las superficies de los óxidos metálicos.

Fukuzaki y otros, (1995) estudiaron la posibilidad de adsorción de BSA y gelatina sobre partículas no porosas de acero inoxidable. La adsorción de las proteínas en la interface

acero inoxidable/líquido, está principalmente determinada por las propiedades específicas de las moléculas de la proteína de la solución. Los mismos autores en su siguiente trabajo han investigado la adsorción de BSA sobre las superficies de óxido de silicio, óxido de titanio, óxido de zirconio y óxido de aluminio y su relación con el pH de la solución (Fukuzaki y otros, 1996). Se ha demostrado que la máxima adsorción de BSA para todos óxidos metálicos ocurre alrededor de su punto isoeléctrico. La extensión de dicha adsorción máxima, depende también del pH y de la densidad de las cargas superficiales de los óxidos metálicos. Los autores suponen que los grupos funcionales de BSA los cuales están cargados negativamente (principalmente grupos carboxilos) se adsorben tanto en las superficies de óxidos metálicos cargadas positivamente como en las superficies de óxidos metálicos cargadas negativamente. Todas las curvas de adsorción para todos los óxidos metálicos siguen el modelo de Langmuir. Al contrario Hughes-Wassell y Embery, (1996) encontraron que la adsorción de BSA sobre óxido de titanio en polvo, no cumple dicho modelo. Según estos autores el que la adsorción dependa del pH, el calcio y el fosfato es un indicio de la importancia del efecto electrostático y de la hidratación. También concluyen que la desorción de la proteína a concentraciones bajas es mucho más difícil debido a los enlaces más fuertes que existen entre la molécula de BSA y la superficie del óxido de titanio. Otro estudio de la adsorción de BSA sobre la superficie de partículas de óxido de titanio (Giacomelli y otros, 1997), confirma la adsorción máxima alrededor del punto isoeléctrico de la proteína y su ajuste con el modelo de Langmuir. En este mismo artículo el efecto estructural estaba relacionado con las diferentes formas de BSA en las cuales se transforma la proteína dependiendo del pH, mientras el efecto electrostático estaba analizado suponiendo que las moléculas de BSA se comportan como partículas blandas. Así los autores explican la independencia de las curvas BSA_{ads} -pH de la concentración del

electrolito usado. Como conclusión general se puede decir que la forma en la que se adsorbe la BSA muestra que la interacción proteína – superficie está dirigida básicamente por las propiedades de la proteína.

2.5. Adsorción en columna de relleno

La adsorción es un proceso de separación en el que se transfieren ciertos componentes de una fase fluida a la superficie de un adsorbente sólido. Normalmente las pequeñas partículas adsorbentes se mantienen en un lecho fijo, y el fluido se pasa continuamente a través del lecho hasta que el sólido está prácticamente saturado y la separación deseada ya no puede lograrse.

La isoterma de adsorción es la relación de equilibrio entre la concentración en la fase fluida y la concentración en las partículas del adsorbente a una temperatura dada.

En la adsorción en lechos fijos, las concentraciones en la fase líquida y en la fase sólida cambian con el tiempo así como con la posición en el lecho. Al inicio, la mayor parte de la transferencia de masa tiene lugar cerca de la entrada al lecho, donde el líquido entra en contacto inicial con el adsorbente. Si el sólido al comienzo no contiene adsorbato, la concentración en el líquido cae exponencialmente con la distancia, tendiendo a cero, antes de que alcance la parte final del lecho. Después de unos pocos minutos, el sólido cerca de la entrada está casi saturado, y la mayoría de la transferencia de masa ocurre más allá de la entrada. El gradiente de concentración suele presentar un perfil en forma de “S” como el mostrado en la Figura 1.

La anchura de la zona de transferencia de masa en el relleno de la columna depende de la velocidad de transferencia de masa, del caudal y de la forma de la curva de equilibrio. Se

han publicado métodos para predecir los perfiles de concentración y del ancho de dicha zona, pero normalmente se necesitan demasiados cálculos y los resultados pueden ser inexactos debido a la incertidumbre en las correlaciones de transferencia de masa.

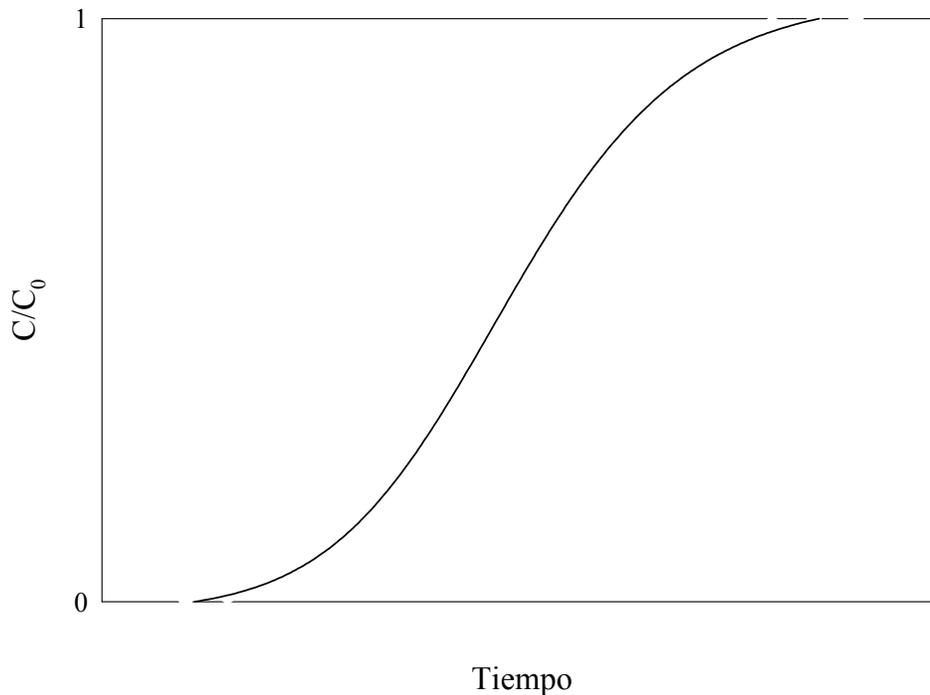


Figura 1. Perfil de concentración a la salida de una columna empacada en forma de “S”
(*Breakthrough curve*)

Habitualmente las columnas de adsorción industriales se diseñan mediante el cambio de escala a partir de pruebas de laboratorio en lechos de diámetro pequeño (Hashimoto y Miura, 1977). La unidad industrial se diseña para el mismo tamaño de partículas y la misma velocidad superficial (Cooney, 1998; McCabe y otros, 1993).

III. Metodología

3.1. Materiales

En este trabajo se han estudiado dos tipos básicos de material adsorbente: óxido de zirconio y óxido de aluminio (alúmina).

Respecto el óxido de zirconio se han empleado dos granulometrias diferentes: en polvo y en partículas, que han sido donadas por Mel Chemicals, Inglaterra y se simbolizarán en este trabajo por ZrO_2 -(po) y ZrO_2 -(pe), respectivamente.

La alúmina empleada igualmente ha sido de dos granulometrias diferentes, una en forma esférica, simbolizada como Al_2O_3 -(pe), que ha sido suministrada por Alcoa Inc., U.S.A. La alúmina en polvo ha sido suministrada por Fluka Chemie AG, Suiza. De esta alúmina se han empleado tres formas: ácida, neutra y básica, simbolizadas por Al_2O_3 -(poA), Al_2O_3 -(poN) y Al_2O_3 -(poB), respectivamente.

Las características de los adsorbentes utilizados se presentan en Tabla I.

El tartrato ácido de potasio (KHT, 24, 353-1), el ácido tartárico $L^{(+)}$ (H_2T , 25, 138) y las proteínas, bovin serum albúmina (BSA, A-3803), ovalbúmina (albumin chicken egg OVAL, A-5503) y lisocima (LYS, L-2879), han sido suministradas por Sigma Chemical Co., U.S.A., se han usado sin purificación previa para la preparación de las soluciones modelo estudiadas.

Algunas de las características de las proteínas se presentan en Tabla II (Achaerandio y otros, 2001).

Tabla I. Propiedades físicas de los adsorbentes estudiados

Adsorbentes	Superficie* BET (m ² /g)	Partículas (mm)	Diámetro medio de poros* (nm)	Superficie de microporos* (%)	Superficie de mesoporos* (%)
ZrO ₂ -(po) [□]	76.6	10 ⁻³	11.2	4.38	95.62
ZrO ₂ -(po) ^{□□}	248.3	10 ⁻³	5.6	5.03	94.97
ZrO ₂ -(pe)	78.9	3	11.0	5.47	94.53
Al ₂ O ₃ -(pe)	351.4	1.19-1.68	4.8	12.31	87.69
Al ₂ O ₃ -(poA)	187.3	0.10-0.15	5.0	13.74	86.26
Al ₂ O ₃ -(poN)	159.2	0.10-0.15	6.3	13.03	86.98
Al ₂ O ₃ -(poB)	184.4	0.10-0.15	5.3	14.49	85.51

*Datos obtenidos aplicando el método de Brauner-Emmett-Teller, mediante un equipo de análisis BET; [□] Óxido de zirconio en polvo de un primer lote; ^{□□} Óxido de zirconio en polvo de un segundo lote

Tabla II. Propiedades de las proteínas usadas

Proteínas	Peso molecular (kDa)	pI	Dimensiones (nm×nm×nm)	Volumen (nm ³)	Enlaces -S-S-	Grupos -SH
BSA	67.0	4.7	11.6 x 2.7 x 2.7	82	17	1
OVA	43.0	4.5	7.0 x 4.5 x 4.5	142	1	4
LYS	14.3	10.7	4.5 x 3.0 x 3.0	41	4	0

En este trabajo se ha utilizado vino blanco obtenido de uva de la variedad *Chardonnay* correspondientes a las vendimias del año 2000 y 2001 proporcionado por la Cooperativa de

Vila-rodona. El vino se ha recibido después de la fermentación sin ningún tipo de tratamiento de filtración o estabilización previa. La concentración inicial de proteínas totales en los vinos ha sido de 11.0 y 30.0 mg/L, para las vendimias del año 2000 y 2001 respectivamente.

Para los estudios de regeneración del material adsorbente los reactivos utilizados han sido: ácido nítrico (HNO_3 65 %, 90060) suministrado por Riedel-de Haën, Alemania, hidróxido de sodio (NaOH , 0288) suministrado por J. T. Baker, Inglaterra, urea (131754) suministrada por Panreac, España, solución salina fisiológica (NaCl 0.9 g, 995373) suministrada por Laboratorios Grifols, S. A., España y tabletas enzimáticas (Subtilisina A, 4493FV) suministradas por Farmaoptics, España.

3.2. Equipos

3.2.1. Equipo para analizar la superficie específica

La caracterización de los adsorbentes se ha realizado mediante un equipo de análisis BET - "Micromeritics", ASAP 2000, mostrado en la Figura 2. El método aplicado es el de Brunauer-Emmett-Teller (BET), (Gates, 1992).

Para obtener la superficie específica de los adsorbentes analizados y la distribución de los poros se hace una desgasificación previa de las muestras a una temperatura de 150 °C. Después se caracteriza el óxido metálico mediante la fisisorción con N_2 , la cual tiene lugar en un matraz sometido en ambiente de nitrógeno líquido.

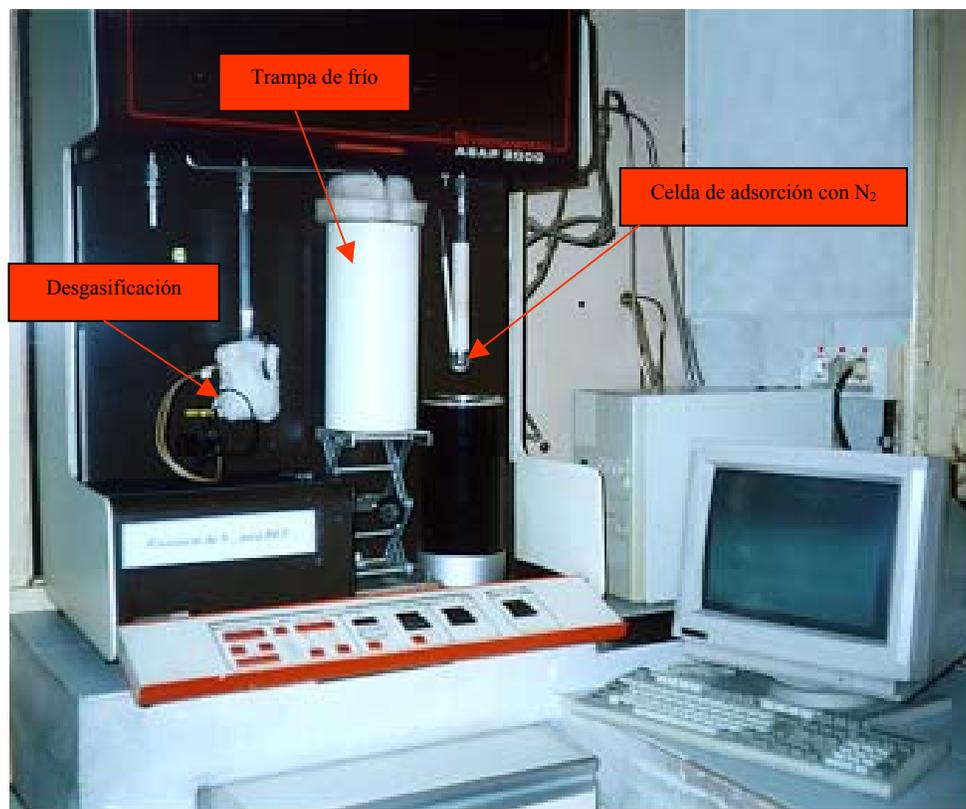


Figura 2. Equipo de análisis BET

3.2.2. Equipo para la experimentación en discontinuo

Para la determinación de las isotermas de adsorción de los diferentes adsorbentes se ha utilizado el procedimiento discontinuo. El equipo utilizado es el presentado en la Figura 3. Consiste en un eje rotativo diseñado especialmente, en el cual se colocan los tubos de vidrio de 20 mL con tapón de rosca. El sistema gira a 60 rpm, favoreciendo el contacto entre la fase sólida y líquida. Las muestras se analizan utilizando un espectrómetro, Hitachi U-2000.

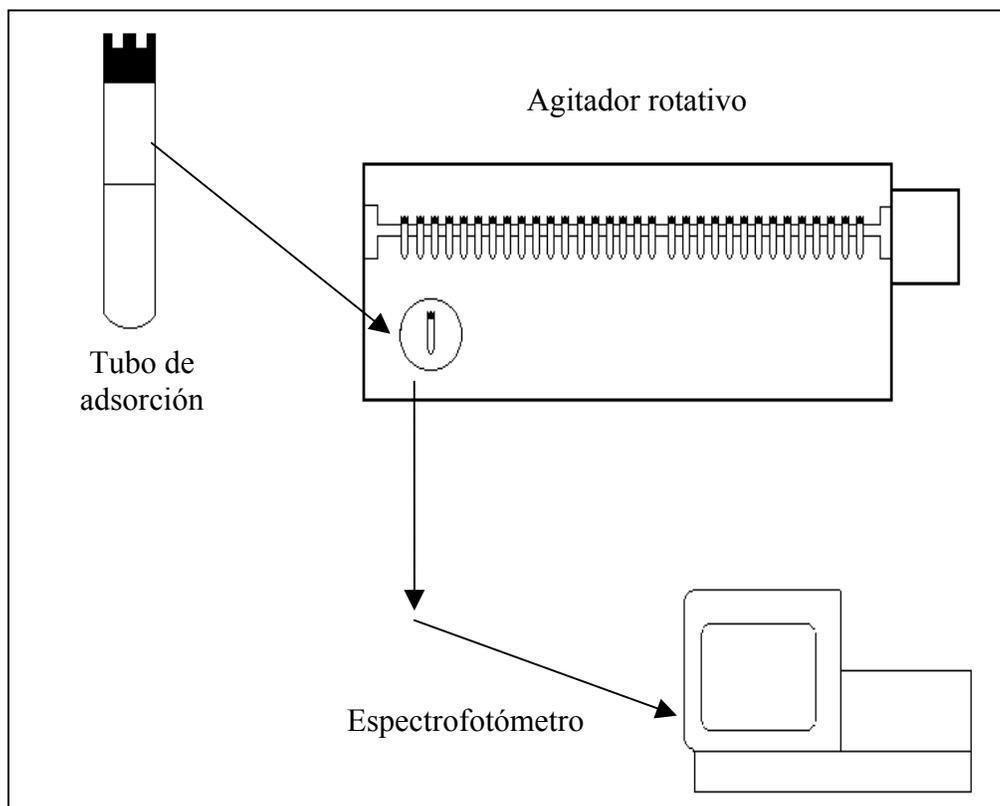


Figura 3. Esquema del equipo para la experimentación en discontinuo

3.2.3. Equipo para la experimentación en continuo

Para el estudio de la adsorción proteica con soluciones modelo o vino blanco en continuo se han utilizado dos columnas, en las que se empacaba el material adsorbente, de dos escalas diferentes. Estos dos equipos se muestran en la Figura 4 y en la Figura 5. La alimentación de la solución a tratar se ha realizado con una bomba peristáltica, Watson Marlow 101 U/R. El material de las dos columnas es metacrilato transparente, aspecto que permitía observar en su interior.

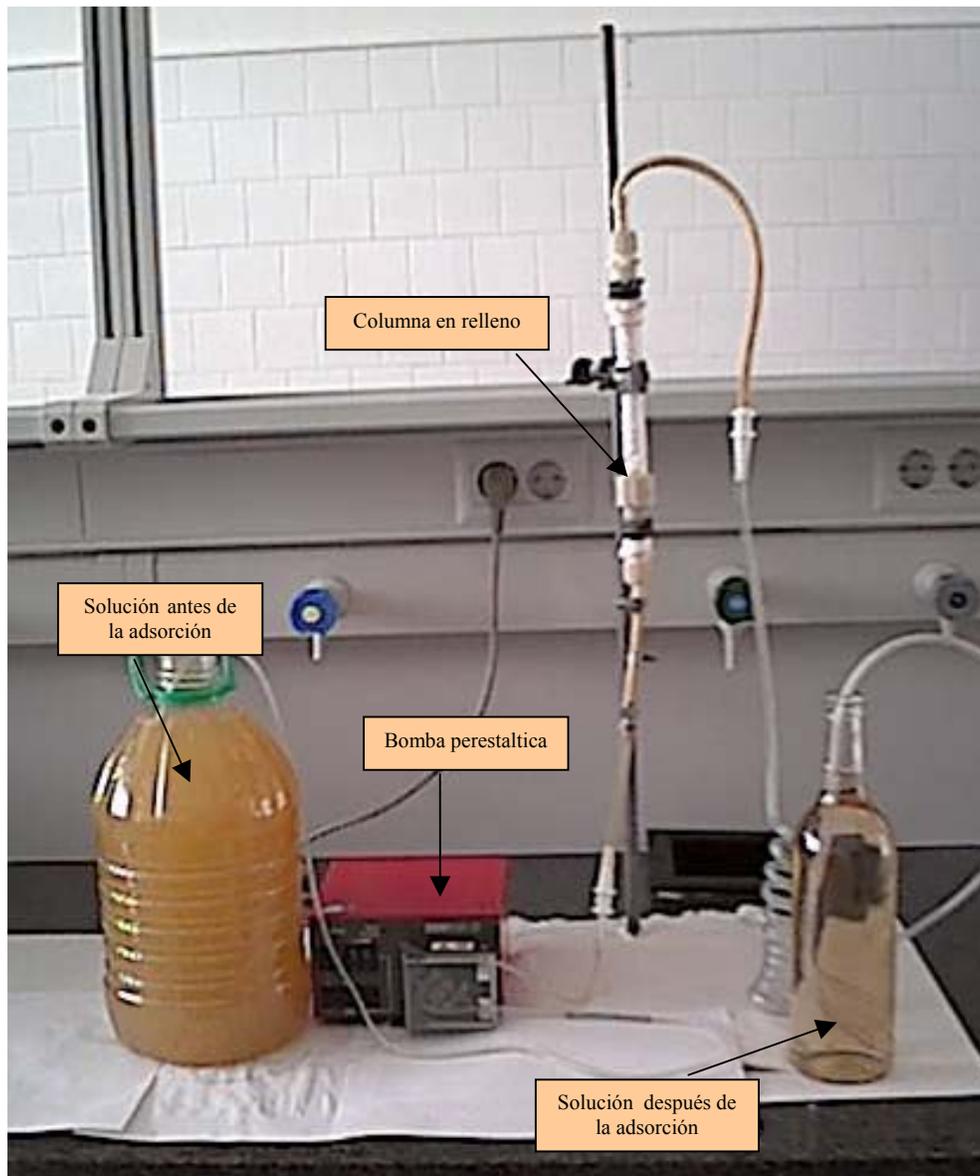


Figura 4. Equipo para los experimentos en continuo en escala pequeña

La columna de escala pequeña (Figura 4) tiene una longitud de 15 cm y un diámetro interno de 1.5 cm. La columna de escala superior (Figura 5) tiene longitud de 19 cm y un diámetro interno de 5.0 cm.

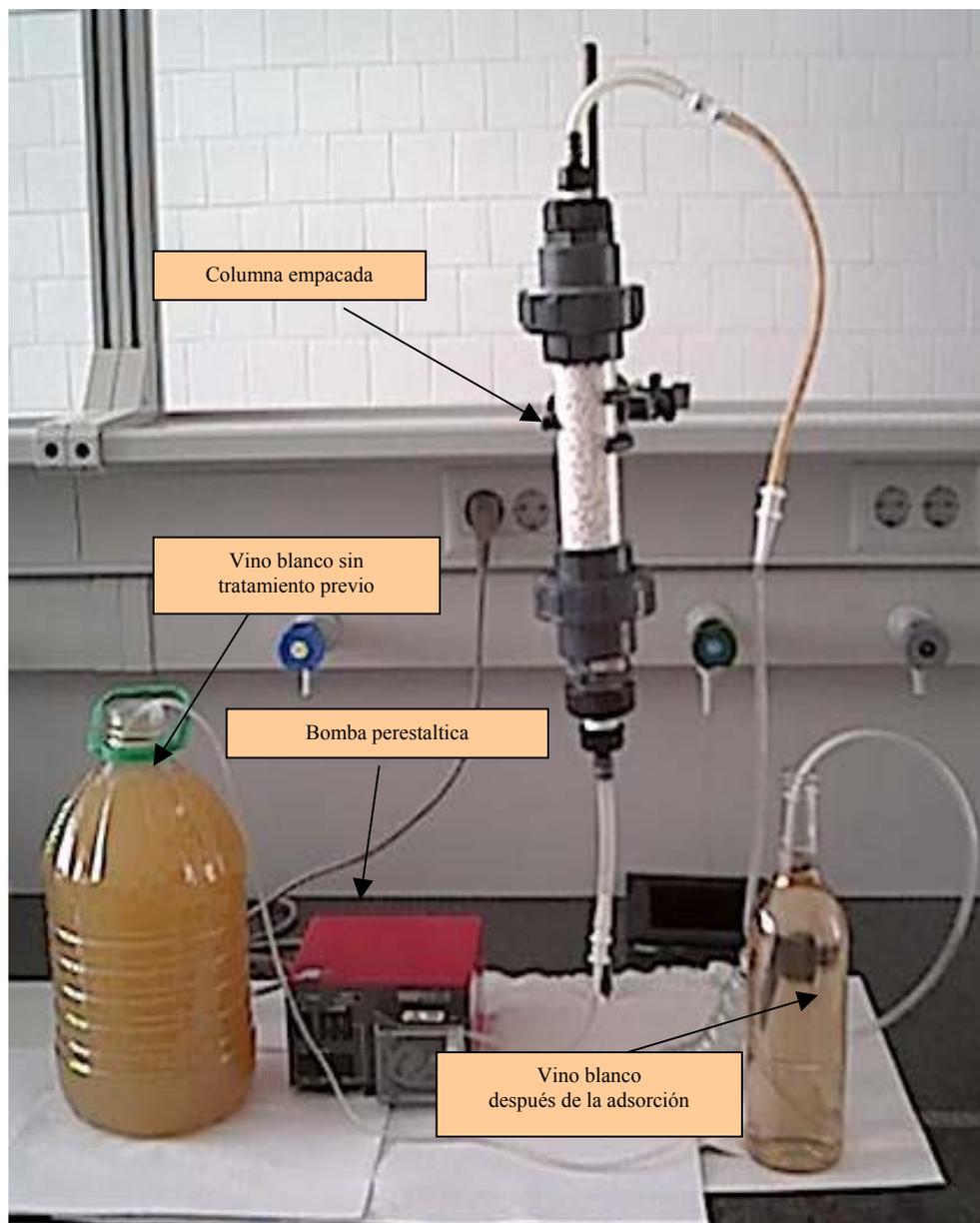


Figura 5. Equipo para los experimentos en continuo en escala media

3.3. Procedimiento experimental

El procedimiento experimental seguido es el mostrado en la Figura 6

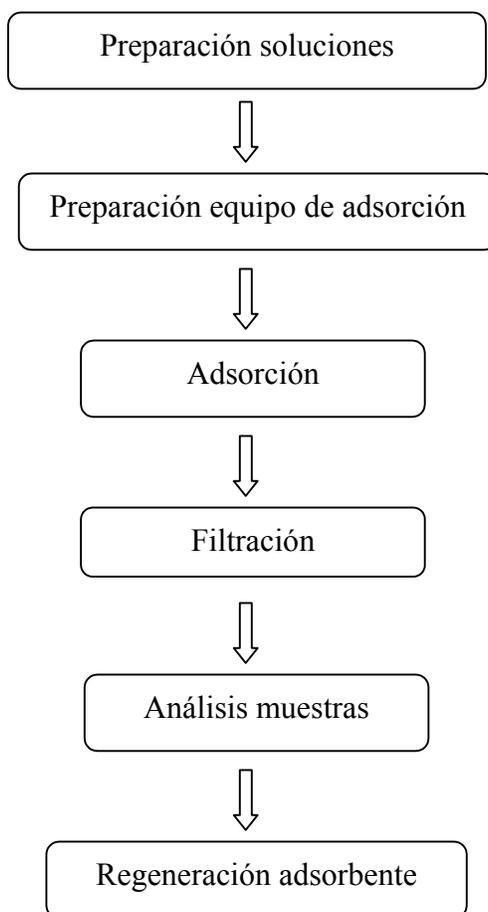


Figura 6. Procedimiento experimental general

3.3.1. Preparación de soluciones modelo

Las soluciones modelo de proteínas utilizadas durante la experimentación se han preparado según el esquema detallado en la Figura 7.

La preparación del tampón tartárico es necesaria para obtener una solución modelo de las proteínas puras con el pH típico para los vinos blancos (pH 3.5).

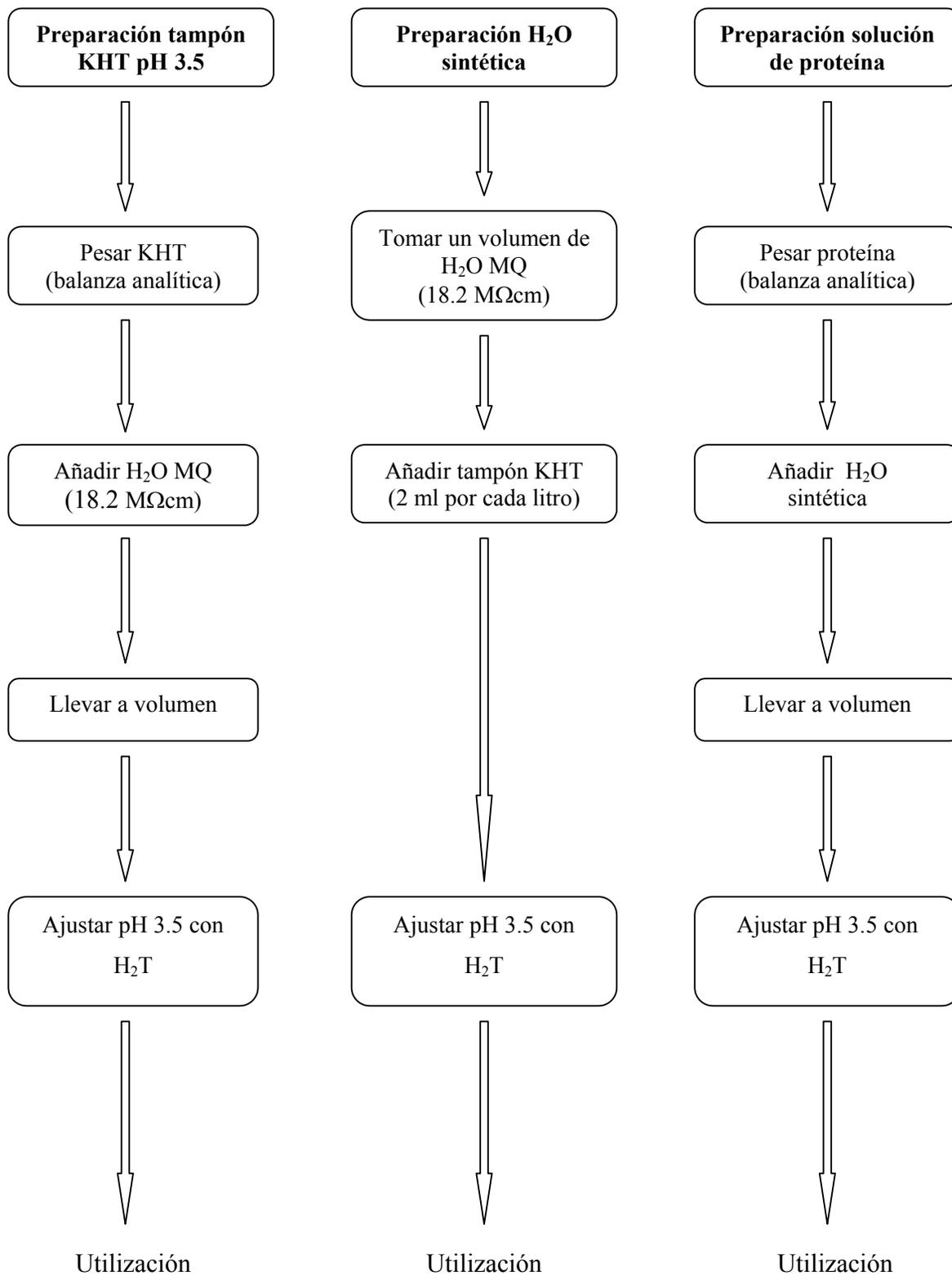


Figura 7. Procedimiento de preparación de soluciones modelo de proteínas

3.3.2. Preparación y realización de la experimentación

3.3.2.1. Experimentación en discontinuo

La selección del material más adecuado para la adsorción de proteínas se ha realizado mediante la determinación experimental de las isothermas de adsorción para todos los adsorbentes, con las tres proteínas estudiadas. Cada punto experimental de las isothermas de adsorción se ha realizado por triplicado.

El procedimiento para la determinación de una isoterma de adsorción es el que se describe a continuación.

Se pone una alícuota de 10 mL de la solución modelo, pH 3.5 y una fuerza iónica 10^{-4} , en tubos de vidrio de 20 mL, donde se ha añadido previamente una cantidad de los óxidos metálicos en polvo o en partículas para obtener una concentración del adsorbente en el rango de 25 a 650 mg/L o 120 a 6000 mg/L, respectivamente. La diferencia de los rangos elegidos proviene de la adsorción máxima mencionada para los adsorbentes utilizados en el trabajo de Fukuzaki y otros, (1996). La concentración de proteína en las soluciones modelo se ha mantenido a 1000 mg/L para los experimentos con bovin serum albúmina (BSA) y ovalbúmina (OVAL), y de 500 mg/L para los experimentos con lisocima (LYS). La isoterma se ha determinado a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), manteniendo la agitación durante 48 h, tiempo suficiente para conseguir el equilibrio (Sarkar y Chatteraj, 1996). La rotación continua permite un contacto adecuado entre el adsorbente y la proteína. Después de que se alcanza el equilibrio, la solución sobrenadante de proteína de cada tubo de ensayo se filtra a través de una membrana de acetato de celulosa de diámetro de poro de 0.45 μm (HAWPO1300), Millipore, U.S.A.

También se han preparado controles de las proteínas y del material adsorbente, para verificar el rango de cambio y la significación de este cambio para los resultados obtenidos en las condiciones del trabajo. Los controles de las proteínas contienen la misma cantidad de la solución modelo analizada, añadida en el tubo de ensayo en ausencia del adsorbente. Igualmente los controles del material adsorbente contienen una cantidad del óxido metálico estudiado colocado en el tubo de vidrio, que esta en contacto con agua sintética (pH 3.5) sin la presencia de ningún tipo de proteína.

3.3.2.2. Experimentación en continuo

La metodología que se ha utilizado en la experimentación con el sistema en continuo es independiente de la escala de la columna empleada. El procedimiento consiste en empacar en la columna el adsorbente elegido, previamente pesado. La solución modelo de BSA (pH 3.5 y una fuerza iónica 10^{-4}) o el vino blanco se pasa a través de la columna en flujo ascendente mediante la bomba peristáltica. El flujo tipo “pistón” se mantiene constante durante todo el experimento. Se toman muestras en el efluente en diferentes intervalos de tiempo, para analizar la concentración de la proteína no adsorbida.

Las muestras recogidas se filtran con una membrana de acetato de celulosa de diámetro de poro de $0.45\ \mu\text{m}$ (HAWPO1300), Millipore, U.S.A. antes de analizarlas, de la misma forma que en los experimentos en discontinuo.

A partir de los experimentos realizados en continuo se obtienen las curvas de saturación (*Breakthrough curve*), en las que se representarán los valores de C/C_0 , donde C es la concentración de proteína en la solución al salir de la columna y C_0 es la concentración a la entrada de la misma, frente al volumen de líquido tratado dividido por el volumen del lecho

(*bed volume, BV*), que en este trabajo está definido por la relación del volumen de la solución tratada por la masa del adsorbente en la columna.

3.3.3. Análisis de las muestras

La concentración de proteína en las diferentes muestras tratadas como en los controles, tanto en los experimentos de determinación de las isothermas de adsorción, como en los experimentos en continuo se ha analizado por espectrofotometría directa.

En los experimentos en continuo con vino blanco la concentración de las proteínas totales del vino se ha obtenido por el método de Bradford, y la determinación de las fracciones proteicas mediante HPLC. Igualmente se han determinado diferentes parámetros analíticos del vino.

Los métodos de análisis utilizados en cada caso particular se describen con mayor detalle a continuación.

3.3.3.1. Proteínas

- Método de espectrofotometría directa

La elección de este método se debe a que todas las proteínas absorben en el espectro UV-visible, dependiendo de la composición de los aminoácidos; el método es simple y no destructivo. Es necesaria una cantidad mínima de proteína, del orden de mg/L, para que sea posible la determinación correcta sin que ocurra el fotoblanqueo de la proteína. Además la medida de la absorción es muy rápida y el volumen requerido de las muestras para los análisis es pequeño.

En una longitud de onda específica, la absorción de la energía de la luz tiene una relación lineal con la concentración de la proteína presentada en la ecuación de Lambert - Beer:

$$A = \chi cl, \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde **A** es la absorción en la longitud de onda específica, χ es el coeficiente de extinción ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$), **c** es la concentración molar de la proteína (M) y **l** es el trayecto (cm) (Nakai y Modler, 1996).

La lectura es a 280 nm, en un espectrofotómetro, ya que la máxima absorción de las proteínas es en el intervalo de UV 260-292 nm. Se utilizan cubetas de cuarzo de un volumen de 1 mL y 1 cm de paso.

- Método de Bradford

Este es un método colorimétrico (Bradford, 1976), siendo uno de los más utilizados en la industria enológica para medir el contenido total de las proteínas de un vino.

El método consiste en mezclar una alícuota de la muestra a analizar con el reactivo BioRad Protein Assay 500-0001, proporcionado por Bio-Rad, Laboratories GmbH, Alemania, se espera 1 h para la formación de color, y a continuación se determina la absorción a 595 nm utilizando el espectrofotómetro. La recta de calibrado se prepara con una proteína pura, y en este trabajo se ha utilizado BSA como patrón.

- Método cromatográfico

Las cantidades de las fracciones proteicas del vino blanco se han analizado por cromatografía de exclusión molecular. Se utiliza un sistema de cromatografía líquida (HPLC) (Martínez-Rodríguez y Polo, 2000; Santoro, 1995), formado por un módulo de

bombas, Beckman, System Gold Programable Solvent Module 126, una columna, TSK-gel G 2000SW (TosoHaas, 7.5 mm ID x 300 mm) provista de una precolumna, Guardcolumn SW (TosoHaas, 7.5 mm ID x 75 mm) y un detector de ultravioleta, Beckman, System Gold Detector Module 166, a una longitud de onda de 220 nm. Como fase móvil se ha utilizado un tampón de fosfato con adición de 0.1 M NaCl a un caudal de 1 mL/min.

3.3.3.2. Test de estabilidad proteica

La caracterización de la estabilidad proteica de un vino se ha determinado mediante la comparación de la turbidez del vino, y la medida para el mismo vino sometido al tratamiento que se detalla a continuación.

Un volumen determinado de vino blanco se filtra con una membrana de diámetro de poro 0.45 μm (HAWPO1300), Millipore, U.S.A. A continuación se calienta a una temperatura de 80 °C, durante 2 h. Después del calentamiento se deja durante 2 h más a una temperatura de 4 °C. Se acondiciona y se mide la turbidez (Dubourdieu y otros, 1988).

La turbidez se ha medido con un nefelómetro, Hach Ratio/XR turbidimeter. La turbidez se expresa en unidades nefelométricas de turbidez (NTU).

La diferencia entre la turbidez medida antes y después del tratamiento de calentamiento/enfriamiento, es proporcional de la inestabilidad proteica del vino analizado.

Un vino se considera estable cuando la diferencia de la turbidez obtenida no supera más de 2 NTU (Moine-Ledoux y Dubourdieu, 1999).

3.3.3.3. pH

La medición del pH en el vino tiene un marcado interés. Este dato es importante por su efecto sobre, microorganismos, matiz del color, sabor, potencial redox, relación entre el dióxido de azufre libre y combinado, quiebras debidas al fosfato de hierro y otros. Los vinos de mesa deben tener un pH inferior a 3.6. (Barceló, 1990; Amerine y Ough, 1976).

El pH de los vinos se han determinado con un pH-metro, Crison micropH 2002.

3.3.3.4. Acidez total

La Oficina Internacional de la Vid y del Vino (O.I.V.) define la acidez total, como la suma de todas las acideces valorables que contiene el vino, hasta pH 7.0, por adición de solución de hidróxido sódico. Los ácidos que se valoran son principalmente el tartárico, málico, láctico, succínico, acético, etc. La acidez total normalmente debe ser menor de 3.3 g/L expresadas como ácido tartárico (Barceló, 1990; Amerine y Ough, 1976).

El método utilizado ha sido el recomendado por la Comisión de las Comunidades Europeas publicadas en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1990). Este método se basa en una valoración potenciométrica con una solución de hidróxido sódico 0.1 M.

3.3.3.5. Acidez volátil

En los vinos, se define como acidez volátil al contenido de ácidos grasos, como el acético, fórmico, propiónico, butírico, etc. Aunque el constituyente principal es el ácido acético. Valores de 0.3 a 0.8 g/L, expresados en ácido acético, se consideran normales en los vinos (Barceló, 1990; Amerine y Ough, 1976).

El método utilizado es el definido por Garcia-Tena (Barceló, 1990). Los reactivos empleados son de la empresa GAB Sistemática Analítica, S. L., España. El método consiste en la destilación fraccionada del vino (11 mL) y una valoración separada de las fracciones recogidas. El primer volumen se recoge en una probeta de 5.1 mL y el segundo en una probeta de 3.2 mL. Las soluciones se valoran con una solución de hidróxido de sodio 0.0204 M en presencia de unas gotas de la solución de fenolftaleina al 1 % como indicador. El número de mililitros gastados para valorar el líquido de la probeta de 3.2 mL nos permite obtener el valor de la acidez volátil real. Para hallar la acidez volátil aparente, se suma a la real el valor calculado con el número de los mililitros gastados para valorar el líquido de la probeta de 5.1 mL.

3.3.3.6. Acidez fija

La acidez fija se determina por la diferencia entre la acidez total y la acidez volátil, expresadas las dos en ácido tartárico.

Las cantidades contenidas en el vino deben ser superiores de 3.0 g/L, expresadas también como ácido tartárico (Barceló, 1990; Amerine y Ough, 1976).

3.3.3.7. Azúcares reductores

Los azúcares reductores están constituidos por el conjunto de los azúcares con función cetónica o aldehídica determinados por su acción reductora sobre una solución cupro-alcalina. La cantidad de los azúcares reductores en un vino seco después de la fermentación alcohólica debe ser menor del 0.1 % (5 g/L) (Amerine y Ough, 1976).

Se utiliza método Rebelein (Barceló, 1990). Los reactivos empleados son de GAB Sistemática Analítica, S. L., España. Este método se fundamenta en la reducción del reactivo cuproalcalino en la que no es necesaria precipitación alguna, lo que representa una mayor exactitud en la determinación, por cuanto no hay pérdidas de materias reductoras, que siempre tiene lugar en el proceso de precipitación.

3.3.3.8. Grado alcohólico volumétrico

El grado alcohólico volumétrico es igual al número de litros de etanol contenidos en 100 litros de vino, medidos ambos volúmenes a la temperatura de 20 °C. Su símbolo es “% vol”.

Se utiliza el método recomendado por la Comisión de las Comunidades Europeas publicadas en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1990), el cual consta de una destilación del vino alcalinizado mediante una suspensión de hidróxido de calcio y determinación de la masa volúmica del destilado por picnometría.

3.3.3.9. Extracto seco total

El extracto seco total o materias secas totales es el conjunto de todas las sustancias que, en determinadas condiciones físicas, no se volatilizan. Esta característica se determina indirectamente, sobre el valor de la densidad del residuo exento de alcohol. La densidad relativa del vino desalcoholizado (d_r) se calcula mediante la fórmula:

$$d_r = d_v - d_a + 1.000, \quad \text{Ecuación 2}$$

donde: d_v es la densidad relativa del vino a 20 °C y d_a es la densidad relativa a 20 °C de la mezcla hidroalcohólica del mismo grado alcohólico que el vino (la densidad relativa a 20 °C del destilado del vino). A partir del valor de d_r se obtiene el peso del extracto seco total, expresado en gramos por litro.

Esto es el método recomendado por la Comisión de las Comunidades Europeas publicadas en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1990).

3.3.3.10. Cenizas

Se denominan cenizas al conjunto de los productos resultantes de la incineración del residuo de evaporación del vino, llevada a cabo de manera que se obtenga la totalidad de los cationes (excluido el amonio) en forma de carbonato y otras sales minerales anhidridas.

Se utiliza el método recomendado por la Comisión de las Comunidades Europeas publicadas en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1990). El método consiste en la incineración del extracto del vino a una temperatura entre 500 y 550 °C hasta la combustión total del carbono.

3.3.3.11. Cloruros

Los cloruros se determinan directamente en el vino por potenciometría utilizando un electrodo Ag/AgCl. Este es el método recomendado por la Comisión de las Comunidades Europeas publicadas en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1990).

3.3.3.12. Sulfatos

En el vino se hallan pequeñas cantidades de sulfatos. Su cantidad depende principalmente del suelo en donde se cultive la uva. Durante la fermentación, los sulfatos sufren ligeras modificaciones, transformándose en sulfuro o dióxido de azufre. Este último es posible, en algunas circunstancias, que se oxide y se transforme en sulfatos. El límite legal es de 2 g/L, expresado como sulfato potásico (Barceló, 1990).

Se ha utilizado el denominado método rápido, recomendado por la Comisión de las Comunidades Europeas publicadas en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1990), que consiste en la precipitación de los sulfatos con el cloruro de bario y una comprobación visual, de la turbidez.

3.3.3.13. Fenoles totales

El conjunto de los compuestos fenólicos del vino se oxida con el reactivo de Folin-Ciocalteu, que está constituido por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que se reducen por la oxidación de los fenoles en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La coloración azul producida posee una absorción máxima en torno a 750 nm y es proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos. Mediante un calibrado se puede medir la cantidad de fenoles totales por espectrofotometría. Los resultados obtenidos se expresan como mg/L de ácido gálico. Este método se conoce como el método Singleton y es el recomendado por la Comisión de las Comunidades Europeas publicadas en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1990).

3.3.3.14. Características cromáticas

La característica cromática de un vino, se basa en dos factores importantes:

Luminosidad, es el factor cuantitativo que define la intensidad del color, puede definirse también como transmitancia, ya que ésta varía inversamente proporcional a la intensidad.

Un vino según la luminosidad pueda variar de pálido a subido.

Tonalidad o cromancia, es el factor de calidad del color y corresponde a la longitud de onda dominante (rojo, amarillo, verde, etc.) que caracteriza la tonalidad.

El color de los vinos es muy variable, debido a su origen, forma de elaboración y envejecimiento.

Las características cromáticas se han determinado por el denominado método rápido, recomendado por la Comisión de las Comunidades Europeas publicadas en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1990), el cual se fundamenta en la lectura de las absorbancias, a las longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm en un espectrofotómetro con evaluación en la zona del espectro visible.

3.3.4. Regeneración de los adsorbentes

La regeneración de los adsorbentes es una parte muy importante de este trabajo.

Se han estudiado varios procedimientos para recuperar o incluso mejorar las características fisicoquímicas de los óxidos metálicos y así disminuir el coste general de la estabilización proteica. Ésta es una operación básica en la elaboración del vino y una etapa que puede incidir en la conservación y valorización del producto final.

Los procedimientos estudiados son:

- *Procedimiento I*

En este procedimiento la regeneración consta de dos fases. En primer lugar el material adsorbente se deja en contacto durante 30 min con una solución 0.5 M de NaOH a una temperatura entre 40 y 50 °C. Posteriormente el adsorbente se lava con H₂O mQ (18.2 MΩcm), pH 7. La segunda fase consiste en tratar el adsorbente durante 15 min con una solución de 5 mL/L de HNO₃, 65 % a una temperatura de 50 °C. Finalmente el adsorbente se lava otra vez con H₂O mQ (18.2 MΩcm), pH 7.

- *Procedimiento II*

Este procedimiento consiste en la regeneración del material adsorbente con una solución de urea 8 M. Si la regeneración se hace en discontinuo se mantienen en contacto el adsorbente y la solución de urea durante 72 h, y si la regeneración es en continuo se trata durante 4 h a un caudal de 0.5 mL/min Finalmente se lava el material adsorbente con agua mQ (18.2 MΩcm), pH 7.

- *Procedimiento III*

Este procedimiento consiste en tratar el material adsorbente con una solución enzimática de Subtilisina A, que se prepara disolviendo una tableta de la enzima de 5 mg en 5 mL de solución salina fisiológica. El tratamiento se realiza a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), durante 4 h en agitación continua. Finalmente el adsorbente se lava con H₂O mQ (18.2 MΩcm) con pH 7.

- *Procedimiento IV*

Este procedimiento consiste en el tratamiento térmico del adsorbente. Después de la saturación del adsorbente se lava con agua mQ (18.2 MΩcm), pH 7. A continuación el óxido metálico se mantiene en una mufla a temperatura de 500 °C durante 4-5 h para una aplicación en condiciones en discontinuo y trabajando con las soluciones modelo o 16 h para una aplicación en condiciones en continuo y tratamiento previo con vino.

IV. Resultados y discusiones

4.1. Isotermas de adsorción

Según la clasificación de Brunnauer, Deming y Teller (Terence, 1990) la adsorción en una interfase sólido/líquido puede ser uno de los tres tipos mostrados en la Figura 8. La isoterma Tipo I se denomina favorable o convexa. La isoterma Tipo II es la denominada lineal, y finalmente la isoterma Tipo III es la denominada desfavorable o cóncava.

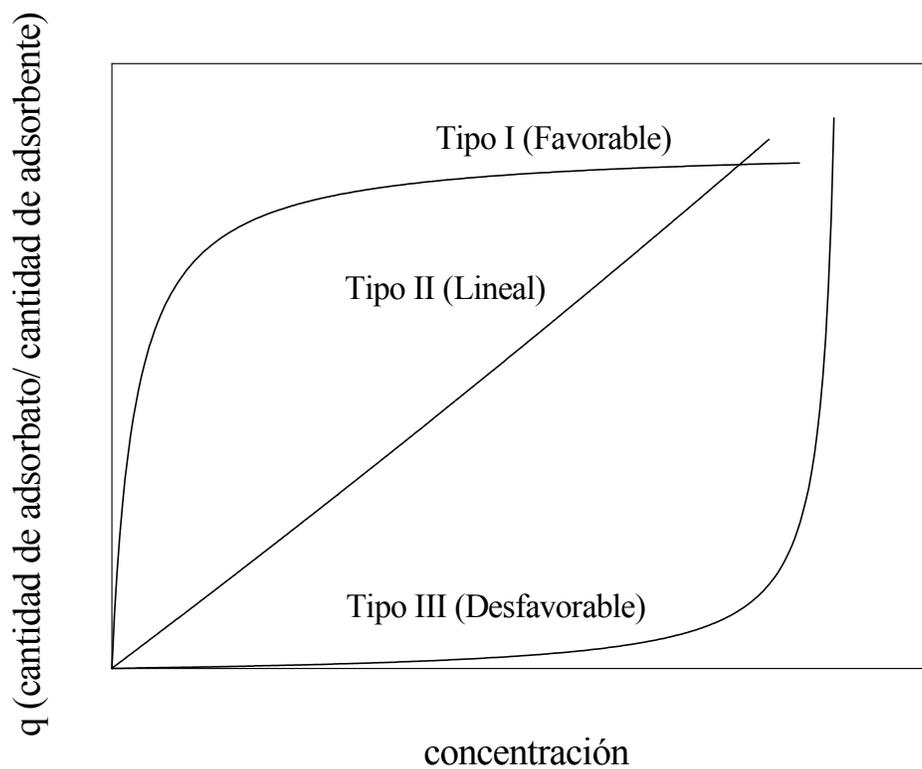


Figura 8. Tipos de isotermas de adsorción

La isoterma de adsorción tipo I se ajusta perfectamente con el modelo de Langmuir. Este modelo se basa en las hipótesis que todos los sitios de adsorción en la superficie del

adsorbente son equivalentes, que en un centro activo de adsorbente se puede adsorber solo una molécula de adsorbato, que la energía de adsorción (la fuerza de los enlaces entre la superficie y las moléculas que se adsorben) es constante para todos los sitios, y por último, que no hay interacciones entre las moléculas adsorbidas (Cooney, 1998).

El modelo de Langmuir sigue la ecuación:

$$q = q_{max} \frac{kC}{1 + kC}, \quad \text{Ecuación 3}$$

donde: q es la cantidad de proteína (adsorbato) adsorbida por unidad de masa del óxido metálico (adsorbente) en el equilibrio, mg/g o $\mu\text{mol/g}$; q_{max} es la máxima cantidad de proteína que puede ser adsorbida por masa del óxido metálico, mg/g o $\mu\text{mol/g}$; k es la constante de Langmuir, mg/L; C es la concentración de la proteína en la solución que está en equilibrio con la proteína adsorbida, mg/L.

En la Figura 9, Figura 10 y Figura 11 se muestran las isotermas de adsorción de BSA, ovalbúmina y lisocima con $\text{ZrO}_2\text{-(po)}^\square$ y $\text{ZrO}_2\text{-(pe)}$. El pH de la solución modelo ha sido de 3.5 (mismo pH que el del vino), y se ha mantenido constante para todos los experimentos.

La isoterma de adsorción del sistema BSA- $\text{ZrO}_2\text{-(po)}^\square$ (Figura 9) es convexa (Tipo I según la clasificación de Brunnauer, Deming y Teller). El hecho que la adsorción sea alta aunque la concentración de proteína en la solución (adsorbato) sea baja explica el interés que representa este tipo de adsorción desde un punto de vista práctico. La isoterma obtenida se ha ajustado muy bien con el modelo de Langmuir ($r^2= 0.9591$) y la adsorción máxima obtenida es $q_{max}=0.68 \mu\text{mol/g}$.

La adsorción de BSA en $\text{ZrO}_2\text{-(pe)}$, sin embargo, es desfavorable. La curva es cóncava y es tipo III según la clasificación de Brunnauer, Deming y Teller (Terence, 1990).

Esto significa que se requiere una concentración alta de la proteína (BSA) en el adsorbato, para que la adsorción obtenida sea significativa. Este diferente comportamiento indica que la adsorción es muy sensible al tamaño de la partícula.

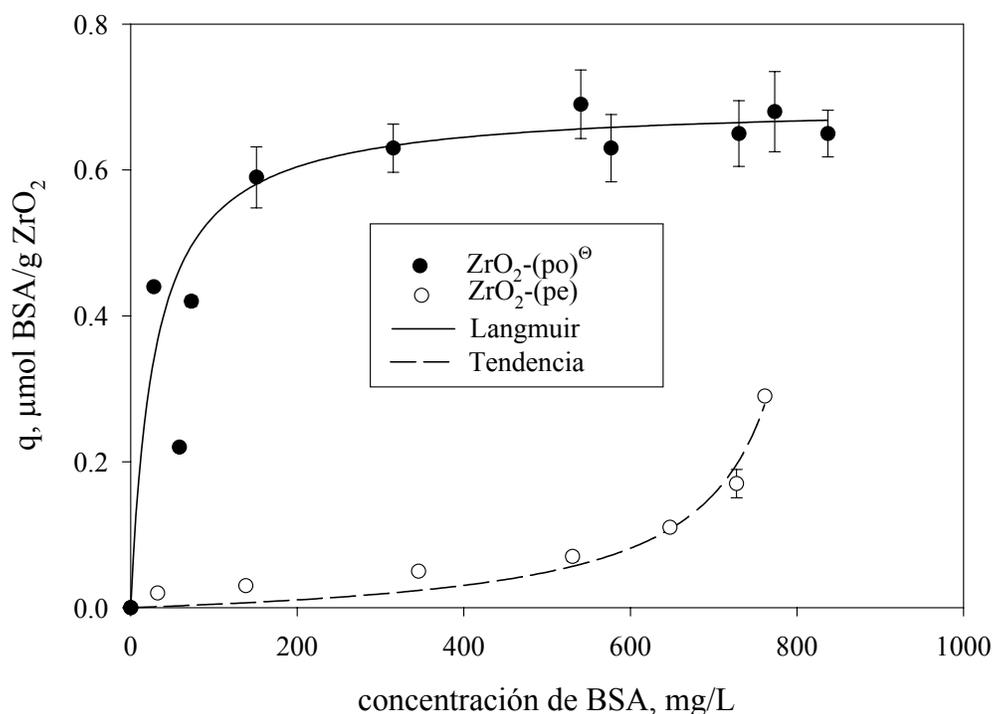


Figura 9. Isotermas de adsorción de BSA en óxido de zirconio

Las isotermas de adsorción de BSA en Al_2O_3 en todas las formas estudiadas son desfavorables (resultados no mostrados). A pesar de esto, la adsorción de BSA con $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-(poA)}$ es mayor, debido probablemente al hecho que el punto isoeléctrico de BSA en cuestión es ácido (4.7) y la adsorción es máxima alrededor de este punto (Giacomelli y otros, 1997; Fukuzaki y otros, 1996).

La curva de adsorción mostrada en la Figura 10 para la OVAL en $\text{ZrO}_2\text{-(po)}$ muestra un punto de inflexión. Esto significa que a concentraciones bajas de OVAL la superficie del

adsorbente no se satura y las moléculas del adsorbato están en orientaciones al azar en la superficie. Cuando el número de las moléculas adsorbidas es mayor a un 50 %, la interacción lateral entre ellas es importante, produciéndose un efecto de reorganización de las moléculas de ovalbúmina, dando lugar a una nueva adsorción de más proteínas en la superficie del adsorbente (Hughes-Vassell y Embery, 1996). La cantidad adsorbida máxima alcanza valores de 1.0 $\mu\text{mol/g}$. El promedio de la adsorción máxima para la OVAL en $\text{ZrO}_2\text{-(pe)}$ tiene valores muy bajos (0.05 $\mu\text{mol/g}$). Igualmente, las isotermas de adsorción para la OVAL son desfavorables con el Al_2O_3 en todas las formas estudiadas.

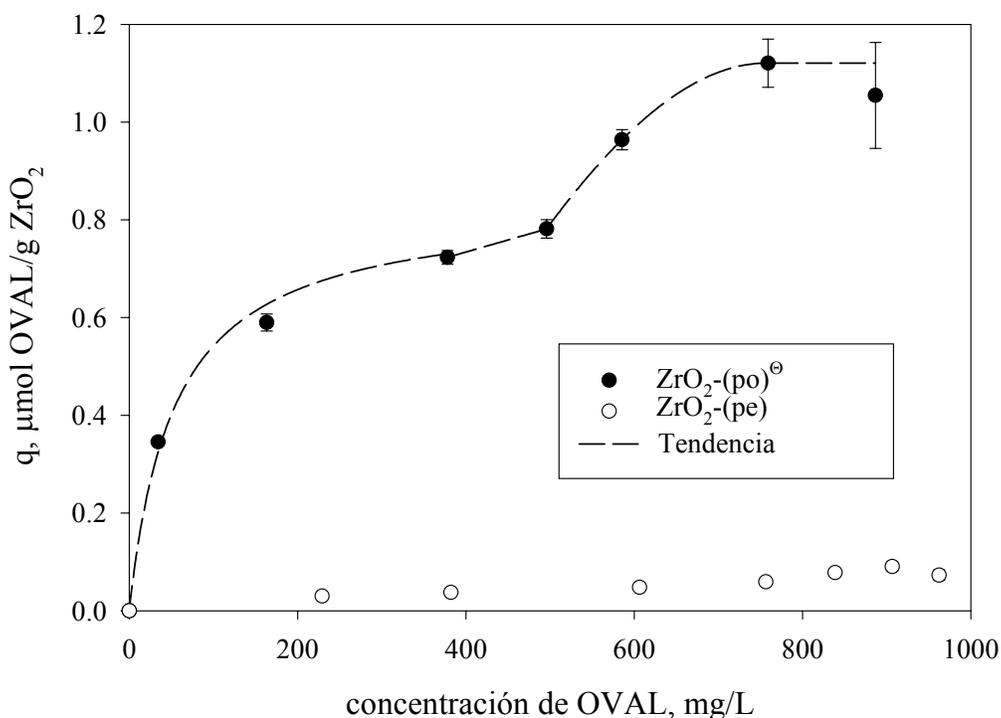


Figura 10. Isotermas de adsorción de OVAL en óxido de zirconio

La isoterma de adsorción para la LYS en $\text{ZrO}_2\text{-(pe)}$ es favorable (Figura 11) y la adsorción máxima es del orden de 0.40 $\mu\text{mol/g}$ ($r^2=0.9009$). En cambio la isoterma de adsorción de la

LYS en ZrO_2 -(po)[□] el desfavorable. Con Al_2O_3 -(pe) la isoterma de adsorción también es favorable y la adsorción máxima obtenida es del 0.45 $\mu\text{mol/g}$ ($r^2= 0.8495$). Sin embargo, para todas las formas de alúmina en polvo, las isotermas de adsorción han sido desfavorables.

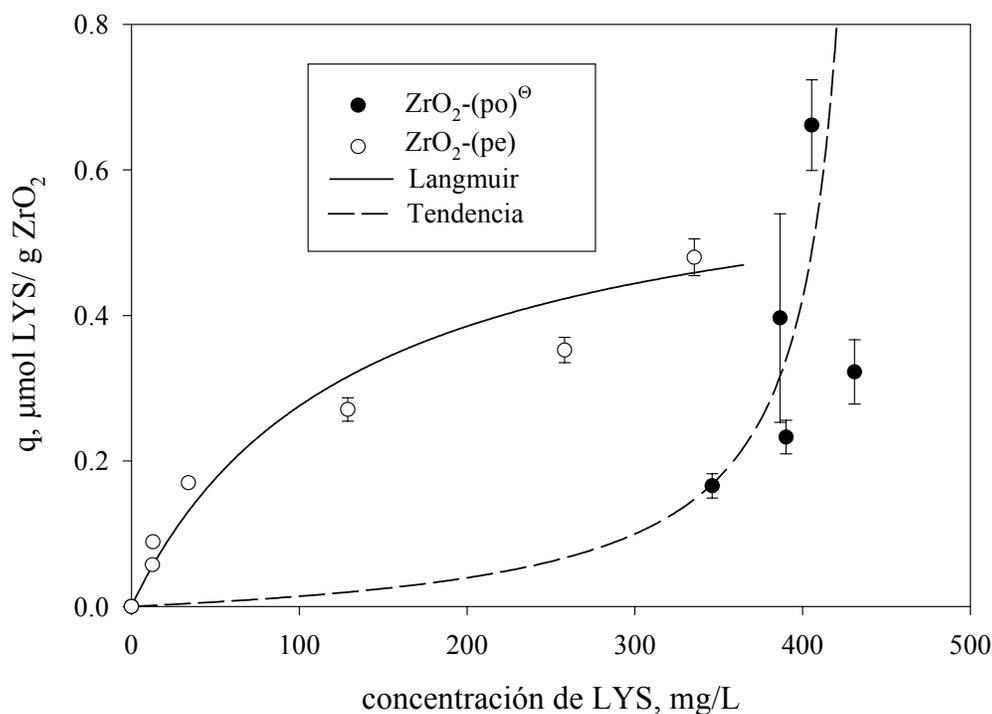


Figura 11. Isotermas de adsorción de LYS en óxido de zirconio

Algunas de las diferencias en el comportamiento de las curvas de adsorción se deben a la diferente granulometría de los adsorbentes (Tabla I) y las distintas características de las proteínas adsorbidas (Tabla II).

A pH 3.5, los adsorbentes y los adsorbatos tienen una carga positiva (Fukuzaki y otros, 1996). También, a bajas fuerzas iónicas (< 0.01) la adsorción de pequeñas moléculas de proteínas (como LYS) está afectada por las propiedades de la superficie del adsorbente. Mientras que las proteínas grandes (como BSA y OVAL) tienen una adsorción máxima alrededor de su punto isoeléctrico, sin que influya el tamaño de las partículas del adsorbente en forma alguna (Fukuzaki y otros, 1995; Kondo y Higashitani, 1992; Kim y Luna, 1989; Norde y otros, 1985; Kotsoukos y otros, 1983). Además el grupo sulfhidrilo (-SH) es uno de los grupos con más afinidad de reacción nucleofílica encontrados en las macromoléculas biológicas (Aslam y Deut, 1998). La posibilidad de obtener una isoterma de adsorción que se ajuste al modelo de Langmuir para la OVAL y la BSA sobre un adsorbente en polvo es debida principalmente a su punto isoeléctrico, la presencia de grupos -SH y la gran superficie de adsorción del adsorbente. Las isotermas de adsorción obtenidas para las mismas proteínas en los adsorbentes granulados son cóncavas, debido posiblemente a que la difusión en los poros es impedida por el tamaño de las mismas. Por contra, la lisocima (LYS) es fácilmente adsorbida en un adsorbente granulado, probablemente debido a que es una molécula pequeña, que penetra en los poros de las partículas del adsorbente y se retiene por oclusión causada por la tortuosidad de los mismos. Este fenómeno no ocurre cuando la granulometría es más pequeña y ésta tortuosidad no existe. La baja afinidad de la adsorción en óxido de zirconio en olvo también puede ser debida a sus diferentes puntos isoeléctricos (del adsorbente y la proteína), y al hecho que la LYS no tiene ningún grupo -SH que pueda favorecer la aglomeración de las moléculas.

4.2. Curvas de adsorción operando en continuo con soluciones modelo

Una vez caracterizadas las isothermas de adsorción de los óxidos metálicos estudiados se han elegido como adsorbentes para los estudios en continuo $ZrO_2-(po)$ y $ZrO_2-(pe)$.

El adsorbato utilizado para estos estudios es una solución modelo de BSA (pH 3.5 y una fuerza iónica 10^{-4}). Los ensayos de eliminación de proteínas con la solución modelo se ha realizado en la columna de escala pequeña definida en el capítulo 3.2.3.

En la Figura 12 y la Figura 13 se presentan las curvas de adsorción de BSA en $ZrO_2-(po)$ y en $ZrO_2-(pe)$, respectivamente. Los valores C/C_0 se representan en el eje de ordenada, donde C es la concentración de proteína (BSA) en la solución al salir de la columna y C_0 es la concentración a la entrada, frente al volumen tratado por unidad de lecho (BV) expresado en mL de solución por el gramo de adsorbente.

La curva de saturación con forma de “S” es típica de los adsorbentes con isothermas de adsorción favorable, como es el caso de la adsorción en continuo con $ZrO_2-(po)$, mientras que para el $ZrO_2-(pe)$ la curva de saturación es muy rápida y corresponde a una isoterma de adsorción desfavorable (Figura 9). El mismo fenómeno ha sido observado por Sarmento y otros (2000) para el estudio de los sistemas BSA – Macro-prep[®]50S y BSA - Spherosil[®]XOB15. Las isothermas de adsorción obtenidas para estos materiales han sido cóncavas y convexas, respectivamente.

Durante el tratamiento en continuo con $ZrO_2-(po)$, la proteína (BSA) se reduce unos 90 %, una vez tratados 30 BV. A volúmenes más altos, la concentración a la salida de la columna empieza a aumentar y la adsorción proteica disminuye.

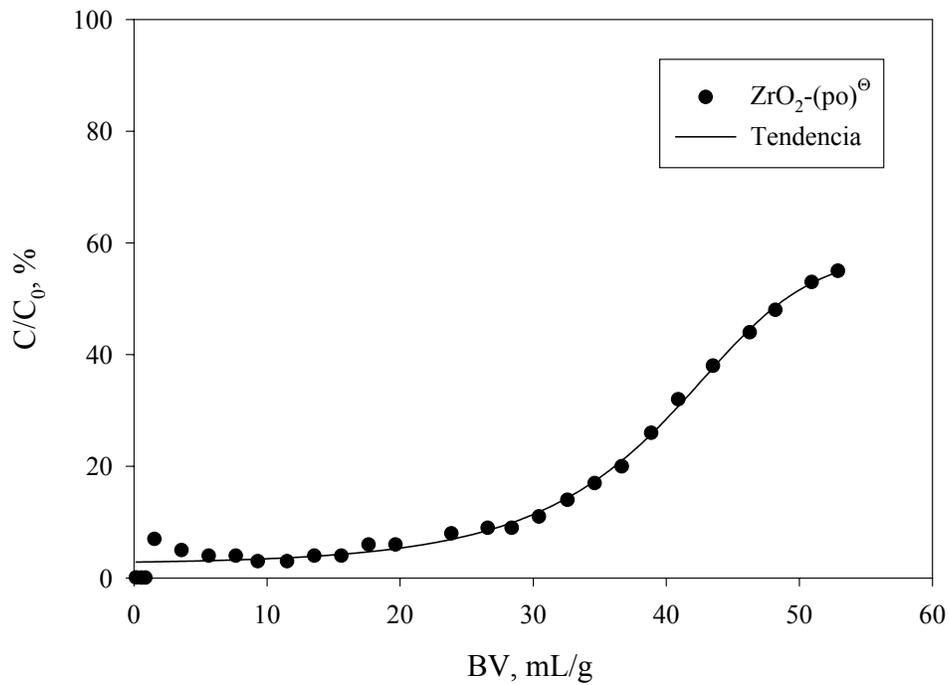


Figura 12. Curva de saturación de BSA en $ZrO_2-(po)^{\ominus}$, caudal 0.2 mL/min

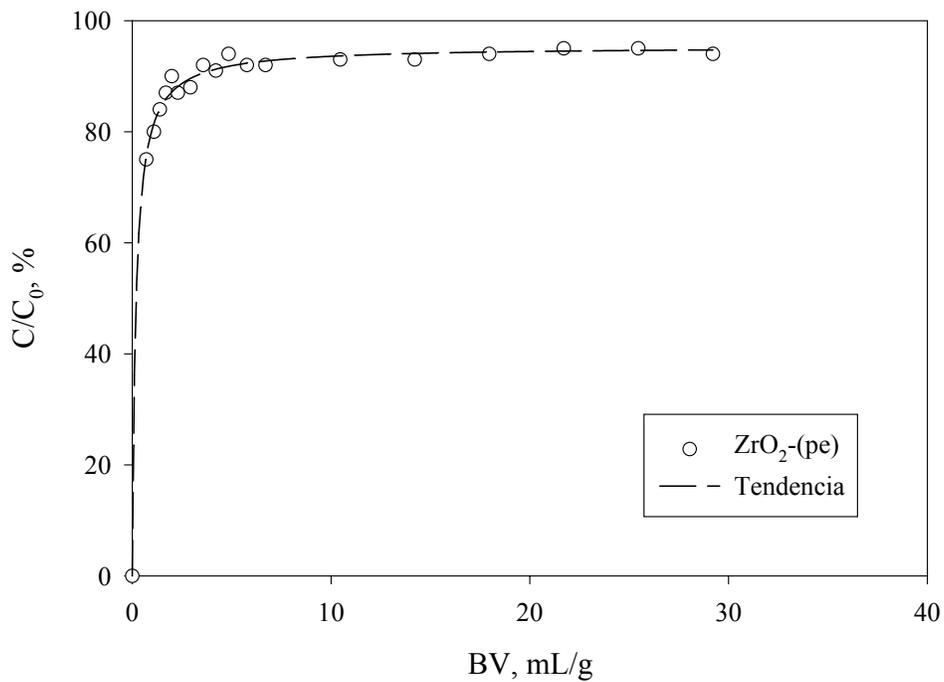


Figura 13. Curva de saturación de BSA en $ZrO_2-(pe)$, caudal 2.0 mL/min

No obstante, cuando se han tratado 50 BV la reducción de BSA es del 40 %, aunque no es aconsejable tratar volúmenes mayores, ya que la capacidad de adsorción del adsorbente disminuye notablemente, por lo que el adsorbente necesitaría ser regenerado.

El tratamiento en continuo con ZrO_2 -(pe) de la solución modelo de BSA no es favorable, como se podía esperar debido a que la isoterma de adsorción obtenida era desfavorable.

4.3. Efecto de la regeneración sobre la capacidad adsorbente del óxido zirconio después de un tratamiento con soluciones modelo

La posibilidad de la regeneración del material adsorbente se ha estudiado por diferentes procedimientos descritos en el apartado 3.3.4. El sistema estudiado básicamente ha sido el BSA – ZrO_2 -(po)[□].

La Figura 14 muestra las isotermas de adsorción obtenidas con el adsorbente regenerado utilizando los procedimientos II, III y IV, la isoterma obtenida con el adsorbente sin ningún tipo de regeneración y la isoterma inicial.

Los resultados muestran que los procedimientos II y III no son efectivos, ya que se obtiene una isoterma prácticamente igual a la obtenida con el adsorbente sin regenerar. Se ve claramente que la regeneración térmica a una temperatura de 500 °C durante 4-5 h es suficiente para que la recuperación de la capacidad de adsorción del ZrO_2 -(po)[□] en condiciones en discontinuo sea más del 90 %.

Igualmente se ha realizado un estudio de la regeneración del material adsorbente mediante los procedimientos I y II para el sistema BSA – ZrO_2 -(po)[□] operando en continuo (Figura 15).

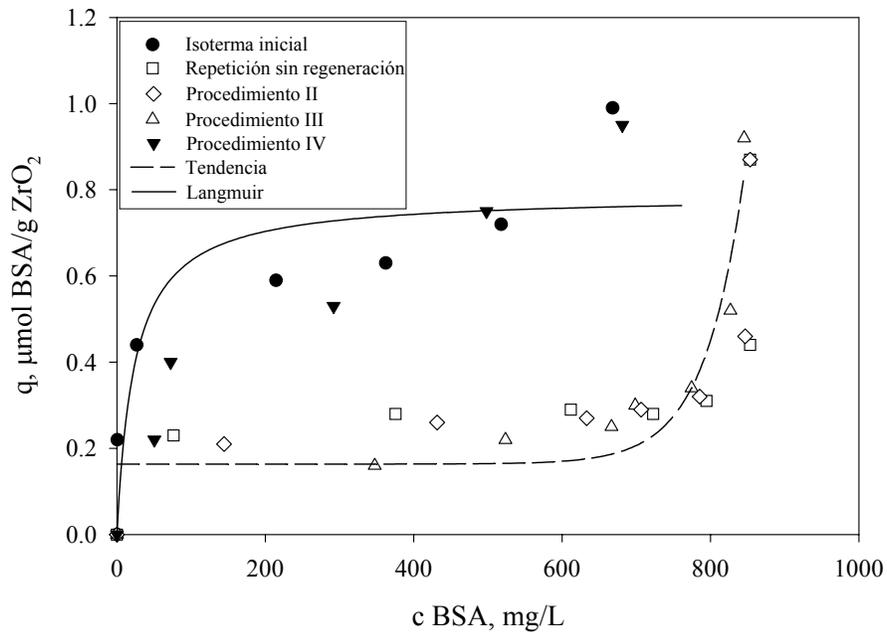


Figura 14. Comparación de la regeneración del sistema BSA – ZrO₂-(po) en condiciones discontinuas

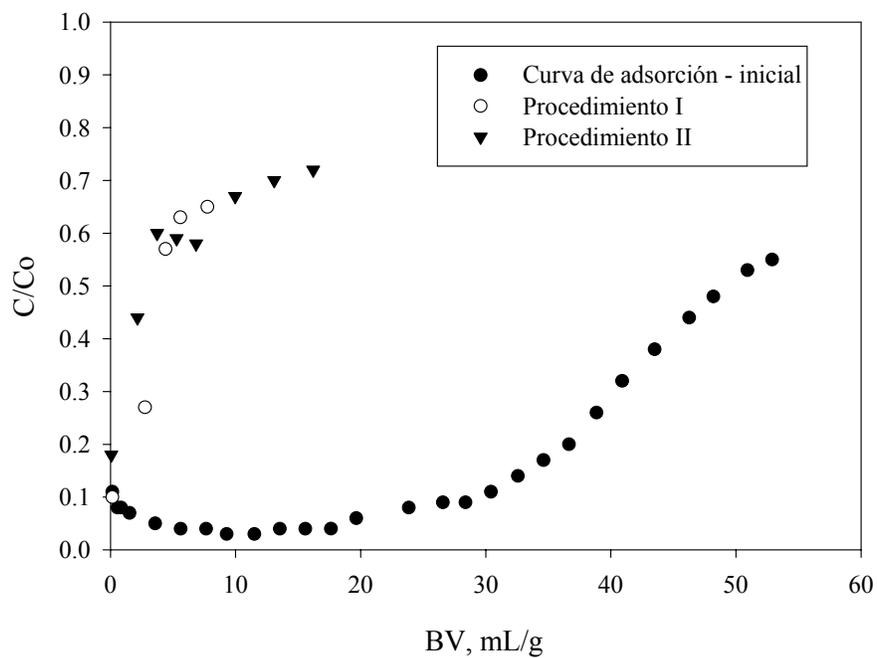


Figura 15. Comparación de la regeneración del sistema BSA – ZrO₂-(po) en condiciones continuas

Según Dumon y Barnier (1992) los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NO}_3$ forman centros de adsorción para las proteínas sobre la superficie del ZrO_2 . Con base en estas conclusiones y siguiendo el método de limpieza recomendado para las membranas cerámicas de ZrO_2 utilizadas en un proceso de ultrafiltración se ha usado el procedimiento I para la desorción de BSA (Figura 15). Se ve claramente que ni este modo ni la desorción con una solución 8 M de urea son eficaces para la regeneración completa del $\text{ZrO}_2\text{-(po)}$ [□]. La favorable adsorción de BSA sobre este adsorbente se convierte en una adsorción desfavorable después del tratamiento con los dos procedimientos aplicados.

Por lo tanto se ha decidido aplicar el tratamiento térmico para la regeneración de los adsorbentes utilizados en la estabilización proteica del vino blanco operando en continuo.

4.4. Estudios de estabilización proteica en continuo con un vino blanco

Los resultados positivos obtenidos en continuo con el sistema BSA - $\text{ZrO}_2\text{-(po)}$ [□], los experimentos con el sistema BSA - $\text{ZrO}_2\text{-(pe)}$, ambos en escala pequeña, y las capacidades de adsorción obtenidas de las isothermas de adsorción con la ovalbúmina y la lisocima con las dos granulometrías del óxido de zirconio estudiadas ha dado lugar a la investigación, con el objetivo de eliminar las proteínas de un vino blanco operando en continuo.

4.4.1. Experimentación en escala pequeña

Se ha estudiado la posibilidad de eliminar proteínas de un vino blanco operando en continuo mediante una columna empacada con óxido de zirconio. En el primer experimento realizado en esta escala se ha empacado $\text{ZrO}_2\text{-(po)}$ [□]. El segundo experimento se ha hecho

con un empaque de una mezcla de $ZrO_2-(po)^{\square}$ y $ZrO_2-(pe)$. El vino blanco utilizado se ha elaborado en el año 2000, y de la variedad *Chardonnay*. Las condiciones de los experimentos se presentan en la Tabla III.

Tabla III. Condiciones de los experimentos en escala pequeña

adsorbente	C₀ mg/L	Q*10³ L/min	W g	L cm	t_{pc} min
$ZrO_2-(po)^{\square}$	11.00	0.11	12.08	2.9	18.8
$ZrO_2-(po)^{\square}$ $ZrO_2-(pe)$	11.00	0.11	8.01 22.82	1.9 11.2	12.4 35.5

La Figura 16 muestra las curvas de saturación de las proteínas totales del vino blanco para los dos experimentos realizados. Para la columna empacada solo con $ZrO_2-(po)^{\square}$, las proteínas totales se reducen a un 50 % después de ser tratados 100 BV y el nivel de la eliminación es prácticamente constante durante todo el tratamiento.

La curva de saturación de las proteínas totales obtenidas después del tratamiento en la columna empacada con la mezcla de $ZrO_2-(po)^{\square}$ y $ZrO_2-(pe)$, muestra una reducción del 30 % en los primeros 40 BV y a partir de este volumen la eliminación disminuye a un 10 % durante el resto del tratamiento. Esta diferencia, entre el comportamiento de las dos curvas de saturación obtenidas, puede ser causada por una mala distribución de $ZrO_2-(po)^{\square}$ en el empaque de la columna, formando caminos preferenciales, provocando que su efectividad sea baja.

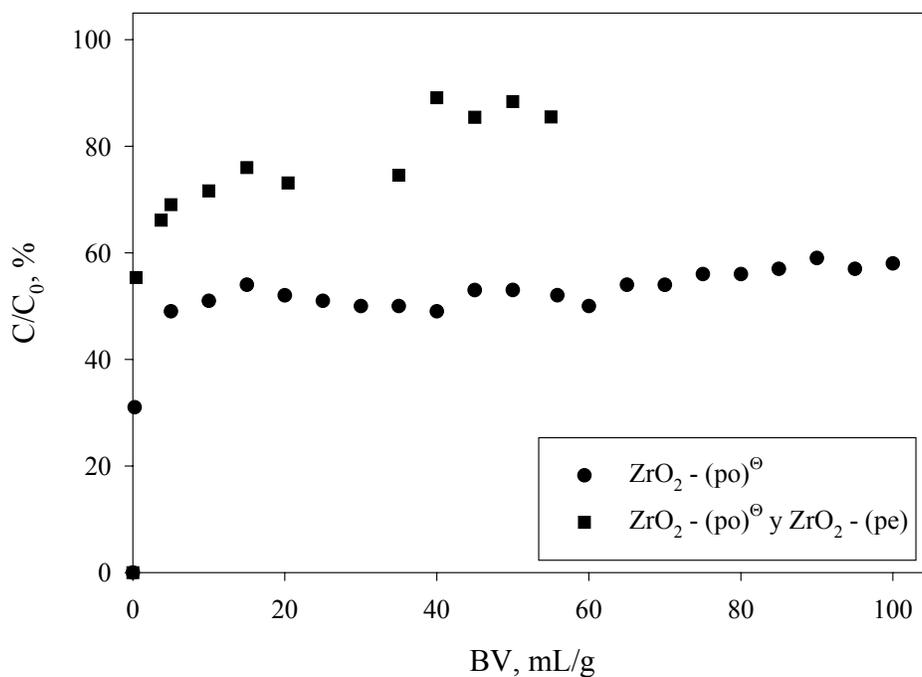


Figura 16. Curvas de saturación de proteínas totales del vino blanco (2000)

En la Figura 17 se muestran las curvas de saturación de las fracciones proteicas identificadas en el vino blanco correspondiente al experimento con la columna empacada con el $ZrO_2-(po)^{\ominus}$.

La eliminación de la fracción proteica con un peso molecular mayor de 70 kDa se mantiene prácticamente constante sobre un 15 % después de haber tratado un volumen de vino de 20 BV. Hasta este valor la disminución en la capacidad de eliminar esta fracción proteica ha aumentado rápidamente.

La fracción proteica con un rango de peso molecular entre 50-70 kDa sufre una reducción importante, siendo de un 70 % el valor medio de los primeros 25 BV de vino tratados. A partir de este valor, y hasta los 100 BV, la eliminación de esta fracción proteica se mantiene estable sobre un 50 %.

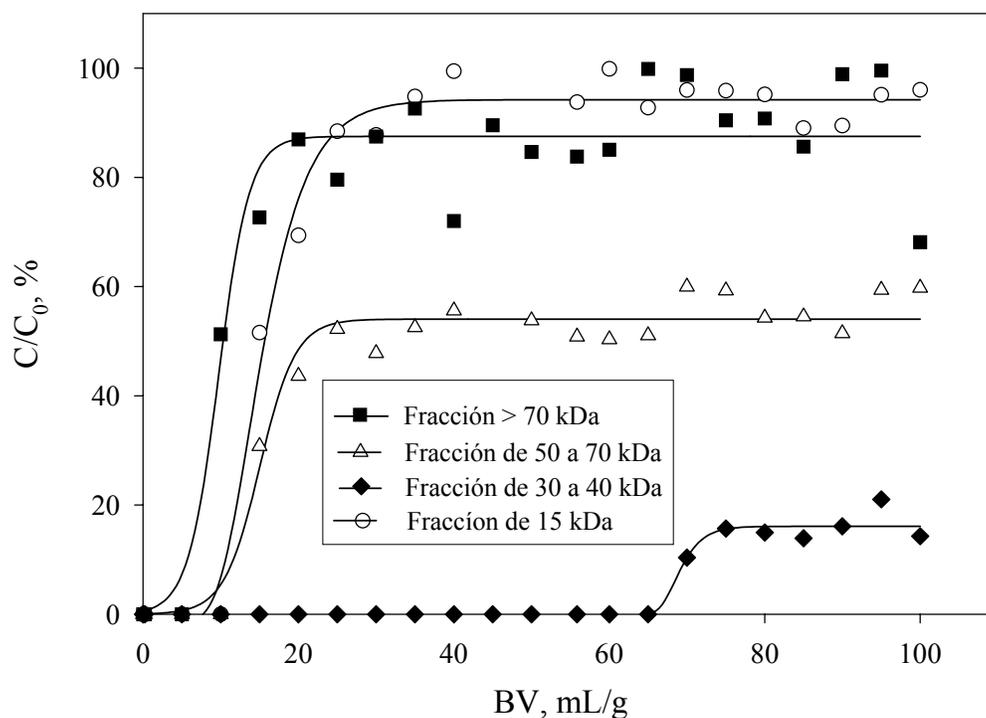


Figura 17. Curvas de saturación de las fracciones proteicas del vino blanco (2000) en $ZrO_2-(po)$

Para la tercera fracción proteica identificada, correspondiente a un rango de peso molecular entre 30-40 kDa, para todo el volumen del vino tratado (100 BV), la reducción media ha sido del 95 %, destacando que en los primeros 70 BV tratados la eliminación es prácticamente total. El vino eluído después de este valor de 70 BV, la reducción disminuye a un 85 %, permaneciendo prácticamente constante hasta los 100 BV.

Finalmente, la reducción de la fracción proteica con un peso molecular de 15 kDa disminuye a un 10 % en los primeros 25 BV y permanece en este valor a lo largo de todo el tratamiento.

Aunque es difícil de correlacionar estos resultados, debido a la complejidad de las fracciones proteicas del vino, con el estudio previo realizado con las soluciones modelo, se encuentra una cierta relación entre los pesos moleculares de las fracciones proteicas del vino y las proteínas puras utilizadas en las soluciones modelos con el $ZrO_2-(po)$ [□]. Las fracciones con un peso molecular de 30-40 kDa se eliminan en mayor proporción que las fracciones proteicas de 50-70 kDa. Este comportamiento es similar al obtenido en las isotermas de adsorción de OVAL (43 kDa) y BSA (67 kDa). La reducción de la fracción proteica con peso molecular de 15 kDa es mínima y esto puede relacionarse con la isoterma desfavorable obtenida para la LYS (14.3 kDa) en $ZrO_2-(po)$ [□].

Los resultados obtenidos para el experimento con la columna empacada con una mezcla de $ZrO_2-(po)$ [□] y $ZrO_2-(pe)$ se presentan en la Figura 18. Los perfiles de las curvas de saturación para las diferentes fracciones proteicas son similares a los obtenidos para el experimento con la columna empacada solo con $ZrO_2-(po)$ [□].

La eliminación de la fracción proteica de peso molecular mayor de 70 kDa es del orden del 5-10 % a partir de los 20 BV del vino tratado. La concentración de la fracción proteica en el rango 50-70 kDa a la salida de la columna se reduce al 60 % de la concentración de entrada a partir de los primeros 20 BV. A partir de este valor hasta el final del experimento (55 BV), esta concentración se mantiene prácticamente constante.

La eliminación de la fracción proteica con un peso molecular entre 30-40 kDa en los primeros 20 BV de vino tratado es prácticamente total, y a partir de este valor hasta el final del experimento (55 BV) la eliminación disminuye a un 60 %, valor a la que parece estabilizarse la eliminación de esta fracción proteica. Finalmente, la fracción proteica con

un peso molecular de 15 kDa a partir de volúmenes de vino tratado de 20 BV prácticamente no se elimina.

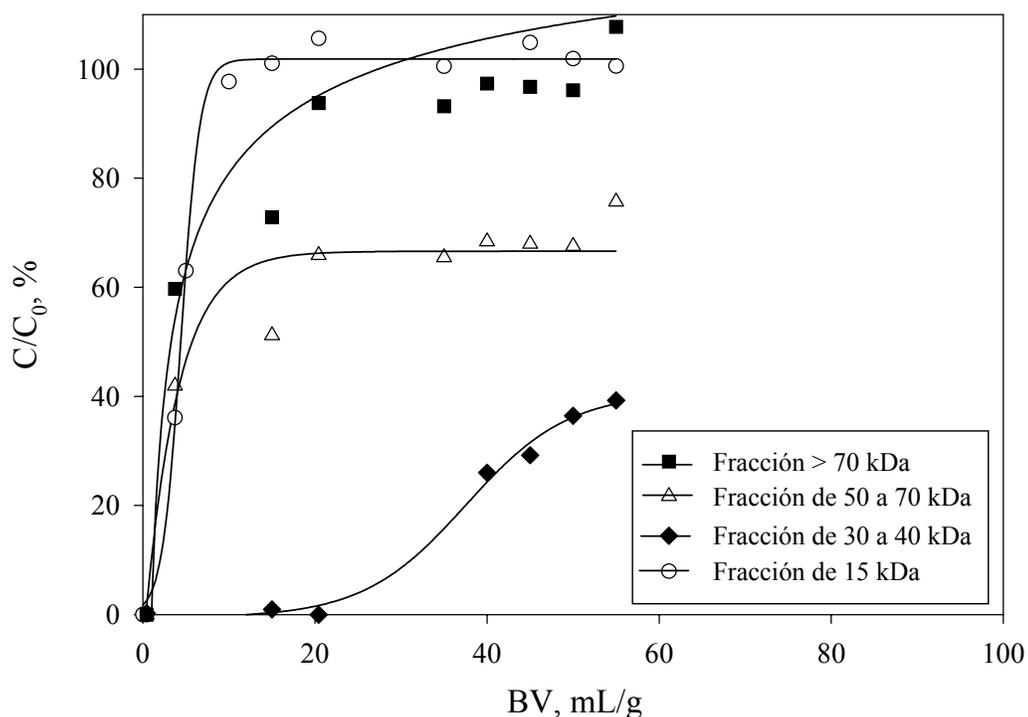


Figura 18. Curvas de saturación de las fracciones proteicas del vino blanco (2000) en una mezcla de ZrO_2 -(po)[□] y ZrO_2 -(pe)

En los vinos obtenidos para los dos experimentos en continuo, después del tratamiento realizado, se ha estudiado su estabilidad proteica. Los resultados obtenidos del test de estabilidad proteica se presentan en la Tabla IV. Se han determinado la turbidez de las muestras antes y después de aplicar el test del calentamiento/enfriamiento descrito en el capítulo 3.3.3.2.

Debido a que en el segundo experimento solamente se pudieron tratar un volumen de vino equivalente a 55 BV, para el primer experimento se han analizado el vino obtenido en los

primeros 60 BV, así como el vino obtenido después de tratar un volumen equivalente a 100 BV.

Tabla IV. Estabilidad proteica del vino blanco *Chardonnay* (2000)

Muestras	Turbidez antes del test (NTU)	Turbidez después del test (NTU)	Diferencia
Vino blanco sin tratamiento	5.43	31.18	25.75
Vino blanco tratado con $ZrO_2-(po)^{\square}$, acumulado 60 BV	3.24	3.90	0.66
Vino blanco tratado con $ZrO_2-(po)^{\square}$, acumulado 100 BV	11.32	18.48	7.16
Vino blanco tratado con $ZrO_2-(po)^{\square}$ y $ZrO_2-(pe)$, acumulado 55 BV	19.02	23.24	4.22
Vino blanco tratado con Bentonita	0.48	20.41	19.93

Como se puede ver en la Tabla IV el único vino que cumple la condición de estabilidad proteica definida por Moine-Ledoux y Dubourieu, (1999), de que la diferencia en la turbidez sea menor de 2 NTU entre el vino inicial y el vino una vez aplicado el test, es el vino tratado con $ZrO_2-(po)^{\square}$ para el volumen equivalente a 60 BV. Destacar que el vino correspondiente al experimento 2 (volumen tratado equivalente a 55 BV) es inestable, pero notablemente menos inestable que el vino sin tratamiento, y el vino estabilizado por el procedimiento tradicional en bodega.

4.4.2. Experimentación en escala media

Vistos los resultados obtenidos de estabilización proteica en escala pequeña para un vino del año 2000. Se planificó para la siguiente campaña (2001) la repetición de los estudios de estabilización proteica de vinos blancos mediante la adsorción en continuo en una escala superior, que permitiese tratar un volumen de vino importante, y poder caracterizar los parámetros analíticos principales del vino tratado por este procedimiento.

En los experimentos realizados en escala media se ha mantenido constante el tiempo de pseudo contacto entre el adsorbente utilizado y el vino blanco.

El vino utilizado es de la misma variedad *Chardonnay* empleado en escala pequeña. La diferencia principal entre los dos vinos ha sido el contenido proteico total, muy superior para el vino *Chardonnay* elaborado en la vendimia del año 2001, 30 mg/L frente a 11 mg/L del vino del año 2000.

Los adsorbentes utilizados en esta fase han sido tanto el $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ como el $ZrO_2-(pe)$. El material adsorbente se ha regenerado en ambos casos por el procedimiento IV descrito en el capítulo 3.3.4. (regeneración con un tratamiento térmico a una temperatura de 500 °C durante 16 h).

Las condiciones de los experimentos se presentan en la Tabla V.

Tabla V. Condiciones de los experimentos en escala media

adsorbente	C_0 mg/L	$Q \cdot 10^3$ L/min	W g	L cm	t_{pc} min
$ZrO_2-(po)^{\square\square}$ nuevo	30	2.00	203.4	4.2	17.4
$ZrO_2-(po)^{\square\square}$ regenerado	30	2.00	203.4	4.2	17.4
$ZrO_2-(pe)$ nuevo	30	2.00	253.6	10.8	21.7
$ZrO_2-(pe)$ regenerado	30	2.00	253.6	10.8	21.7

La Figura 19 muestra las curvas de saturación correspondientes a las proteínas totales y de las diferentes fracciones proteicas, del vino blanco *Chardonnay* de la cosecha del año 2001, después del tratamiento a través de la columna empacada con el $ZrO_2-(po)^{□□}$.

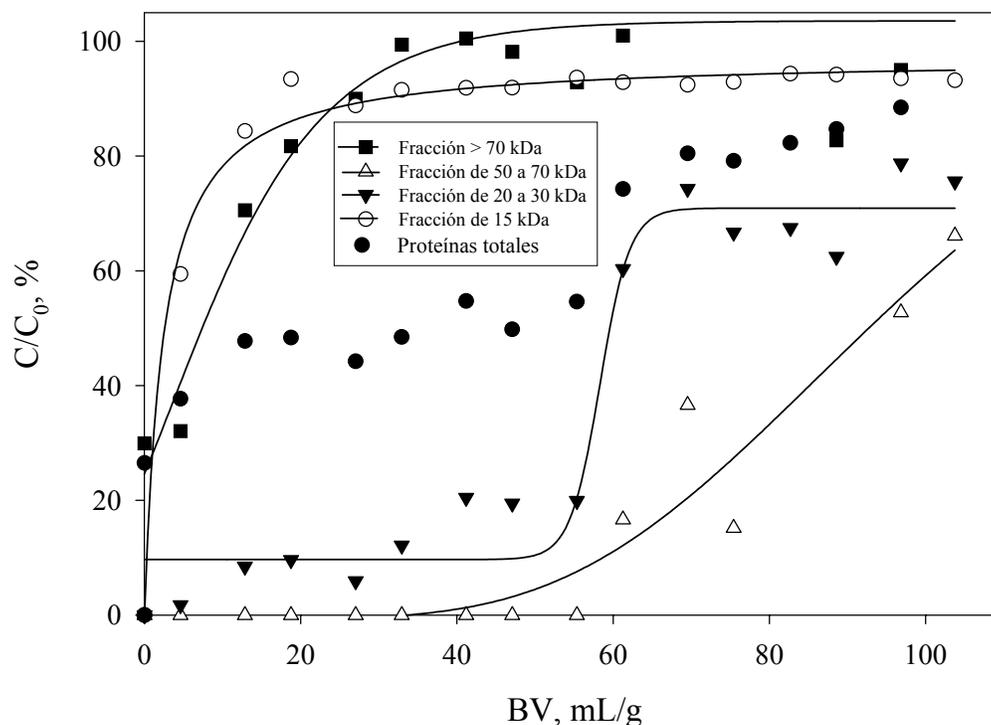


Figura 19. Curvas de saturación de vino blanco (2001) en $ZrO_2-(po)^{□□}$ nuevo

La reducción de las proteínas totales es de un 50 % durante el tratamiento de los primeros 55 BV (mismo nivel de reducción que en escala pequeña). A partir de este valor la eliminación de las proteínas totales disminuye rápidamente a valores del 20 % hasta el final del volumen tratado.

Las curvas de saturación obtenidas en escala media son similares a las obtenidas en escala pequeña, destacando que el perfil proteico del vino de la cosecha 2001 tiene una fracción

proteica de 20-30 kDa que el vino de la cosecha 2000 no posee, además en la cosecha 2001 la fracción de 30-40 kDa no existe.

La reducción de la fracción proteica con un peso molecular mayor de 70 kDa y de la fracción proteica de 15 kDa presenta un perfil similar al obtenido en escala pequeña. Una vez tratados 20-25 BV, la eliminación se reduce a valores del orden del 10 %.

La reducción de la fracción proteica con un peso molecular entre 50-70 kDa hasta 55 BV es total. La concentración de esta fracción en el vino tratado aumenta a partir de este valor, llegando a una reducción del 30 % para 100 BV de vino tratado. Respecto al vino tratado en escala pequeña el perfil en principio parece diferente (ver Figura 17), no obstante hasta un cierto volumen la reducción de esta fracción es total en ambos experimentos, seguido de una disminución rápida de esta capacidad de reducción, volviéndose a estabilizar, cosa que no se ha podido observar en el experimento en escala media, debido a que no se ha llegado a una estabilización en la concentración de esta fracción proteica del vino tratado.

La nueva fracción proteica con un peso molecular entre 20 a 30 kDa presenta una reducción del 80-90 % en los primeros 50 BV del vino tratado. A volúmenes tratados, mayores de 50 BV la reducción de esta fracción disminuye al 30 %, permaneciendo constante hasta los 100 BV.

El $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ utilizado en el experimento anterior se ha regenerado mediante el procedimiento IV, y los resultados obtenidos de las curvas de saturación con el adsorbente regenerado a condiciones de operación iguales (Tabla V) se muestran en la Figura 20.

Se puede observar que la reducción de proteínas totales se estabiliza a partir de los 30 BV a un 50 % y este valor permanece constante durante todo el experimento, de forma similar al experimento en escala pequeña.

El comportamiento de la fracción proteica de 15 kDa es el mismo con el material nuevo y regenerado. El perfil de la curva de saturación es similar, y rápidamente se estabiliza en una reducción del 10 %. La fracción correspondiente a un peso molecular mayor de 70 kDa disminuye su reducción progresivamente hasta el 50 % en los primeros 40 BV, permaneciendo en este valor hasta los 70 BV del vino tratado, disminuyendo una segunda vez a valores del 20-25 % hasta el final del experimento. También se puede observar en la Figura 20 que se logra la eliminación total de la fracción proteica con un peso molecular entre 50-70 kDa.

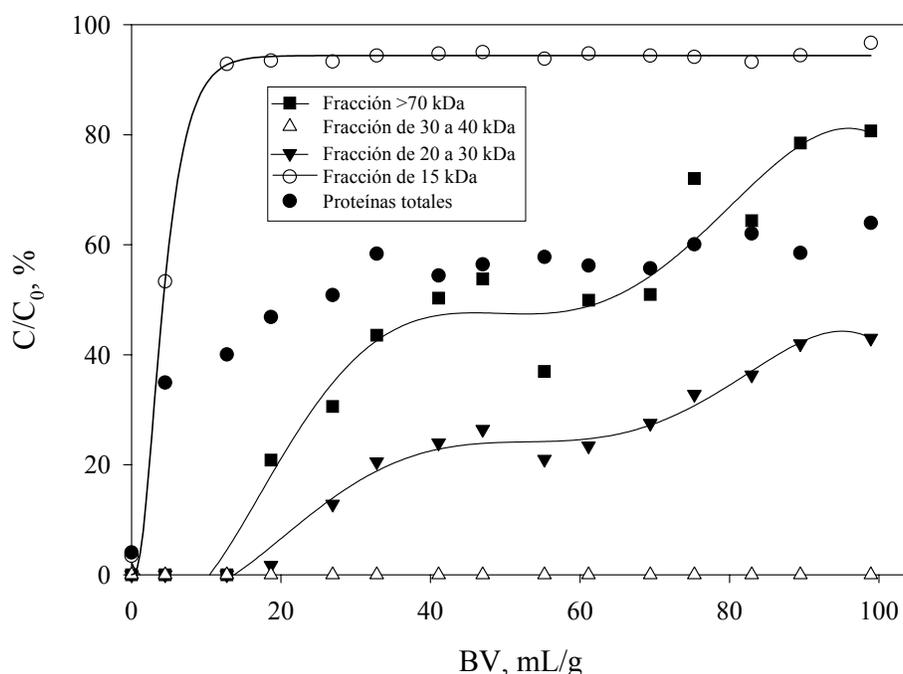


Figura 20. Curvas de saturación de vino blanco (2001) en $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ regenerado

La reducción de la fracción proteica de 20-30 kDa con el adsorbente regenerado también ha aumentado respecto al material nuevo. En los primeros 20 BV esta prácticamente nula.

Después de los 20 BV hasta los 60 BV se mantiene sobre el 80 %, y para volúmenes tratados superiores a 60 BV la reducción disminuye a valores del 60 %, mientras que para el $\text{ZrO}_2\text{-(po)}$ nuevo a partir de este volumen del vino tratado la reducción proteica disminuía al 30 %.

Después de la regeneración térmica el comportamiento del material adsorbente ha variado, ya que ha aumentado su capacidad de adsorción respecto el material nuevo. Probablemente el efecto de la regeneración a temperatura alta (500 °C) aumenta el número de los centros activos en la superficie del adsorbente.

La Figura 21 muestra las curvas de saturación del vino 2001 con el $\text{ZrO}_2\text{-(pe)}$ nuevo. Como se puede observar las proteínas totales se reducen un 35 % después de ser tratadas los primeros 40 BV. A partir de este valor la eliminación de las proteínas totales disminuye y el nivel de la eliminación es del 20 % y se mantiene constante durante el resto del tratamiento. El comportamiento de la fracción proteica con un peso molecular mayor de 70 kDa es muy parecido al experimento con el $\text{ZrO}_2\text{-(po)}$ nuevo (Figura 19). La reducción proteica es mínima, del orden del 5-10 %. La reducción de la fracción proteica con un peso molecular entre 50-70 kDa es total durante los primeros 10 BV. Con el aumento del volumen de vino tratado la adsorción de esta fracción disminuye y a los 30 BV tratados la reducción se estabiliza alrededor del 30 %. Este valor se conserva hasta el final del tratamiento. La fracción proteica con un peso molecular entre 20 y 30 kDa tiene una tendencia similar, aunque su reducción al inicio es de un 80 %, a partir de valores mayores de 30 BV de vino tratado la reducción de esta fracción pasa a ser del 35-40 %.

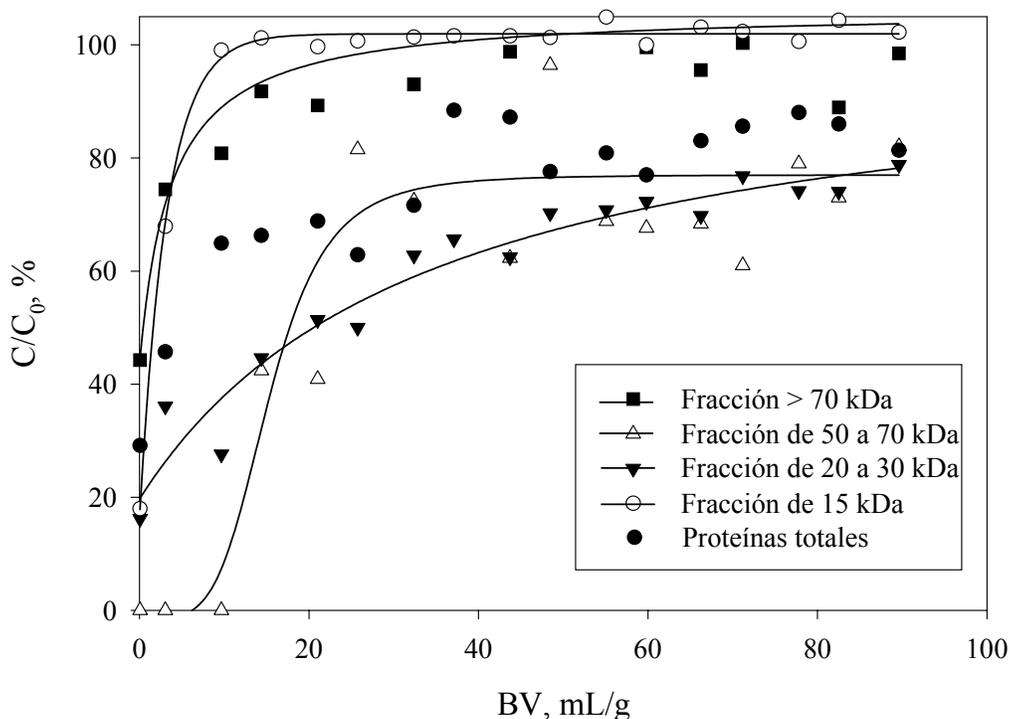


Figura 21. Curvas de saturación de vino blanco (2001) en ZrO_2 -(pe) nuevo

Finalmente, la reducción de la fracción proteica con un peso molecular de 15 kDa es prácticamente nula a partir de los primeros 10 BV de volumen de vino tratado, y permanece en este valor durante todo el tratamiento.

De la misma forma que para el ZrO_2 -(po) se ha regenerado térmicamente el ZrO_2 -(pe). Las curvas de saturación obtenidas se muestran en la Figura 22. Las condiciones de operación han sido las mismas que para la estabilización con el ZrO_2 -(pe) nuevo (ver Tabla V).

Las proteínas totales se reducen en un 35 %, y este valor permanece constante durante todo el tratamiento. Después de la regeneración térmica, se observa un aumento de la capacidad de adsorción del ZrO_2 -(pe) regenerado, respecto el material nuevo, del mismo modo que con el ZrO_2 -(po) ^{□□}.

La fracción proteica menos afectada por la regeneración del ZrO_2 -(pe) es la fracción con menor peso molecular (de 15 kDa). La reducción es del orden del 10 % mientras que para el material inicial era prácticamente nula. La fracción con un peso molecular mayor de 70 kDa se reduce en un 30 %, permaneciendo prácticamente constante hasta los 100 BV del vino tratado. La fracción proteica con un peso molecular entre 50-70 kDa se elimina totalmente en los primeros 20 BV. A partir de los 20 BV la adsorción de esta fracción disminuye al 50 %, y este valor permanece constante hasta el final del tratamiento. La reducción de la fracción proteica con un peso molecular entre 20 a 30 kDa es del 90 % en el inicio del experimento, disminuyendo esta capacidad de reducción de la misma fracción de proteínas durante el resto del tratamiento, llegando a valores del 40-50 %, superiores a los obtenidos con el adsorbente sin regenerar.

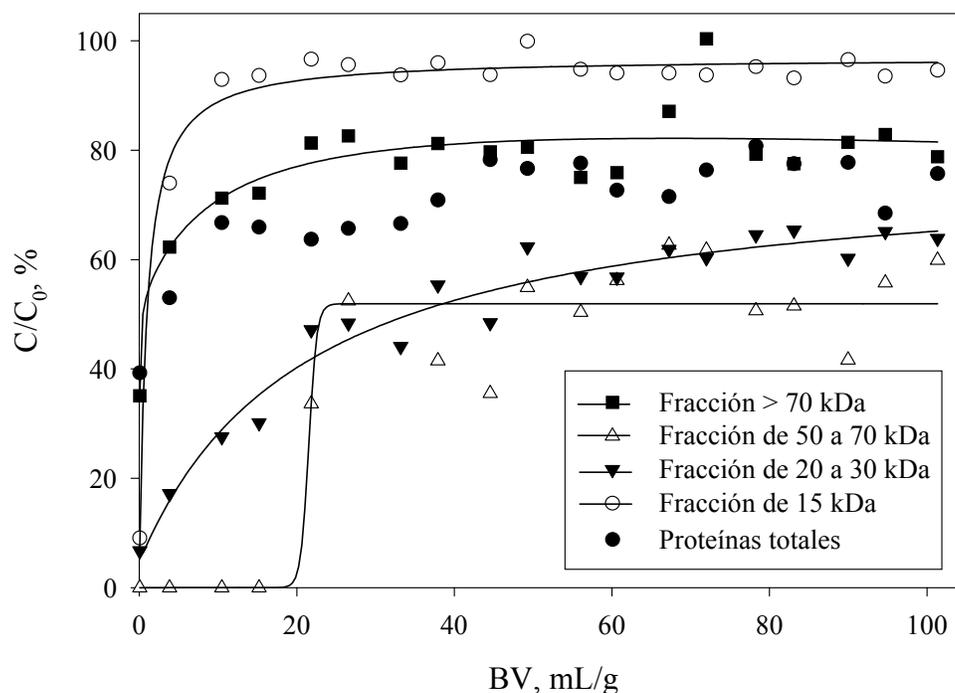


Figura 22. Curvas de saturación de vino blanco (2001) en ZrO_2 -(pe) regenerado

4.5. Efecto de la regeneración sobre la capacidad adsorbente del $ZrO_2-(po)$ y $ZrO_2-(pe)$ en escala media

En primer lugar se compara el efecto que ha tenido la regeneración térmica (procedimiento IV) del material adsorbente sobre la cantidad adsorbida de las proteínas totales, evaluadas por el método de Bradford, en los experimentos realizados en escala media. En segundo lugar se realiza la misma comparación para cada una de las fracciones proteicas identificadas en el vino blanco *Chardonnay* (2001).

En la Figura 23 se observa claramente que hay una diferencia importante entre la adsorción de las proteínas totales tratadas debido a la granulometría del adsorbente. Esta diferencia es mayor después de la regeneración térmica de los dos adsorbentes. Hay un cambio importante en la reducción de las proteínas totales del vino blanco pasado a través de la columna empacada con $ZrO_2-(po)$ regenerado comparado con el mismo material antes de la regeneración. Este cambio tiene un valor del 30 % de diferencia a partir de los 60 BV de vino tratado. Igualmente se observa un comportamiento similar, aunque no tan importante para el caso de la columna rellena con $ZrO_2-(pe)$. Posiblemente este comportamiento indique que el mecanismo de adsorción sea similar independientemente del tratamiento térmico, pero se ha podido producir un aumento de los centros activos, que haga aumentar la capacidad total del material adsorbente después de la regeneración.

La Figura 24 muestra el cambio que ocurre en el comportamiento del adsorbente con la fracción proteica correspondiente a mayor de 70 kDa después de pasar el vino a través de unas columnas empacadas con $ZrO_2-(po)$ y $ZrO_2-(pe)$, respectivamente, antes y después de la regeneración térmica.

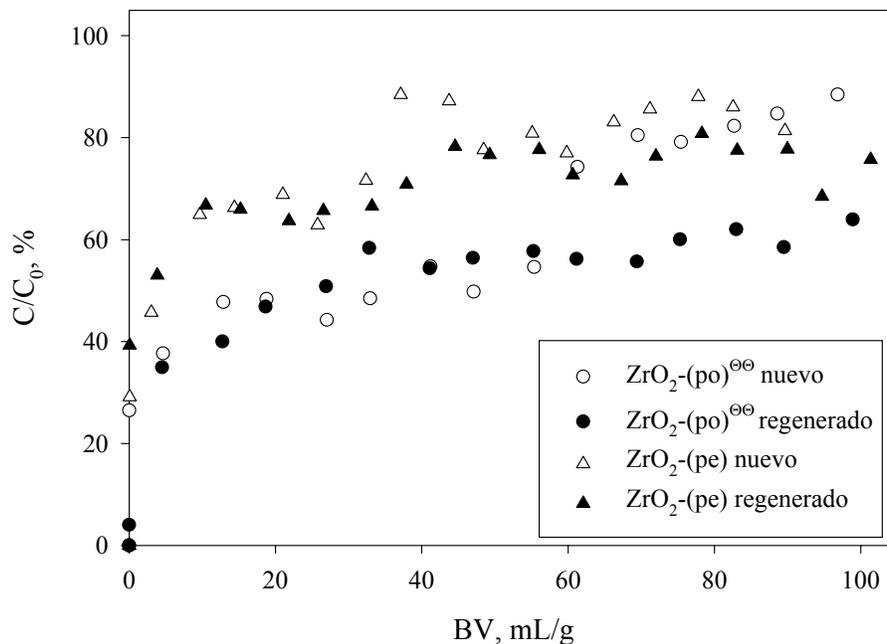


Figura 23. Comportamiento de proteínas totales del vino blanco (2001) a través de una columna empacada en escala media

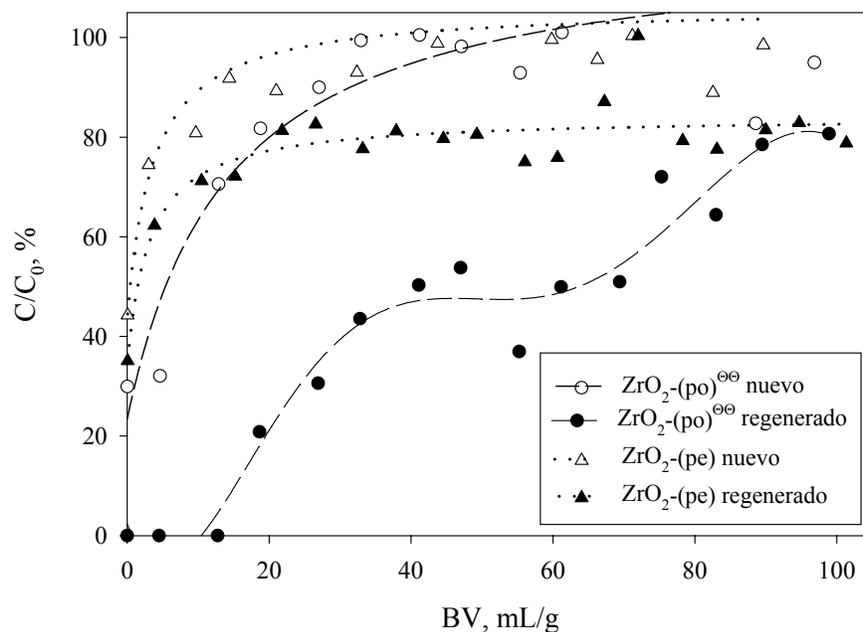


Figura 24. Comportamiento de la fracción proteica (> 70 kDa) del vino blanco (2001) a través de una columna empacada en escala media

Se observa que la adsorción de esta fracción es muy similar con los dos adsorbentes de diferente granulometría antes de regenerarlos. Por contra, la regeneración aplicada para los dos adsorbentes tiene un efecto mayor en el modo de adsorción de esta fracción proteica para el $ZrO_2-(po)^{\square\square}$. La eliminación de esta fracción no solo aumenta con la regeneración, sino que también cambia la forma de adsorción.

El efecto del tratamiento térmico de los adsorbentes sobre la fracción proteica con un peso molecular de 50 a 70 kDa se muestra en la Figura 25.

Aunque esta fracción proteica se elimina al 100 % en los primeros 55 BV tratados con $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ antes de regenerarlo, después de la regeneración la eliminación de esta fracción es total durante todo el tratamiento. Igualmente la adsorción aumenta para el $ZrO_2-(pe)$ regenerado pasando de una reducción del 25 % al 50 %, a partir de haber tratado 25 BV del vino hasta el final del tratamiento.

Es importante hacer énfasis en el hecho de que la eliminación es total en el caso del tratamiento con el $ZrO_2-(pe)$ regenerado en los primeros 20 BV.

La Figura 26 presenta las curvas de saturación obtenidas para el $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ y $ZrO_2-(pe)$, antes y después de la regeneración, para la fracción proteica correspondiente a 20-30 kDa.

Nuevamente se ve que con la regeneración térmica la adsorción ha mejorado. La eliminación de la fracción proteica con el $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ regenerado es total en los primeros 20 BV. A partir de este valor disminuye levemente al 80 % y se mantiene hasta los 60 BV, después de los cuales disminuye un poco más llegando a un 60 % hasta el final del tratamiento. El comportamiento de esta fracción proteica sobre el $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ antes de la regeneración es similar en los primeros 50 BV (reducción de un promedio del 90 %), y a partir de los 50 BV la adsorción disminuye a un 35 %.

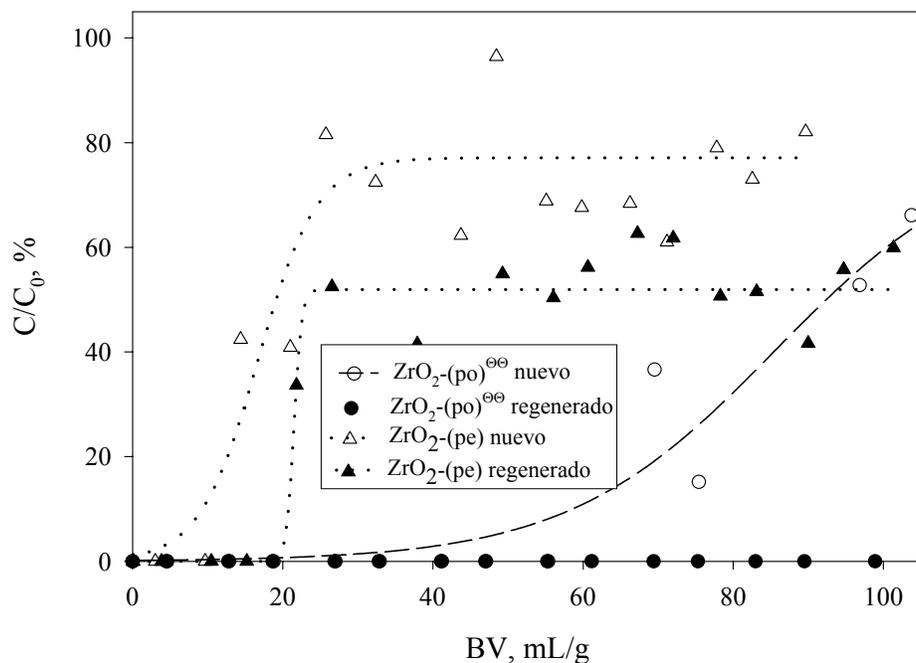


Figura 25. Comportamiento de la fracción proteica (de 50 a 70 kDa) del vino blanco (2001) a través de una columna empacada en escala media

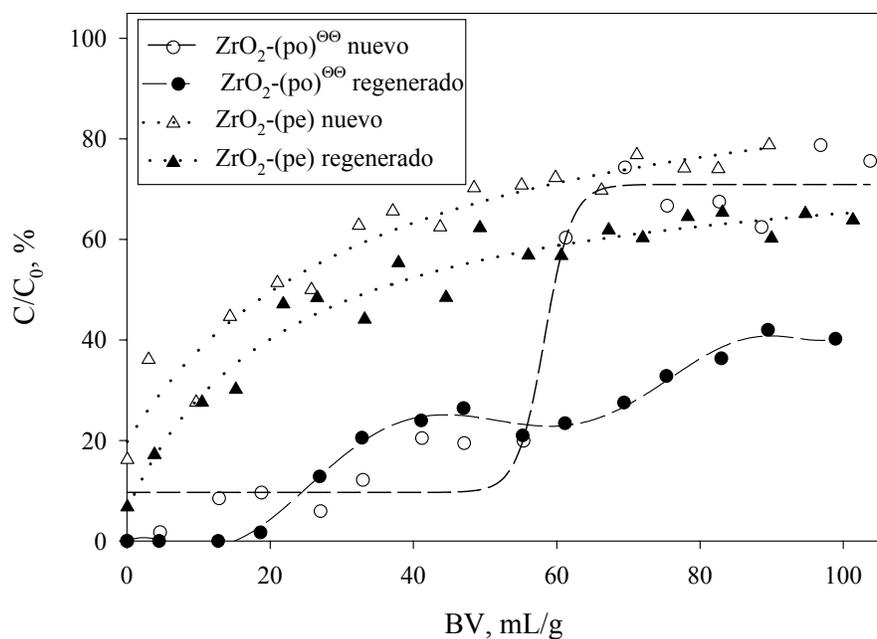


Figura 26. Comportamiento de la fracción proteica (de 20 a 30 kDa) del vino blanco (2001) a través de una columna empacada en escala media

El comportamiento de la adsorción de la fracción proteica de 20 a 30 kDa con ZrO_2 -(pe) antes y después de la regeneración es muy similar al comportamiento de la fracción proteica con un peso molecular mayor de 70 kDa con los mismos adsorbentes. El incremento de la capacidad de adsorción para esta fracción proteica aumenta un 10 %, entre la forma inicial y la regenerada.

También destacar que el comportamiento de esta fracción es muy distinto para las dos granulometrías estudiadas, ZrO_2 -(po) y ZrO_2 -(pe). Relacionando este comportamiento podemos decir que esta fracción proteica tiene una adsorción favorable con el ZrO_2 -(po) y desfavorable con el ZrO_2 -(pe).

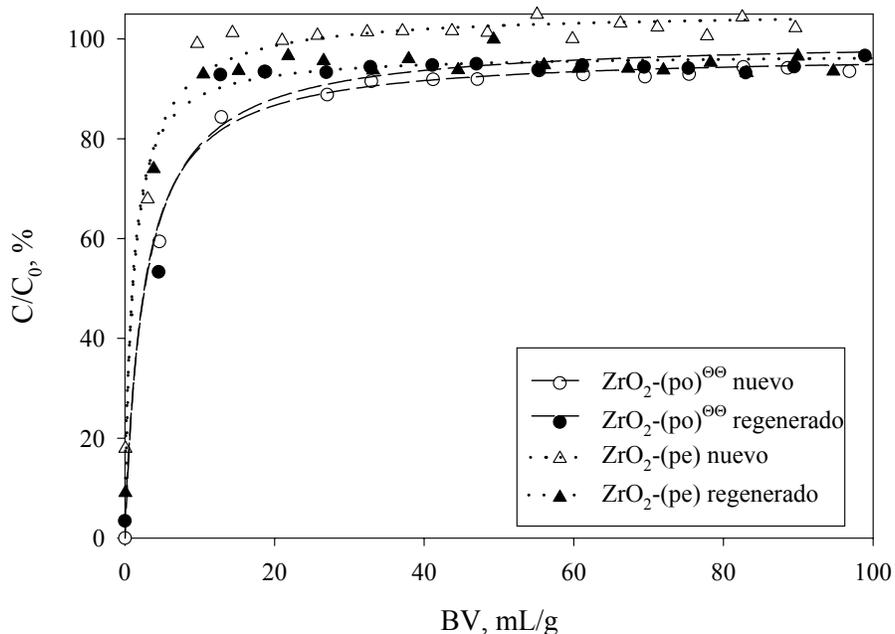


Figura 27. Comportamiento de la fracción proteica (de 15 kDa) del vino blanco (2001) a través de una columna empacada en escala media

Finalmente la fracción proteica con un peso molecular de 15 kDa (Figura 27) muestra una adsorción mínima para las dos granulometrías estudiadas, aunque la forma regenerada térmicamente presenta un ligero aumento de su capacidad de adsorción, principalmente el ZrO_2 -(pe). La reducción de esta fracción proteica es solamente de un 10 % a partir de los 20 BV del vino tratado.

4.6. Estabilidad proteica y caracterización de los vinos

4.6.1. Estabilidad de los vinos obtenidos

Los vinos obtenidos después del tratamiento con el ZrO_2 -(po)^{⊗⊗} y el ZrO_2 -(pe), y sus respectivas formas regeneradas, se han analizado desde el punto de vista de su estabilidad proteica.

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre las características fisicoquímicas del vino tratado, igualmente se han estudiado diferentes fracciones del vino obtenido.

Las Tablas VI y VII muestran la estabilidad proteica de los vinos y sus fracciones obtenidas después del tratamiento con el ZrO_2 -(po)^{⊗⊗} nuevo y el regenerado térmicamente, respectivamente.

Para los vinos obtenidos después del tratamiento con el ZrO_2 -(po)^{⊗⊗}, solo los tratados con la forma regenerada térmicamente muestran una estabilidad proteica de una diferencia de turbidez < 2 NTU, cumpliendo el criterio de Moine-Ledoux y Dubourdieu (1999).

No obstante aunque la diferencia de la turbidez medida para las diferentes fracciones del vino acumulado después del tratamiento con el ZrO_2 -(po)^{⊗⊗} nuevo es mayor de 2 NTU, el

vino tratado muestra un aumento de la estabilidad comparada con la misma del vino blanco sin tratamiento.

Tabla VI. Estabilidad proteica del vino blanco *Chardonnay* (2001), tratado con óxido de zirconio en polvo nuevo

Vino	Turbidez antes del test, (NTU)	Turbidez después del test, (NTU)	Diferencia Δ , (NTU)
sin tratamiento	0.83	115.80	114.98
tratado, acumulado 0-10 BV	0.98	8.56	7.58
tratado, acumulado 0-30 BV	0.57	18.13	17.67
tratado, acumulado 0-60 BV	0.46	26.94	26.48
tratado, acumulado 0-100 BV	0.31	61.30	60.99
tratado, acumulado 10-60 BV	0.21	33.08	32.87
tratado, acumulado 60-100 BV	0.61	128.05	127.44

Tabla VII. Estabilidad proteica del vino blanco *Chardonnay* (2001), tratado con óxido de zirconio en polvo regenerado

Vino	Turbidez antes del test, (NTU)	Turbidez después del test, (NTU)	Diferencia Δ , (NTU)
sin tratamiento	0.83	115.80	114.98
tratado, acumulado 0-30 BV	0.38	0.75	0.37
tratado, acumulado 0-60 BV	0.22	1.14	0.92
tratado, acumulado 0-100 BV	0.51	2.58	2.07
tratado, acumulado 5-30 BV	0.14	0.54	0.40
tratado, acumulado 30-100 BV	0.26	6.61	6.35

En las tablas VIII y IX se presentan los resultados de la turbidez y la estabilidad proteica de los diferentes volúmenes acumulados del vino blanco *Chardonnay* (2001), después de que se ha hecho pasar a través de una columna empacada con el ZrO_2 -(pe) nuevo y el regenerado térmicamente.

Tabla VIII. Estabilidad proteica del vino blanco *Chardonnay* (2001), tratado con óxido de zirconio en partículas nuevo

Vino	Turbidez antes del test, (NTU)	Turbidez después del test, (NTU)	Diferencia Δ , (NTU)
sin tratamiento	0.83	115.80	114.98
tratado, acumulado 0-10 BV	1.92	6.25	4.33
tratado, acumulado 0-30 BV	1.13	5.31	4.18
tratado, acumulado 0-60 BV	0.76	7.56	6.80
tratado, acumulado 0-100 BV	0.73	19.46	18.73
tratado, acumulado 10-40 BV	0.97	11.85	10.88
tratado, acumulado 50-100 BV	0.74	26.15	25.41

Tabla IX. Estabilidad proteica del vino blanco *Chardonnay* (2001), tratado con óxido de zirconio en partículas regenerado

Vino	Turbidez antes del test, (NTU)	Turbidez después del test, (NTU)	Diferencia Δ , (NTU)
sin tratamiento	0.83	115.80	114.98
tratado, acumulado 0-10 BV	0.46	18.12	17.66
tratado, acumulado 0-30 BV	0.50	25.28	24.78
tratado, acumulado 0-60 BV	0.56	38.89	38.33
tratado, acumulado 0-100 BV	0.45	56.67	56.22
tratado, acumulado 10-30 BV	0.29	32.58	32.29
tratado, acumulado 45-100 BV	0.53	58.10	57.57

La adsorción de proteínas sobre el ZrO_2 -(pe) no ha logrado estabilizar el vino tratado, aunque también se ha reducido notablemente su inestabilidad, sobre todo después del tratamiento con el ZrO_2 -(pe) nuevo.

Se ha analizado la relación entre la turbidez y la reducción de las fracciones proteicas, obtenida con los diferentes adsorbentes utilizados en los tratamientos aplicados para la estabilización del vino blanco estudiado. La expresión gráfica de esta relación se muestra en las Figuras 28-31. Las tres series de puntos para cada fracción proteica presente en el

vino blanco *Chardonnay* (2001) corresponden a las acumulaciones representativas de 0 a 30, 60 y 100 BV, respectivamente.

Se observa que la fracción correspondiente a 15 kDa no parece tener ninguna influencia en la diferencia de turbidez, pues en todas las pruebas realizadas su nivel permanece prácticamente constante aunque la estabilidad proteica varía. En estudios realizados de Hsu y Heatherbell (1987), llegaron a conclusiones bien diferentes, ya que la inestabilidad proteica se ha atribuido principalmente a dicha fracción.

Los niveles de concentración de las fracciones proteicas de 20-30 y 50-70 kDa, son diferentes en función del adsorbente usado. Para un mismo tratamiento su nivel de eliminación en función del volumen tratado es variable.

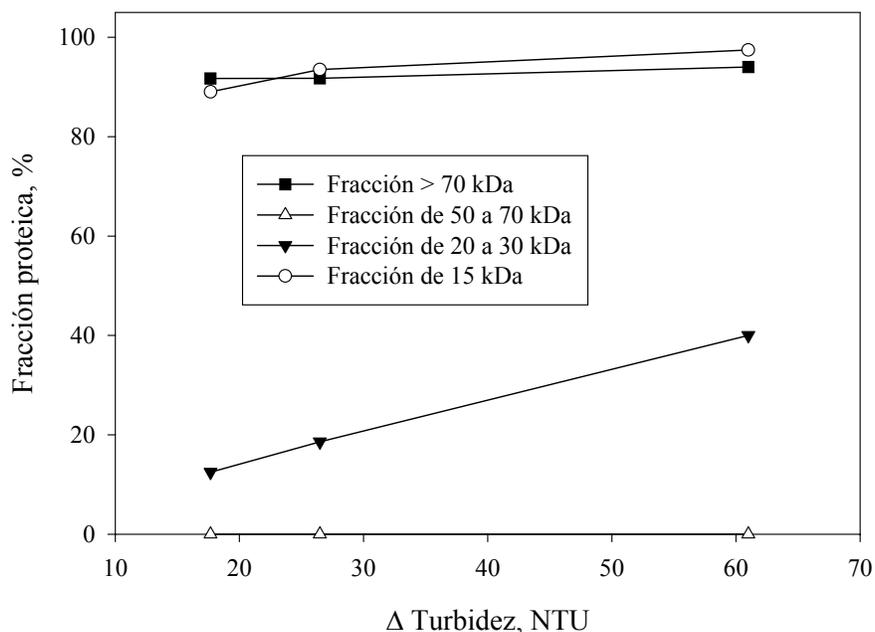


Figura 28. Relación entre la estabilidad proteica y la eliminación de las fracciones proteicas presentes en el vino analizado después del tratamiento con $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ nuevo

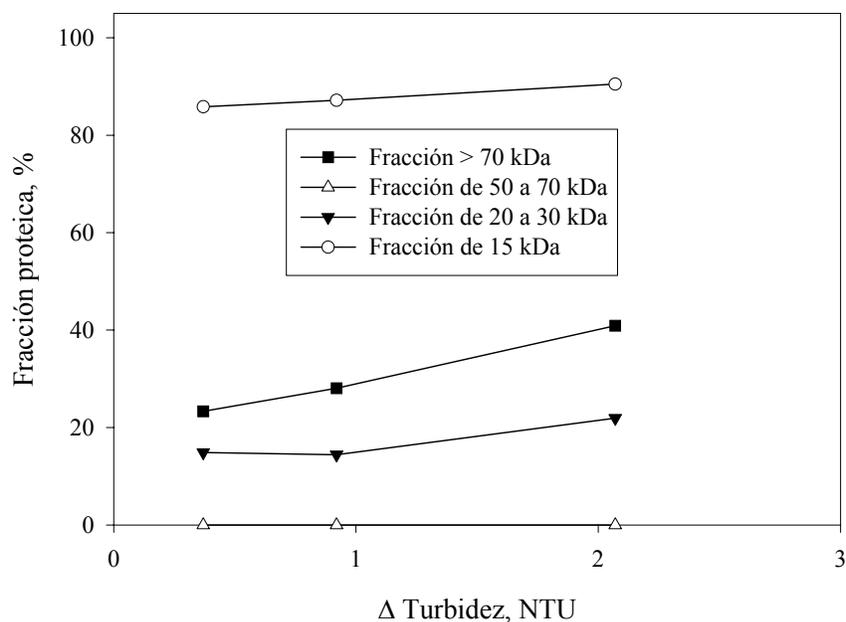


Figura 29. Relación entre la estabilidad proteica y la eliminación de las fracciones proteicas presentes en el vino analizado después del tratamiento con $ZrO_2-(po)$ regenerado

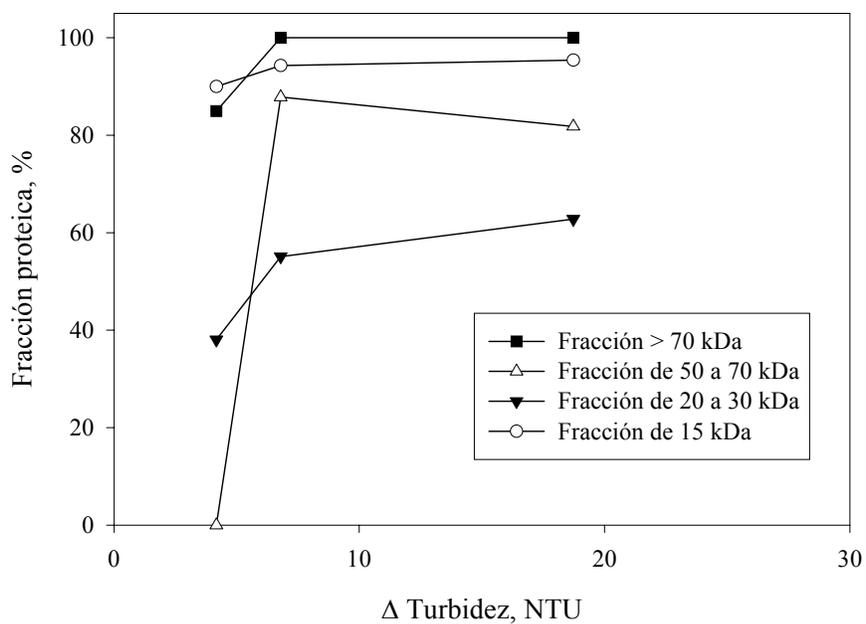


Figura 30. Relación entre la estabilidad proteica y la eliminación de las fracciones proteicas presentes en el vino analizado después del tratamiento con $ZrO_2-(pe)$ nuevo

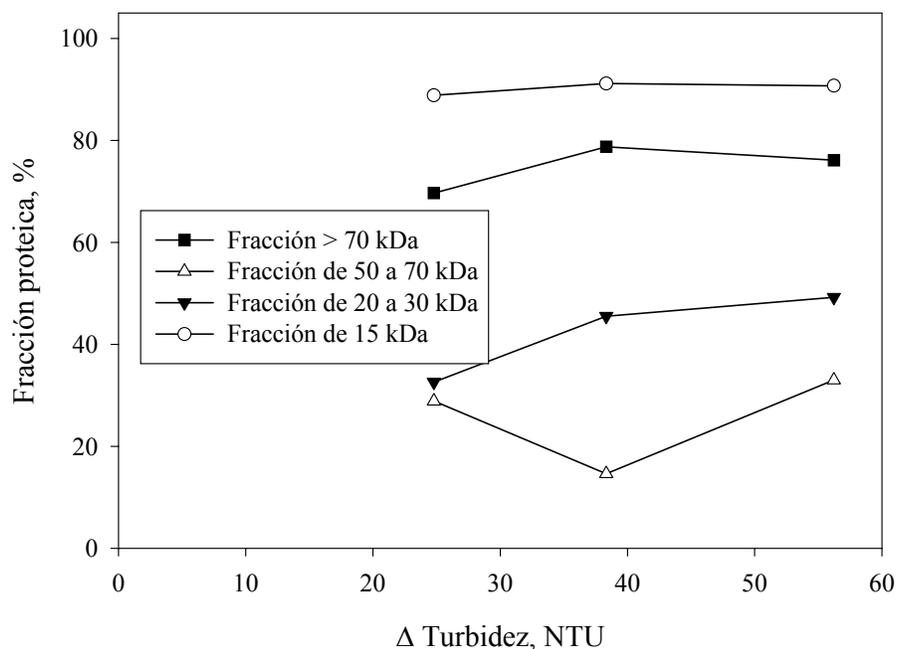


Figura 31. Relación entre la estabilidad proteica y la eliminación de las fracciones proteicas presentes en el vino analizado después del tratamiento con ZrO_2 -(pe) regenerado

De todo ello no es observable una funcionalidad general entre estos niveles de concentración y la estabilidad proteica, por lo tanto es muy posible que dicha diferencia de turbidez esté influenciada por la interacción entre las diferentes fracciones.

No obstante la fracción proteica correspondiente a un peso molecular superior de 70 kDa parece tener una mayor responsabilidad en que el vino blanco sea o no térmicamente estable. La reducción de esta fracción proteica a valores menores del 40 % (Figura 29) produce vinos térmicamente estables. Mientras que cuando esta fracción proteica tiene valores superiores al 40 %, los vinos obtenidos no son estables y no existe una relación directa con el incremento en la diferencia de la turbidez del vino.

4.6.2. Características fisicoquímicas de los vinos obtenidos

En la Figura 32 se presentan las mediciones de la intensidad del color de las diferentes muestras del vino tratado con los adsorbentes estudiados, tomadas a la salida de la columna a distintos BV. Ninguno de los adsorbentes utilizados genera una variación significativa en la intensidad cromática a partir de 10 BV.

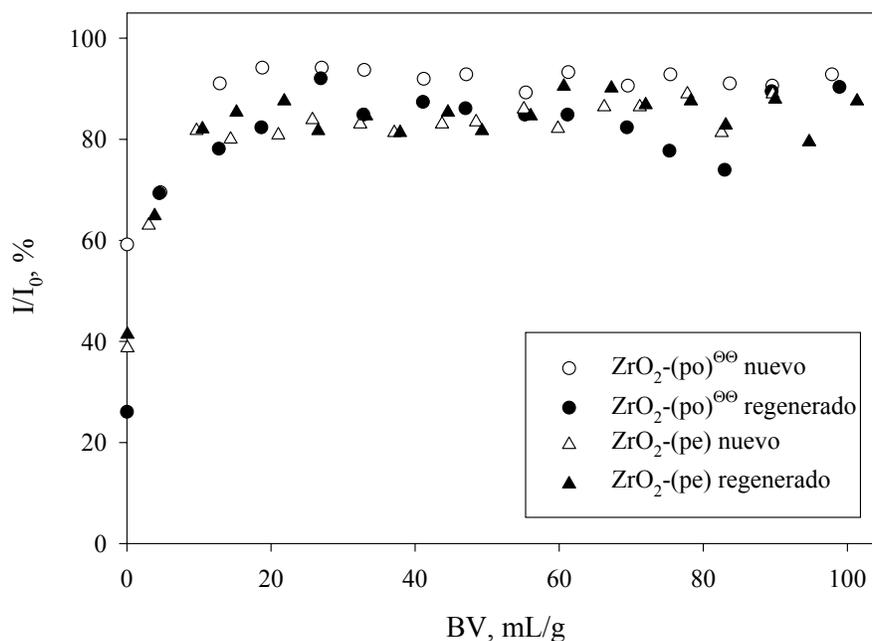


Figura 32. Medida del color: *Luminosidad* (Intensidad)

En la Figura 33 se muestran los valores de tonalidad del color de las diferentes muestras del vino tratado con los adsorbentes estudiados, tomadas a la salida de la columna a distintos BV. Se observa un comportamiento similar al de la intensidad del color, pues tampoco se genera una variación significativa en la tonalidad del color a partir de 10 BV sin importar el tipo de adsorbente utilizado.

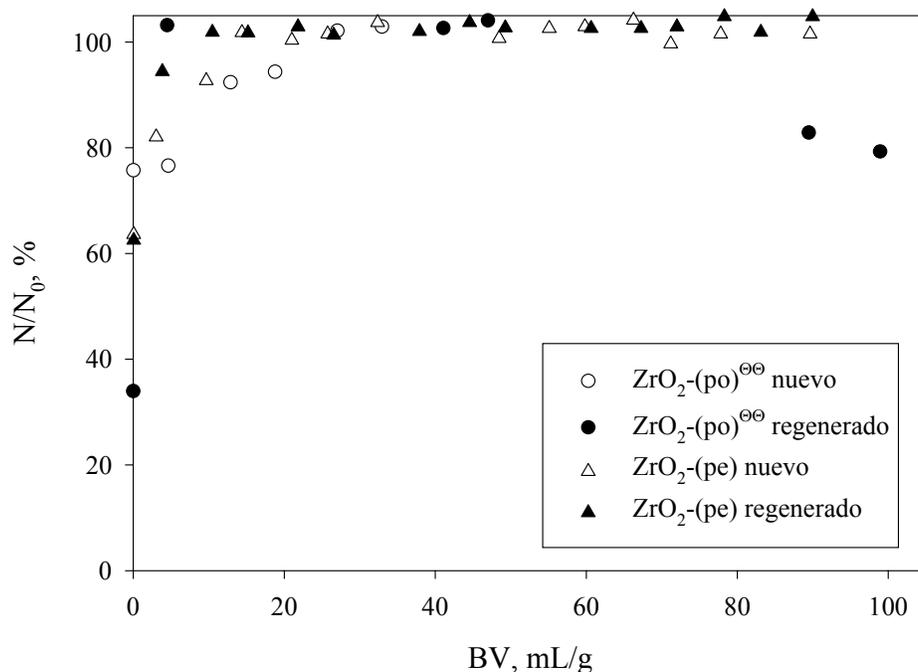


Figura 33. Medida del color: *Tonalidad*

Los vinos obtenidos y las diferentes fracciones acumuladas por el tratamiento con ZrO₂ se han analizado, especialmente el vino blanco tratado con el ZrO₂-(po)^{⊕⊕} regenerado, ya que este vino y sus fracciones se puede considerar estables, pues la diferencia de turbidez (Δ) obtenida no supera en ningún caso los 2 NTU. El vino sin tratar se ha analizado igualmente para comparar el efecto del tratamiento sobre los diferentes parámetros caracterizados.

En la Tabla X se presenta un resumen de la caracterización de los vinos estudiados después del tratamiento realizado con ZrO₂-(po)^{⊕⊕} regenerado.

En primer término se observa que el pH de las muestras permanece invariable y está dentro del intervalo permitido. En cuanto a la acidez total se puede afirmar nuevamente que la variación es poco significativa. La acidez fija presenta una pequeña disminución para las primeras fracciones acumuladas, pero se recupera después. Se observa un pequeño

incremento en la acidez volátil en la medida que avanza el experimento, aunque los valores obtenidos para todas las muestras están dentro del intervalo considerado normal de 0.3 a 0.8 g/L. El grado alcohólico no se ve afectado por el tratamiento. El extracto seco permanece prácticamente constante alrededor de 20.6 g/L, con las excepciones la fracción acumulada de 0-60 BV. Las cenizas y los cloruros presentan una variación que se encuentra dentro del error experimental del método utilizado.

El índice de polifenoles total muestra una pequeña reducción al comienzo del experimento pero luego se nivela, las diferencias tampoco son significativas. La medida de los fenoles totales expresada como ácido gálico es proporcional al IPT.

La cantidad de sulfatos está dentro del límite legal y no muestra variabilidad alguna.

Se observa una disminución de las características cromáticas en las primeras muestras principalmente, aunque como se ha visto anteriormente la disminución al final es de alrededor de un 10 %.

Los vinos tratados con el $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ nuevo y el $ZrO_2-(pe)$ nuevo y regenerado, de igual forma no presentan variaciones significativas en los parámetros analíticos determinados (Tablas XI-XIII).

Tabla X. Características fisicoquímicas de las fracciones acumuladas del vino blanco tratado con $ZrO_2-(po)^{\square\square}$ regenerado

Vino/muestra	inicial	0-30 BV	0-60 BV	0-100 BV	5-30 BV	30-100 BV
pH	3.44	3.47	3.45	3.43	3.45	3.44
Acidez total, g/L	5.0	4.1	4.5	5.0	4.7	5.1
Acidez fija, g/L	4.6	3.1	3.5	4.4	3.8	4.6
Acidez volátil, g/L	0.4	0.8	0.8	0.5	0.7	0.4
Grado alcohólico, %vol	13.86	13.74	13.24	14.10	13.69	13.98
Extracto seco, g/L	20.6	20.6	18.0	20.6	20.6	20.6
Cenizas, g/L	2.42	1.88	2.00	1.82	1.98	2.18
Azúcares reductores, g/L	1.10	0.90	0.05	0.30	0.90	0.95
Indice de polifenoles totales, IPT	5.98	5.20	5.82	5.84	6.02	6.00
Polifenoles totales, mg/L a. gálico	296.6	256.5	280.3	281.1	288.0	287.2
Cloruros, g/L NaCl	2.4	1.5	1.5	3.1	1.8	2.5
Sulfatos, g/L K_2SO_4	< 0.7	0.7	< 0.7	< 0.7	< 0.7	< 0.7
Intensidad Colorante Modificada	0.246	0.192	0.199	0.204	0.221	0.229
Tonalidad	3.291	2.841	2.889	2.913	2.827	3.000

Tabla XI. Características fisicoquímicos de las fracciones acumuladas del vino blanco tratado con $ZrO_2-(po)^{□□}$ nuevo

Vino/muestra	inicial	0-30 BV	0-60 BV	0-100 BV	0-10 BV	10-60 BV	60-100 BV
pH	3.44	3.68	3.56	3.52	3.75	3.61	3.50
Acidez total, g/L	5.0	3.1	4.1	4.6	2.3	4.3	5.2
Acidez fija, g/L	4.6	-	-	-	-	-	-
Acidez volátil, g/L	0.4	-	-	-	-	-	-
Grado alcohólico, %vol	13.86	-	-	-	-	-	-
Extracto seco, g/L	20.6	-	-	-	-	-	-
Cenizas, g/L	2.42	-	-	-	-	-	-
Azúcares reductores, g/L	1.10	1.00	1.00	1.00	0.80	1.00	1.00
Indice de polifenoles totales, IPT	5.98	3.68	4.06	4.02	3.96	5.40	5.94
Polifenoles totales, mg/L ácido gálico	296.6	198.0	212.6	211.1	208.8	264.2	284.9
Cloruros, g/L NaCl	2.4	2.2	1.7	2.1	1.7	1.6	1.7
Sulfatos, g/L K_2SO_4	< 0.7	<0.7	< 0.7	< 0.7	<0.7	< 0.7	< 0.7
Intensidad Colorante Modificada	0.246	0.187	0.194	0.204	0.156	0.216	0.224
Tonalidad	3.291	2.354	2.521	2.451	2.579	2.731	2.741

Tabla XII. Características físicoquímicos de las fracciones acumuladas del vino blanco tratado con ZrO₂-(pe) nuevo

Vino/muestra	inicial	0-30 BV	0-60 BV	0-100 BV	0-10 BV	10-40 BV	50-100 BV
pH	3.44	3.48	3.45	3.44	3.50	3.45	3.44
Acidez total, g/L	5.0	4.4	4.8	5.0	2.2	5.0	5.1
Acidez fija, g/L	4.6	-	-	-	-	-	-
Acidez volátil, g/L	0.4	-	-	-	-	-	-
Grado alcohólico, %vol	13.86	-	-	-	-	-	-
Extracto seco, g/L	20.6	-	-	-	-	-	-
Cenizas, g/L	2.42	-	-	-	-	-	-
Azúcares reductores, g/L	1.10	1.00	1.00	0.60	0.60	0.75	1.00
Indice de polifenoles totales, IPT	5.98	4.02	5.58	5.56	5.02	6.16	5.98
Polifenoles totales, mg/L ácido gálico	296.6	211.1	271.1	270.3	249.5	293.3	286.5
Cloruros, g/L NaCl	2.4	2.3	1.4	2.2	2.6	1.5	1.5
Sulfatos, g/L K ₂ SO ₄	< 0.7	<0.7	< 0.7	< 0.7	<0.7	< 0.7	< 0.7
Intensidad Colorante Modificada	0.246	0.200	0.209	0.213	0.177	0.209	0.224
Tonalidad	3.291	2.556	2.608	2.615	2.805	2.979	3.020

Tabla XIII. Características fisicoquímicos de las fracciones acumuladas del vino blanco tratado con ZrO_2 -(pe) regenerado

Vino/muestra	inicial	0-30 BV	0-60 BV	0-100 BV	0-10 BV	10-30 BV	45-100 BV
pH	3.44	3.48	3.45	3.44	3.50	3.45	3.44
Acidez total, g/L	5.0	-	-	-	-	-	-
Acidez fija, g/L	4.6	-	-	-	-	-	-
Acidez volátil, g/L	0.4	-	-	-	-	-	-
Grado alcohólico, % vol	13.86	-	-	-	-	-	-
Extracto seco, g/L	20.6	-	-	-	-	-	-
Cenizas, g/L	2.42	-	-	-	-	-	-
Azúcares reductores, g/L	1.10	-	-	-	-	-	-
Indice de polifenoles totales, IPT	5.98	5.68	6.00	6.16	4.00	6.40	6.72
Polifenoles totales, mg/L ácido gálico	296.6	274.9	287.2	293.4	210.3	302.6	314.9
Cloruros, g/L NaCl	2.4	-	-	-	-	-	-
Sulfatos, g/L K_2SO_4	< 0.7	<0.7	< 0.7	< 0.7	<0.7	< 0.7	< 0.7
Intensidad Colorante Modificada	0.246	0.333	0.372	0.408	0.256	0.386	0.389
Tonalidad	3.291	2.602	2.559	2.495	2.661	2.557	2.561

V. Conclusiones

5.1. Isotermas de adsorción

- Las isotermas de adsorción muestran que el mejor adsorbente para la eliminación de moléculas de gran peso molecular como bovin serum albumina y ovalbumina de la solución modelo, es el óxido de zirconio en forma de polvo.
- La concentración de pequeñas moléculas proteicas como lisocima en la solución modelo, disminuye con los óxidos metálicos en partículas tanto para el óxido de zirconio, como para el óxido de aluminio.

5.2. Adsorción en continuo con solución modelo

- El óxido de zirconio en ambas formas (polvo y partículas) se puede empacar en una columna sin causar ningún tipo de problema técnico.
- Con el tipo de las isotermas de adsorción obtenidas para los sistemas estudiados, se puede predecir la forma de la saturación de los mismos en un proceso continuo.

5.3. Estabilización proteica en continuo para el vino blanco

- Se ha logrado la estabilización proteica del vino blanco tipo *Chardonnay* utilizando el óxido de zirconio, como adsorbente.
- Ninguno de los adsorbentes utilizados (ZrO_2 -(po) y ZrO_2 -(pe)) en los ensayos que se han hecho con vino blanco tipo *Chardonnay*, en vistas de la posibilidad de su aplicación en la industria enológica, han afectado significativamente las propiedades fisicoquímicas del producto final.

- Ambas formas del adsorbente estudiado muestran una selectividad en las fracciones proteicas adsorbidas, dependiendo de su peso molecular.
- La fracción proteica con peso molecular de 15 kDa no muestra efecto sobre la inestabilidad proteica de los vinos estudiados.
- Las fracciones proteicas con peso molecular de 20-30 y 30-40 kDa, presentes en los vinos de los años 2001 y 2000 respectivamente, parecen no afectar de manera apreciable en la estabilidad del vino.
- La fracción proteica con peso molecular más de 70 kDa es la que muestra un mayor efecto sobre la inestabilidad proteica de los vinos estudiados. Cuando se reduce su composición a valores inferiores al 40 % de su concentración inicial la estabilidad del vino aumenta.
- El efecto de la fracción proteica de 50-70 kDa sobre la estabilidad del vino no es clara. No obstante una presencia elevada de esta fracción parece inhibir el efecto desestabilizante de la fracción de >70 kDa.

5.4. Regeneración de los adsorbentes

- Los métodos utilizados, excepto el tratamiento térmico, no han sido efectivos para la regeneración del óxido de zirconio, pero se recomienda explorar distintas condiciones de operación.
- El tratamiento térmico a 500 °C durante 16 h, ha sido suficiente para que el adsorbente (óxido de zirconio en ambas formas) se regenerara completamente, aunque en un futuro se deberá hacer un estudio más profundo de la influencia de la temperatura y el tiempo de tratamiento, sobre la regeneración del material.

- El tratamiento térmico muestra un efecto positivo sobre el óxido de zirconio en polvo, pues aumenta su capacidad de adsorción y permite obtener vinos estables proteicamente.

VI. Bibliografía

A

Achaerandio, I.; Pachova, V.; Güell, C.; López, F., *Protein adsorption by bentonite in a white wine model solution: Effect of protein molecular weight and ethanol*, American Journal of Enology and Viticulture, 52, 122-126, (2001)

Amerine, M., A.; Ough, C., S., *Análisis de vinos y mostos*, Editorial ACRIBIA, (1976)

Anelli, G., *The proteins of musts*, American Journal of Enology and Viticulture, 28, 200-203, (1977)

Aslam, M.; Dent, A., M., *Bioconjugation: Protein coupling techniques for the biomedical science*, 1st. ed., Groves dictionaries Inc., (1998)

B

Barceló, J., G., *Técnicas analíticas para vinos*, 1ª ed., GAB, Barcelona, (1990)

Bayly, F., C.; Berg, H., W., *Grape and wine proteins of white wine varieties*, American Journal of Enology and Viticulture, 18, 18-32, (1967)

Belleville, M-P.; Briouet, J-M.; Taroto de la Fuente, B; Moutounet, M., *Fouling colloids during microporous alumina membrane filtration of wine*, Journal of Food Science, 57, 396-400, (1992)

Blade, H.,W.; Boulton, R., *Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution*, American Journal of Enology and Viticulture, 39, 193-199, (1988)

Bradford, M., *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry, 72, 248-254, (1976)

Brillouet, J-M.; Moutounet, M.; Escudier, J-L., *Fate of yeast and grape pectic polysaccharides of a young red wine in the cross-flow microfiltration process*, Vitis, 28, p.49, (1989)

C

Chibata, I.; Tosa, T.; Mori, T.; Watanabe, T.; Sakata, N, *Immobilized tannin – a novel adsorbent for protein and metal ion*, Enzyme Microbiology and Technology, 8, 130-136, (1986)

Colby, G., E., *Report of viticultural work*, Univ. Calif. Col. Agr., 1887-1893, (1986)

Cooney, D., O., *Adsorption design for wastewater treatment*, Lewis Publishers, Inc., (1998)

Correa-Gorospe, I.; Polo, M., C.; Hernandez, T., *Characterization of the proteic and the phenolic fraction in tartaric sediments from wines*, Food Chemistry, 41, 135-146, (1991)

D

Dawes, H.; Boyes, S.; Keene, J.; Heatherbell, D, *Protein instability of wines: Influence of protein isoelectric point*, American Journal of Enology and Viticulture, 45, 319-326, (1994)

Diario Oficial de las Comunidades Europeas, *Reglamento (CEE) N° 2676/90 de la Comisión*, de 17 de septiembre de 1990

Dubourdieu, D.; Serrano, M.; Vannier, A-C.; Ribureau-Gayon, P., *Etude comparée des tests de stabilité protéique*, Conn Vigne Vin, 22, 261-273, (1988)

Dumon, S.; Barnier, H., *Ultrafiltration of protein solution on ZrO₂ membranes. The influence of surface chemistry and solution chemistry on adsorption*, Journal of Membrane Science, 74, 289-302, (1992)

F

Flores, J., H.; Heatherbell, D., A.; McDaniel, M., R, *Ultrafiltration of wine: effect of ultrafiltration on white Riesling and Gewürztraminer wine composition and stability*, American Journal of Enology and Viticulture, 41, 207-214, (1990)

Fukuzaki, S.; Urano, H.; Nagata, K., *Adsorption of Bovin Serum Albumina onto metal oxide surfaces*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 81, 163-167, (1996)

Fukuzaki, S.; Urano, H.; Nagata, K., *Adsorption of protein onto stainless-steel surfaces*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 80, 6-11, (1995)

G

Gates, B., *Catalytic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., (1992)

Giacomelli, C., E.; Avena, M.,J.; De Pauli, C., P., *Adsorption of Bovin Serum Albumin onto TiO₂ particles*, Journal of Colloid and Interface Science, 188, 387-395, (1997)

Giacomini, E.; Giacomini, P., *La calidad de los vinos en las prácticas enológicas post-vendimia*, Vitivinicultura, 11/12, 69-75, (1991)

González-Lara, R.; Polo, M. C.; Correa, I.; Ramos, M., *Características de las proteínas de los mostos de uvas de variedades cultivadas en España*, Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 29(3), 332-339, (1989)

Güell, C.; López, F.; Pérez, M., A.; Rolan, A.; Moreno, E., *Aplicación de técnicas de separación por membrana en la industria enológica*, Alimentación – Equipos y Tecnología, 12, 89-96, (1999)

Gump, B., H.; Huang, Ch.-F., *Removal of unstable protein in grape juice and wine by adsorbent resins*, Research Bulletin, Viticulture and Enology Research Center (California State University, Fresno), April, (1999)

H

Hashimoto, K.; Miura, K., *Experimental verification of design methods for liquid phase fixed-bed adsorbers*, Journal of Chemical Engineering of Japan, 10, 27-34, (1977)

Hsu, J., C.; Heatherbell, D., *Heat unstable proteins in wine. I. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment*, American Journal of Enology and Viticulture, 38, 11-16, (1987)

Hughes-Wassell, D., T.; Embery, G., *Adsorption of Bovine Serum Albumin on to titanium powder*, Biomaterials, 17, 859-864, (1996)

K

Kean, C., E.; Marsh, G., L., *Investigation of copper complexes causing cloudiness in wine. I. Chemical composition*, American Journal of Enology and Viticulture, 8, 80-86, (1956)

Kim, J., C.; Lund, B., B., *Adsorption of κ -lactoglobulin onto stainless steel surfaces*, In Kessler, H., G.; Lund, D., B., (ed.), *Fouling and cleaning in food processing*, Prien, Chemsel, (1989)

Koutsonkos, P., G.; Norde, W.; Lyklema, J., *Protein adsorption on hematite (α - Fe_2O_3) surfaces*, Journal of Colloid and Interface Science, 95, 385-397, (1983)

Koch, J.; Sajak, E., *A review and some studies on grape protein*, American Journal of Enology and Viticulture, 10, 114-123, (1959)

Kondo, A.; Higashitani, K., *Adsorption of model proteins with wide variation in molecular properties on colloidal particles*, Colloid and Interface Science, 150, 344-351, (1992)

L

López, F. ; Castells, F. ; Ben Aim, R., *Aplicación de la filtración tangencial en enología*, Viticultura y Enología Profesional, 20, 60-75, (1992)

Lubbers, S.; Guerreau, J.; Feuillat, M, *Étude de l'efficacité déprotéinisante de bentonites commerciales sur un moût et des vins des cépages Chardonnay et Sauvignon*, Bulletin de l'O.I.V., 769-770 (1), 225-244, (1995)

M

Marchal, R.; Bouquelet, S.; Maujean, A., *Purification and partial biochemical characterization of glycoproteins in a champenois Chardonnay wine*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 44, 1716-1722, (1996)

Martínez-Rodríguez, A.; Polo, M-C., *characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48, 1081-1085, (2000)

McCabe, W., L.; Smith, J., C.; Harrott, P., *Unit Operations of Chemical Engineering*, McGraw-Hill, Inc., (1993)

Mesquita, P., R.; Monteiro, S.; Picarra-Pereira, M. A.; Loureiro, V., B.; Teixeira, A.; Ferreira, R., B., *Wine instability. I. The importance of the wine proteins*, Proceedings of the International Congress, organized by DG-XII European Commission and CSIC, Valencia, 372-376, (1999)

Mesquita, P., R.; Monteiro, S.; Picarra-Pereira, M. A.; Loureiro, V., B.; Teixeira, A.; Ferreira, R., B., *Wine instability. II. The influence of several non-proteic components*, Proceedings of the International Congress, organized by DG-XII European Commission and CSIC, Valencia, 372-376, (1999)

Mesquita, P., R.; Monteiro, S.; Picarra-Pereira, M. A.; Loureiro, V., B.; Teixeira, A.; Ferreira, R., B., *Wine instability. III. The influence of pH*, Proceedings of the International Congress, organized by DG-XII European Commission and CSIC, Valencia, 372-376, (1999)

Mesrob, B.; Gorinova, N.; Tsakov, D., *Characterization of the electrical properties and of the molecular weights of the proteins in white wines*, *Nahrung*, 27, 727-733, (1983)

Mijares, M^a-I.; Sáez, J-A., *El vino – de la cepa a la copa*, 3^a edición; Ediciones Mundi-Prensa, España, (2000)

Moine-Ledoux, V.; Dubourdiou, D., *An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 537-543, (1999)

Moio, L.; Addeo, F., *Focalizzazione isoelettrica delle proteine clouding*, *Vignevini*, 4, 53-57, (1989)

Monteiro, S.; Picarra-Pereira, M., A.; Mesquita, P., R.; Loureiro, V., B.; Teixeira, A.; Ferreira, R., B., *The wide diversity of structurally similar wine proteins*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 3999-4010, (2001)

Moretti, R., H.; Berg, H., W., *Variability among wines to protein clouding*, American Journal of Enology and Viticulture, 16, 69-78, (1965)

Murphy, J., M.; Spayd, S., E.; Powers, J., R., *Effect of grape maturation on soluble protein characteristics of Gewürztraminer and white Riesling juice and wine*, American Journal of Enology and Viticulture, 40, 199-207, (1989)

N

Nagaba-Mbiakop, P.,R., *Investigation of methods for determination and prevention of protein instability in wines*, Thesis, doctor of Philosophy, Oregon State University, Corvallis, USA, (1981)

Nakai, Sh.; Modler, H., *Food proteins: properties and characterization*, VCH Publishers, Inc., (1996)

Norde, W.; MacRitchie, F.; Nowicka, G.; Lyklema, G, *Protein adsorption at solid-liquid interfaces: reversibility and conformation aspects*, Journal of Colloid and Interface Science, 112, 447-456, (1985)

P

Powers, J., R.; Nagel, C., W.; Weller, K., *Protein removal from a wine by immobilized grape proanthocyanidins*, American Journal of Enology and Viticulture, 39, 117-120, (1988)

S

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

Sarkar, D.; Chattoraj, D., K., *Kinetics of desorption of proteins from the surface of protein – coated alumina by various desorbing reagents*, Journal of Colloid and Interface Science, 178, 606-613, (1996)

Sarmiento, M. R.; Olivera, J. C.; Boulton, R. B., *Selection of low swelling materials for protein adsorption from white wines*, International Journal of Food Science and Technology, 35, 41-47, (2000)

Somers, T., C.; Ziemelis, G., *Direct determination of wine proteins*, American Journal of Enology and Viticulture, 24, 47-50, (1973)

T

Terence, A., *Particle sizes measurement*, 4th. ed., Chapman and Hall, (1990)

V

Vernhet, A.; Pellerin, P.; Prieur, C.; Osminski, J.; Moutounet, M., *Charge Properties of some grape wine polysaccharide and polyphenolic fractions*, American Journal of Enology and Viticulture, 47, 25-30, (1996)

W

Waters, E., J.; Wallace, W.; Tate, M., E.; Williams, P., J., *Isolation and Partial Characterization of a natural haze protective factor from wine*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 41, 724-730, (1993)

Waters, E., J.; Wallace, W.; Williams, P., J., *Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 40, 1514-1519, (1992)

Waters, E., J.; Wallace, W.; Williams, P., J., *Heat haze characteristic of fractionated wine proteins*, American Journal of Enology and Viticulture, 42, 123-127, (1991)

Waters, E., J.; Wallace, W.; Williams, P., J., *Peptidases in winemaking*, In: "Proceedings Seventh Australian Wine Industry Technical Conference", Eds. Willims, P., J.; Davidson, D., M.; Lee, T., H., Adelaide, Australia (Winetitles: Adelaide), 186-191, (1990)

Weetall, H.; Zelko, J.; Bailey, L, *A new matod for the stabilization of white wine*, American Journal of Enology and Viticulture, 35, 212-215, (1984)

Y

Yokotsuka, K.; Youshii, M.; Aihara, T.; Kushida, T., *Turbidity formation caused by the interaction of must proteins with wine tannins*, Journal of Fermentation Technology, 61, 413-416, (1983)

Z

Zamorani, A.; Spettoli, P.; Lante, A.; Crapisi, A.; Pasini, G., *Immobilized laccase and tyrosinase: An approach for wine stabilization*, Italian Journal of Food Science, 4, 409-414, (1993)