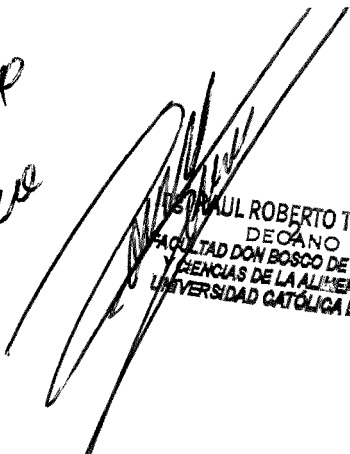


UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUYO
FACULTAD DON BOSCO DE ENOLOGÍA Y
CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

LICENCIATURA EN ENOLOGÍA E INDUSTRIA
FRUTIHORTÍCOLA

*Ejemplar para
Biblioteca*



ING. PAUL ROBERTO TORNELLO
DECANO
FACULTAD DON BOSCO DE ENOLOGÍA
Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUYO

ESTUDIO DE ESTABILIZACIÓN PROTEICA EN VINO BLANCO CHARDONNAY FERMENTADO CON TANINOS ENOLÓGICOS

María Azul Molinar

Director de tesis: Lic. Daniel Buono

Aspectos formales: Mgter. Elena Caliguli

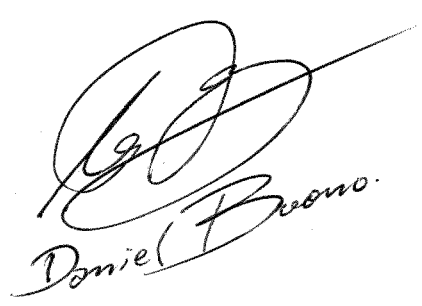
Lugar y fecha de defensa oral: 17/12/2021 Mendoza, Rodeo
del Medio

Defensa oral:

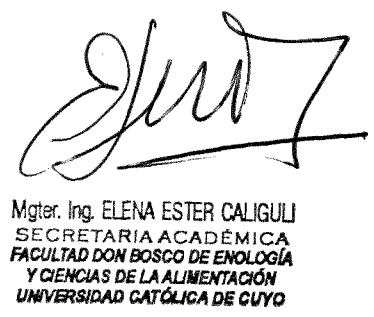
Libro: _____ Acta: _____ Folio: _____

Calificación: *Aprobado con mención.*

Tribunal examinador:



Daniel Buono.



Mgter. Ing. ELENA ESTER CALIGULI
SECRETARIA ACADÉMICA
FACULTAD DON BOSCO DE ENOLOGÍA
Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUYO



Ing. PAUL ROBERTO TORNELLO
DECANO
FACULTAD DON BOSCO DE ENOLOGÍA
Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUYO

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi papá y mamá por darme la posibilidad de estudiar una carrera universitaria y por ser maestros de vida, también a toda mi familia, a mi novio, a mis amigos, por el apoyo incondicional y por estar presentes en todo momento.

Gracias a la Facultad Don Bosco por brindarme los conocimientos y las herramientas para mi formación como profesional, a los Directivos y en especial a cada uno de los integrantes de la comunidad de Don Bosco, que además de enseñarme como ser una mejor profesional, me enseñaron como ser mejor persona. Gracias a mis amigos y compañeros de estudio por compartir horas de vida, esfuerzos y alegrías.

Quiero agradecer a mi profesor Daniel Buono por el acompañamiento y asesoramiento durante todo el proceso, también por ser un excelente profesor y una gran persona. Gracias a Norberto Richardi por la gran ayuda, predisposición y por su vocación por la educación y la enología.

Mis agradecimientos también son para todo el equipo de The Vines of Mendoza, para Pablo Martorell por darme la posibilidad de que esta investigación haya podido llevarse a cabo en la bodega, para Marcelo Paiva por su excelente predisposición y asesoramiento continuo, y para cada uno de los integrantes del equipo de trabajo quienes, a su modo, aportaron un grano de arena para que todo esto sea posible.

Introducción

Todos los vinos blancos son susceptibles de tener una quebradura proteica, esto es un enturbiamiento producido por la desnaturalización de las proteínas que contiene el vino principalmente a las variaciones de temperatura en los vinos terminados, en las etapas de almacenamiento o transporte de las botellas.

Uno de los métodos más utilizados para prevenir estos enturbiamientos es emplear bentonita. Debido a las elevadas concentraciones de prótidos que tienen los vinos de Mendoza en general, las dosis de bentonita requeridas son elevadas trayendo consigo varios efectos secundarios.

Por tal razón, los objetivos planteados en este estudio son:

- Buscar alternativas al empleo de bentonita para la estabilización proteica de los vinos Chardonnay
- Reducir las desventajas de su empleo, que son entre otras: la disminución de características organolépticas, sabor y aromas principalmente, y la pérdida de vino en volumen de borras que representa entre un 3 a un 10% del volumen de vino total.
- También sabiendo que la bentonita no es reciclable, se busca disminuir este importante residuo.

La hipótesis planteada en este trabajo afirma que, es posible la estabilización proteica de vinos Chardonnay empleando taninos enológicos para evitar el uso de bentonita.

En este trabajo se realizó el estudio sobre la vinificación de uva Chardonnay, ya que, como se expone en el libro "Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos" (Flanzy, 2000) es un excelente ejemplar por ser uno de los varietales con mayor contenido en prótidos en su composición¹, obteniendo concentraciones de 85,1 mg/L en mostos y entre 89 y 108 mg/L en vinos

La bentonita se utiliza en la enología para eliminar los prótidos termo sensibles, pero con su empleo se elimina también un porcentaje importante de la fracción aromática en los vinos terminados. Esto es un problema para los enólogos porque con este tratamiento se pierden compuestos encargados de la calidad e intensidad aromática. Según Flanzy (2000) si se miden las interacciones entre las bentonitas y los compuestos aromáticos (como la γ -decalactona y la β -ionona) se observa que la capacidad de fijación de aromas es variable según las bentonitas, pero no despreciable ya que puede llegar al 25%.

Con el objeto de evitar esta disminución aromática, en este trabajo se buscan alternativas para disminuir las dosis requeridas de bentonita y así sus efectos negativos. Se utilizaron para esto, dosis crecientes de taninos Procianidínicos en fermentación, en tanques de distintos materiales: envases de plástico y barricas de roble francés de primer uso de tostado medio. Para corroborar la estabilidad proteica se hicieron test de calor a los distintos ensayos.

Se observó que en los envases de plástico las dosis necesarias de taninos, para disminuir las cantidades requeridas de bentonita, eran muy elevadas y desequilibraban al vino organolépticamente. Pero en las barricas se observó que con dosis moderadas de

¹ En la Tabla 1 (pág. 9), "Contenido en proteínas de los mostos y vinos de diferentes variedades expresado en mg/L (Flanzy, 2000)", se puede ver la concentración de proteínas en Chardonnay y otros varietales.

taninos se logra disminuir considerablemente las dosis de bentonita necesarias para llegar a la estabilidad proteica.

Este marco teórico está formado por cuatro temas principales que son la base en la que se desarrolla esta investigación, ellos son:

- 1- Proteínas: componentes a estabilizar o disminuir para evitar o prevenir la quebradura proteica.
- 2- Quebradura proteica: alteración en el vino dada por la desnaturalización de proteínas termo sensibles que produce un enturbiamiento y precipitado blanco algodonoso en forma de nube.
- 3- Taninos: conjunto de compuestos fenólicos que poseen propiedades comunes, entre otras, la propiedad de coagular proteínas.
- 4- Bentonita: clarificante mineral empleado en mostos o vinos para lograr la estabilidad proteica. Debido a las desventajas del empleo de la bentonita es que en este estudio se busca reducir o eliminar el uso de este insumo.

A modo de referencia, este marco teórico se basa principalmente en los escritos de Hidalgo Togores (2003) "Tratado de Enología", Francisco Oreglia (1979) "Enología Teórico-Práctica", Flanzky (2000) "Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos" y la tesis maestra de la Ingeniera Carolina Pereira (2014) "Estabilización proteica en vinos blancos: estudio y comparación de distintas alternativas para Sauvignon Blanc".

Capítulo I Proteínas

Las proteínas son sustancias nitrogenadas de constitución compleja, estas macromoléculas están formadas por polímeros lineales de aminoácidos ligados por enlaces peptídicos.

Figura 1

Estructura aminoácido

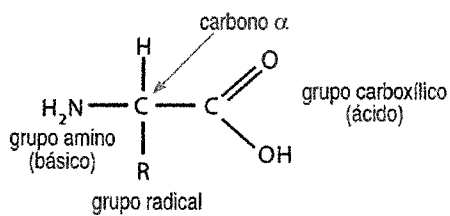
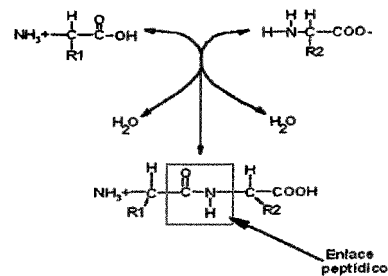


Figura 2

Estructura enlace peptídico



Las proteínas en solución acuosa se comportan como un coloide hidrófilo con carga eléctrica negativa, transformándose en positivo cuando se añade al vino, con un pH menos a 4,7 donde se encuentra su Punto Isoeléctrico (PI).

Los prótidos son sintetizados a partir de sustancias nitrogenadas del suelo, savia bruta, y de compuestos elaborados a partir de la fotosíntesis, savia elaborada. Se transportan en formas simples a través de la planta (catión amonio, aminoácidos y polipéptidos). (Hidalgo Togores, 2003)

El tenor de prótidos y la fracción nitrogenada en el mosto y vino dependen de numerosos factores, entre otros:

- La cepa y clima del año
- Sanidad de la uva, mayor concentración en uvas enfermas
- La riqueza en nitrógeno del suelo y abonados con nitrógeno

- Grado de madurez de la uva: la concentración de proteínas extraíbles de la uva aumenta continuamente durante la maduración, por lo que se presume que el potencial enturbiamiento proteico es mayor a medida que la madurez de la uva es mayor (Murphey et al. 1989, Tattersall et al. 1997, Pocock et al. 2000 en Pereira, 2014).

Sin embargo, se destaca que a orden práctico los vinos de cosechas tempranas son más inestables a la quebradura proteica que los vinos de cosecha tardía. La razón de este fenómeno se puede deber a que en la uva menos madura hay mayor concentración de proteínas inestables al calor (independientemente de la cantidad total de proteínas). Por ejemplo, las proteínas de defensa o también llamadas proteínas PRs son las que participan en mayor proporción en los enturbiamientos proteicos (explicadas detalladamente más adelante) y según Flanzy (2000) la concentración de estas proteínas en las bayas depende del estado de desarrollo del fruto, disminuyendo a partir del envero. Por otro lado, los vinos procedentes de uvas de cosechas tempranas poseen una menor concentración de sustancias que pueden coagular estas proteínas inestables como taninos, alcohol, etc.

- Despalillado, si no se efectúa, los taninos del escobajo ayudan a eliminar proteínas.
- Operaciones para extracción del mosto y maceraciones; según Hidalgo Togores el 70 – 80% de sustancias proteicas se encuentra en el hollejo y semillas, el resto en la pulpa. Por lo tanto, mientras más intensa sea la extracción, mayor contenido en prótidos tendrá el mosto. En Flanzy se ve especificado que la piel ocupa entre un 7 – 9% de la baya y de ese porcentaje, entre 1,5 – 2% son compuestos nitrogenados; en cuanto a la

pepita que ocupa entre 0 – 6% de la baya con un promedio en 4,4%, entre 4 - 6,5% son compuestos nitrogenados (estos últimos se encuentran en el interior de la semilla, por lo que, si esta no se rompe, los compuestos nitrogenados en su composición no pasarán al medio).

- Dosis excesivas de SO₂ aumentan las extracciones y los contenidos en prótidos. (Hidalgo Togoeres, 2003)

Tabla 1

Contenido en proteínas de los mostos y vinos de diferentes variedades expresado en mg/L. (Flanzy, 2000)

Variedad	Mosto	Vino	Autor
Chardonnay	85,1	108	Leleu (1993)
		89,0 – 105,0	Leleu (1993) Bayly & Berg (1967)
Sauvignon Blanc	8,7	27,0	Anelli (1977)
	80,0	72,0	Hsu y Heatherbekk (1987b)
		79,0	Bayly & Berg (1967) Leleu (1993)
Semillón	10,6		Anelli (1977)
	55,0	30,0	Bayly & Berg (1967)
Riesling	1,5		Yokotsuka <i>et al.</i> (1977)
	8,6		Anelli (1977)
	40		Yokotsuka <i>et al.</i> (1977)
	39,2-40,2	30,1-30,5	Hsu <i>et al.</i> (1987)
	41,7-49,0	27,6-33,8	Hsu <i>et al.</i> (1987)
	68,0-110,0	39,0-80,0	Murphey <i>et al.</i> (1989)
		30,0	Flores <i>et al.</i> (1990)
		28,0-36,1	Hsu y Heatherbekk (1987b)
		52,0-60,0	Flores <i>et al.</i> (1990)
	54,5-55,0	Hsu <i>et al.</i> (1987)	
	60,8-61,5	Hsu <i>et al.</i> (1987)	
Pinot Blanc		95,0	Bayly & Berg (1967)
Sylvaner	90,0	70,0	Bayly & Berg (1967)
Colombard	90,0		Bayly & Berg (1967)
Higgins	32,7		Lamikanra (1987)
Carlos	79,5	14,2	Lamikanra <i>et al.</i> (1988)
Canelli	80,0	72,0	Bayly & Berg (1967)
Welder	133,4	30,3	Lamikanra <i>et al.</i> (1988)
D'Alexandrie		113,0	Waters <i>et al.</i> (1992)
	260	233,0	Bayly & Berg (1967)
		269,0	Sommers y Ziemelis (1973)

Aunque las proteínas sean el componente minoritario de las fracciones nitrogenadas de mostos y vinos, cumplen un papel fundamental en diferentes operaciones llevadas a cabo por las bodegas (filtración, clarificación y estabilización) y en diferentes aspectos relacionados a la estabilidad del vino.

En el transcurso de la fermentación cierta cantidad de prótidos es descompuesta por acción de las enzimas proteolíticas, presentes en mayor cantidad en las vendimias estrujadas, que tornan estos prótidos en aminoácidos y péptidos asimilables por las levaduras. Gracias a esto y a otros factores como, la presencia de alcohol y taninos (disminuyen la concentración por precipitación), la concentración de prótidos y compuestos nitrogenados en mostos es mucho mayor a la presente en los vinos. (Oreglia, 1979)

Las levaduras liberan durante la fermentación alcohólica o la crianza, péptidos o aminoácidos estables, mientras que las proteínas inestables procedentes del mosto no son asimiladas por las levaduras por lo tanto pasan al vino pudiendo producir su insolubilización dando origen a la quebradura proteica (Hidalgo Togores, 2003).

Capítulo II Quebradura proteica

Esta quebradura se da principalmente en vinos blancos, frecuentemente en rosados ya que en la mayoría de los casos los taninos de los vinos tintos eliminan los próticos.

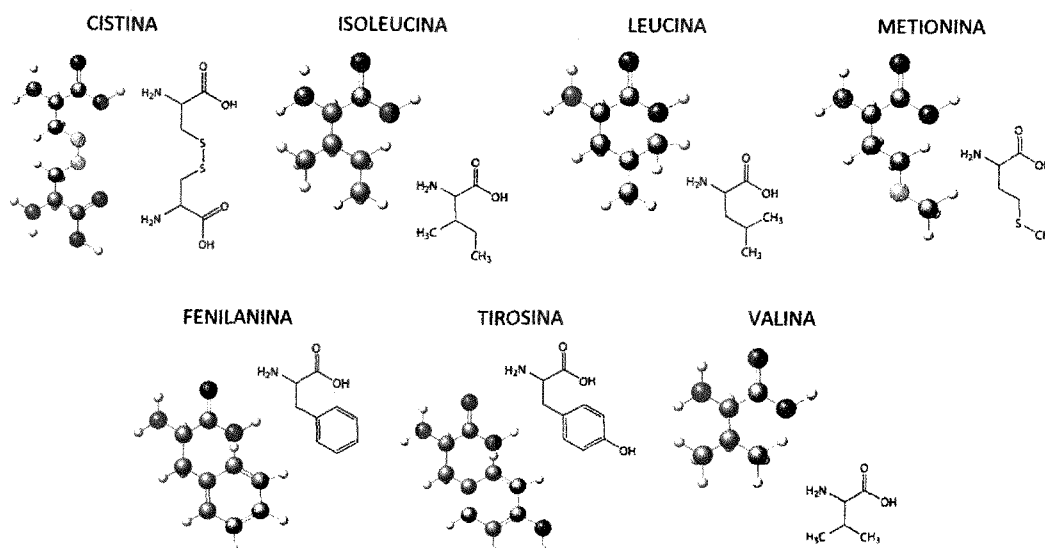
Los próticos inestables que tienen masa molecular entre 12 y 35 kDa, son procedentes de la uva y de acuerdo a la variedad puede diferir el tipo de proteína, al igual que su Punto Isoeléctrico (PI) y están en el vino en estado disperso y disuelto. En cuanto al Punto Isoeléctrico, existe un efecto de interacción entre el PI y el pH del vino en la formación de enturbiamientos. (Pereira, 2014). Por ejemplo, la precipitación de proteínas por taninos es dependiente del pH, existiendo un pH óptimo, que coincide aproximadamente con el punto isoeléctrico de dicha proteína. (Fernandez, 1995). Los próticos termosensibles tienen PI comprendidos entre 4,1 y 5,8 (Flanzy, 2003).

Los grupos proteicos termolábiles, según Molina Úbeda, están formados por los siguientes aminoácidos termolábiles: tirosina, valina, metionina, cistina, fenilalanina, leucina, isoleucina.

A modo de referencia y para mayor información, en la tabla a continuación se puede ver la concentración de aminoácidos termolábiles presentes en mostos, vinos tintos y vinos blancos. Los mismos son extraídos de Flanzy (2000) presentes en una tabla de compuestos nitrogenados en general encontrados en mostos, vinos tintos y vinos blancos.

Tabla 2*Aminoácidos Termolábiles (en gramos por litro) (Flanzy, 2000)*

AA ²	Mostos			Vinos tintos			Vinos blancos		
	Mínimo	Máximo	Media	Mínimo	Máximo	Media	Mínimo	Máximo	Media
Cys	ND	2.10 ⁻³	ND	1.10 ⁻³	30.10 ⁻³	6.10 ⁻³	2.10 ⁻³	25.10 ⁻³	4.10 ⁻³
Ile	2.10 ⁻³	10.10 ⁻³	3.10 ⁻³	2.10 ⁻³	36.10 ⁻³	6.10 ⁻³	4.10 ⁻³	30.10 ⁻³	22.10 ⁻³
Leu	3.10 ⁻³	58.10 ⁻³	18.10 ⁻³	6.10 ⁻³	13.10 ⁻³	8.10 ⁻³	7.10 ⁻³	15.10 ⁻³	5.10 ⁻³
Met	ND	15.10 ⁻³	-	1.10 ⁻³	10.10 ⁻³	3.10 ⁻³	ND	8.10 ⁻³	4.10 ⁻³
Phe	4.10 ⁻³	62.10 ⁻³	15.10 ⁻³	5.10 ⁻³	34.10 ⁻³	10.10 ⁻³	4.10 ⁻³	22.10 ⁻³	6.10 ⁻³
Tyr	2.10 ⁻³	75.10 ⁻³	15.10 ⁻³	2.10 ⁻³	58.10 ⁻³	6.10 ⁻³	2.10 ⁻³	17.10 ⁻³	9.10 ⁻³
Val	ND	0,11	0,11	1.10 ⁻³	45.10 ⁻³	5.10 ⁻³	ND	36.10 ⁻³	7.10 ⁻³

Figura 3*Estructura molecular aminoácidos termolábiles*

Según Ferreira (2002), la cantidad de proteínas presentes en vinos que no han sido estabilizados fluctúa entre los 15 y 230 mg/L y puede llegar hasta unos 300 mg/L. El contenido de proteínas está significativamente influenciado por la variedad. Dicho esto, cabe destacar que Flanzy (2000) menciona que la cantidad de proteínas del vino no se

² Nomenclatura de tres letras de aminoácidos (AA): cisteína: Cys, isoleucina: Ile, leucina: Leu, metionina: Met, fenilalanina: Phe, tirosina: Tyr, valina: Val (Wikipedia, Nomenclatura de aminoácidos, 2021)

correlaciona con su susceptibilidad a presentar una quebradura proteica pero su conocimiento puede ser orientativo al momento de establecer la naturaleza de las proteínas y posterior estabilización.

Carolina Pereira en su tesis maestra "Estabilización proteica en vinos blancos: estudio y comparación de distintas alternativas para Sauvignon Blanc" (2014) explica muy bien los prótidos causantes del enturbiamiento:

Se ha demostrado que los enturbiamientos proteicos no se correlacionan con la cantidad total de proteínas presentes (Bayly & Berg, 1967; Hsu & Heatherbell, 1987a), pero depende de la presencia de proteínas específicas, identificadas principalmente como proteínas relacionadas a patógenos (PR), por ejemplo, proteínas tipo thaumatin y quitinasas (Waters, Peng, Pocock & Williams, 1995a; Waters, Haysaka, Tattersall, Adams, & Williams 1998), que están presentes en el vino en alta proporción. Además, junto a estas proteínas, que parecerían ser un pre requisito para la formación de enturbiamiento y precipitado, hay un compuesto o factor desconocido del vino que también debe estar presente (Pocock et al. 2007, Batista et al. 2009).

Además, se encontró que proteínas con 24, 28 y 32 kDa son las que participan en mayor proporción en los enturbiamientos proteicos y consecuentemente se demostró por los mismos autores que son proteínas PR (Waters et al. 1996). Las fracciones de peso molecular de 24 kDa son tipo thaumatin, las de 28 kDa son quitinasas y las de 32 kDa son péptidos. Recientemente se demostró que estos péptidos de 32 kDa serían la β -1,3 glucanasa, también proteína PR (Esteruelas et al. 2009). (Pereira, 2014, pp 13-14)

Más adelante la Ingeniera explica, con el respaldo teórico de otros autores, que las proteínas de la uva relacionadas a patógenos o también llamadas proteínas de defensa (PR), quitinasas de 32 kDa y las proteínas tipo thaumatin de 24 kDa (que poseen el doble de influencia en la aparición de enturbiamiento en comparación con las quitinasas), son las proteínas más solubles del vino y ha sido demostrado que son las que participan de los enturbiamientos.

- Las taumatinas son proteínas conformadas por 207 aminoácidos. En su estructura molecular presenta una gran cantidad de puentes disulfuro. (Alonso, 2010)

Figura 4

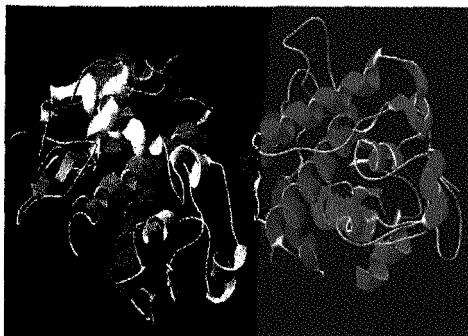
Estructura molecular tridimensional Taumatina (Alonso, 2010)



- Las quitinasas son glicosil hidrolasas que catalizan la ruptura hidrolítica de los enlaces 1,4- β -glucosídicos siendo su principal sustrato la quitina. Pueden sistematizarse en siete clases propias de acuerdo a su composición de aminoácidos y diferencias estructurales. Por ejemplo, las quitinasas de clase I son enzimas que presentan una masa molecular que oscila entre 32 y 34 kDa, con aproximadamente 40 aminoácidos (rico en cisteínas), las de clase IV tienen alrededor de 22 aminoácidos siendo significativamente más pequeñas (Goñi Ramos, 2011)

Figura 5

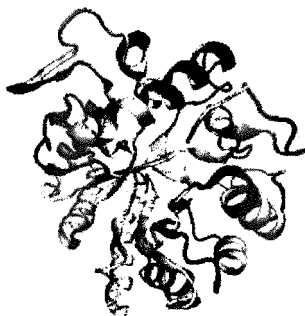
Estructura molecular tridimensional quitinasa (Wikipedia, 2021)



- Las 1,3- β -glucanasas (glucano 1,3- β -glucosidasas) son glicosil hidrolasas que catalizan la ruptura hidrolítica de los enlaces 1,3- β -glucosídicos presentes en β -1,3-glucanos. Existen como un conjunto de múltiples isoenzimas estructurales que varían en tamaño, punto isoeléctrico, estructura primaria (Gofí Ramos, 2011)

Figura 6

Estructura molecular β -1,3 glucanasa (Deyanira, 2006)



Según Flanzky, la síntesis de estas proteínas PR ocurre principalmente en el hollejo y es regulada de forma específica en función al estado de desarrollo de la baya, disminuyendo su concentración a partir del envero por lo que estas proteínas están presentes en mayor cantidad en uva verde que en uva madura (debido a esto, la uva verde es menos atacada por enfermedades criptogámicas por tener mayor presencia de

PR). Por lo tanto, los vinos obtenidos de estas uvas son más sensibles a las quebraduras proteicas a su vez por dos razones a saber:

- a. estas proteínas son muy solubles
- b. estas proteínas son muy sensibles al calor y se inestabilizan fácilmente.

Las proteínas de peso molecular mayor (63 kDa), con polisacáridos, son estables al calor.

2.1- Factores que producen la insolubilización de prótidos.

Las proteínas son compuestos de alta complejidad en cuanto a su estructura y reactividad, por lo que pueden dar lugar a la inestabilidad a causa de:

- la constitución de la molécula
- o la constitución del medio.

A menudo se trata de fenómenos coloidales difíciles de prever en virtud de la complejidad y variabilidad de las interacciones y de la combinación de factores de inestabilidad³. Los principales factores de estabilidad son: solvatación y carga eléctrica. De esto se desprende que la pérdida de alguno de estos son las causas principales de inestabilidad (Celotti, 2005).

Algunos de los factores que producen la inestabilidad en los prótidos son:

Temperatura. (factor de gran importancia para el estudio de esta investigación).

- *Calor*, desolvata la fracción termolábil de los prótidos, desnaturalizándolos de liófilos a liófobos con carga positiva que son coagulados por coloides de signo

³ En el vino se encuentran contemporáneamente una solución verdadera y una solución coloidal. La estabilidad coloidal depende de varios factores; podemos mencionar los movimientos brownianos, las interacciones de Van der Waals, la hidrofobicidad, la solvatación, la carga eléctrica superficial, los enlaces hidrógeno, el efecto de enmascaramiento coloidal (acción de coloides protectores), la depleción (pérdida de agua) coloidal y el efecto concentración. Estos fenómenos son difíciles de prever, además, considerando las diferentes condiciones de conservación del vino, será difícil prever de forma "exacta" si el vino sufrirá una precipitación coloidal, causado por ejemplo por las proteínas (Celotti, 2005).

opuesto, o se unen a taninos que estos le transfieren su carga y son coagulados por coloides de carga positiva o por próticos desolvatados y no coagulados.

- *Frío*, cumple una doble función, por un lado, aumenta la eficacia de las sustancias tánicas y por otro, estimula los procesos de aglomeración de los coágulos proteicos.

Sustancias tánicas. producen la coagulación de próticos y el enturbiamiento del vino. Explicado en profundidad más adelante

Ácidos minerales. La adición de un gramo por litro de ácido sulfúrico coagula parcialmente los próticos (*cabe destacar que la práctica de agregado de estos ácidos es irracional porque implica un gran riesgo para la salud por su contenido en metales pesados cancerígenos*).

Ácido meta tartárico. (de elevado índice de esterificación) enturbian vinos ricos en próticos (enturbiamiento lechoso).

Lisozima. Los autores mencionados en la cita a continuación estudiaron el efecto químico y sensorial de la adición de lisozima a vinos tintos y blancos después de seis meses de conservación comprobaron que la adición de la enzima al vino no provoca pardeamiento durante los seis meses de conservación, pero induce una inestabilidad al calor en vinos blancos. (Eveline J. Bartowsky, 2005)

CMC. Debido a que presenta carga negativa, la interacción con las proteínas es inevitable. Es importante que se agregue este producto cuando el vino ya está estable a próticos ya que, si hay proteínas en el medio, la interacción entre estos puede inestabilizarlas (Filipe Ribeiro, 2020)

Alcohol. coagulan próticos, producen una desolvatación. M. Úbeda menciona que el alcohol produce una disminución de la reactividad de los taninos con las proteínas, así como también una disminución de la solubilidad de los coloides formados.

Procesos de óxido reducción. Los prótidos resultan implicados con frecuencia en estos procesos, que culminan en las quebraduras férricas y cuprosas.

El aspecto del precipitado de la quebradura proteica tiene aspectos diversos, algunas veces algodonosos y livianos, otras densos y pesados o ambas al mismo tiempo. (Oreglia, 1979)

La estabilización de los vinos con respecto a prótidos se puede realizar por:

Adsorción: con bentonita principalmente, elimina los prótidos naturales y los presentes por sobreencolado gracias a la acción por diferencias de cargas; y otros como anhídrido silícico (acción parcial), ferrocianuro de potasio (acción de sus cargas) (no utilizado en vinos con este fin, sino para tratamiento de metales pesados), filtraciones sobre harina fósil y empleo de carbón.

Eliminación por precipitado: a través del calentamiento, aunque tiene efectos negativos en características organolépticas (75 °C 15 minutos elimina la totalidad de los prótidos termolábiles, por desolvatación, siempre que haya como mínimo 100 mg de taninos por litro), enfriamiento prolongado o agregado de taninos.⁴

Tratamientos con enzimas proteolíticas o proteasas o por agregado de coloides protectores, aunque, según explica Oreglia (1997) sus resultados no son muy convincentes, comenta que hay dificultades de orden práctico y que deben considerarse con reserva.

⁴ Los mecanismos para la eliminación de prótidos ya mencionados: adsorción y eliminación por precipitado con taninos son puntos de gran importancia para esta investigación y se desarrollan con mayor profundidad más adelante.

Capítulo III Taninos

El nombre tanino se aplica a un conjunto de compuestos fenólicos que poseen propiedades comunes como sabor astringente, propiedad de coagular proteínas, ralentización o inhibición de las acciones enzimáticas por desnaturalización de la fracción proteica y, entre otras, colorear de azul las sales de hierro. Se encuentran en varias especies vegetales, estando la uva y especialmente sus pepitas dentro de ellas, también se puede obtener de la madera como el roble o el castaño, o de sus frutos en la *Cesalpineea gigyna* o *spinosa*, o de las agallas que son protuberancias patológicas por la picadura de insectos de diversos arbustos de la familia de las terebintáceas⁵ y de otras especies. (Hidalgo Togores, 2003)

Figura 7

Agallas en tejidos vegetales (Viña, 2013)



⁵ Pertenece a una familia de plantas leñosas con fruto en drupa, como el mango y el zumaque.

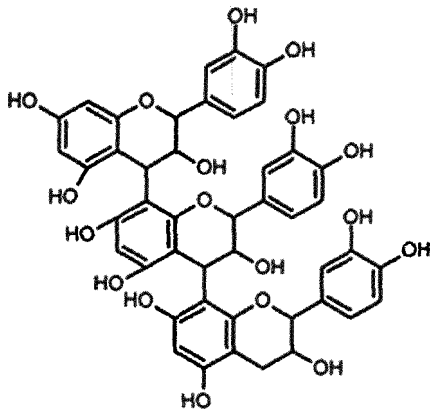
Los taninos se clasifican en dos grupos:

3.1- Taninos condensados o procianidínicos.

Son polímeros de unidades flavonoideas unidas por enlace C-C (Carbono-Carbono). Cuando se calienta en medio ácido, se rompe el enlace dando monómeros de antocianidina o cianidina (color rojo), por este motivo se llaman "pro-cianidínicos o pro-antocianidinas".

Figura 8

Taninos condensados o procianidínicos (Molina Úbeda, 2000).



Son extraídos principalmente de la uva (el grado de polimerización está relacionado con el grado de madurez) (Molina Úbeda, 2000), también se pueden encontrar en el quebracho. Son moléculas activas frente a proteínas gracias a sus pesos moleculares.

Los taninos de la uva son de pesos moleculares bajos, los taninos de las semillas están aproximadamente entre los 900 a 1100 Dalton y los del hollejo entre de 2300 a 2500.

Los taninos de quebracho poseen pesos moleculares mayores a 3000 Da. Para un mejor aprovechamiento se los somete a tratamientos específicos que generan la hidrólisis de los mismos y así disminuyen el peso molecular (Richardi, Entrevista Estudio Estabilización Proteica en Vino Chardonnay con taninos Enológicos, 2019).

3.2- Taninos hidrolizables.

Se clasifican a su vez en Galotaninos que liberan por hidrólisis ácida únicamente ácido gálico y en Elagitaninos (los más abundantes) que por hidrólisis ácida dan además de ácido gálico dan ácido elágico (Molina Úbeda, 2000). Sometidos al calor no forman cianidina y son moléculas muy voluminosas.

3.2.1- Los Galotaninos.

Según Hidalgo Togores, extraídos de agallas y de frutos, son moléculas oxidables, acomplejantes, poco activas frente a proteínas y de sabor amargo. Se utilizan para eliminar olores a reducido en vinos blancos y también son muy útiles para las uvas podridas por su capacidad de coagular la lacasa.

Figura 9

Ácido Gálico (M. Úbeda, 2000)

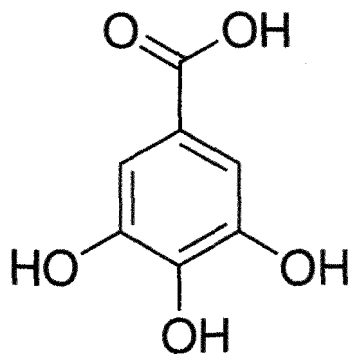
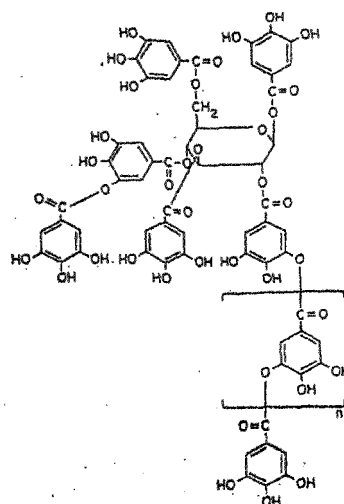


Figura 10

Galotanino (M. Úbeda, 2000)



3.2.2- Los Elagitaninos.

Extraídos de la madera de roble o castaño, son también moléculas oxidables, fuertemente acomplejantes, poco activas frente a prótidos, aromáticos y astringentes. Son utilizados para eliminar olores a reducción y para reducir el exceso de cobre o hierro. (Hidalgo Togoeres, 2003)

Figura 11

Ácido elágico (M. Úbeda, 2000)

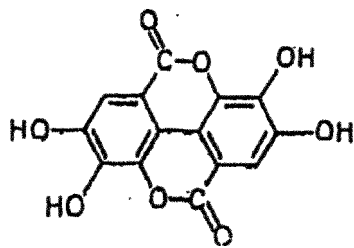
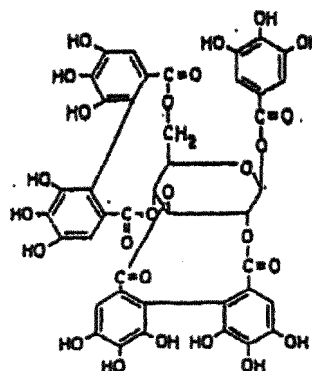


Figura 12

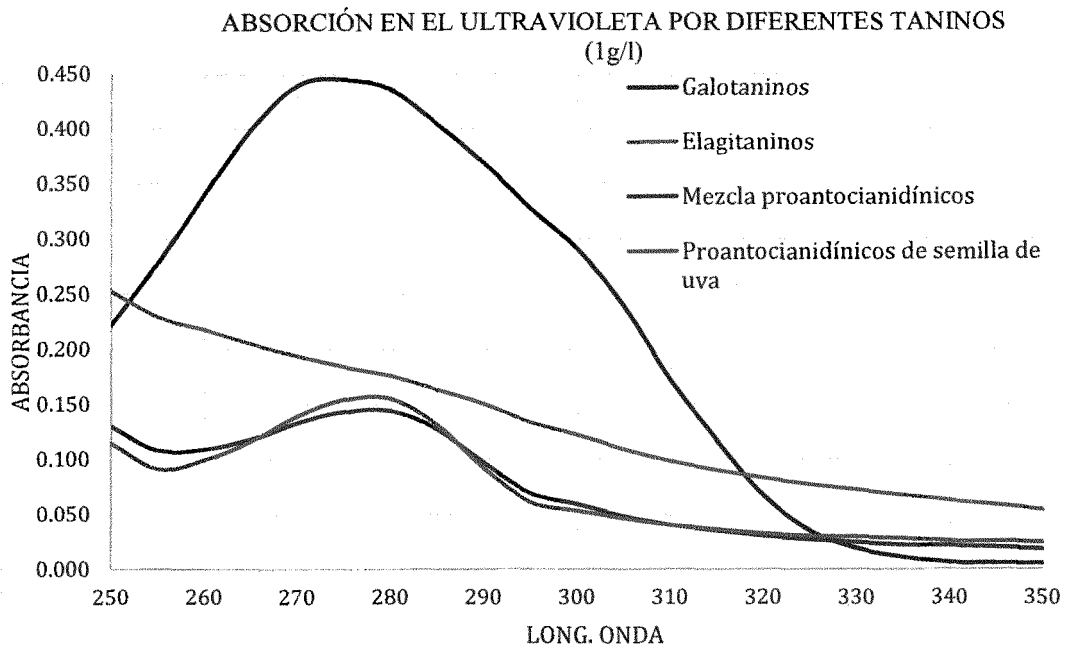
Elagitanino (M. Úbeda, 2000)



El Licenciado Norberto Richardi en su laboratorio desarrolló una técnica para diferenciar los distintos tipos de taninos. Esta consiste en someterlos a una absorbancia en la zona de luz UV, haciendo un barrido entre 250 a 350 nanómetros (nm) de longitud onda. Se toma este intervalo de longitud de onda ya que al analizar cada tanino bajo las mismas condiciones y entre estos valores de longitud de onda, se pueden distinguir e identificar de qué tipo de tanino se trata según el comportamiento que exprese la curva en la gráfica.

Figura 13

Diferenciación de taninos por curvas de absorción en luz UV. (Richardí, Entrevista Estudio Estabilización Proteica en Vino Chardonnay con taninos Enológicos, 2019).



La curva que expresa cada tipo de tanino es distinta. Como se puede observar, la curva de los galotaninos tiene un pico en 270 nm y luego desciende sostenidamente. En el caso de los elagitaninos a medida que aumenta la longitud de onda, entre los 250 a 350 nm, la absorbancia disminuye. Para los taninos proantocianidínicos o prociandínicos tienen una depresión en 250 nm, un pico en los 280 nm y una nueva depresión en los 290 nm, continuando con un posterior descenso a medida que aumenta la longitud de onda.

3.3- Reacción con proteínas.

Desde la antigüedad es bien conocido el efecto de los taninos sobre las proteínas para curtir las pieles de los animales y convertirlas en cuero. La capacidad de los taninos de coagular con las proteínas da origen a la astringencia. (Richardi, Exposición sobre Taninos Enológicos, 2019). El “sabor astringente” es una sensación de sequedad que se produce en la boca debido a la reacción de los taninos con las proteínas de la saliva que son las encargadas de mantener lubricada la cavidad bucal. Cuando estas son desnaturalizadas la capacidad lubricante se pierde y aparece la sensación de aspereza o sequedad.⁶

La interacción entre taninos y proteínas depende en primer término de la naturaleza química de ambos componentes, resultando ser determinantes no sólo las estructuras químicas primarias (presencia de grupos reactivos) sino también otras características moleculares, como el tamaño y estructura secundaria o tridimensional, las cuales pueden resultar en factores decisivos para la formación de los complejos con la proteína. (Fernandez, 1995)

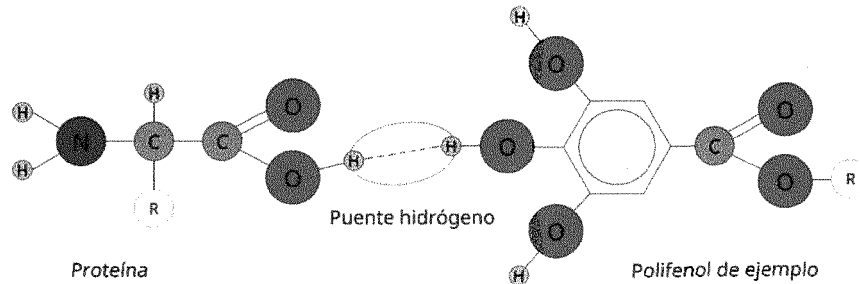
A continuación, se enumeran las posibles vías de interacción y razones de coagulación entre tanino-proteína:

- 1- Los aminoácidos, son capaces de reaccionar con los polifenoles mediante enlaces de punto de hidrógeno entre los grupos carbonílicos peptídicos de la proteína y el hidrógeno del oxhidrilo de los polifenoles (Urbina, 2013), sin la intervención de enlaces iónicos o covalentes (Fernández, 1995).

⁶ La saliva, es rica en prolina. Este aminoácido tiene gran afinidad con los taninos porque tiene un nitrógeno amino secundario lo que genera que el oxígeno adyacente sea un buen aceptor del enlace hidrógeno. (Fernandez, 1995). Por este motivo, las proteínas ricas en prolina (como por ejemplo colágeno y prolaminas) tendrán una gran afinidad por los taninos.

Figura 14

Puente hidrógeno entre proteínas y polifenoles



2- Esta interacción debida a enlaces de hidrógeno viene reforzada por las interacciones hidrofóbicas⁷ entre regiones no polares de ciertos aminoácidos de las proteínas, como la fenilalanina, y las regiones no polares aromáticas del tanino. (Fernandez, 1995)

3- Atracción electrostática o puentes salinos, ya que las proteínas presentan carga positiva en solución vínica y los taninos carga negativa.

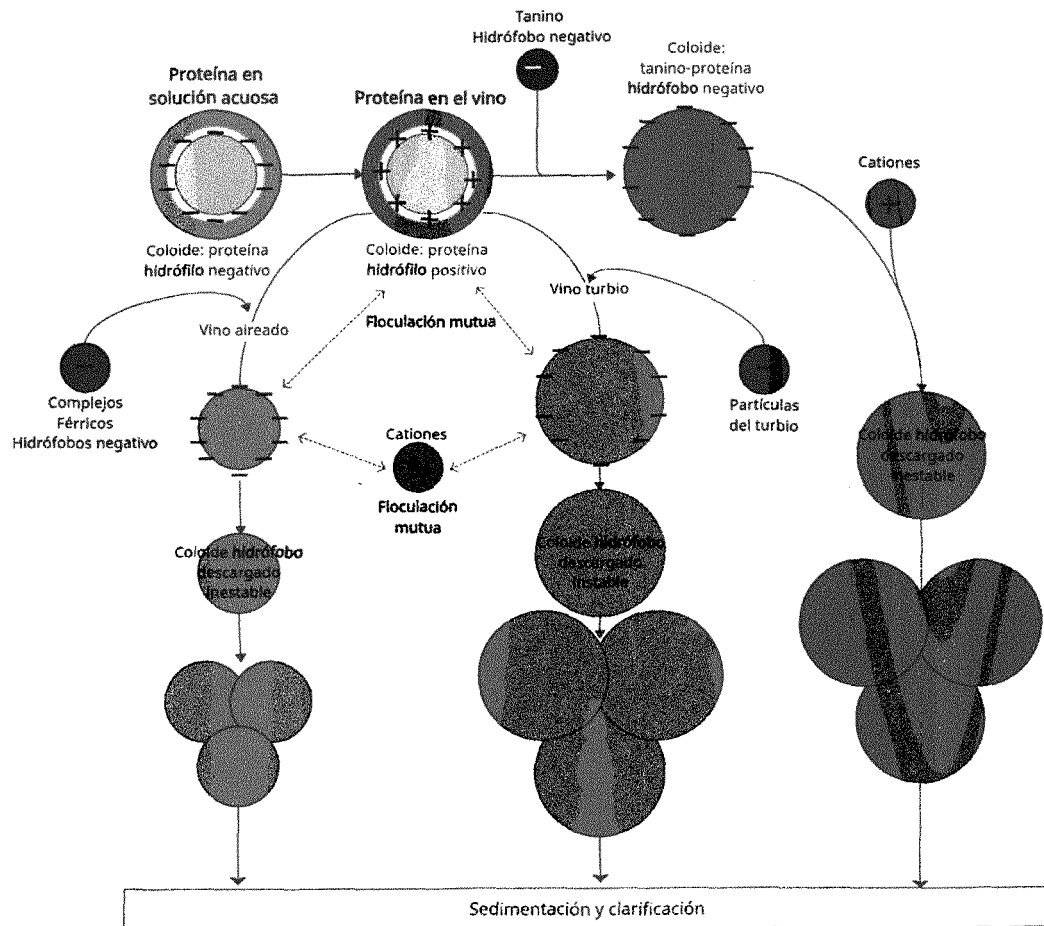
Como ya se mencionó anteriormente, los principales factores de estabilidad son: solvatación y carga eléctrica. De esto se desprende que la pérdida de alguno de estos son las causas principales de inestabilidad

El mecanismo de coagulación y floculación de las proteínas está dividido en dos etapas: la floculación como la consecuencia entre los taninos y las proteínas y la clarificación proceso que separa del vino, por acción del colage, las partículas en suspensión (Molina Úbeda, 2000).

⁷ Las interacciones hidrofóbicas se dan entre las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos, estos aminoácidos suelen disponerse en el interior de la proteína, evitando de esta manera las interacciones con el agua. Este tipo de fuerzas hidrofóbicas intervienen en el correcto plegamiento de la proteína. (Wikipedia, Estructura de las proteínas, 2021).

Figura 15

Esquema del mecanismo de floculación de las proteínas del vino



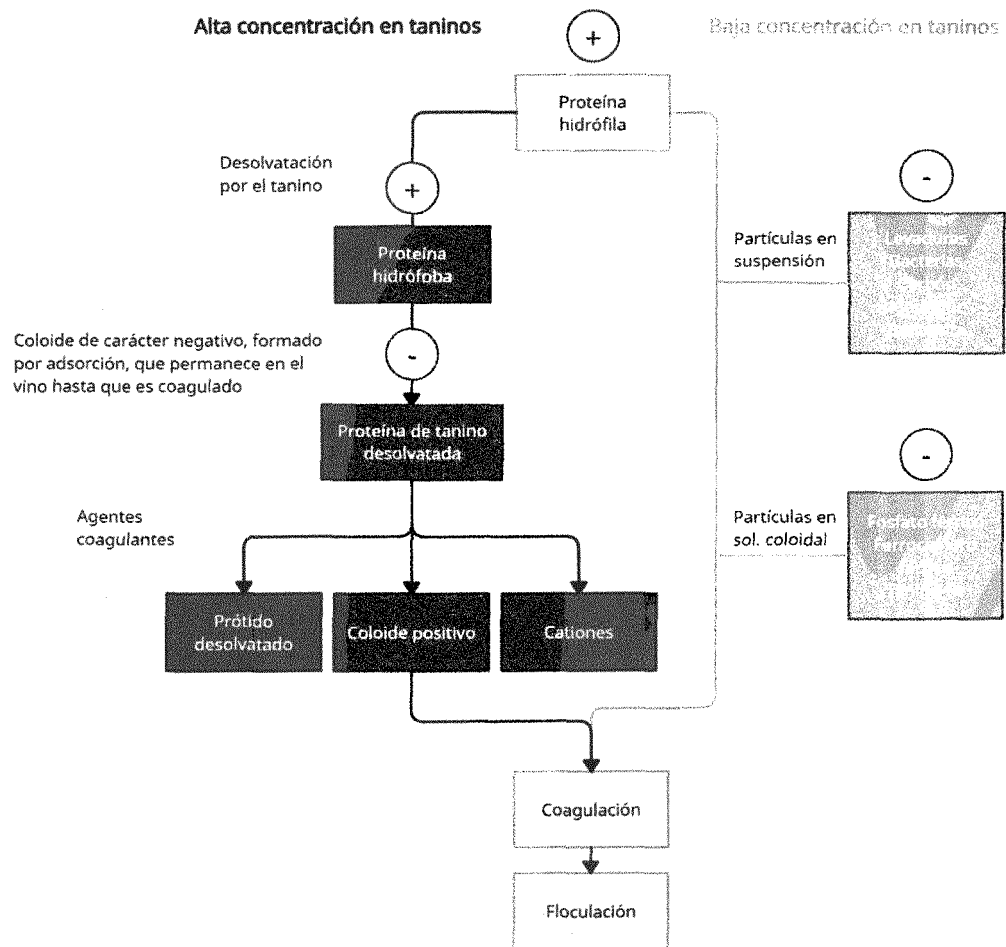
A efectos prácticos Molina Úbeda explica que toda proteína presente a un vino puede seguir los dos caminos expuestos en la gráfica a continuación, dependiendo de la concentración de taninos activos del medio.

Para una alta concentración de taninos, es lógico pensar que la interacción proteína-tanino es casi instantánea. Ya que, al agregar proteínas a un vino con elevado contenido en taninos (por ejemplo, vino tinto), estas coagulan inmediatamente (lado izquierdo de la gráfica).

Cuando la concentración de taninos es baja, la cinética de reacción es más lenta (lado derecho de la gráfica).

Figura 16

Mecanismos de coagulación y floculación de prótidos entre pH 3,2 – 3,6 (Molina Úbeda, 2000)



Es de importancia saber que para que la reacción entre taninos y prótidos sea eficaz y estable, los pesos de sus moléculas deben ser superiores a 500 Da, pero inferiores a 3000 (es decir, de 0,5 – 3 kDa), porque si sus moléculas son demasiado

voluminosas, no puede acercarse lo suficiente a las zonas activas de los pr6tidos (Rib6reau Gay6n, 2003; Oreglia, 1979) y la precipitaci6n no se produce.

La estructura molecular del tanino puede influir tambi6n en la interacci6n tanino-prote6na. En los elagitaninos es plana y redondeada, con los grupos fen6licos situados en la parte exterior, mientras que la de los taninos condensados presenta disposici6n en cadenas helicoidales, pero, tanto las mol6culas de taninos condensados como hidrolizables poseen grupos orto-dihidroxifen6licos con alta afinidad por las prote6nas (Fernandez, 1995).

Numerosos autores, entre ellos Rib6reau Gay6n (2003) explican que no existe una estequiometr6a en la reacci6n taninos-prote6nas. En el caso de una baja concentraci6n en prote6nas, los polifenoles se unen en la superficie de la prote6na, luego se producen fen6menos de agregaci6n y de precipitaci6n. Cuando la concentraci6n en prote6nas es elevada se produce un fen6meno id6ntico. Estos fen6menos se han estudiado para la eliminaci6n de algunos taninos en vinos con un clarificantes proteico como la gelatina.

Norberto Richardi en su exposici6n sobre taninos enol6gicos (2019) expone:

La acci6n de los diferentes tipos de taninos sobre los vinos, estudiada, entre otros por Dubourdieu (1986), se informa en la siguiente tabla a trav6s del turbio que se origina (medido por nefelometr6a) por el agregado de 100 mg/l tanino, como tambi6n se consigna el porcentaje de disminuci6n de las prote6nas totales solubles.

En esta tabla se indica la influencia de las distintas naturalezas de los taninos enol6gicos sobre la formaci6n de turbidez y la disminuci6n de las prote6nas solubles en un vino blanco joven Sauvignon Blanc elaborado con maceraci6n prefermentativa. Los taninos se emplean a raz6n de 100 mg/l. La turbidez se expresa en NTU y el porcentaje de disminuci6n de las prote6nas solubles son

determinadas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), Dubourdieu (1986).

Tabla 3

Turbidez originada y porcentaje de disminución de proteínas totales solubles

Medición realizada	Tanino de pepitas de uva Procianidínico	Tanino de orujo de uva Procianidínico	Tanino de roble Elagitanino	Tanino de Castaño Elagitanino
Turbidez originada expresada en NTU	83,0	57,0	6,2	12,5
% disminución de las proteínas totales solubles	43,3	36,5	8,3	14,6

En la próxima tabla se informa la capacidad de los taninos Procianidínico para precipitar las proteínas, según su grado de polimerización, expresado cantidades de catequinas por mol o Grado Medio de Polimerización, GMP

Tabla 4

Capacidad de taninos procianidínicos para precipitar proteínas

Número de catequinas por mol o GMP	Denominación	Propiedades
1 y 2	Flavonoide y Di flavonoide	Soluble en agua y no precipita proteínas
3 a 10	Taninos condensados	Soluble en agua y precipita proteínas
Mayor de 10	Flobafenos/taninos bermellones	Insoluble en agua y no precipita proteínas

(Richardí, Exposición Sobre Taninos Enológicos, 2019, pp 2-3)

Por los valores de turbidez y el porcentaje de disminución de las proteínas totales solubles se comprueba que los taninos que tienen la mayor capacidad de interaccionar con prótidos son los procianidínicos. Esto es confirmado a su vez por otros autores como Hidalgo Togores y Molina Úbeda. Por este motivo, como se explicará a continuación en

el título "Elaboración del vino con taninos en fermentación", los taninos utilizados en el ensayo son taninos procianidínicos.

3.4- Taninos de la madera de roble.

Las concentraciones de elagitaninos en los robles pedunculados y rubra varían de 6 a 42 mg/g de madera seca, la cesión de estos en la crianza en barrica refuerza los taninos del vino y ellos se tornan más tánicos. Con la oxidación y la hidrólisis de los mismos estos caracteres tienden a desaparecer. Se considera que la cantidad de taninos que pasan al vino durante el proceso de crianza oscila alrededor de 200 a 300 mg/L. (Richardi, Exposición sobre Taninos Enológicos, 2019)

La cantidad de taninos aportada por la madera depende de varios factores:

- el tostado de la madera, ya que, mientras más elevadas sean las temperaturas a las que la madera es sometida, mayor será la desnaturalización de los taninos de la misma y por ende será menor la concentración de estos a interactuar con el vino
- los diferentes tipos de roble, aportan cantidades sensiblemente diferentes, así, Q. petraea (roble francés) cede tres veces más elagitaninos que Q. alba (roble americano). Al ser este último una madera más dura que Q. petraea, cede menos taninos.
- la variabilidad entre especies, también, puede atenuar o aumentar la concentración en elagitaninos debido a la gran influencia que ejercen las condiciones de suelo, manejo forestal, climatología y edad de los árboles que tienen una gran injerencia sobre los caracteres estructurales de la madera
- envejecimiento de las duelas, con el correr de los años la disminución de elagitaninos puede alcanzar un 80 %

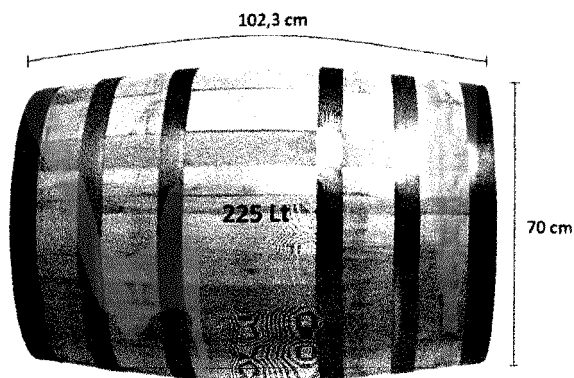
- a mayor concentración de alcohol y menor pH por parte del vino, aumenta la extracción de taninos de la madera.
- Por último, la temperatura, la cesión es menor a 12° C que a 20 °C, pero a esta temperatura los procesos de oxidación e hidrólisis de los elagitaninos también se ven acelerados, disminuyendo así su concentración. (Richardí, Exposición sobre Taninos Enológicos, 2019)

El Licenciado Richardí en su exposición sobre taninos enológicos (2019) logra cuantificar aproximadamente la cantidad de taninos aportados por la madera en una estadía de 12 meses del vino en contacto con la madera:

Cálculo del enriquecimiento en taninos Elágicos aportado por una barrica nueva

Figura 17

Dimensiones barrica



- Si consideramos un cilindro de 225 litros, de 7 dm de diámetro, se deduce una altura de 10,23 dm:
 - **Superficie interna en cm² será:**

$$(2 \times \pi \times 3,5^2 \text{ dm}) + (\pi \times 7 \text{ dm} \times 10,23 \text{ dm}) = 302 \text{ dm}^2$$

$$302 \text{ dm}^2 = 30200 \text{ cm}^2$$
- Si consideramos una penetración del vino, a través de la duela, de 3 mm, (0,3 cm) en el transcurso de 12 meses, el volumen de madera en contacto con el vino será:

- **Volumen de madera que interacciona con el vino:**

$30200 \text{ cm}^2 \times 0,3 \text{ cm} = 9060 \text{ cm}^3$ o sea 9,06 litros.

- La densidad de la madera de roble con 12% de humedad es 770 g/litro.

- **Gramos de roble que interaccionan con el vino / litro de vino:**

$\text{g/l} = (9,06 \text{ l} \times 770 \text{ g}) / 225 \text{ l} = 31 \text{ g/l}$

- Suponiendo una cesión de taninos de 10 mg/g de madera⁸, la cesión de elagitaninos será:

- **mg de elagitaninos cedidos por la madera / litro de vino:**

$\text{mg/l} = 31 \text{ g/l de madera por litro} \times 10 \text{ mg/g}$

$\text{mg/l} = 310 \text{ mg/l (miligramos de tanino cedidos por la madera por cada litro de vino)}$.

(Richardì, Exposición Sobre Taninos Enológicos, 2019, pp 3-4)

Estos cálculos son de importancia en esta investigación y fueron tomados en cuenta a la hora de estimar la cantidad de taninos aportados por las barricas.

⁸ Esta suposición se hace basada en lo expuesto en el título 3.4: Taninos de la madera de roble: las concentraciones de elagitaninos en los robles pedunculados y rubra varían de 6 a 42 mg/g de madera seca. I

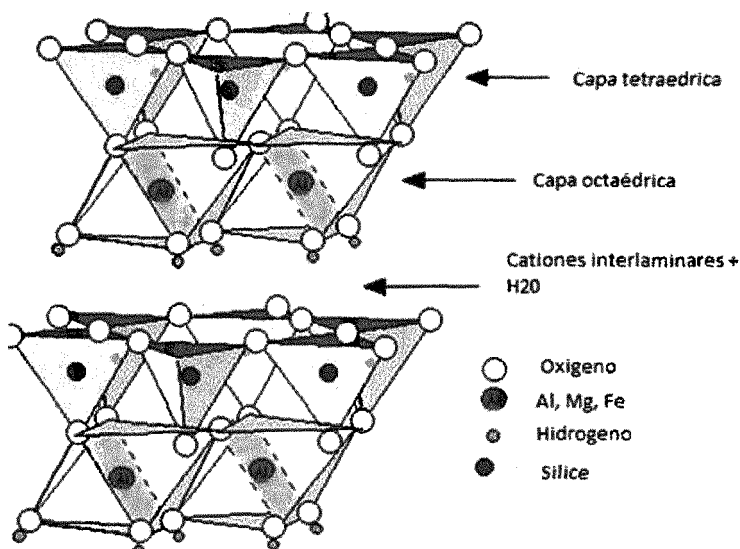
Capítulo IV Bentonita

La bentonita es un clarificante mineral empleado en la enología. La práctica de su adición a mostos o vinos es una de las más utilizadas hace muchos años para lograr la estabilidad proteica. Normalmente, para disminuir los próticos inestables y para lograr la estabilidad deseada se requieren dosis excesivas que pueden afectar la calidad aromática y en el caso de vinos espumantes, el perlage. Los valores utópicos para que estos efectos sean mínimos son de aproximadamente 50 g/Hl, aunque para los vinos de nuestra zona es muy poco probable que se llegue a la estabilidad con estas dosis.

Las bentonitas son arcillas de estructura laminar que pertenecen al grupo de los filosilicatos, son obtenidas por la descomposición de las cenizas volcánicas. Su fórmula química es $\text{Si}_4\text{O}_{10}\text{Al}_{2-y}\text{Mg}_y(\text{OH})_2\text{M}_y$ (Hidalgo Togados, 2003)

Figura 18

Estructura de la bentonita (QuimiNet, 2014)



Estas tienen la capacidad de hincharse con el agua y otros líquidos dando dispersiones coloidales liófilas de carga negativa⁹. Una de las propiedades más importantes es el poder adsorbente que tienen con las proteínas y aún más cuando están bien hidratadas.

Las proteínas termosensibles, recordando lo mencionado anteriormente, tienen pesos moleculares débiles, entre 12 y 35 KDa con puntos isoeléctricos comprendidos entre 4,1 y 5,8. Según Flanzy la bentonita elimina del vino prioritariamente las proteínas que tienen punto isoeléctrico elevado (5,8 a 8,0) y masa molecular comprendidas entre 32 y 45 KDa¹⁰. Molina Úbeda confirma esto y a su vez ambos autores explican que el efecto sobre prótidos de mayor peso molecular es poco o nulo. Para las fracciones proteicas de masa molecular elevada: de 60 a más de 100 KDa la bentonita no ejerce efecto ya que su elevado volumen y características estéricas limitan el acceso al espacio interfoliar de la bentonita, que es donde tienen lugar los intercambios iónicos.

Las bentonitas sódicas en estado seco, presentan una superficie específica de 25 a 50 m²/gramo mientras que en suspensión acuosa este valor se eleva a 300-400 m²/gramo y para bentonitas cálcicas de 200 a 250 m²/gramo. La adsorción o la capacidad de fijar determinadas sustancias por las bentonitas se debe a su elevada superficie específica, a las fuerzas de Van der Waals y a su elevada carga. (Togores, 2003)

Como se mencionó anteriormente, la fuerte carga negativa de la bentonita en el vino y su distribución superficial ejerce una importante acción sobre las proteínas. La

⁹ La bentonita tiene la particularidad de tener carga negativa (ubicadas en las partes planas de la molécula) y a su vez positiva (ubicadas en los extremos de la molécula). La carga positiva de la bentonita explica la interacción de la bentonita con la materia colorante, de carga negativa, proceso en el que también concurren las fuerzas superficiales de Van der Waals (Buono Daniel, 2021)

¹⁰ Aunque los intervalos de pesos moleculares de los prótidos termo sensibles y los prótidos eliminables por la bentonita no coincidan en su totalidad, Flanzy explica que en la realidad y a efectos prácticos, se tiene una gran variedad de bentonitas comerciales que presentan una buena correlación entre la superficie de adsorción de las bentonitas y su efecto desproteinizante y que aseguran la estabilidad proteica de los vinos.

presencia de cargas positivas en las proteínas disueltas en el vino hace posible su floculación por la bentonita que a pH de mostos y vinos se comporta como un intercambiador de cationes ante las mismas.

Hay varios factores que influyen en la acción de la bentonita sobre las proteínas:

- El de mayor importancia es el pH. A menor pH mayor es la acción desproteinizante de la bentonita (Costa Juan Ignacio, 2018).
- También el PI de las proteínas tienen una gran influencia en la efectividad de la remoción de proteínas debido al mecanismo de intercambio catiónico. Como ya se mencionó, la bentonita tiende a extraer del vino las proteínas de alto PI (5,8-8).
- Otro factor que influye en menor medida es la presencia de taninos que tiende a obstaculizar la interacción de la bentonita con los prótidos (Molina Úbeda 2000).¹¹

Según su origen o su tratamiento industrial, las diferentes bentonitas son más o menos eficaces, con una velocidad de sedimentación y un volumen de depósito variables. La suspensión debe prepararse en una concentración adecuada de agua para lograr una correcta solvatación del clarificante.

Según Oreglia, el empleo de esta técnica tiene varias ventajas como:

- Eliminar del vino los prótidos naturales termolábiles y los prótidos presentes por sobre encolado, de forma rápida y completa, dejando el vino estable con relación a la quebradura proteica.

¹¹ Se supone que es debido a la carga positiva de la bentonita (ubicadas en los extremos de la molécula). Mediante las fuerzas de Van der Waals, interacciona con los taninos de los vinos que es de carga negativa, obstaculizando su interacción con prótidos.

- Al eliminar los prótidos le confiere al vino una mayor estabilidad respecto de la quebradura cuprosa y otras quebraduras que requieren de proteínas en su desarrollo para manifestarse.
- Capacidad de adsorber polifenolasas contribuyendo a estabilizar al vino con respecto a la quebradura oxidásica.
- Elimina la materia colorante en estado coloidal y la que se encuentra unida a SO₂.

Pero este clarificante tiene también varias desventajas que son las principales motivaciones para el desarrollo de esta investigación. Estas son:

- Provoca una notable disminución de aromas en vinos blancos.
- Se produce un apreciable volumen de borras lo que implica una gran pérdida en volumen de vino de imbibición que queda retenido por la bentonita.
- Al hidratar la bentonita, el agua de hidratación está ligada al clarificante. Pero si hay un exceso de agua (sobrenadante) esta pasa al vino enriqueciéndose en este compuesto.
- Posible enriquecimiento del vino en hierro y calcio.
- Produce una leve disminución de la acidez fija del vino, una pequeña elevación de pH, un reducido aumento de las cenizas y de su alcalinidad (Oreglia, 1979)

4.1- Bentonita, coloides y aromas

Numerosos trabajos han demostrado que los coloides presentes en el vino, entre ellos las proteínas, pueden tener interacciones con las sustancias aromáticas a escala molecular. Al emplear clarificantes para estabilizar en el vino estas suspensiones coloidales, estos pueden: fijar directamente compuestos volátiles o bien eliminar coloides del vino que son fijadores de aromas (enlaces de tipo Van der Waals y de tipo hidrófobo).

Si se miden las interacciones entre las bentonitas y los compuestos aromáticos como la γ -decalactona y la β -ionona, se observa que la capacidad de fijación de aromas es

variable según las bentonitas, pero no despreciable ya que puede llegar al 25% (Flanzy, 2003).

En este punto es de importancia resaltar la diferencia del mecanismo de adsorción implicado entre la bentonita y los compuestos aromáticos.

La capacidad de fijación de aromas y el efecto desproteinizante de las bentonitas no presentan relación directa. En efecto, los mecanismos utilizados son diferentes. En el caso de las proteínas, la bentonita dispersa en forma de partículas cargadas electronegativamente al pH de los mostos y los vinos, se comporta como un intercambiador de cationes ante las proteínas, que están cargadas electro positivamente. En el caso de los compuestos aromáticos, como ya se mencionó, ponen en juego enlaces débiles de energía, de tipo hidrógeno o interacciones hidrófobas (Flanzy, 2003).

4.2- Dosis de bentonita.

Las dosis de bentonita necesarias para lograr la estabilidad proteica en las bodegas, se determinan mediante ensayos induciendo el enturbiamiento. El más utilizado es el calentamiento de muestras ya que es el que mejor imita las condiciones de almacenamiento (Pereira, 2014)

Sarmiento (2000) observó que el test de calor era un buen indicador del contenido total de proteínas y es el menos afectado por otros componentes comparado con otros como el test de etanol y el de taninos, procedimientos también utilizados para determinar la inestabilidad proteica. Son necesarias temperaturas mayores ($> 60^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos) para precipitar las proteínas tipo thaumatin y las quitinasas, proteínas mayoritariamente inestables en el vino.

Con el objetivo de tratar de reducir las desventajas de este insumo en el vino, que es un problema mayor en nuestra zona gracias al alto contenido proteico que poseen los vinos blancos y a las altas dosis de bentonita demandadas para estabilizarlo; es que se

buscan alternativas o complementos a este insumo, como es el caso de esta investigación con los taninos, explicada a continuación.

Capítulo V Materiales y Método

5.1- Elaboración del vino con taninos en fermentación

La uva utilizada para realizar la experimentación fue uva Chardonnay cosechada el día 11 de marzo de 2019 de viñedos de la bodega The Vines of Mendoza, ubicados en Los Chacayes, Tunuyán-Mendoza.¹²

La uva se cosechó de forma manual en cajas de 14 kg, la descarga se realizó en la cinta de selección de racimos, luego fue despalillada, pasó por una cinta de selección de granos y fue llevada a una prensa neumática donde tuvo una maceración de 6 horas. Durante el ingreso de los granos a la prensa se fueron adicionando de forma homogénea, SO₂ 8 gr/qq y hielo seco 5 kg/qq. Luego del prensado, el mosto fue llevado a un tanque donde se le hizo un desborre previo en frío a 10°C por 24 horas.

¹² El proceso de elaboración del vino empleado en esta experimentación se encuentra graficado al final de este capítulo en un diagrama de flujos que a su vez especifica los días entre las distintas etapas de la elaboración.

Tabla 5*Composición química de la uva en el ingreso*

Alcohol % vol.	0,00
Azúcar Reductor g/l	229,67
Ac. Total en ácido tartárico g/l	4,43
Ac. Volátil en ácido acético g/l	0,01
Ac. Fija g/l	4,42
Ac. Málico g/l	2,79
Ac. Láctico g/l	0,00
pH	3,83
SO ₂ Total mg/l	41
SO ₂ Libre mg/l	5
SO ₂ Molecular	0,04

En el tanque se corrigió acidez 1 gr/l y se agregaron enzimas pectolíticas. Finalizado el desborre se trasegó a otro tanque y se agregó nutrientes¹³ (Thiazote¹⁴ de Laffort) 10 g/hl, se ajustaron dosis de SO₂ y acidez. Finalmente se llevaron a los recipientes en donde se realizaron los ensayos.

Esto fue el día 12 de marzo y se considera este día como el día 1 de contacto entre jugo de uva a fermentar y los taninos (procianidínicos agregados y elágicos presentes en la madera de la bodega).

Para hacer la experimentación se utilizaron dos tipos de materiales:

- Plástico, bidones de 20 litros, material inerte al vino.
- Madera, barricas de primer uso de 225 litros, roble francés marca Treuil de Brive Tonneliers (tonelería ubicada en Brive Francia). Línea TG (Tight

¹³ Aditivo pre -estandarizado por los enólogos para todo mosto Chardonnay que ingresa a la bodega

¹⁴ Nutriente mineral a base de factores de crecimiento (sulfato de amonio) y de tiamina (Laffort, Thiazote, 2019)

Grains o grano apretado), MT (Medium Toast o tostado medio), las tapas de la barrica estaban sin tostar.

La madera interactúa con la composición del mosto en fermentación aportando diversas sustancias, entre ellas la de mayor interés para esta investigación son los taninos elágicos, presentes en gran cantidad.

Se agregaron dosis crecientes de taninos en cada envase:

Tabla 6

Dosis de taninos

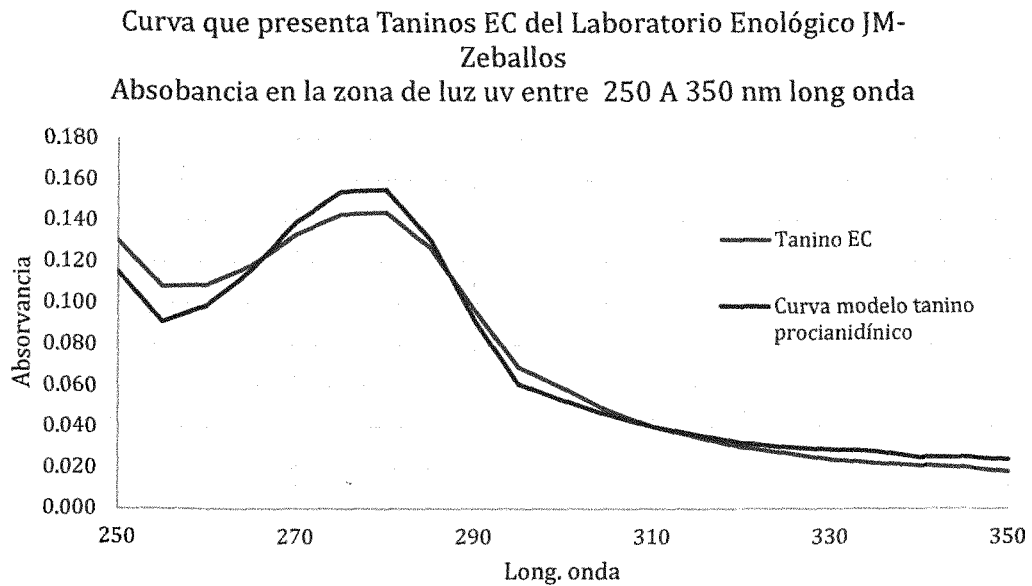
ENSAYO	DOSIS TANINO
AT	0 g/hl
A1	6 g/hl
A2	18 g/hl
A3	54 g/hl
A4	162 g/hl
BT	0 g/hl
B1	3 g/hl
B2	6 g/hl
B3	12 g/hl
B4	25g/hl

A = bidones de plástico de 20 litros,
ensayos realizados por duplicado
B = barricas de roble de 225 litros

Los taninos usados son taninos EC del Laboratorio Enológico JM-Zeballos, las dosis recomendadas por el fabricante son de 10-30 g/hl. Estos taninos fueron analizados en el Instituto enológico de investigación Richardi donde se corroboró que son taninos procianidínicos, ya que presentan, como se expone en la siguiente gráfica, una depresión en 250 nm, un pico en los 280 nm y una nueva depresión en los 290 nm, continuando con un posterior descenso a medida que aumenta la longitud de onda. Como bien se menciona en la página 24 y se expone en la figura 13: "Diferenciación de taninos por curvas de absorción en luz UV", estos valores de absorbancia son característicos de los taninos procianidínicos.

Figura 19

Curva de absorbancia en luz UV de tanino procianidínico empleado en los ensayos



Para el comienzo de fermentación se adicionaron Levaduras VL1¹⁵ 25 g/hl más Superstart¹⁶ 20 g/hl en agua de hidratación (productos Laffort). La fermentación se realizó a 18°C. Al segundo, cuarto y sexto día de comenzada la fermentación se agregó nitrógeno amoniacal¹⁷ 10 g/hl y hacia el final de la fermentación se agregó 10 g/hl de corteza de levadura¹⁸.

Durante la fermentación se realizaron batonage, los primeros ocho días de fermentación tres veces por día, luego dos veces al día y hacia el final una vez al día.

¹⁵ Levadura seca activa (LSA) *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada, (Laffort, Zymaflore VL1, 2019)

¹⁶ Preparador de levaduras a base de autolizados de levadura y de levaduras inactivas (Laffort, Superstart, 2019). Aditivo estandarizado para todas las fermentaciones en la bodega The Vinnes.

¹⁷ Aditivo estandarizado para todas las fermentaciones en la bodega The Vinnes.

¹⁸ Aditivo estandarizado para todas las fermentaciones en la bodega The Vinnes.

Tabla 7*Composición química de los vinos terminados¹⁹*

En sa yo	Alcohol %vol.	Azúcar Reductor g/l	Ac. Total en ácido tartárico g/l	Ac. Volátil en ácido acético g/l	Ac. Fija g/l	Ac. Málico g/l	Ac. Láctico g/l	pH	SO ₂ Libre mg/l
BT	14.64	2.33	5.64	0.11	5.50	2.56	0.04	3.52	10
B1	14.62	2.44	5.32	0.10	5.23	2.64	0.01	3.61	12
B2	14.76	2.42	5.67	0.10	5.58	2.50	0.06	3.68	12
B3	14.59	2.57	5.61	0.12	5.46	2.47	0.05	3.57	13
B4	14.56	2.50	5.63	0.14	5.46	2.50	0.01	3.55	20
AT	14.41	2.25	5.11	0.11	4.97	2.40	0.00	3.70	25
A1	14.28	2.01	4.79	0.10	4.72	2.85	0.00	3.81	27
A2	14.16	1.77	4.66	0.12	4.51	2.70	0.00	3.86	34
A3	14.32	1.98	4.57	0.10	4.51	2.68	0.00	3.87	33
A4	14.27	1.75	4.49	0.20	4.24	2.49	0.00	3.87	39

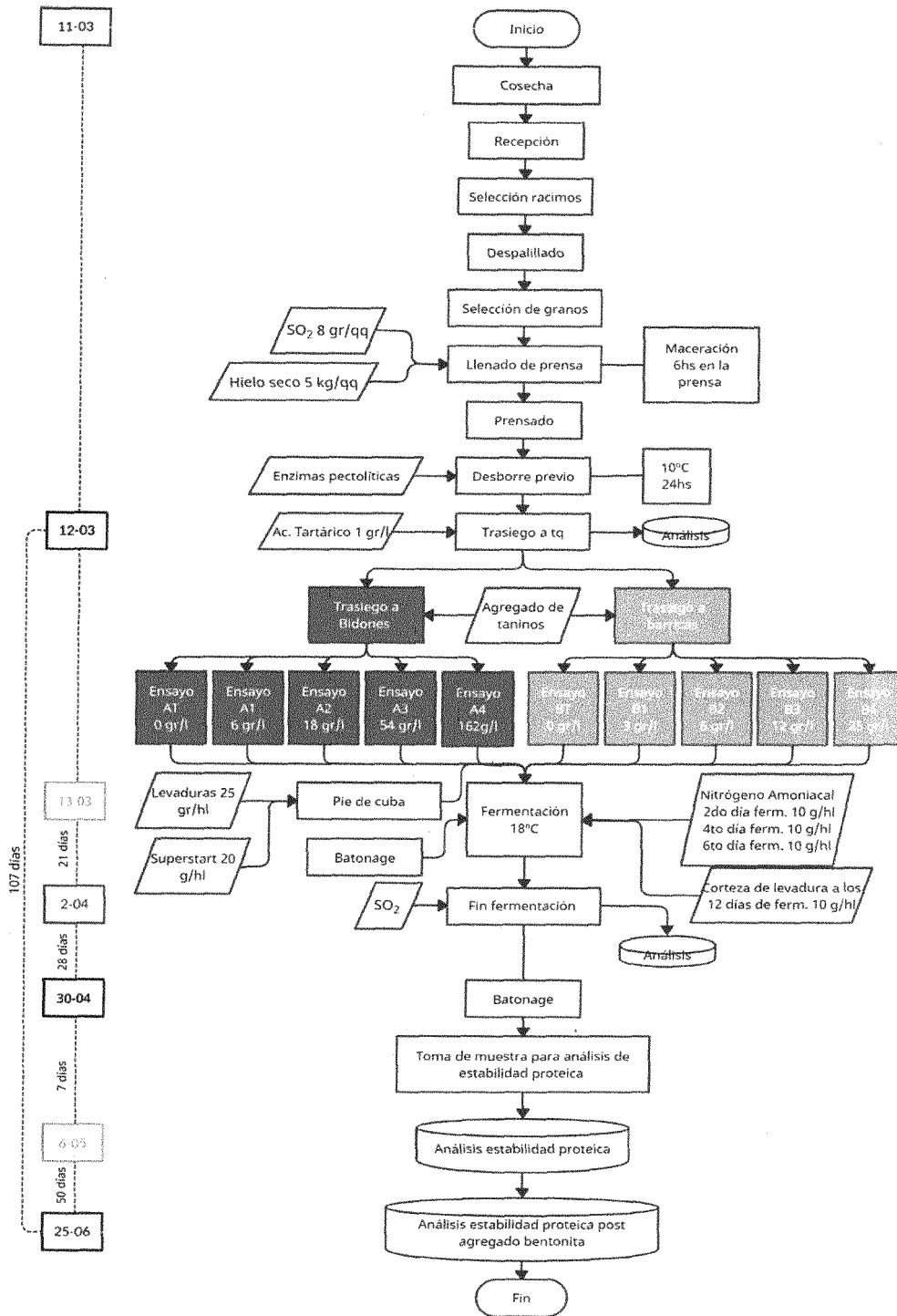
El 30 de abril, a cuatro semanas de finalizada la fermentación, se tomaron muestras en botellas de 500 ml. Para tomar las muestras se realizó un batonage, se dejó reposar 10 minutos y luego se extrajo el líquido por succión introduciendo una manguera de plástico a media profundidad del recipiente. Estas muestras fueron analizadas el 6 de mayo, haciendo un total de 57 días de contacto entre el vino y los taninos. Posteriormente se les hizo el test de calor para ver si algún ensayo había quedado estable con el agregado de taninos únicamente.

En la figura a continuación se puede observar graficado todo lo expuesto en este capítulo mediante un diagrama de flujo que a su vez especifica las fechas y tiempo transcurrido entre una etapa del proceso y la siguiente.

¹⁹ La presencia de ciertas disparidades analíticas (por ejemplo, diferencias en pH y SO₂ entre los ensayos) se pueden deber a la dificultad para medir e incorporar los aditivos a los envases plásticos. Al ser envases de 20 litros de vino, las cantidades a agregar de cada aditivo eran muy pequeñas y no se contaba en la bodega con balanzas analíticas de alta precisión.

Figura 21

Diagrama de flujo del proceso productivo



Capítulo VI Resultados

6.1- Resultados de test de prótidos a vino con tanino agregado en fermentación.

El test de calor consiste filtrar por membranas de acetato de celulosa de 0,45 μm y posteriormente se hace una lectura con nefelómetro (2100P Turbidimeter HACH). Se registra el dato de la turbidez en NTU. Posteriormente se lleva a Baño María a 80°C (BM termostatzado) durante 30 minutos, se enfría a 20°C, se espera 24 horas y se vuelve a tomar la lectura con nefelómetro. Se registra así el dato de la turbidez en NTU posterior al calentamiento. Se considera que el vino es estable con respecto a la quebradura proteica, cuando la diferencia de NTU es inferior a 1. Los resultados de los análisis expuestos en la tabla a continuación fueron realizados el 6 de mayo de 2019.

Tabla 8

Resultados de test de prótidos a vino con tanino agregado en fermentación

Tipo de vino	Estabilidad Proteica			
	NTU Testigo	NTU Calor (80°C, 30 min-NTU a las 24 Hs)	Diferencia NTU	Estabilidad Proteica
AT 0 g/HI	2,88	17,8	14,92	INESTABLE
A1 6 g/HI	3,46	21,1	17,64	INESTABLE
A2 18 g/HI	2,68	17,2	14,52	INESTABLE
A3 54 g/HI	1,49	12,5	11,01	INESTABLE
A4 162 g/HI	1,4	8,99	7,59	INESTABLE
BT 0 g/HI	1,37	9,9	8,53	INESTABLE
B1 3 g/HI	2,72	10,3	7,58	INESTABLE
B2 6 g/HI	1,93	8,21	6,28	INESTABLE
B3 12 g/HI	4,25	8,26	4,01	INESTABLE
B4 25 g/HI	2,13	9,17	7,04	INESTABLE

Con los siguientes resultados se observó que el vino no queda estable a prótidos con ninguna de las dosis empleadas dado que la variación de NTU fue mayor a 1. Por lo tanto, se optó por hacer ensayos con dosis crecientes de bentonita hasta lograr la estabilidad.

6.2- Resultados de test de prótidos a ensayos con dosis de bentonita

Como se ve en la siguiente tabla, por cada ensayo con una dosis de tanino, se agregaron dosis crecientes de bentonita a razón de 20, 40, 60 y 80 g/Hl. La bentonita utilizada es la Bentogran del Laboratorio Enológico JM-Zaballos, la cual es una bentonita sódica proveniente de Italia. Los resultados de los análisis expuestos en la tabla a continuación fueron realizados el 25 de junio de 2019.

Tabla 9

Resultados test de calor en ensayos con dosis crecientes de bentonita

Dosis de taninos	Ensayo bentonita más	NTU Testigo	NTU Calor (80°C, 30 min-NTU a las 24 Hs)	Diferencia NTU	Estabilidad Proteica
BIDONES					
0 g/Hl	AT TESTIGO	2,88	17,8	14,92	INESTABLE
	AT + 20 g/Hl	2,41	17,5	15,09	INESTABLE
	AT + 40 g/ Hl	2,47	13,7	11,23	INESTABLE
	AT + 60 g/ Hl	2,76	9,52	6,76	INESTABLE
	AT + 80 g/ Hl	2,65	9,1	6,45	INESTABLE
6 g/Hl	A1 TESTIGO	3,46	21,1	17,64	INESTABLE
	A1 + 20 g/ Hl	2,97	17,2	14,23	INESTABLE
	A1 + 40 g/ Hl	0,11	20,5	20,39	INESTABLE
	A1 + 60 g/ Hl	3,03	12,4	9,37	INESTABLE
	A1 + 80 g/ Hl	2,85	6,4	3,55	INESTABLE
18 g/Hl	A2 TESTIGO	2,68	17,2	14,52	INESTABLE
	A2 + 20 g/ Hl	3,12	21,4	18,28	INESTABLE
	A2 + 40 g/ Hl	3,67	12,9	9,23	INESTABLE
	A2 + 60 g/ Hl	2,70	8,44	5,74	INESTABLE
	A2 + 80 g/ Hl	2,96	4,04	1,08	ESTABLE
54 g/Hl	A3 TESTIGO	1,49	12,5	11,01	INESTABLE
	A3 + 20 g/ Hl	2,91	6,21	3,30	INESTABLE
	A3 + 40 g/ Hl	2,63	3,19	0,56	ESTABLE

Dosis de taninos	Ensayo más bentonita	NTU Testigo	NTU Calor (80°C, 30 min-NTU a las 24 Hs)	Diferencia NTU	Estabilidad Proteica
	A3 + 60 g/ HI	2,60	1,71	-0,89	ESTABLE
	A3 + 80 g/ HI	2,61	1,18	-1,43	ESTABLE
BARRICAS					
0 g/HI	BT TESTIGO	1,37	9,9	8,53	INESTABLE
	BT + 20 g/ HI	2,34	9,24	6,9	INESTABLE
	BT+ 40 g/ HI	2,64	4,93	2,64	INESTABLE
	BT + 60 g/ HI	2,51	2,91	0,40	ESTABLE
	BT + 80 g/ HI	2,57	1,58	-0,99	ESTABLE
3 g/HI	B1 TESTIGO	2,72	10,3	7,58	INESTABLE
	B1 + 20 g/ HI	2,76	8,14	5,38	INESTABLE
	B1 + 40 g/ HI	3,26	5,24	1,98	ESTABLE
	B1 + 60 g/ HI	2,68	2,62	-0,06	ESTABLE
	B1 + 80 g/ HI	2,57	1,28	-1,29	ESTABLE
6 g/HI	B2 TESTIGO	1,93	8,21	6,28	INESTABLE
	B2 + 20 g/ HI	2,86	6,24	3,38	INESTABLE
	B2 + 40 g/ HI	2,70	3,7	1,00	ESTABLE
	B2 + 60 g/ HI	2,68	1,61	-1,07	ESTABLE
	B2 + 80 g/ HI	2,64	1,52	-1,12	ESTABLE
12 g/HI	B3 TESTIGO	4,25	8,26	4,01	INESTABLE
	B3 + 20 g/ HI	2,76	5,32	2,56	INESTABLE
	B3 + 40 g/ HI	2,82	2,76	-0,06	ESTABLE
	B3 + 60 g/ HI	2,71	1,95	-0,76	ESTABLE
	B3 + 80 g/ HI	2,63	1,04	-1,59	ESTABLE

Con estos nuevos resultados se corrobora un paralelismo en cuanto a la estabilidad proteica, entre las variables crecientes de dosis de taninos y las dosis de bentonita necesarias para llegar a la estabilidad, es decir, a mayor dosis de taninos, menor es la dosis de bentonita necesaria para llegar a la estabilidad. Como se puede observar en la tabla las dosis requeridas de bentonita para llegar a la estabilidad proteica en función de la dosis de tanino que tiene cada ensayo, son superiores en los bidones (AT, A1, A2 y A3) que en las barricas (ensayo BT, B1, B2 y B3).

Se puede observar en la tabla que el vino testigo del ensayo AT, que no tiene taninos agregados ni taninos aportados por la madera, no queda estable ni con 80 g/HI de bentonita, esto quiere decir que para llegar a la estabilidad hubiese requerido dosis

mayores, con lo cual se produciría una gran disminución en su intensidad aromática y atributos organolépticos.

Recién con el agregado de 18 g/HI (ensayo A2) de taninos procianidínicos más el agregado de 80 g/HI de bentonita se logra llegar a la estabilidad proteica del vino Chardonnay elaborado en envase de plástico. Con 54 g/HI de taninos agregados (ensayo A3), se logra obtener la estabilidad con dosis de bentonita a partir de los 40 g/HI (dosis que no afecta a las características organolépticas), la desventaja en este caso es que la dosis de tanino es elevada y modifica en gran medida el sabor y la identidad organolépticas en general del varietal. Seguramente con una dosis intermedia, 30 g/HI, por ejemplo, se hubiesen podido obtener buenos resultados (cabe recordar que para los taninos procianidínicos utilizados en los ensayos, la dosis recomendada por el fabricante es 10-30 g/HI).

En el caso del vino elaborado en Barricas de roble francés de primer uso, se observó que en el ensayo BT, que no tiene taninos agregados, pero si los taninos elágicos que aporta la madera, el vino Chardonnay llega a la estabilidad con una dosis de 60 g/HI, la cual no pasa desapercibida organolépticamente pero no es excesivamente elevada. En los vinos elaborados en barrica con agregado de taninos procianidínicos, ensayo B1, B2 y B3 (3, 6 y 12 g/HI de taninos), se logra llegar a la estabilidad en todos los casos con 40 g/HI de bentonita, la cual es una dosis que no hace notable la disminución de la intensidad aromática del varietal. Cabe destacar, que en el ensayo B3 el delta NTU del vino con 20 g/HI de bentonita queda muy cercano a la estabilidad (2,56).

Capítulo VII Conclusiones

A pesar de los conocidos efectos negativos de la bentonita, el agregado de tanino procianidínico ni los taninos aportados por la barrica durante la fermentación lograron evitar su uso para conseguir la estabilidad proteica en el vino Chardonnay.

En esta experimentación se demuestra que el agregado de taninos funciona para disminuir las dosis necesarias de bentonita. Como se puede ver en el vino testigo AT (ensayo que no presenta taninos agregados y es fermentado en envases de plástico), las dosis necesarias de bentonitas son superiores a 80 g/Hl y se logra disminuir esta dosis por debajo de 80 g/Hl a partir del ensayo A2 al que se ha agregado 18 g/Hl de taninos procianidínicos.

En los ensayos fermentados en barricas, el agregado de tanino procianidínico funciona también como un buen complemento disminuyendo las dosis necesarias de bentonita.

Comparando los ensayos fermentados en barrica con los fermentados en envases plásticos se observa lo siguiente: las dosis necesarias de bentonita en los ensayos fermentados en barrica se reducen considerablemente, en algunos casos a la mitad, respecto a las utilizadas en el vino elaborado en envases de plástico. Como se puede observar en la siguiente tabla, el ensayo A1 y el ensayo B2 tienen ambos 6 g/Hl de taninos procianidínicos agregados, pero en B2 se logra la estabilidad con menos de la mitad de la dosis de bentonita empleada en A1.

Tabla 10*Dosis de bentonita necesarias para lograr la estabilidad*

Ensayo (dosis de tanino procianidínico)	Bentonita necesaria para llegar a la estabilidad
AT (0 g/Hl)	Mayor a 80 g/hL ²⁰
A1 (6 g/Hl)	Mayor a 80 g/hL
A2 (18 g/Hl)	80 g/hL
A3 (54 g/Hl)	40 g/hL
BT (0 g/Hl)	60 g/hL
B1 (3 g/Hl)	40 g/hL
B2 (6 g/Hl)	40 g/hL
B3 (12 g/Hl)	40 g/hL

Esto es gracias a los taninos elágicos aportados por la madera de roble francés o *Q. petraea* (madera que cede tres veces más elagitaninos que *Q. alba* o roble americano por ser de madera más dura que *Q. petraea*).

Se observa que, por más de que la teoría explique que no son los taninos más indicados para reaccionar con prótidos, al estar presentes en grandes cantidades permiten que el vino llegue a la estabilidad proteica con menores dosis de taninos agregados, disminuyendo por lo tanto las dosis de bentonita necesarias.

Para darle valores numéricos a la cesión de taninos de la madera al vino debemos diferenciar los efectos de penetración y difusión. Difusión: el gradiente de difusión de la madera al vino aumenta con el movimiento convectivo de la fermentación, por tanto, en este proceso aumenta la cesión de taninos. Tanto la penetración como la difusión: del

²⁰ Una falla en esta experimentación fue no haber determinado la dosis de bentonita necesaria para llegar a la estabilidad en los ensayos AT y A1, y emplear mismas dosis experimentales de bentonita para todos los ensayos.

vino en la madera disminuyen con la presencia de la borra fina (levaduras y demás partículas coloidales) esto disminuye la cesión de taninos.

Considerando lo expuesto en el párrafo anterior, al emplear los cálculos del Licenciado Richardi (expuestos en la página 31, subtítulo "Cálculo del enriquecimiento en taninos Elágicos, aportado por una barrica nueva") se supone una penetración del vino en la madera de 1,5 mm en vez de 3 mm y se obtiene que la cantidad de elagitaninos cedidos por la madera está alrededor de 15,5 g/Hl. En la tabla a continuación se expone la dosis total de taninos presente sumando los taninos procianidínicos agregados con los taninos elágicos aportados por la barrica durante la fermentación.

Tabla 11

Concentración aprox. de taninos totales presentes en los ensayos en barrica

Ensayo	Taninos elágicos aportados por la barrica	Taninos procianidínicos agregados	Taninos totales
BT	15,5 g/Hl	0 g/Hl	15,5 g/Hl
B1	15,5 g/Hl	3 g/Hl	18,5 g/Hl
B2	15,5 g/Hl	6 g/Hl	21,5 g/Hl
B3	15,5 g/Hl	12 g/Hl	27,5 g/Hl

Con estos números orientativos, podemos deducir que las dosis de taninos totales en estos ensayos son elevadas y logran que se llegue a la estabilidad proteica con dosis menores de bentonita.

Cabe mencionar que cuando se emplean barricas de roble de primer uso en vinos blancos existe el riesgo de que haya un desequilibrio organoléptico en el vino gracias a que como se expresa comúnmente "la madera le gana al vino". Por tanto, hay que tener cuidado que los aromas y sabores que provienen de la madera no opaquen lo los aromas y sabores que le dan identidad al varietal. En este ensayo las características organolépticas fueron buenas y el vino estaba integrado correctamente a la madera.

Como bien se menciona en el subtítulo 4.1 “Bentonita, coloides y aromas”, la capacidad de fijación de aromas es variable según las bentonitas, pero no despreciable ya que puede llegar a disminuir en un 25% los aromas presentes en el momento de su agregado. En esta investigación, al demostrar que es posible la disminución del uso de la bentonita, se supone que con ello los efectos negativos que ejerce la misma serán menores. Logrando reducir las desventajas del empleo de la bentonita, que son entre otras: la disminución de características organolépticas, sabor y aromas principalmente, y la pérdida de vino en volumen de borras que representa entre un 3 a un 10% del volumen de vino total. También sabiendo que la bentonita no es reciclable, se logra la disminución de este importante residuo.

Para dar cierre a esta conclusión, decimos que la hipótesis no se ha cumplido totalmente, ya que la estabilidad proteica lograda es parcial al emplear taninos enológicos durante la fermentación del vino Chardonnay, en las dosis y en los tiempos empleados en esta experimentación. Pero si es posible disminuir las dosis necesarias de bentonita y así sus efectos negativos cuando se emplean las dosis determinadas de taninos en fermentación.

Referencias

- Alonso, J. R. (20 de Noviembre de 2010). *La Granja*. Obtenido de Edulcorantes naturales : <https://www.redalyc.org/pdf/4760/476047396002.pdf>
- Blade Boulton, W. H. (1988). *Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution*. California: Am. J. Enol. Vitic.
- Buono, D. (Enero de 2021). *Bentonita*. Obtenido de YouTube: <https://www.youtube.com/watch?v=Rnod2GHpRsc>
- Celotti. (2005). Nuevo método para la evaluación de la inestabilidad proteica potencial de los vinos. *Enoforum* (pág. 2). Piacenza: Departamento de Ciencias de los Alimentos, Università degli Studi di Udine.
- Costa, J. I. (2018). *Influencia del pH en la acción desproteinizante de la bentonita en vinos*. Mendoza: Facultad Don Bosco de Enología y Ciencias de la alimentación.
- Deyanira, F. S.-A. (6 de Enero de 2006). *Mediagraphic*. Obtenido de ENDO-β-1,3-glucanasas reconocidas por anticuerpos tipo IgE de sueros de pacientes alérgicos: <https://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2006/al061d.pdf>
- Eveline J. Bartowsky, P. J. (23 de Agosto de 2005). *Efecto químico y sensorial de la adición de lisozima a vinos tintos y blancos después de seis meses de conservación*. Obtenido de Info Wine: https://www.infowine.com/es/resmenes_cientficos/efecto_quimico_y_sensorial_d_e_la_adicin_de_lisozima_a_vinos_tintos_y_blanco_s_despues_de_seis_meses_d_e_conservacin_sc_2349.htm

- Fernandez, E. C. (1995). *Estudio de la composición tánica de madera, corteza y hojas de Eucalyptus Camaldulensis, E. Globulus y E. Rudis*. Madrid: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria .
- Ferreira, R. B. (2002). *The wine proteins*. Trends Food Sci. Technol.
- Filipe Ribeiro, A. A. (1 de Junio de 2020). *Estabilización tartárica de vinos blancos con carboximetilcelulosa (CMC) - Eficiencia y economía*. Obtenido de Info wine: https://www.infowine.com/es/noticias/estabilizacin_tartrica_de_vinos_blanco_s_co_n_carboximetilcelulosa_cmc_-_eficiencia_y_economia_sc_18639.htm
- Flanzy, C. (2003). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos* . Madrid: Ediciones Mundi-Prensa .
- Goñi Ramos, Ó. (2011). *AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y FUNCIONALIDAD DE QUITINASAS Y 1,3-βGLUCANASAS INDUCIDAS DIFERENCIALMENTE EN FRUTOS DE "ANNONA CHERIMOLA" MILL. POR BAJAS TEMPERATURAS Y ELEVADAS CONCENTRACIONES DE CO2* . Obtenido de UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS : <https://eprints.ucm.es/id/eprint/12088/1/T32689.pdf>
- Laffort. (10 de 12 de 2019). Obtenido de Zymaflore VL1: <https://laffort.com/es/productos/zymaflore-vl1/>
- Laffort. (10 de 12 de 2019). Obtenido de Thiazote: <https://laffort.com/es/productos/thiazote/>
- Laffort. (10 de 12 de 2019). Obtenido de Superstart: <https://laffort.com/es/productos/superstart/>
- Molina Úbeda, R. (2000). *Teoría de la Clarificación de Mostos y Vinos y sus Aplicaciones Prácticas*. Madrid: Mundi Prensa .
- Oreglia, F. (1978). *Enología Teórico Práctica*. Buenos Aires: Instituto Salesiano de Artes Gráficas .

- Pereira, C. (2014). *Estabilización Proteica En Vinos Blancos: Estudio Y Comparación De Distintas Alternativas Para Sauvignon Blanc*. Mendoza: Universidad Nacional de Cuyo.
- QuimiNet. (13 de Junio de 2014). *QuimiNet.com*. Obtenido de Las Nanoarcillas mejoran la retardancia a la flama de los plásticos:
<https://i.mkt.lu/cont/1632084/486/376/fqc-nanoarcilla-1.jpg>
- Ribéreau Gayón. (2003). *Tratado de Enología: Química del Vino Estabilización y Tratamientos*. Mundi-Prensa.
- Richardi, N. (12 de Octubre de 2019). Entrevista Estudio Estabilización Proteica en Vino Chardonnay con taninos Enológicos. (A. Molinar, Entrevistador)
- Richardi, N. (Octubre de 2019). Exposición Sobre Taninos Enológicos.
- Sarmiento, M. (2000a). *Influence of Intrinsic factors on conventional wine protein stability tests*. Food Control.
- Togores, J. H. (2003). *Tratado de Enología*. Madrid: Mundi-Prensa .
- Urbina, V. (16 de Mayo de 2013). *Urbina Vinos Blog*. Obtenido de Clarificantes Sintéticos para el Vino: Poliamida, Polivinilpirrolidona (PVP), Polivinilpolipirrolidona (PVPP):
<http://urbinavinos.blogspot.com/2013/05/clarificantes-sinteticos-para-el-vino.html>
- Urbina, V. (15 de Mayo de 2013). *Urbina Vinos Blog*. Obtenido de Clarificación de los vinos con bentonita: <http://urbinavinos.blogspot.com/2013/05/clarificacion-de-los-vinos-con-bentonita.html>
- Viña, S. Z. (2013). Compuestos fenólicos. En J. A. Ringuelet, & S. Z. Viña, *Productos Naturales Vegetales* (pág. 109). La Plata: Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.
- Wikipedia. (21 de Abril de 2021). Obtenido de Estructura de las proteínas:
https://es.wikipedia.org/wiki/Estructura_de_las_prote%C3%ADnas

Wikipedia. (21 de Mayo de 2021). Obtenido de Nomenclatura de aminoácidos:

https://es.wikipedia.org/wiki/Nomenclatura_de_amino%C3%A1cidos

Wikipedia. (Junio de 2021). *Wikipedia*. Obtenido de Quitinasa:

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chitinase-1CNS.png>

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Contenido en proteínas de los mostos y vinos de diferentes variedades expresado en mg/L. (Flanzy, 2000)</i>	9
Tabla 2 <i>Aminoácidos Termolábiles (en gramos por litro) (Flanzy, 2000)</i>	12
Tabla 3 <i>Turbidez originada y porcentaje de disminución de proteínas totales solubles</i> .	29
Tabla 4 <i>Capacidad de taninos procianidínicos para precipitar proteínas</i>	29
Tabla 5 <i>Composición química de la uva en el ingreso</i>	40
Tabla 6 <i>Dosis de taninos</i>	41
Tabla 7 <i>Composición química de los vinos terminados</i>	44
Tabla 8 <i>Resultados de test de prótidos a vino con tanino agregado en fermentación</i>	46
Tabla 9 <i>Resultados test de prótidos en ensayos con dosis crecientes de bentonita</i>	47
Tabla 10 <i>Dosis de bentonita necesarias para lograr la estabilidad</i>	51
Tabla 11 <i>Concentración aprox. de taninos totales presentes en los ensayos en barrica</i>	52

Índice de figuras

Figura 1 Estructura aminoácido	Figura 2 Estructura enlace peptídico.....	7
Figura 3 Estructura molecular aminoácidos termolábiles.....		12
Figura 4 Estructura molecular tridimensional Taumatina (Alonso, 2010)		14
Figura 5 Estructura molecular tridimensional quitinasa (Wikipedia, 2021)		15
Figura 6 Estructura molecular β -1,3 glucanasa (Deyanira, 2006)		15
Figura 7 Agallas en tejidos vegetales (Viña, 2013)		19
Figura 8 Taninos condensados o procianidínicos (Molina Úbeda, 2000)		20
Figura 9 Ácido Gálico (M. Úbeda, 2000)	Figura 10 Galotanino (M. Úbeda, 2000)	21
Figura 11 Ácido elágico (M. Úbeda, 2000)	Figura 12 Elagitanino (M. Úbeda, 2000) ..	22
Figura 13 Diferenciación de taninos por curvas de absorción en luz UV. (Richard, Entrevista Estudio Estabilización Proteica en Vino Chardonnay con taninos Enológicos, 2019).....		23
Figura 14 Puente hidrógeno entre proteínas y polifenoles.....		25
Figura 15 Esquema del mecanismo de floculación de las proteínas del vino.....		26
Figura 16 Mecanismos de coagulación y floculación de prótidos entre pH 3,2 – 3,6 (Molina Úbeda, 2000).....		27
Figura 17 Estructura de la bentonita.....		33
Figura 18 Curva de absorbancia en luz UV de tanino procianidínico empleado en los ensayos.....		42
Figura 19 Curvas de cinética fermentativa en bidones y barricas		43
Figura 20 Diagrama de flujo del proceso productivo		45

Índice General

Agradecimientos	3
Introducción	4
Capítulo I Proteínas	7
Capítulo II Quebradura proteica	11
2.1- Factores que producen la insolubilización de prótidos.	16
Capítulo III Taninos	19
3.1- Taninos condensados o procianidínicos.	20
3.2- Taninos hidrolizables.	21
3.2.1- Los Galotaninos.	21
3.2.2- Los Elagitaninos.	22
3.3- Reacción con proteínas.	24
3.4- Taninos de la madera de roble.	30
Cálculo del enriquecimiento en taninos Elágicos, aportado por una barrica nueva	31
Capítulo IV Bentonita	33
4.1- Bentonita, coloides y aromas	36
4.2- Dosis de bentonita.	37
Capítulo V Materiales y Método	39
5.1- Elaboración del vino con taninos en fermentación	39

Capítulo VI Resultados	46
6.1- Resultados de test de prótidos a vino con tanino agregado en fermentación.	46
6.2- Resultados de test de prótidos a ensayos con dosis de bentonita	47
Capítulo VII Conclusiones	50
Índice Bibliográfico	54
Índice de tablas	58
Índice de figuras	59
Índice General	60