

Cristina Gómez Mondaca

**Estudio de la eficiencia de un extracto de proteínas de semilla
de uva para la clarificación de vinos**

TREBAJO FINAL DE MÁSTER

dirigido por Fernando Zamora

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

Facultat d'Enologia

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto "Circular-based alternative protein extraction from grape seeds for wine-making process" (LIFE-SEEDSPRO2WINE).



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Tarragona
Junio 2024**

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Fernando Zamora por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su departamento y, especialmente, gracias a Jordi Gombau por su ayuda y dedicación.

RESUMEN.

Se ha evaluado la eficacia de un extracto proteico de semilla de uva como clarificante en vino blanco y tinto. Se realizaron diferentes clarificaciones con diferentes clarificantes comúnmente usados en enología. En el caso del vino blanco, se realizaron clarificaciones con bentonita, cola de pescado, gelatina, proteína de patata (patatina) y el extracto de semilla. Además, en vino blanco, los clarificantes de naturaleza proteica se usaron solos o en combinación con la bentonita. En vino tinto se realizaron clarificaciones con gelatina, ovoalbúmina, patatina y el extracto de semilla. Se evaluó el efecto de los diferentes tratamientos sobre la inestabilidad proteica, en vino blanco, y sobre la materia colorante, en vino tinto, así como sobre otros parámetros relacionados con las características químicas, organolépticas y sensoriales de los vinos. El tratamiento con extracto de semilla fue eficaz en términos de limpidez, y de estabilidad proteica (vino blanco) y de materia colorante (vino tinto). Sin embargo, las muestras tratadas con este clarificante fueron las menos preferidas por los catadores en el análisis sensorial.

Palabras clave: clarificación, proteína de semilla de uva, turbidez, inestabilidad proteica, inestabilidad de materia colorante, análisis sensorial.

ABSTRACT.

The efficiency of a grape seed protein extract has been evaluated as a fining agent in white and red wines. Different clarifications were done with different fining agents commonly used in oenological industry. In white wine, clarifications with bentonite, isinglass, gelatine, potato protein extract (patatin) and grape seed extract were realized. In addition, in white wine, these fining agents were employed alone or combined with bentonite. In red wine, clarifications with gelatine, egg albumin, patatin and grape seed extract were performed. The effect of these treatments on protein instability, in white wine, colour matter instability, in red wine, and on other parameters related to chemical, organoleptic and sensorial characteristics were evaluated. Treatment with grape seed extract was successful in terms of lightness, protein stability (white wine) and colour matter stability (red wine). Unfortunately, wines clarified with this fining agent were the least preferred by tasters in sensorial analysis.

Key words: fining, grape seed protein, turbidity, protein instability, colour matter instability, sensorial analysis.

ÍNDICE

1)	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1)	El vino como sistema coloidal; macromoléculas y coloides.....	1
1.2)	Los compuestos fenólicos del vino.....	2
1.3)	Las proteínas en el vino.....	5
1.4)	Los polisacáridos en el vino.....	6
1.5)	Clarificación y estabilización del vino blanco.....	7
1.6)	Clarificación y estabilización del vino tinto.....	8
1.7)	Clarificantes usados en enología.....	9
2)	MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
2.1)	Vinos, clarificantes, reactivos químicos.....	11
2.2)	Diseño experimental.....	11
	Vino blanco.....	11
	Vino tinto.....	12
2.3)	Análisis fisicoquímicos en vino blanco.....	13
2.4)	Análisis fisicoquímicos vino tinto.....	13
2.5)	Análisis sensorial.....	14
3)	RESULTADOS.....	15
3.1)	Clarificación vino blanco.....	15
3.2)	Clarificación en vino tinto.....	19
3.3)	Análisis sensorial.....	24
	Vino blanco.....	24
	Vino tinto.....	25
	Síntesis del análisis sensorial.....	26
4)	CONCLUSIONES.....	27
4.1)	Vino blanco.....	27
4.2)	Vino tinto.....	27
5)	BIBLIOGRAFÍA.....	28

1) INTRODUCCIÓN.

1.1) El vino como sistema coloidal; macromoléculas y coloides.

El vino, además de ser una disolución molecular *verdadera*, también se puede definir como un sistema coloidal de macromoléculas (proteínas, polisacáridos y compuestos fenólicos) y micelas cuyas propiedades físicas y químicas afectan directamente a su estabilidad (Mierczynska-Vasilev & Smith, 2015). La *Tabla 1* ilustra los sistemas dispersos presentes en el vino y su efecto en la apariencia de este.

Apariencia	LIMPIO		TURBIO	
Sistema	Solución	Dispersión coloidal	Suspensión	
Tamaño	< 0.002 μm	0.002-0.1 μm	> 0.1 μm	
\varnothing medio	-	0.03 μm	0.3 μm	10 μm
Visibilidad	-	Microscopio electrónico	Microscopio óptico	Visibles a la luz
	Moléculas o iones	Macromoléculas o micelas	Suspensiones M.O	Precipitados
	Azúcares	Materia colorante coloidal		
Ejemplos	Ác.orgánicos	Coloides de polisacáridos	Levaduras	Materia colorante
		Coloides proteicos	Bacterias	floculada
	Sales	Quiebra férrica y cúprica		

Tabla 1: clasificación sistemas coloidales del vino. M.O= microorganismos (adaptado de Molina, R., 2000).

Las partículas coloidales se encuentran libres en el medio pudiendo presentar una carga eléctrica cuyo signo dependerá del pH del medio. Esta carga genera fuerzas de repulsión que mantienen a las partículas en movimiento, interaccionando unas con otras de forma espontánea y desordenada (movimiento browniano) de modo que se distribuyen en la fase dispersante y no sedimentan instantáneamente. Por otra parte, los coloides también se atraen mediante fuerzas débiles de Van der Waals (Mierczynska-Vasilev & Smith, 2015; Molina, 2000; Vernhet, 2018). Cuando estas interacciones son superiores a las fuerzas de repulsión las partículas coloidales forman agregados más grandes que pueden flocular y originar turbidez en el vino. Con lo cual, para que la solución coloidal sea estable es necesario mantener las fuerzas de repulsión entre los coloides (Mierczynska-Vasilev & Smith, 2015). Esto es muy difícil de controlar, especialmente cuando el vino ya embotellado sale de la bodega y pasa

un largo tiempo almacenado y expuesto a factores como altas temperaturas, oxidación o luz directa a lo largo de la cadena de distribución. Para asegurar la limpidez, calidad y estabilidad del producto antes de que llegue al consumidor es necesario forzar la formación de estos agregados, que después se eliminan mediante el uso de clarificantes antes del embotellado.

El origen de los coloides en el vino es diverso. Por ejemplo, algunos aparecen de forma natural durante el envejecimiento, como es el caso de los compuestos fenólicos, y otros se forman accidentalmente, como ocurre con las quiebras férricas y cúpricas (Molina, 2000), debidas a las altas concentraciones de hierro y cobre en el vino. Por otra parte, la gelatina y otros clarificantes de naturaleza proteica ampliamente usados en la industria enológica pueden ocasionar turbidez por sobrencolado (Molina, 2000; Moreno & Peinado 2010a). Es por esto por lo que normalmente los clarificantes proteicos se usan combinados con bentonita.

Respecto a los coloides de origen macromolecular (polifenoles, proteínas y polisacáridos), su estructura, concentración y composición juegan un papel muy importante en el perfil organoléptico, estabilidad y clarificación del vino (Mierczynska-Vasilev & Smith, 2015). Estos compuestos son susceptibles de interactuar entre sí y formar complejos cuya estabilidad depende de la matriz. Además, es necesario mencionar que en el vino podemos tener riesgo de cristalización de sales del ácido tartárico (tartrato ácido de potasio y tartrato neutro de calcio) debido a altas concentraciones de ácido tartárico, potasio y calcio, conociendo este fenómeno como inestabilidad tartárica. Los protocolos más usados en bodega para evitar la inestabilidad tartárica son el tratamiento en frío, el intercambio catiónico, la electrodiálisis o la adición de carboximetilcelulosa (CMC), poliaspartato potásico (KPA) o ácido metatartárico (Just-Borràs et al., 2022).

En los tres siguientes apartados se hace una breve introducción sobre la composición de compuestos fenólicos, polisacáridos y proteínas del vino, para entender con más detalle los procesos de inestabilidad de la materia colorante en el caso del vino tinto y la inestabilidad proteica en el caso del vino blanco.

1.2) Los compuestos fenólicos del vino.

Como es conocido, el proceso de vinificación de los vinos blancos y tintos es distinto. En el vino blanco se fermenta solo el mosto, mientras que el vino tinto pasa por una etapa de maceración-fermentación con pieles y semillas. Esto marca las diferencias en la composición fenólica entre vinos tintos y blancos. Estas diferencias son la causa, por ejemplo, del color que presenta cada tipo de vino, entre otras propiedades sensoriales. Además, esta composición en compuestos fenólicos

determinará la estabilidad del vino tinto. La *Figura 1* muestra la clasificación de los principales compuestos fenólicos encontrados en el vino.

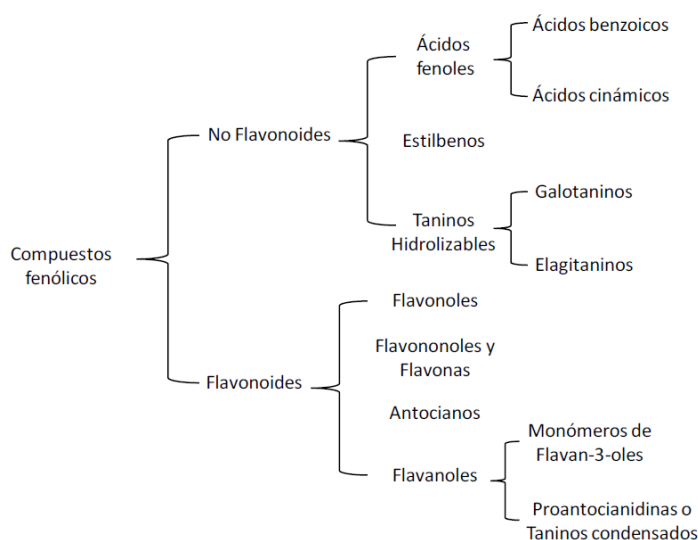


Figura 1: clasificación compuestos fenólicos en el vino (adaptado de Gombau, 2020).

En el vino tinto los compuestos fenólicos más relevantes son los antocianos y los flavanoles (Escribano-Bailón et al., 2019), ambos de naturaleza flavonoide. Los flavanoles se pueden presentar en forma de monómeros o de polímeros, que reciben el nombre de taninos condensados o proantocianidinas.

Los antocianos son los responsables del color rojo-azulado de los vinos tintos, uno de los atributos más importantes en términos de calidad en estos vinos. Se encuentran únicamente en la piel de la uva, excepto en las variedades tintoreras, que también los contienen en la pulpa. En el género *Vitis*, el antociano mayoritario es, en la mayoría de los casos, la malvidina-3-O-monoglucósido (Zamora, 2003).

En función del pH, los antocianos están en equilibrio en diferentes estructuras químicas con distinta tonalidad, e incluso con formas incoloras. Estas son: el carbocatión flavilio (A^+), de color rojo; la forma quinona (AO), de color violáceo, y moléculas del tipo carbinol (AOH), incoloras. La forma AOH puede dar lugar a calconas amarillas, las cuales pueden oxidarse en presencia de oxígeno formando ácidos fenoles incoloros. Esto provoca la pérdida irreversible del color del vino tinto (Zamora, 2003). En la *Figura 1* se presenta un esquema de estas reacciones de equilibrio que pueden modificar el color del vino tinto. No obstante, los fenómenos de copigmentación y la formación de aductos antociano-flavanol pueden modificar estos equilibrios, afectando a la intensidad y tonalidad, así como a la estabilidad del color del

vino tinto, respectivamente. La copigmentación consiste en la formación de estructuras tipo “sandwich” entre los antocianos o entre antocianos y otras moléculas planas (ácidos fenoles, flavonoles, aminoácidos, polisacáridos) que genera un entorno hidrofóbico, impidiendo así las reacciones de hidratación que dan lugar a las formas incoloras del tipo carbinol (Zamora, 2003).

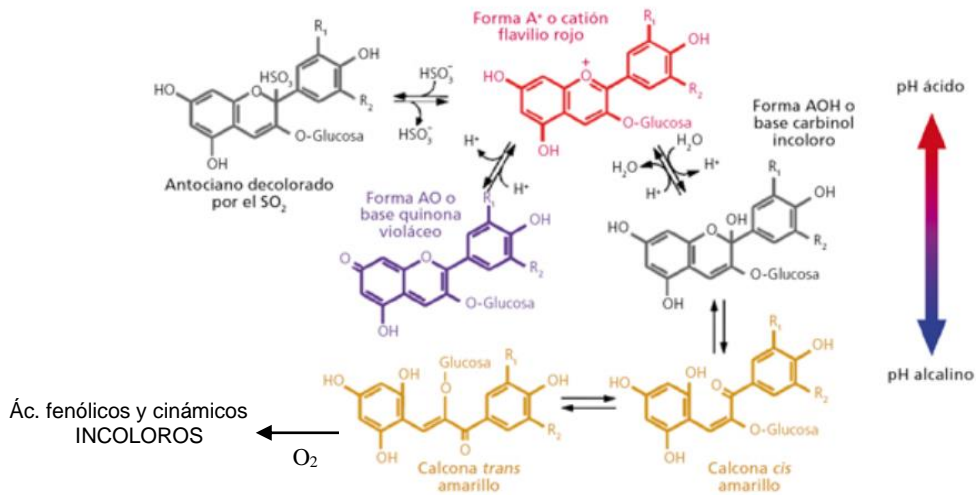


Figura 1: equilibrio de estructuras químicas de antocianos en función del pH (Adaptado de Zamora, 2013)

Por otro lado, los flavanoles se encuentran en la piel, semilla y raspón. Son una familia de compuestos formada por monómeros de catequina en sus formas isoméricas, y por sus polímeros, conocidos como taninos condensados o proantocianidinas. No obstante, la mayoría de los flavanoles del vino se encuentran en forma de taninos condensados. Los flavanoles son responsables del amargor de los vinos tintos, especialmente los monómeros de flavanol. Los taninos condensados se relacionan con la astringencia, la componente amarilla del color, con el cuerpo/ estructura, con la estabilidad del color y la capacidad de estos vinos para envejecer (Zamora, 2003) Se conoce que los taninos condensados con mayor grado medio de polimerización y mayor porcentaje de galoilación (mayor proporción de galato de (-)-epicatequina) son los más astringentes (Ferrer-Gallego et al., 2010; Hufnagel & Hofmann, 2008; Peña-Neira, 2019; Zamora, 2003). No obstante, aquellos con un grado de polimerización medio muy alto pueden volverse insolubles y precipitar, lo cual disminuye la astringencia (Peña-Neira, 2019; Scollary et al., 2012), pero también perjudica la estabilidad fisicoquímica del vino por la posible presencia de precipitados.

Sin embargo, la composición química de las proantocianidinas de las semillas y de los hollejos no es idéntica. Las proantocianidinas de las semillas de uva son polímeros compuestos de (+)-catequina, (-)-epicatequina y galato de (-)- epicatequina (Prieur et al., 1994). Las proantocianidinas de la piel de la uva están compuestas por los mismos monómeros, pero también contienen (-)-epigallocatequina, y la proporción de galato de (-)- epicatequina es mucho menor (Souquet et al., 1996). Por consiguiente, los taninos de la piel de la uva están compuestos de procianidinas y prodelfinidinas porque su escisión ácida origina cianidina y delfinidina, mientras que los taninos de las semillas de uva están compuestos únicamente de procianidinas. Además, las proantocianidinas de las semillas tienen un menor grado de polimerización (mDP) que las proantocianidinas de la piel (Prieur et al., 1994). En consecuencia, las pieles de las uvas liberan procianidinas y prodelfinidinas con un mDP más alto, mientras que las semillas de las uvas solo liberan procianidinas con una mayor proporción de galoilación y un mDP más bajo. Se considera, generalmente, que las proantocianidinas de las semillas son más astringentes que las de la piel porque tienen una mayor proporción de galato de (-)- epicatequina.

La composición fenólica del vino blanco se reduce a los ácidos fenólicos, presentes en la pulpa, y a los flavonoles, presentes en la piel y responsables del color amarillo de la uva y de estos vinos (Zamora, 2003). Estos compuestos no tienen un efecto muy significativo en la calidad sensorial del vino, sin embargo, son substratos potencialmente oxidables por las polifenoloxidasas, lo cual puede provocar el pardeamiento de estos vinos, como se comenta más adelante (*apartado 1.5*).

1.3) Las proteínas en el vino.

Se consideran proteínas a los polímeros peptídicos con peso molecular superior a 10 kDa. Además, pueden presentar carga negativa o positiva en función del pH del medio. La mayoría de ellas se encuentran con carga positiva dado que el pH del vino suele ser inferior a su punto isoeléctrico (Moreno & Peinado, 2010b). Se conoce que la uva contiene proteínas en un rango entre 11 y 190 kDa, quedando al final de la vinificación aquellas con un peso molecular en el rango de 11 a 65 kDa (Mercadé, 2021).

En el vino tinto, la concentración de proteínas es prácticamente nula, ya que son precipitadas por los taninos. Sin embargo, en el vino blanco (y rosado) el contenido en proteínas se asemeja a la concentración inicial de estas en el mosto (Moreno & Peinado, 2010b), encontrándose en un rango entre 30 y 230 mg/L (Mercadé, 2021). Las proteínas mayoritarias en la uva son las invertasas (71,5 kDa) (Dambrouck et al., 2005; Mercadé, 2021) y algunas relacionadas con el estrés patogénico o PRs

(Pathogenesis Related- Stress proteins), como thaumatinas y quitinasas, con peso molecular entre 24-32 kDa (Mercadé, 2021; Waters et al., 1996). Bajo malas condiciones de almacenamiento (altas temperaturas), algunas proteínas del tipo PRs y otras, como las β -glucanasas, pueden desnaturalizarse y formar agregados, dando lugar a lo que se conoce como quiebra proteica, un problema común en vinos blancos que provoca su enturbiamiento (Esteruelas et al., 2009a).

No obstante, en vinos espumosos, se conoce que las proteínas pueden participar en la estabilización de la espuma gracias a sus propiedades surfactantes.

1.4) Los polisacáridos en el vino.

La concentración de polisacáridos en vino tinto puede llegar a ser el doble respecto al vino blanco, debido al largo contacto con las pieles durante la maceración-fermentación.

Los polisacáridos presentes en el vino proceden de las paredes celulares de la uva y de la levadura. La pared celular de la uva aporta polisacáridos pécticos que se solubilizan en mosto/vino mediante tratamientos mecánicos o por acción enzimática de las pectinasas (Mariona, 2013). Los homogalacturonanos (HG) son los más abundantes en la uva, pero se encuentran en menor concentración en el vino debido a su alta solubilidad y baja resistencia a la hidrólisis enzimática (Guadalupe & Ayestarán, 2007; Vidal et al., 2001). También encontramos rhamnogalacturonanos de tipo I (RG-I) que, al igual que los HG, tienen poca resistencia a la hidrólisis ácida y su concentración en el vino es muy baja (Mariona, 2013), y de tipo II (RG-II), con una estructura muy compleja, de modo que su extracción es significativa en la última etapa de la fermentación, cuando la concentración de alcohol es más alta (Mariona, 2013). Los HG, RG-I y RG-II son pectinas ácidas y constituyen alrededor del 20% de los polisacáridos del vino (Mercadé, 2021). Las pectinas neutras representan, aproximadamente, el 40% de los polisacáridos del vino. En esta categoría se encuentran los arabinanos y los arabinogalactanos de tipo I (AG-I) y II (AGP) (Mercadé, 2021). Los AGP contienen proteínas en su estructura.

Por último, la pared celular de la levadura aporta manoproteínas, las cuales representan en torno al 35% de los polisacáridos totales del vino (Mercadé, 2021; Vidal et al., 2003).

Tal y como se comenta en el siguiente apartado, los polisacáridos son beneficiosos para la estabilidad física del vino. Por ejemplo, las manoproteínas aportadas por la levadura actúan como coloides protectores, mejoran la estabilidad colorante en vinos tintos (evitan la formación de agregados tanino-tanino) y disminuyen el riesgo de quiebra proteica en vinos blancos, así como la precipitación de

tartratos. A nivel sensorial, mejoran las propiedades espumantes, aportan dulzor y untuosidad, y reducen la astringencia y amargor (Ferreira et al., 2002; Mariona, 2013; Vernhet, 2018)

1.5) Clarificación y estabilización del vino blanco.

En el vino blanco no se dan problemas de precipitación de materia colorante como en el caso del vino tinto ya que, como es sabido, éste no contiene antocianos ni taninos. No obstante, etapas de maceración como la maceración prefermentativa pueden aumentar ligeramente la concentración de flavanoles en el vino. En este sentido, la composición fenólica del vino blanco está formada principalmente por ácidos fenólicos y flavonoles, substratos potencialmente oxidables por las polifenoxidasas que pueden provocar el pardeamiento de estos vinos (Oliveira et al., 2011). Además, las reacciones enzimáticas de oxidación de estos compuestos dan lugar a reacciones de polimerización, formando melaninas, que pueden acabar precipitando. No obstante, dosis correctas de dióxido de azufre inhiben total o parcialmente estas reacciones (Bustamante et al., 2024).

En cualquier caso, el uso de clarificantes proteicos, como en el vino tinto, permite eliminar estos compuestos fenólicos potencialmente oxidables de la matriz del vino blanco.

Uno de los problemas más significativos de los vinos blancos es su inestabilidad proteica, que puede producir lo que se conoce como quiebra proteica si éste se almacena y es expuesto a altas temperaturas, perjudicando profundamente la limpidez del vino y su valor comercial (Ferreira et al., 2002). Esto no ocurre en el vino tinto ya que las proteínas son precipitadas por los taninos. Los estudios realizados a cerca de la inestabilidad proteica revelan que las proteínas con baja masa molecular y bajo punto isoeléctrico (pI) son las responsables de este fenómeno. Concretamente, las proteínas relacionadas con estrés patogénico (PR) como las quitinasas, las de tipo taumatina (TLPs) y las β -glucosidasas, cuya biosíntesis aumenta en el envero y en caso de ataques fúngicos, son las más abundantes en vinos blancos y las responsables de su inestabilidad proteica (Esteruelas et al., 2009a). Las quitinasas se encuentran en todas las partes de la vid, mientras que las TLPs sólo se presentan en la baya madura (Ferreira et al., 2002; Liu et al., 2023). Para comprobar la estabilidad proteica del vino blanco éste se somete a un tratamiento con calor (80°C, 60 min) que provoca la desnaturalización de las proteínas térmicamente inestables. Si la diferencia de turbidez tras la prueba es menor a 2 NTU, el vino se considera estable (Esteruelas et al., 2009b).

La bentonita es el clarificante universalmente usado para la clarificación de vinos blancos. Se trata de una arcilla que actúa como intercambiador catiónico adsorbiendo las proteínas que se encuentran con carga positiva al pH del vino. Se puede emplear sola o en combinación con otros clarificantes proteicos ya que, en ocasiones, el uso de estos puede dar lugar a enturbiamientos por sobreencolado. En estos casos, se ha de añadir en primer lugar el agente proteico y después la bentonita.

1.6) Clarificación y estabilización del vino tinto.

En el caso del vino tinto uno de los problemas más comunes en términos de inestabilidad del producto es la formación de precipitados de materia colorante debido a la polimerización de taninos y a la formación de aductos antociano-tanino. Estos forman complejos de alta masa molecular, los cuales pueden ser insolubles en la matriz del vino y dar lugar a precipitados de un color rojo/azulado que, en ocasiones, podemos encontrar en el fondo de las botellas de algunos vinos tintos comerciales. También es conocida la formación de precipitados por interacción entre taninos y proteínas presentes en el vino de forma natural (Gordillo et al., 2021; Vernhet, 2018).

Los polisacáridos presentes en el vino pueden interactuar con los compuestos fenólicos, evitando así la interacción de éstos con las proteínas o entre ellos mismos. En este sentido, la interacción de polisacáridos con polifenoles conduce a la estabilidad de la materia colorante, evitando posibles polimerizaciones de éstos y, por tanto, la posible aparición de precipitados de materia colorante (Mariona, 2013; Vernhet, 2018). De hecho, una de las estrategias ampliamente usadas antes del embotellado del vino tinto es la adición de goma arábica, polisacárido autorizado en enología, del cual se sabe que actúa como coloide protector (Mierczynska-Vasilev & Smith, 2015; Vernhet, 2018).

No obstante, el empleo de clarificantes proteicos es una práctica ampliamente conocida en el vino tinto, no solo para estabilizar el vino en términos de riesgo de precipitación de materia colorante, sino también para suavizar la astringencia, ya que está estrechamente relacionada con altas concentraciones de taninos, entre otros muchos factores (Vernhet, 2018).

Cabe destacar que en aquellos vinos destinados a una crianza en bodega la estabilización de materia colorante y la suavización de la astringencia se produce de forma natural en la bodega. En este sentido, la microoxigenación pasiva del vino durante el envejecimiento en bodega produce una serie de reacciones que estabilizan el color (reacción entre antocianos y taninos). Además, durante el envejecimiento también se produce la precipitación de aquella materia colorante potencialmente inestable que podría aparecer en forma de precipitado en botella (Zamora, 2003). Por

otro lado, durante el envejecimiento la condensación de las proantocianidinas y las interacciones de éstas con otros coloides del vino, como por ejemplo los polisacáridos, produce una suavización de la astringencia (Mariona, 2013). Estas reacciones son las condensaciones directas antociano-flavanol, las condensaciones antociano-flavanol con la participación de etanal, y las polimerizaciones de los flavanoles ya sea por formación de un carbocatión o con la participación de etanal (Zamora, 2003).

Por tanto, en enología, el uso de clarificantes proteicos para la clarificación y estabilización del vino tinto es empleado en aquellos vinos que más bien no tienen que pasar por un periodo de envejecimiento en bodega. En este sentido, estaríamos hablando de vinos destinados al consumo en pocos años y que, de alguna forma, a causa de largas maceraciones durante la vinificación entre otros factores, son un poco duros, astringentes y amargos a nivel sensorial, y con un potencial de posibles precipitaciones de materia colorante en botella.

1.7) Clarificantes usados en enología.

Teniendo en cuenta el riesgo que supone para la limpidez y calidad del vino la precipitación de materia colorante (en vino tinto), y la quiebra proteica (en vino blanco), la clarificación y estabilización son fundamentales para lograr la estabilidad física del vino (Mierczynska-Vasilev & Smith, 2015). La clarificación, además de eliminar aquellas partículas y coloides que generan precipitados o turbidez y ayudar a la formación de fangos, también tiene como objetivo eliminar los compuestos fenólicos para mejorar características sensoriales, tales como: (i) suavizar la astringencia en vinos tintos eliminando el exceso de taninos (Vernhet, 2018), (ii) evitar el pardeamiento de color por oxidación en vinos blancos (Mierczynska-Vasilev & Smith, 2015).

En el vino tinto, dada su alta composición fenólica, los clarificantes más usados en la industria enológica son agentes proteicos de origen animal, como la ovoalbúmina o gelatina (Cosme et al., 2009; Segade et al., 2020). En el vino blanco, para evitar la quiebra proteica, el tratamiento más usado y eficaz hasta el momento es la bentonita. A pesar de que se han hecho estudios que proponen otras alternativas a la bentonita debido a las mermas (del 5 al 20 %) y pérdidas económicas que genera, sigue siendo el tratamiento más empleado en bodega (Ferreira et al., 2002). Sin embargo, no actúa de forma selectiva, con lo que puede eliminar otros compuestos que contribuyan positivamente a su aroma o gusto, especialmente si se añade en altas dosis (Ferreira et al., 2002; Voilley et al., 1990). No obstante, también se usan clarificantes de naturaleza proteica para mejorar la limpidez de los vinos blancos, pero, como ya se ha comentado, éstos deben dosificarse junto con bentonita para que sean eficaces y, en ocasiones, para evitar el sobreencolado. En este sentido, la bentonita ayuda a

compactar el sedimento en el fondo del depósito y evita el enturbiamiento por sobreencolado que puede provocar el uso de clarificantes proteicos. La *Tabla 2* ilustra los clarificantes convencionales más usados en vinos blancos y tintos (Molina, 2000).

Clarificante	V. Blanco	V. Tinto	Efectos
<i>Ovoalbúmina</i>	No	Sí	↓ Astringencia en vinos muy tánicos. No altera perfil organoléptico.
<i>Gelatina</i>	Sí	Sí	↓ Compuestos fenólicos y materia colorante. ↓ 60% máx. taninos y 15% máx. antocianos. *Mayor pérdida color en vino envejecido *Riesgo sobreencolado
<i>Cola de pescado</i>	Sí	No	↓ Proteínas inestables Muy eficaz en vinos poco turbios. ↓ Matices amargos/ herbáceos. Mejora filtrabilidad vinos con Botrytis. *Riesgo sobreencolado.
<i>Bentonita</i>	Sí	No	↓ Proteínas inestables. *Efecto obstaculizado por taninos. ↓ Antocianos ↓ Quiebra cúprica

Tabla 2: clarificantes convencionales para vinos tintos y blancos (elaboración propia).

En los últimos años se han investigado y comercializado clarificantes proteicos de origen vegetal como alternativa a los de origen animal debido a su potencial alergénico y al auge en la demanda de productos veganos/ vegetarianos y de vinos con poca intervención (Marangon et al., 2019). Se han investigado numerosas fuentes de proteínas vegetales como cereales (arroz, trigo), legumbres (guisante, lentejas, soja), patata y subproductos de la uva. Entre ellos, los derivados proteicos de patata y guisante fueron aprobados por la OIV (Resolución OIV-OENO 495-2013) para su uso como clarificantes y, actualmente, están disponibles a través de distintas casas comerciales como, por ejemplo, Laffort, Agrovin o Enartis.

Los clarificantes proteicos basados en residuos de la uva, como el hollejo o extracto de semilla, son una alternativa de especial interés ya que no son elementos exógenos a la matriz del vino (Marangon et al., 2019; Segade et al., 2020). Legalmente, no se aplicarían restricciones relativas a concentraciones residuales que puedan quedar tras el tratamiento, tal y como ocurre con la ovoalbúmina o caseína, de origen animal y que, en un futuro, podrían llegar afectar a los clarificantes vegetales procedentes de productos exógenos al vino (Marangon et al., 2019). La OIV

recomienda un protocolo (Guía de buenas prácticas de clarificación) para reducir el riesgo de residuos proteicos tras el tratamiento con proteína de origen animal (Marangon et al., 2019). Asimismo, existen tratamientos eficaces para eliminarlos como el uso de bentonita, gel de sílice o tanino enológico. No obstante, la utilización de subproductos de la uva como posibles agentes proteicos en la clarificación supondría una ventaja debido a que no son de origen animal y, por tanto, además de no ser sujeto de restricciones legales como ya se ha comentado, permitirían elaborar vinos con el sello “vegano”. Una ventaja adicional sería que, al proceder de la misma materia prima que el vino, podrían tener una mejor aceptación en un mercado que, cada vez más, prefiere los productos naturales.

El objetivo de este trabajo fue, por tanto, la evaluación de la eficacia de un extracto proteico de semilla de uva como clarificante en vino tinto y en vino blanco, en comparación con diferentes clarificantes comerciales comúnmente usados en la industria enológica.

2) MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1) Vinos, clarificantes, reactivos químicos.

- Vinos: vino tinto de la variedad Merlot y vino blanco de la variedad Moscatel, sin clarificar, producidos en la bodega experimental de la Universidad Rovira i Virgili.
- Clarificantes: bentonita (Miracol, Martin Vialatte), cola de pescado (Cristalline, IOEC), ovoalbúmina (Ovoclaryl, Laffort), gelatina (Gecoll Supra, Laffort), patatina (Vegefine®, Laffort), extracto de semilla proporcionado por la empresa CAVIRO (Italia).
- Reactivos químicos y materiales: ácido clorhídrico 37% y ácido tartárico de Panreac. Ácido tánico, ovoalbúmina, metilcelulosa y acetaldehído de Sigma-Aldrich, y polivinilpolipirrolodona de Sigma ®. Metabisulfito de sodio 97% de Acros Organics y etanol de grado cromatográfico de Lichrosolv®.

2.2) Diseño experimental.

Vino blanco

Con el fin de estudiar la eficacia del extracto de semilla (SE), se comparó su efecto con el vino sin tratar (control, C) y con clarificantes habitualmente usados en vinos blancos, a saber: bentonita (B), cola de pescado (CP), gelatina (GE) y la proteína de patata (patatina, PA).

Asimismo, se comparó la eficacia de los distintos clarificantes proteicos por sí solos y en combinación con bentonita, con el fin de evaluar su efecto respecto a la inestabilidad proteica. En estos casos la bentonita se adicionó 24 horas después en una dosis de 40 g/ hL. Las dosis fueron escogidas de acuerdo con la recomendación de cada fabricante.

Los tratamientos se realizaron en tubos de 200 mL durante 5 días. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado. La *Tabla 3* muestra las dosificaciones para cada tratamiento.

Tratamiento	Dosis	Tratamiento	Dosis
Control	-	Gelatina+ B	60 cl/ hL
Bentonita	40 g/ hL	Patatina	6 g/ hL
Cola Pescado	1 g/ hL	Patatina + B	6 g/ hL
Cola Pescado + B	1 g/hL	Extracto semilla	6 g/ hL
Gelatina	60 cl/ hL	Extracto semilla + B	6 g/ hL

Tabla 3: clarificantes y dosis en tratamiento de vino blanco. + B significa adición bentonita (40 g/ hL) 24 horas después de la dosificación del clarificante proteico (Cola de pescado+B, Gelatina+B, Patatina+B y Extracto de semilla +B).

Vino tinto

En el caso del vino tinto, se evaluó la efectividad del extracto de semilla comparándolo con el vino control (sin adición de clarificante), y con otros clarificantes proteicos de origen animal y vegetal: gelatina, ovoalbúmina y patatina. La clarificación se realizó en tubos de 200 mL durante 5 días, tras los cuales se recuperó la muestra sin sedimentos y se procedió a los análisis fisicoquímicos de los vinos resultantes. Todas las muestras se prepararon por duplicado. Las dosis se añadieron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La *Tabla 4* recoge los distintos tratamientos y dosis.

Tratamiento	Dosis
Control	-
Gelatina	60 cl/ hL
Ovoalbúmina	6 g/ hL
Patatina	7 g/ hL
Extracto de semilla	8 g/ hL

Tabla 4: clarificantes y dosis en vino tinto.

2.3) Análisis fisicoquímicos en vino blanco.

Turbidez y estabilidad proteica. La turbidez, en NTU, de los vinos después de la clarificación fue determinada en un nefelómetro (Hach, 2100N IS). Para evaluar la estabilidad proteica, se midió la turbidez inicial de la muestra filtrada y la turbidez después de un tratamiento de calor a 80 °C durante 60 minutos. Posteriormente, se calculó la diferencia entre ambas. Cuando el aumento de turbidez fue menor a 2 NTU se consideró la muestra estable en cuanto a la quiebra proteica.

Índice de polifenoles totales y color. El índice de polifenoles totales (IPT) se determinó midiendo la absorbancia de las muestras diluidas (1:10) a 280 nm con espectrofotómetro UV-vis (JENWAY 7205) (Ribéreau-Gayon, 1970). Para el color, se midió la absorbancia de las distintas muestras a través de una cubeta de 10 mm de camino óptico a una longitud de onda de 420 nm.

Proteínas. FPLC. La concentración de proteínas totales se determinó por cromatografía líquida de alta resolución basada en exclusión molecular (HRSEC-*High resolution size-exclusion chromatography*). Este método permite determinar la distribución de pesos moleculares de las proteínas del vino, así como cuantificar la concentración de proteína totales. La metodología utilizada fue la descrita por (Canals et al., 1998), en la cual la cuantificación se realizó mediante un detector UV a una longitud de onda de 230 nm. Para ello, se utilizó una recta de calibrado usando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón externo.

En nuestro trabajo solo se cuantificó la concentración de proteínas totales de los vinos resultantes de cada clarificación y del vino control.

2.4) Análisis fisicoquímicos vino tinto.

Turbidez y estabilidad colorante. La turbidez, en NTU, de los vinos después de la clarificación fue determinada en un nefelómetro (Hach, 2100N IS). Para evaluar la estabilidad de la materia colorante, se midió la turbidez inicial de la muestra filtrada y la turbidez después de un tratamiento en frío (4°C) de 24 horas. Posteriormente se calculó la diferencia entre ambas. Cuando el aumento de turbidez fue menor a 2 NTU se consideró la muestra estable respecto a la precipitación de materia colorante.

Parámetros del color. Se midió la absorbancia de las distintas muestras a través de una cubeta de 1 mm de camino óptico haciendo un barrido en el rango entre 400-650 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (JENWAY 7205). Por un lado, se determinó la intensidad colorante como la suma de las absorbancias a 420 nm, 520 nm y 620 nm. Por otra parte, las absorbancias obtenidas a 450 nm, 520 nm, 570 nm y 630 nm se introdujeron en el software MSCVes4 para determinar las coordenadas del espacio CIEL*a*b*.

Antocianos y copigmentación. La concentración de antocianos totales, en mg/L, se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de las distintas muestras, con y sin adición de metabisulfito de sodio, a 520 nm (Ribéreau-Gayon & Stonestreet, 1965). Los antocianos combinados con flavanoles se cuantificaron mediante el índice de polivinilpolipirrolodona (PVPP) (Glories, 1984; Ribéreau-Gayon et al., 1999). El porcentaje de antocianos que dan color al pH del vino se determinó con el índice de ionización (I.I) (Glories, 1984; Ribéreau-Gayon et al., 1999). Por último, el índice de copigmentación (I.Cp) se determinó según el método de Boulton, 1996. En todos los análisis se usó un espectrofotómetro UV-Vis (JENWAY 7205).

Índice de polifenoles totales (IPT), taninos e índice de astringencia. El índice de polifenoles totales se determinó midiendo la absorbancia de cada muestra diluida (1:100) a 280 nm (Ribéreau-Gayon, 1970). La concentración de taninos totales (mg/L) se determinó mediante el método de precipitación con metilcelulosa (Montedoro & Fantozzi, 1974). Por último, el índice de astringencia se determinó usando ovoalbúmina como agente precipitante y ácido tánico como patrón externo para el calibrado (Llaudy et al., 2004).

2.5) Análisis sensorial.

Las muestras se cataron en la sala de catas de la Facultad de Enología de la URV (Tarragona) por 10 panelistas. Se emplearon copas de cata que cumplen con la normativa estipulada por la ISO (Organización Internacional de Estandarización, 1997). En primer lugar, se cató el vino blanco y después el tinto. Para el vino tinto se cataron todos los grupos experimentales. En el caso del vino blanco, solo se cataron el control y aquellas condiciones que contenían bentonita (sola o en combinación con los diferentes agentes proteicos). Se eligieron únicamente las muestras con suplementación de bentonita, ya que, en la industria enológica, los clarificantes proteicos siempre se usan en combinación con bentonita para asegurar la estabilidad proteica del vino blanco.

En ambos casos se realizó una cata descriptiva en la cual los catadores puntuaron en una escala de 0-10 los siguientes atributos:

- En el vino blanco, en la fase visual, se evaluó la intensidad del color y la limpidez; en nariz, la intensidad y calidad de aroma; en boca, la acidez, untuosidad, astringencia, amargor y calidad.
- En vino tinto se evaluó la intensidad y tonalidad del color en la fase visual; la intensidad y calidad del aroma en nariz y, finalmente, el verdor, cuerpo/ estructura, astringencia, amargor y calidad en boca.

3) RESULTADOS

3.1) Clarificación vino blanco.

Turbidez y estabilidad proteica.

La *Tabla 5* recoge los resultados de turbidez (T) y estabilidad proteica de los vinos blancos, expresada como diferencia de turbidez (ΔT) después del tratamiento con calor (80°C, 60 min) de las diferentes muestras tras 5 días de clarificación.

	T (NTU)			ΔT (NTU)		
C	13.8	± 0.1	a	41.2	± 0.2	a
B	5.0	± 0.3	d	0.2	± 0.1	g
CP	1.2	± 0.6	f	12.2	± 0.2	e
CP+B	3.1	± 0.7	e	0.2	± 0.1	g
GE	6.6	± 0.6	c	37.0	± 0.1	c
GE+B	3.7	± 0.5	e	3.4	± 0.7	f
PA	8.1	± 0.5	b	38.5	± 0.3	b
PA+B	1.5	± 0.4	f	0.2	± 0.1	g
SE	3.9	± 0.2	e	34.6	± 0.7	d
SE+B	1.8	± 0.1	f	0.2	± 0.1	g

Tabla 5: turbidez y estabilidad proteica del vino blanco tras clarificación. C: control, B: bentonita, CP: cola de pescado, GE:gelatina, PA: patatina, SE: extracto de semilla. +B: adición de bentonita a las 24h de suplementación con agente de clarificación proteico.

Todos los tratamientos redujeron de forma estadísticamente significativa la turbidez respecto al vino control. Sin embargo, comparando la clarificación en la que únicamente se añadió bentonita con los distintos clarificantes proteicos sin bentonita (CP, GE, PA, SE), el tratamiento más efectivo en términos de limpieza fue el de cola de pescado seguido, en orden decreciente, por el extracto de semilla, bentonita, gelatina y, por último, la patatina. Por tanto, parece ser que el extracto de semilla y la cola de pescado fueron más eficaces reduciendo la turbidez que la bentonita, mientras que las clarificaciones con patatina y gelatina mostraron mayor turbidez respecto el tratamiento con bentonita.

No obstante, los tratamientos con los diferentes agentes proteicos combinados con bentonita resultaron en vinos con menor turbidez respecto a la adición de estos sin bentonita (CP, GE, PA, SE), con excepción de la cola de pescado. En este caso la turbidez fue mayor cuando éste se añadió junto con la bentonita (CP+ B). Por otro lado, comparando entre los distintos agentes proteicos suplementados con bentonita,

el tratamiento menos eficaz en la reducción de la turbidez fue el de la gelatina y bentonita (GE+ B).

Estos resultados muestran que la mejor opción para la clarificación de vino blanco en términos de limpidez es la adición de agentes proteicos combinados con bentonita, excepto en el caso de la cola de pescado, que fue más eficaz cuando se aplicó sin bentonita. Asimismo, cabe destacar que el resultado menos satisfactorio en términos de turbidez, entre aquellos tratamientos en los que se usó un agente proteico junto con bentonita, fue el de la gelatina y bentonita. Esto podría ser debido a una dosis relativamente alta de gelatina, la cual habría generado un enturbiamiento que la bentonita no tuvo capacidad de reducir.

Respecto a la estabilidad proteica, se observó que la diferencia de turbidez después del test de calor fue significativamente menor en todos los tratamientos respecto al vino control. No obstante, las clarificaciones con los extractos proteicos por sí solos (GE, OA, PA, SE), a pesar de que consiguieron vinos más límpidos respecto al control, no fueron eficaces en términos de estabilidad proteica ya que la diferencia de turbidez tras el test de calor fue superior a 2 NTU en todos ellos. Cabe destacar, que el mejor entre estos tratamientos fue aquel en el que se usó cola de pescado.

Por otra parte, sólo los tratamientos en los que se empleó bentonita, sola o en combinación con clarificantes proteicos, resultaron en diferencias de turbidez menores a 2 NTU y, por tanto, eliminaron el riesgo de quiebra proteica. Sin embargo, esto no se cumplió en el tratamiento con gelatina y bentonita, lo cual podría asociarse a la formación de turbidez por sobreencolado de gelatina y una acción deficiente de la bentonita en la adsorción de los coloides formados en consecuencia. Este problema se solucionaría fácilmente incrementando la dosis de bentonita.

En definitiva, estos resultados ponen de manifiesto que una disminución de turbidez respecto al vino control no exime del riesgo de quiebra proteica, tal y como se observó en el caso de los clarificantes proteicos GE, OA, PA y SE. Por tanto, un test de inestabilidad proteica, como el test de calor, es esencial para corregir y asegurarse de que no se producirán futuros enturbiamientos en el vino. Asimismo, estos resultados evidencian la eficacia de la bentonita para reducir la turbidez y asegurar la estabilidad proteica de los vinos con respecto al uso de los clarificantes proteicos sin bentonita.

Índice de polifenoles totales (IPT) y color.

La *Tabla 6* presenta los resultados referentes al índice de polifenoles totales o IPT (absorbancia a 280 nm) y color amarillo (absorbancia a 420 nm) del vino sin adición de clarificante, tratado con bentonita (B), con los extractos proteicos solos (cola

de pescado/ CP, gelatina/ GE, patatina/ PA, extracto de semilla/ SE) y combinados con bentonita (+B)

	<i>IPT (A₂₈₀ nm)</i>	<i>A₄₂₀ nm</i>
<i>Control</i>	7.59 ± 0.05 a	0.074 ± 0.001 a
<i>B</i>	7.21 ± 0.01 b	0.064 ± 0.001 c
<i>CP</i>	7.62 ± 0.02 a	0.070 ± 0.001 b
<i>CP+B</i>	7.31 ± 0.07 b	0.064 ± 0.001 c
<i>GE</i>	7.57 ± 0.06 a	0.070 ± 0.001 b
<i>GE+B</i>	7.36 ± 0.08 b	0.065 ± 0.001 c
<i>PA</i>	7.57 ± 0.02 a	0.069 ± 0.001 b
<i>PA+B</i>	7.29 ± 0.14 b	0.062 ± 0.001 c
<i>SE</i>	7.57 ± 0.02 a	0.071 ± 0.001 b
<i>SE+B</i>	7.27 ± 0.02 b	0.063 ± 0.001 c

Tabla 6: *IPT y color del vino blanco tras la clarificación. B: bentonita, CP: cola de pescado, GE: gelatina, PA: patatina, SE: extracto de semilla. +B: adición de bentonita 24 horas después del extracto proteico.*

Las muestras tratadas con bentonita (CP+B, GE+B, PA+B, SE+B y B) mostraron valores de IPT significativamente menores respecto al vino control y a los tratamientos con clarificantes proteicos sin adición de bentonita (CP, GE, PA, SE). Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con agentes proteicos sin bentonita (CP, GE, PA y SE) y el vino control. Esto significaría que la bentonita pudo haber adsorbido parte de los compuestos polifenólicos presentes en el vino blanco (ácidos fenoles, hidroxicinámicos y/o flavonoles).

En el análisis del color, todas las muestras clarificadas mostraron absorbancias a 420 nm ligeramente menores, pero estadísticamente significativas, respecto al vino control, independientemente del tratamiento. Con lo cual todos los tratamientos redujeron el color respecto al vino sin tratar. Además, al igual que en el índice de IPT, esta disminución de absorbancia fue mayor en aquellas muestras clarificadas con bentonita con respecto a aquellas muestras tratadas únicamente con los extractos proteicos. Estos resultados confirman, de nuevo, la capacidad de la bentonita para adsorber compuestos polifenólicos del vino, entre ellos los flavonoles responsables del color amarillo de los vinos blancos.

Proteínas, FPLC.

La *Tabla 7* presenta las concentraciones totales de proteínas para cada tratamiento.

Concentración total proteínas (mg/L)				
Control	93.0	±	2.0	a
B	13.9	±	8.2	e
CP	38.0	±	3.4	c
CP+B	23.9	±	3.5	de
GE	83.0	±	13.3	a
GE+B	43.2	±	1.5	c
PA	70.6	±	6.7	b
PA+B	18.2	±	0.6	e
SP	50.2	±	12.5	c
SP+B	9.1	±	3.5	ef

Tabla 7: concentración de proteínas totales tras clarificación en vino blanco.

La concentración de proteínas del vino sin clarificar fue de 93.0 mg/L. Los tratamientos en los que se aplicaron los distintos agentes proteicos (sin adición de bentonita) disminuyeron la concentración de proteínas de los vinos, con excepción del tratamiento con gelatina. Esto podría indicar que las proteínas contenidas en los clarificantes podrían interaccionar con las proteínas del vino, precipitando parte de ellas. Asimismo, el tratamiento que eliminó más proteínas del vino, de entre aquellos en los que solo se utilizaron agentes proteicos, fue en el que se usó cola de pescado. De hecho, fue este tratamiento el que mejores resultados dio en cuanto a estabilidad proteica en el test de calor.

Por su parte, los tratamientos con bentonita, sola o en combinación con los diferentes agentes proteicos, fueron los que produjeron una mayor disminución en la concentración de proteínas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa respecto a las clarificaciones en las que solo se emplearon los agentes proteicos. Por tanto, podemos concluir que la adición de bentonita es imprescindible para eliminar proteínas de los vinos en mayor proporción y asegurar la estabilidad proteica de los vinos blancos.

Por otra parte, el tratamiento con bentonita y gelatina (GE+ B) fue el que menos proteínas eliminó del vino de entre todos los tratamientos en que se usó la bentonita. Esto puede ser debido a que la bentonita no tenga habilidad para eliminar los residuos proteicos de gelatina presentes en el vino tras su adición. Este resultado estaría

relacionado con el hecho que este tratamiento fue el único que no consiguió la estabilidad proteica del vino, de entre todos aquellos que usaron bentonita.

Entre los otros tratamientos con bentonita, el que más proteínas eliminó de la matriz fue el extracto de semilla (SP+B), seguido en orden decreciente, por la bentonita (B), patatina (PA+B) y la cola de pescado (CP+B). Cabe destacar que no hubo diferencias significativas de (SP+B), (PA+B) y (CP+B) respecto con el tratamiento en el que solo se usó bentonita. No obstante, la concentración de proteínas en la muestra (SP+B) fue significativamente menor que (PA+B) y (CP+B).

En definitiva, todos los tratamientos en los que se empleó bentonita, excepto el de gelatina y bentonita, fueron satisfactorios en lo que a la estabilidad proteica se refiere y adsorbieron más proteínas que el agente proteico solo. Es posible que la falta de eficacia en el caso de la gelatina con bentonita se deba a la alta dosis de gelatina empleada en este experimento.

3.2) Clarificación en vino tinto.

Turbidez y estabilidad colorante.

La *Tabla 8* muestra los resultados referentes a la turbidez y la estabilidad de la materia colorante, expresada como diferencia de turbidez, después del tratamiento en frío de 24 horas, de las muestras tras 5 días de clarificación con y sin (vino control) adición de los diferentes clarificantes de origen proteico.

Todos los vinos tratados con clarificantes proteicos, excepto la muestra tratada con ovoalbúmina (OA), mostraron valores menores de turbidez estadísticamente significativos respecto al vino control (sin adición de clarificante), tras 5 días de clarificación. Comparando los tratamientos con los clarificantes que sí lograron una disminución de la turbidez (gelatina/GE, patatina/PA, extracto de semilla/SE), no se observaron diferencias significativas entre ellos.

	Control	Gelatina	Ovoalbúmina	Patatina	Extracto semilla
T NTU	15.6 ± 0.5 a	11.7 ± 0.6 b	15.9 ± 0.4 a	10.4 ± 0.1 b	11.6 ± 1.0 b
ΔT NTU	39.5 ± 0.6 a	0.9 ± 0.4 b	1.1 ± 1.0 b	1.7 ± 0.8 b	0.5 ± 0.1 b

Tabla 8: turbidez y estabilidad de materia colorante tras la clarificación en vino tinto.

Respecto a la estabilidad de la materia colorante, tanto las muestras tratadas con clarificantes proteicos de origen animal (GE, OA) como las tratadas con clarificantes de origen vegetal (PA, SE) mostraron diferencias de turbidez menores a 2.00 NTU tras 24 horas de conservación en frío, mientras que para el vino control (C) la diferencia de turbidez fue de 39.54 NTU. Este resultado indica que el riesgo de

precipitación de materia colorante es mínimo en todas las muestras tratadas con clarificantes proteicos, sin ser su origen, animal o vegetal, relevante. Con lo cual, todos los tratamientos fueron eficaces y disminuyeron de forma estadísticamente significativa el riesgo de precipitado de la materia colorante respecto al vino control, asegurando así la estabilidad del vino en términos de precipitación de materia colorante tras la clarificación.

Parámetros del color.

La *Tabla 9* muestra los resultados de la intensidad del color (IC) y de las coordenadas CIEL*a*b* de los vinos resultantes tras las clarificaciones.

La muestra clarificada con gelatina fue la que presentó una menor intensidad colorante, siendo este valor estadísticamente significativo respecto al resto de las condiciones (C, OA, PA, SE). Referente a los vinos tratados con extracto de semilla y ovoalbúmina, la intensidad de color también fue significativamente menor respecto al vino control, pero esta disminución no fue tan pronunciada como en el caso del tratamiento con gelatina. La muestra tratada con patatina fue estadísticamente similar al control en términos de intensidad colorante.

	<i>Control</i>	<i>Gelatina</i>	<i>Ovoalbúmina</i>	<i>Patatina</i>	<i>Extracto semilla</i>	
<i>IC</i>	14.9 ± 0.2 a	13.4 ± 0.3 c	14.3 ± 0.3 b	14.8 ± 0.1 a	14.3 ± 0.1 b	
<i>CIEL*a*b*</i>	<i>L*</i>	38.85 ± 0.55 c	42.85 ± 0.75 a	40.95 ± 0.95 b	39.95 ± 0.15 b	40.85 ± 0.05 b
	<i>C*</i>	49.92 ± 0.68 a	49.69 ± 0.05 a	50.85 ± 0.73 a	50.68 ± 0.14 a	47.86 ± 0.17 b
	<i>h*</i>	10.27 ± 0.13 a	8.94 ± 0.08 c	9.82 ± 0.04 b	9.76 ± 0.01 b	9.28 ± 0.05 b

Tabla 9: Intensidad colorante y parámetros CIEL*a*b* tras la clarificación de vino tinto.

La coordenada CIEL*a*b* L*, que expresa la claridad del vino, fue significativamente mayor para el vino tratado con gelatina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la intensidad colorante en esta muestra, que mostró una menor intensidad del color y como es bien conocido, a mayor claridad (L*) menor es la intensidad del color (Piccardo et al., 2019). Las muestras tratadas con ovoalbúmina, patatina y extracto de semilla también mostraron un valor de L* significativamente mayor en comparación con la muestra control, lo cual estaría relacionado con una menor intensidad del color detectada en estas muestras con respecto al vino sin clarificar. No obstante, en el caso de la patatina el valor de la intensidad colorante fue menor pero no significativo estadísticamente respecto al control, como se ha comentado anteriormente.

En cuanto a la saturación (C^*), coordenada que expresa la saturación del color, la muestra tratada con extracto de semilla mostró un valor menor estadísticamente respecto al resto de las condiciones (C, OA, PA, SE). Esto significaría que tras la clarificación con extracto de semilla el vino tendría un color menos vivo. Esto podría ser debido a la composición de este extracto, el cual podría contener polifenoles de diferente naturaleza que hayan modificado la saturación de este color. Respecto a la tonalidad, coordenada h^* , todas las muestras clarificadas con un agente proteico mostraron un valor menor estadísticamente respecto al control. A su vez, fue la muestra tratada con gelatina la que mostró un valor significativamente menor de h^* . En este sentido, valores menores de este parámetro indican tonalidades más rojo-azuladas, mientras que valores mayores indicarían tonalidades más rojo-anaranjadas. Con lo cual, parece ser que los clarificantes proteicos testados dan lugar a vinos con tonalidades ligeramente más rojo-azuladas respecto al vino control.

Antocianos e índice de copigmentación.

La *Tabla 10* muestra la concentración de antocianos totales, el índice de PVPP (% de antocianos combinados), el índice de ionización (% antocianos que presentan color al pH del vino) y el índice de copigmentación (% del color debido a la copigmentación).

		Control	Gelatina	Ovoalbúmina	Patatina	Extracto semilla
A.T	(mg/L)	205 ± 11 a	168 ± 28 a	184 ± 21 a	208 ± 3 a	205 ± 1 a
PVPP	%	67.5 ± 0.7 a	57.5 ± 4.1 b	62 ± 7.3 a	71.0 ± 2.0 a	70.8 ± 1.8 a
I.I	%	54.9 ± 0.4 c	57.0 ± 0.3 b	58.2 ± 1.4 ab	60.3 ± 1.1 a	56.4 ± 1.1 b
I.Cp	%	9.5 ± 4.2 a	9.9 ± 0.2 a	11.0 ± 0.7 a	7.8 ± 2.3 a	8.1 ± 0.1 a

Tabla 10: Análisis de antocianos totales en mg/L, combinados (PVPP), ionizados (I.ionización) e índice copigmentación. A.T: antocianos totales, I.I: índice de ionización, I. Cp: índice de copigmentación.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos y el vino control con relación a la concentración de antocianos de los vinos resultantes de las clarificaciones. No obstante, sí que se observó una mayor disminución de la concentración de antocianos en la muestra clarificada con gelatina en comparación con el resto de los clarificantes (OA, PA, SE). Estos resultados podrían relacionarse con una menor intensidad del color observada en esta muestra y podría indicar que la gelatina adsorbió ligeramente una parte de los antocianos presentes en el vino.

El índice de PVPP de la muestra tratada con gelatina fue significativamente menor respecto al resto de condiciones. Esto podría asociarse a su alta capacidad

para eliminar taninos y/o pigmentos poliméricos formados por la unión tanino-antociano. Este resultado también concuerda con la observación hecha en el análisis anterior respecto a su capacidad para arrastrar parte de los antocianos presentes en el vino. Las muestras tratadas con patatina y extracto de semilla tuvieron valores ligeramente más altos del índice de PVPP respecto al vino control, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En este sentido, la semilla de uva contiene ácidos fenoles y taninos condensados, con lo cual el extracto de semilla usado como clarificante podría haber aportado taninos condensados, favoreciendo su combinación con antocianos y elevando así el índice de PVPP respecto al vino control.

Todos los tratamientos mostraron valores del índice de ionización estadísticamente mayores respecto al vino control. Los valores de este parámetro en orden decreciente fueron PA > OA > GE > SE >> C. El índice de ionización depende en gran parte del pH del vino y de la combinación de los antocianos con los taninos, ya que los antocianos combinados son menos sensibles a los cambios de pH que cuando están en forma libre. Sin embargo, también puede depender de la concentración de posibles copigmentos al vino.

Por último, respecto al índice de copigmentación no se observaron diferencias significativas entre las distintas condiciones.

Índice de polifenoles totales, concentración de taninos y astringencia.

La *Tabla 11* muestra el índice de polifenoles totales (IPT), la concentración de taninos totales, expresada en mg/L, y el índice de astringencia, expresado en mg/L de ácido tánico.

		Control	Gelatina	Ovoalbúmina	Patatina	Extr.semilla
IPT	%	69.5 ± 0.1 a	66.2 ± 1.1 b	69.2 ± 0.5 a	69.3 ± 0.1 a	67.8 ± 0.2 b
Taninos	(mg/L)	2752 ± 67 a	2191 ± 148 c	2727 ± 127 a	2542 ± 88 b	2636 ± 42 ab
Astringencia	(mg/L)	588 ± 3 b	470 ± 4 c	565 ± 3 b	579 ± 5 b	651 ± 7 a

Tabla 11: Índice de polifenoles totales (IPT), concentración de taninos totales (mg/L) y astringencia (mg/L ác. Tánico).

Referente al índice de polifenoles totales, la muestra tratada con gelatina fue la que mostró un valor significativamente menor. Este resultado, junto con lo visto en el caso de los antocianos totales y el índice de PVPP, estaría indicando la fuerte habilidad de la gelatina para eliminar compuestos fenólicos del vino. Seguido del vino tratado con gelatina, aquél que redujo en mayor medida el índice de polifenoles del vino fue el tratado con extracto de semilla. La explicación de este resultado para el

extracto de semilla es mucho más difícil de discutir pudiendo existir un balance entre un posible aporte de polifenoles por parte del extracto y la eliminación de éstos por parte de las proteínas contenidas en el vino.

Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el vino control y las muestras clarificadas con ovoalbúmina y patatina. Por tanto, parece ser que el tratamiento con gelatina del vino tinto sería el más enérgico en cuanto a la eliminación de polifenoles de los vinos.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de taninos totales entre la muestra tratada con ovoalbúmina y el control, lo cual iría en concordancia con los valores de IPT obtenidos. En la muestra tratada con patatina sí se observó una bajada en la concentración de tanino respecto al control. No obstante, es necesario mencionar que esta disminución en la concentración de taninos en la muestra tratada con patatina no fue ligada a una disminución del IPT, lo cual puede ser debido a que este índice hace referencia a todos los compuestos fenólicos. En este sentido, este índice puede depender en gran medida del coeficiente de absorción molar de cada una de las familias de los compuestos fenólicos y por tanto a veces puede ser difícil ver una tendencia en este parámetro. Para la muestra tratada con extracto de semilla se vio una ligera bajada en la concentración de tanino, que iría en concordancia con el valor del IPT, pero ésta no fue estadísticamente significativa respecto al control.

Por su parte, la muestra clarificada con gelatina fue la que mostró una concentración menor en taninos siendo estadísticamente significativa respecto al resto de condiciones (C, OA, PA, SE). Este resultado concuerda con el índice de astringencia observado para esta muestra, siendo éste significativamente menor respecto al vino control y al resto de los tratamientos (OA, PA, SE). Además, el índice de astringencia de las muestras clarificadas con ovoalbúmina y patatina presentaron valores ligeramente menores (y no significativos) respecto al vino control, pero mayores que en el caso de la gelatina.

Para la muestra tratada con extracto de semilla se obtuvo el mayor índice de astringencia, con diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de tratamientos (GE, OA, PA) y al vino control. Aunque la concentración de taninos totales de los vinos tratados con este extracto fue estadísticamente igual al control, se observó un aumento del índice de astringencia. Esto podría asociarse a la posible presencia de taninos condensados en el extracto de semilla y que podrían ser aportados al vino. En este sentido, es bien conocido que los taninos procedentes de la semilla contienen alta proporción de galato de (-)-epicatequina (Cheynier, 2006; Peña-Neira, 2019).

Esta mayor proporción de galato de (-)-epicatequina incrementa el número de grupos hidroxilo (-OH) en la molécula pudiendo interactuar más fuertemente mediante puentes de hidrógeno con las proteínas de la saliva y aumentar así la sensación de astringencia

3.3) Análisis sensorial

Vino blanco

La *Figura 2* muestra el diagrama de tela de araña con las puntuaciones correspondientes al vino blanco.

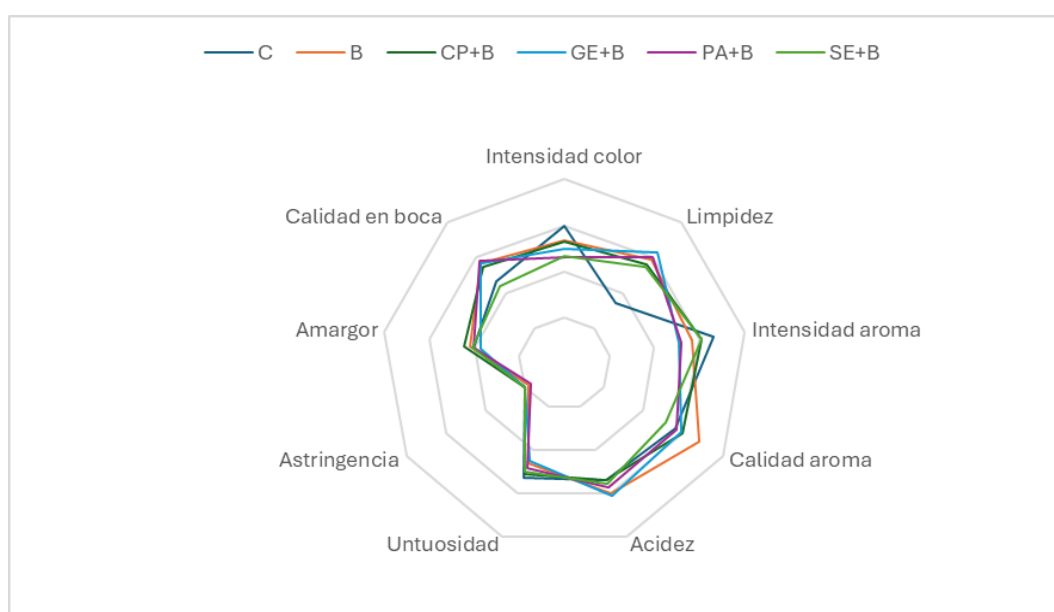


Figura 2: diagrama de tela de araña del vino blanco tras cata de vino control y clarificados. C: control, B: bentonita, CP: cola de pescado, GE: gelatina, PA: patatina, SE: extracto de semilla; +B: adición de bentonita 24 horas después del clarificante proteico.

En la fase visual, el vino percibido con mayor intensidad de color y menor limpidez fue el vino control (sin clarificar). Esta percepción en la intensidad del color coincide con las menores absorbancias a 420nm observadas en los vinos clarificados en comparación con el vino control. Por otra parte, los panelistas evaluaron con menor intensidad de color a las muestras tratadas con clarificantes vegetales (patatina y extracto de semilla)

En nariz, el vino control fue calificado con la mayor intensidad aromática, mientras que los tratamientos con patatina y gelatina en combinación con bentonita se percibieron con menor intensidad del aroma. No obstante, los catadores puntuaron con la mejor calidad de aroma a la muestra tratada únicamente con bentonita, la cual, por otra parte, fue percibida con una intensidad de aroma intermedia.

Referente a la sensación en boca, las muestras que fueron percibidas con una acidez más alta fueron las clarificadas con gelatina junto con bentonita (GE+ B) y aquella clarificada solamente con bentonita. Sin embargo, los catadores no percibieron grandes diferencias entre las distintas condiciones en cuanto a la untuosidad, astringencia y amargor de los vinos.

Por último, todos los vinos, independientemente del clarificante empleado, fueron bien evaluados en lo referente a la calidad en boca, a excepción del tratado con extracto de semilla, calificado con la puntuación más baja.

Vino tinto

La *Figura 3* muestra un diagrama tipo araña donde se representan las puntuaciones medias de los catadores en los diferentes atributos sensoriales de los vinos.

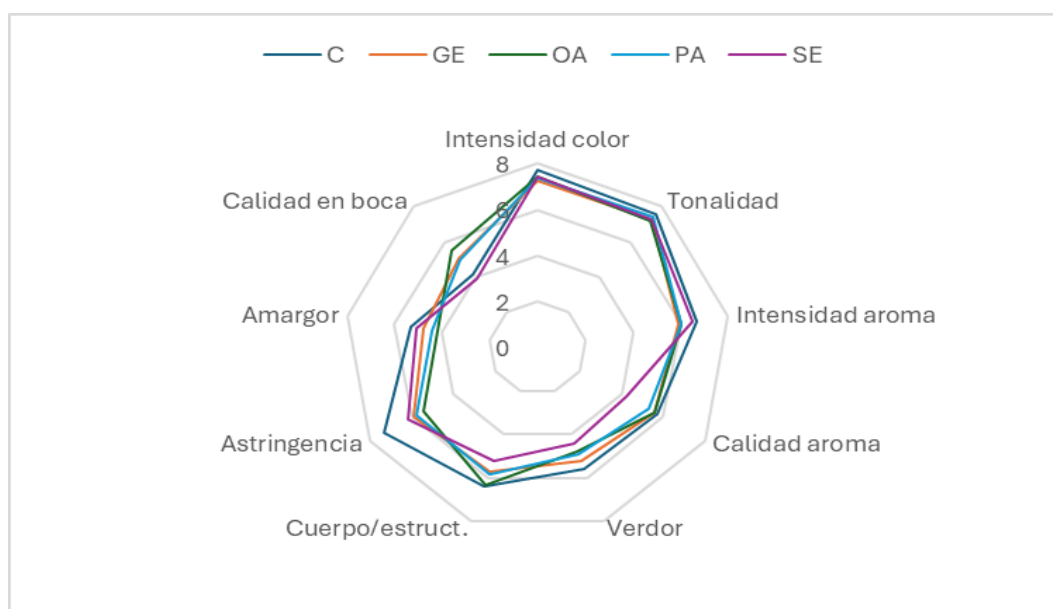


Figura 3: diagrama de tela de araña tras la cata de los vinos control y clarificados. C: control, GE: gelatina, OA: ovoalbúmina, PA: patatina, SE: extracto de semilla.

La intensidad del color fue percibida por los catadores de forma similar para todas las condiciones, puntuando ligeramente el control con una mayor intensidad del color. Referente al olfato, los catadores puntuaron con mayor intensidad de aroma el vino control y el vino tratado con extracto de semilla. No obstante, la calidad del aroma fue muy mal puntuada para el extracto de semilla mientras que las muestras tratadas con gelatina, ovoalbúmina y patatina fueron mejor evaluadas en este parámetro. En la muestra control la apreciación de verdor fue mayor que para las muestras tratadas con el resto de los clarificantes.

Referente al gusto y la percepción táctil en boca, los catadores puntuaron con mayor astringencia, mayor amargor, mayor cuerpo y estructura el vino control respecto los vinos tratados con los diferentes clarificantes. Es necesario mencionar que con el índice de astringencia determinado analíticamente se observó una mayor astringencia en el vino tratado con extracto de semilla con respecto al control, no obstante, los catadores apreciaron una menor astringencia del vino tratado con este extracto respecto el control. Sin embargo, fue el vino puntuado con más astringencia de entre todos los vinos tratados con los diferentes clarificantes. Esto puede ser debido a la posible presencia de taninos con mayor proporción de galato de epicatequina en este extracto. En este sentido, el galato de epicatequina tiene un coeficiente de extinción molar mayor que los otros monómeros de flavanol (Kennedy J. A et al., 2001) y por tanto la caída de absorbancia a 280nm determinada analíticamente (método del índice de astringencia) será mayor para una misma concentración de tanino de semilla precipitado por la ovoalbúmina.

Por último, la calidad en boca fue mejor puntuada para el control y las muestras tratadas con agentes proteicos de origen animal con respecto a las muestras tratadas con proteínas de origen vegetal.

Síntesis del análisis sensorial

De acuerdo con la clasificación realizada por los panelistas en ambas catas (vino blanco y vino tinto), el vino clarificado con extracto de semilla fue el menos preferido. El orden de preferencia, de mayor a menor, para cada uno de los vinos catados en función del tratamiento de clarificación fue el siguiente:

- En vino blanco:
Bentonita > Bentonita y gelatina > Bentonita y cola de pescado > Control (sin adición de clarificante) > Bentonita y patatina > Bentonita y extracto de semilla.
- En vino tinto:
Ovoalbúmina > Gelatina > Patatina > Control (sin clarificante) > Extracto de semilla.

4) CONCLUSIONES.

4.1) Vino blanco.

- i. Todos los tratamientos de clarificación redujeron la turbidez respecto al vino control.
- ii. Únicamente los tratamientos con bentonita, sola o en combinación con los distintos clarificantes proteicos, tanto de origen animal como los vegetales, lograron la estabilidad proteica de los vinos.
- iii. Todos los vinos clarificados presentaron una intensidad de color analíticamente inferior al vino control, lo cual se corresponde con la percepción de los panelistas. Además, en los vinos tratados con clarificantes vegetales la percepción sensorial del color fue menor que en el caso de los de origen animal y la bentonita.
- iv. El vino clarificado con extracto de semilla fue puntuado por los catadores con una peor calidad en boca y fue el menos preferido por éstos.

4.2) Vino tinto.

- i. Todos los tratamientos, con excepción de la clarificación con ovoalbúmina, produjeron una disminución de la turbidez respecto el control.
- ii. Todos los tratamientos consiguieron estabilidad de la materia colorante con respecto al vino sin clarificar.
- iii. Todos los clarificantes produjeron una disminución de la intensidad colorante, con excepción de la patatina. No obstante, todos los tratamientos con los diferentes clarificantes producen vinos con mayor claridad (L^*) que el control.
- iv. Los catadores puntuaron todos los vinos clarificados con una menor intensidad del color que el control, independientemente del clarificante empleado.
- v. La gelatina fue el tratamiento que eliminó más compuestos fenólicos y especialmente, más taninos del vino, lo cual se tradujo en un menor índice de astringencia.
- vi. A nivel sensorial, los catadores puntuaron los vinos clarificados como menos astringentes y amargos que el control.
- vii. Los catadores puntuaron el vino sin clarificar y el vino tratado con extracto de semilla con mayor intensidad del aroma. No obstante, la calidad del aroma del vino clarificado con extracto de semilla fue la peor puntuada.

5) BIBLIOGRAFÍA.

- Boulton, R. B. (1996). Methods for the assessment of copigmentation in red wines. *Presented at the 47th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture.*
- Bustamante, M., Giménez, P., Just-Borràs, A., Solé-Clua, I., Gombau, J., Heras, J., Sieczkowski, N., Gil, M., Pérez-Navarro, J., Gómez-Alonso, S., Canals, J., & Zamora, F. (2024). Use of glutathione, pure or as a specific inactivated yeast, as an alternative to sulphur dioxide for protecting white grape must from browning. *Foods*, 13 (2), 310.
- Canals, J.M., Arola, L., & Zamora, F. (1998). Protein Fraction Analysis of White Wine by FPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (4), 383-388.
- Cheyrier, V. (2006). Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. In Ø. M. Andersen & K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids in wine: Vol. ref. 294* (pp. 263–318). CRC Press LLC.
- Cosme, F., Ricardo-da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2009). Effect of Various Proteins on Different Molecular Weight Proanthocyanidin Fractions of Red Wine during Wine Fining. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60 (1), 74–81.
- Dambrouck, T., Marchal, R., Cilindre, Cp. M., & Jeandet, P. (2005). Determination of the Grape Invertase Content (Using PTA-ELISA) following Various Fining Treatments versus Changes in the Total Protein Content of Wine. Relationships with Wine Foamability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (22), 8782–8789.
- Escribano-Bailón, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., & García-Estévez, I. (2019). Wine Color Evolution and Stability. In Elsevier & Book Aid International (Eds.), *Red Wine Technology* (pp. 195–204). Charlotte Cockle.
- Esteruelas, M., P., Poinssaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M. F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2009). Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine. *Food Chemistry*, 113 (1), 28–35.
- Esteruelas, M., Poinssaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M. F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2009). Methods for Estimating Protein Stability-303. *American Journal of Enology & Viticulture*, 60, 302–311. <https://doi.org/10.5344/ajev.2009.60.3.302>
- Ferreira, R. B., Piç Arra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Virgí, {, Loureiro, B., & Teixeira, A. R. (2002). The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 230–239.

- Ferrer-Gallego, R., García-Marino, M., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2010). Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening. *Analytica Chimica Acta*, 660 (1–2), 22–28.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vin rouges. 2ème partie. Mesure, origin et interpretation. *Connaissance de La Vigne et Du Vin*, 18, 253–271.
- Gombau, J. (2020). *Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina* [Tesis doctoral]. <http://hdl.handle.net/20.500.11797/TDX3395>
- Gordillo, B., Chamizo-González, F., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2021). Impact of alternative protein fining agents on the phenolic composition and colour of Syrah red wines from warm climate. *Food Chemistry*, 342. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128297>
- Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2007). Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of tempranillo red wines. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 55, Issue 26). <https://doi.org/10.1021/jf0716782>
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 809–812.
- Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008). Orosensory-Directed Identification of Astringent Mouthfeel and Bitter-Tasting Compounds in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (4), 1376–1386.
- Just-Borràs, A., Pons-Mercadé, P., Gombau, J., Giménez, P., Vilomara, G., Conde, M., Cantos, A., Canals, J. M., & Zamora, F. (2022). Effects of using cationic exchange for reducing pH on the composition and quality of sparkling wine (Cava). *OENO One*, 56 (2), 179–192.
- Kennedy J. A, Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E. J., & Jones, G. P. (2001). Composition of Grape Skin Proanthocyanidins at Different Stages of Berry Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11), 5348–5355.
- Liu, Z., Xu, L., Wang, J., Duan, C., Sun, Y., Kong, Q., & He, F. (2023). Research progress of protein haze in white wines. In *Food Science and Human Wellness* (Vol. 12, Issue 5, pp. 1427–1438). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2023.02.004>

- Llaudy, M. C., Canals, R., Canals, J. M., Rozés, N., Arola, L., & Zamora, F. (2004). New Method for Evaluating Astringency in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 742–746.
- Marangon, M., Vincenzi, S., & Curioni, A. (2019). Wine fining with plant proteins. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24112186>
- Gil, M. (2013). *Influencia de la madurez de la uva y de ciertas prácticas vitivinícolas sobre el color, los compuestos fenólicos y los polisacáridos del vino tinto* [Tesis doctoral] <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=84659>
- Mercadé, P. P. (2021). *Yeasts autolysis on the manufacture of sparkling wines; Influence of aging time on the release of polysaccharides and proteins and the consumption of oxygen by the lees* [Tesis de doctorado]. <https://www.tesisenred.net/handle/10803/672221?locale-attribute=es#page=1>
- Mierczynska-Vasilev, A., & Smith, P. A. (2015). Current state of knowledge and challenges in wine clarification. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 615–626. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12198>
- Molina, R. (2000a). Clarificantes orgánicos. In V. A. Madrid & Mundi-Prensa (Eds.), *Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas* (1ª, pp. 177–207).
- Molina, R. (2000b). El vino como solución coloidal. In A. M. Vicente & Mundi-Prensa (Eds.), *Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas* (1ª, pp. 13–52).
- Montedoro, G., & Fantozzi, P. (1974). Dosage des tannins dans les moûts et les vins à l'aide de la methyl cellulose et evolution d'autres fractions phenoliques. *Lebensmittel-Wissenschaft Und -Technologie*, 7, 155–161.
- Moreno, J. J., & Peinado, R. (2010a). Coloides de interés enológico. In V. A. Madrid & Mundi-Prensa (Eds.), *Química enológica* (1ª, pp. 393–419).
- Moreno, J. J., & Peinado, R. (2010b). Compuestos nitrogenados. In V. A. Madrid & Mundi-Prensa (Eds.), *Química enológica* (1ª, pp. 223–235).
- Resolution OIV-OENO 495-2013, Pub. L. No. OIV-OENO 28/2004, Monograph on protein plant origin - Modification of the file (2013).
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C., de Freitas, V., & Silva, A. M. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International Journal*, 44, 1115–1126.
- Peña-Neira, A. (2019). Management of Astringency in Red Wines. In Elsevier & Book Aid International (Eds.), *Red Wine Technology* (pp. 257–272). Charlotte Cackle.

- Piccardo, D., Favre, G., Pascual, O., Canals, J. M., Zamora, F., & González-Neves, G. (2019). Evaluación de la composición y calidad del color de vinos tintos Tannat elaborados por maceración pre-fermentativa en caliente. *BIO Web Conferences*, 12(41st World Congress of Vine and Wine), 02006.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry (Oxford)*, 36 (3), 781–784.
- Ribéreau-Gayon, J. (1970). Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chim. Anal*, 52, 627–631.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (1999). Phenolic Compounds. In John Wiley & sons & L. Chichester (Eds.), *Handbook of enology. The chemistry of wine, Stabilization and treatments* (Vol. 2, pp. 129–186).
- Ribéreau-Gayon, P., & Stonestreet, E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bulletin de La Société Chimique de France*, 9, 2649–2652.
- Scollary, G. R., Pásti, G., Kállay, M., Blackman, J., & Clark, A. C. (2012). Astringency response of red wines: Potential role of molecular assembly. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 27, Issue 1, pp. 25–36). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.05.002>
- Segade, S. R., Paissoni, M. A., Vilanova, M., Gerbi, V., Rolle, L., & Giacosa, S. (2020). Phenolic composition influences the effectiveness of fining agents in vegan-friendly red wine production. *Molecules*, 25 (1). <https://doi.org/10.3390/molecules25010120>
- Souquet, J.-M., Cheynier, V., Brossaud, F., & Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry (Oxford)*. *Phytochemistry (Oxford)*, 43 (2), 509–512.
- Vernhet, A. (2018). Red Wine Clarification and Stabilization. In *Red Wine Technology* (pp. 237–251). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00016-5>
- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P. (2003). The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54 (4), 439–447.
- Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M. A., & Pellerin, P. (2001). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 45 (4), 315–323.
- Voilley, A., Lamer, C., Dubois, P., & Feuillat, M. (1990). Influence of macromolecules and treatments on the behavior of aroma compounds in a model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 248–251.

- Waters, E. J., Shirley, N. J., & Williams, P. J. (1996). Nuisance Proteins of Wine Are Grape Pathogenesis-Related Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (1), 3–5.
- Zamora, F. (2003). El color del vino tinto. In V. A. Madrid & Mundi-Prensa (Eds.), *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos* (1ª, pp. 13–46).
- Zamora, F. (2013). *Equilibrios de los antocianos en función del pH. La química del color del vino.* Acenología. https://www.acenologia.com/quimica_color_vino_cienc1213/. [Acceso 03/ 06/ 2024]).