

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
APLICACIÓ DE TÈCNIQUES DE CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA DE PROTEÏNES (FPLC) A L'ESTUDI DE VINS BLANCS  
Joan Miquel Canals Bosch  
DL:T-1570-2009/ISBN: 978-84-692-4529-3





8

0,100-89460



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI



Fernando Zamora Marín  
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA  
Escola d'Enologia  
Ramón y Cajal, 70  
43005  
Tel. (977) 230 334  
Fax

**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**  
**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA**

Dr. Fernando Zamora Marín, Professor Titular d'Escola Universitària de Bromatologia i Nutrició del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili,

FA CONSTAR,

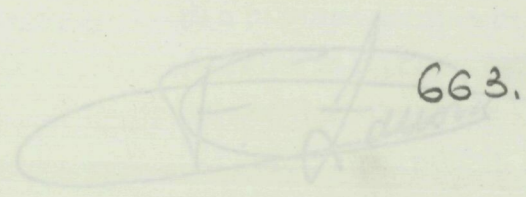
que el present treball, amb el títol "APLICACIÓ DE TÈCNiques DE CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA DE PROTEÏNES (FPLC) A L'ESTUDI DE VINS BLANCS" que presenta en JOAN MIQUEL CANALS I BOSCH, per optar al Grau

---

**APLICACIÓ DE TÈCNiques DE CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA DE PROTEÏNES (FPLC) A L'ESTUDI DE VINS BLANCS.**

I perquè se'n prengui coneixement i tingui els efectes que correspongui, signa aquesta certificació.

---

 663.253 Can <sup>(NP)</sup>

Dr. Fernando Zamora Marín

Memòria presentada per  
**JOAN MIQUEL CANALS I BOSCH**  
per optar al grau de Doctor en Ciències Químiques  
sota la Direcció del Dr. Fernando Zamora Marín  
EXCLÒS DE PRÉSTEC









UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

Fernando Zamora Marín  
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I  
BIOTECNOLOGIA  
Escola d'Enologia  
Ramón y Cajal, 70  
43005-Tarragona  
Tel. (977) 250 358  
Fax (977) 250 347

Dr. Fernando Zamora Marín, Professor Titular d'Escola Universitària de Bromatologia i Nutrició del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili,

FA CONSTAR,

que el present treball, amb el títol "APLICACIÓ DE TÈCNiques DE CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA DE PROTEÏNES (FPLC) A L'ESTUDI DE VINS BLANCS" que presenta en JOAN MIQUEL CANALS I BOSCH, per optar al Grau de Doctor en Ciències Químiques per la Universitat Rovira i Virgili, ha estat realitzat sota la seva direcció, i que tots els resultats obtinguts són fruit dels experiments duts a terme per l'esmentat doctorand.

I perquè se'n prengui coneixement i tingui els efectes que correspongui, signa aquesta certificació.

Dr. Fernando Zamora Marín

Tarragona, octubre de 1997



**A la Mariajo i als meus pares,  
sense els quals aquest treball  
no hauria reeixit.**

Si a la vinya madura hi ha el cant de la verema  
Al celler hi ha el perfum del most que va rajant  
del corró acanalat que els raïms va esclafant  
i la premsa que potent, la brisa esprema...

J. M. Font  
La Granada, Alt Penedès.





**La present Tesi Doctoral ha estat realitzada en els laboratoris de l'Escola d'Enologia i en el laboratori del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, sota el finançament de la CICYT (subvencions nº ALI 94-0505 i nº ALI 95-0887-C04-01) .**





## **Agraïments.**

Al finalitzar aquest treball voldria mostrar el meu agraïment a totes les persones que han fet possible escriure aquestes lletres.

Al Dr. Fernando Zamora, que des del començament em va ajudar, recordo ara aquells dies al laboratori de Bioquímica esperant per destenyir els primers gels a veure si sortien les bandes... Sempre s'ha implicat al màxim i aquest treball es fruit també de la seva tenacitat a la cerca de l'incògnit.

Al Dr. Lluís Arola vull agrair la claretat amb que veu les coses fins i tot a la foscor.

A la Cinta i la Montse, que han estat com unes germanes grans a les meves "correrries" per Tarragona i després han estat unes "supporters" magnífiques en tot el meu procés de maduració científica i sobretot humana.

Al departament he trobat uns companys que en tot moment m'han recolzat i donat moral i ajuda, tan a nivell de professors com de tècnics. Recordo especialment al Jordi Cartanyà, que em va ajudar molt als inicis de la cuina de l'electroforesi...

A l'escola he estat com un rei, per una persona que estima el vi com jo treballar a aquest lloc és un orgull i una responsabilitat molt gran; per això vull agrair molt sincerament a tots els companys que ens veiem cada dia la seva amabilitat en el tracte i la seva comprensió en aquests últims temps d'acceleració doctoral. La bibliografia no hauria set el mateix sense la Xose i la Inma, que mantenen la biblioteca al dia en tots els aspectes.

Companys de tesi n'he tingut molts en aquests cinc anys. Anomenar-los seria tasca feixuga i segur que m'en deixo algun, així que ja ho sabeu: sou els millors!!.

A la Francesca, companya de despatx, li he d'agrair les moltes hores compartides, que han tratat una bona amistat.

A tots els meus amics (ells ja saben qui són) i família (especialment els més petits/es), que tot i ser els últims a citar són els que més presents tinc, tot i les meves darreres absències.



---

## Índex

---

<b>PLANTEJAMENT INICIAL I OBJECTIUS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Origen de les proteïnes en els mostos i vins.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Quantificació de la proteïna total en mostos i vins. ....</b>	<b>9</b>
2.1. Nitrogen total pel mètode de Kjendahl.....	9
2.2. Mètode de Biuret.....	10
2.3. Mètode de Lowry.....	10
2.4. Espectres d'absorció UV.....	10
2.5. Mètode de Bradford.....	11
2.6. Altres mètodes.....	12
2.7. Resum de quantificació de diferents autors.....	12
<b>3. Mètodes d'aïllament i concentració utilitzats en proteïnes del vi.....</b>	<b>15</b>
3.1. Precipitació i centrifugació.....	15
3.2. Diàlisi.....	16
3.3. Filtració per gel o cromatografia d'exclusió molecular.....	17
3.4. Ultrafiltració.....	17
<b>4. Mètodes de separació i caracterització de les proteïnes del most i vi. ....</b>	<b>19</b>
4.1. Cromatografia en columna oberta.....	20
4.1.1. Filtració per gel o exclusió molecular.....	20
4.1.2. Bescanvi iònic.....	20
4.1.3. Altres rebliments.....	21
4.2. Cromatografia líquida de proteïnes (FPLC).....	22
4.3. Cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC).....	23
4.4. Electroforesi en gels de poliacrilamida.....	25
4.5. Electroforesi capil·lar.....	30
4.6. Estudis dels aminoàcids de les proteïnes dels vins.....	34
<b>5. Factors que afecten a la concentració i distribució de les proteïnes. ....</b>	<b>37</b>
5.1. Efecte de la varietat vinífera.....	37
5.2. Influència del clima.....	37
5.3. Producció.....	38
5.4. Maduració del raïm.....	38





## II

5.5. Verema.....	38
5.6. Obtenció del most .....	38
5.7. Fermentació alcohòlica.....	39
5.8. Tractaments postfermentatius.....	41
5.9. Efecte de la criança i envelliment.....	3942
<b>6. Impòrtancia de les proteïnes sobre la qualitat dels vins.....</b>	<b>43</b>
6.1. Estabilitat dels vins vers les proteïnes.....	43
6.1.1. Mètodes de control de l'estabilitat.....	45
6.1.2. Estabilització de les proteïnes termolàbils.....	47
6.1.2.1. Proteases.....	48
6.1.2.2. Clarificació.....	49
6.1.2.3. Col·loides protectors.....	53
6.2. Vins escumosos.....	54
6.2.1. Mètodes per determinar la qualitat de l'escuma.....	56
6.2.2. Influència de les proteïnes sobre l'escuma.....	58
6.2.3. Efectes dels tractaments enològics.....	60
6.3. Efectes de les proteïnes sobre l'anàlisi organolèptic dels vins.....	61
6.3.1. Efectes sobre les aromes.....	61
6.3.2. Efectes sobre el gust.....	61
<b>MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>63</b>
<b>1. Materials.....</b>	<b>65</b>
1.1. Celler i vinyes experimentals "El Mas dels Frares".....	65
1.2. Raïm emprat per l'experiència.....	67
1.2.1. Pinot noir.....	67
1.2.2. Chardonnay.....	69
1.2.3. Macabeu.....	69
1.2.4. Xarel·lo.....	70
1.2.5. Parellada.....	70
<b>2. Mètodes.....</b>	<b>71</b>
2.1. Seguiment de la maduració.....	71
2.2. Procés d'elaboració dels vins base per escumós.....	72
2.3. Elaboració del vi en barriques de roure.....	74
2.4. Anàlisi dels vins.....	74
2.4.1. Grau alcohòlic provable.....	75
2.4.2. Acidesa total.....	75

2.4.3. Diòxid de sofre lliure i total .....	75
2.4.4. Densitat .....	75
2.4.5. Materies reductores .....	75
2.4.6. Greu alcohòlic .....	75
2.4.7. Àcid acètic .....	76
2.5. Preparació de la mostra .....	76
2.6. Determinació de la proteïna total soluble. ....	76
2.7. Determinació dels glúcids totals. ....	77
2.8. Cromatografia líquida de proteïnes a baixa pressió (FPLC). ....	77
2.8.1. Exclusió molecular .....	77
2.8.2. Bescanvi catiònic .....	78
2.9. Electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants..	79
2.10. Isoelectroenfocament .....	80
2.11. Tractament estadístic de les dades. ....	80
<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ. ....</b>	<b>81</b>
<b>CAPÍTOL 1. Estudi del mètode de separació i quantificació. ....</b>	<b>81</b>
1.1. Estudi del mètode de determinació de proteïnes. ....	85
1.2. Estudi de la diàlisi. ....	86
1.3. Separació per exclusió molecular. ....	87
1.4. Separació per bescanvi catiònic. ....	92
1.5. Metodologia de quantificació. ....	97
1.6. Conclusions del capítol 1. ....	99
<b>CAPÍTOL 2. Elaboració dels vins base per escumós. ....</b>	<b>101</b>
2.1. Característiques dels vins. ....	103
2.2. Concentracions i evolució de la proteïna total. ....	106
2.3. Evolució de les fraccions separades per exclusió molecular. ....	108
2.4. Separació de la fracció de baixa massa molecular per bescanvi catiònic. ....	112
2.5. Conclusions del capítol 2. ....	126
<b>CAPÍTOL 3. Vinificació en barrica. ....</b>	<b>127</b>
3.1. Evolució de la concentració total de proteïna. ....	129
3.2. Separació per exclusió molecular. ....	131
3.3. Separació per bescanvi catiònic. ....	133

*IV*

3.4. Conclusions del capítol 3. ....	136
<b>CAPÍTOL 4. Estudi de maduració del raïm.....</b>	<b>137</b>
4.1. Seguiment de la maduració. ....	139
4.2. Evolució de la proteïna total. ....	141
4.3. Evolució de les fraccions separades per exclusió molecular. ....	143
4.4. Evolució de les fraccions separades per bescanvi catiònic de la fracció de baixa massa molecular. ....	147
4.5. Conclusions del capítol 4. ....	160
<b>CAPÍTOL 5. Identificació varietal. ....</b>	<b>161</b>
<b>CONCLUSIONS GENERALS.....</b>	<b>169</b>
<b>BIBLIOGRAFIA. ....</b>	<b>173</b>



---

# **Plantejament inicial i objectius.**

---



## **Plantejament inicial**

Les proteïnes del most i del vi es troben en concentracions molt baixes, de l'ordre de miligramms per litre (Dubourdieu i col., 1981). Tot i aquesta baixa quantitat presenten una gran importància tecnològica degut a les seves propietats físico-químiques. Aquesta família de molècules, junt amb els polisacàrids, formen el que s'anomenen els col·loides del vi. L'excés de proteïnes en el vi provoca precipitacions indesitjables per la imatge del producte; degut a desnaturalitzacions per la calor, per combinacions amb polifenols o metalls (Hsu i Heatherbell, 1987a, b; Waters i col., 1991).

Però la seva presència té un paper fonamental a les característiques organolèptiques del vi, tan a nivell aromàtic com a fixadores d'aromes (Lubbers i col., 1993), com gustatiu aportant sensació de cos i volum al vi (Glories, 1976; Waters i col., 1996). També s'ha observat la participació de les proteïnes, degut a les seves propietats com a tensioactius, a la formació i estabilització de l'escuma en begudes carbonatades, com la cervesa (Bamforth, 1985 i 1993) o els vins escumosos (Brissonnet i Maujean, 1991; Malvy i col., 1994). Tanmateix l'estudi de les proteïnes també permet abordar la caracterització varietal (Correa i col., 1988; Gonzalez-Lara i col., 1989; Pueyo i col., 1993), tal com ja s'ha fet en estudis ampelogràfics (Bachman i Blaich, 1988; Benin i col., 1988; Tedesco i col., 1997).

Al llarg del procés de vinificació, des de la vinya fins a l'embotellat, es produeixen canvis en el contingut i composició proteica. Algunes proteïnes s'insolubilitzen, d'altres són hidrolitzades per proteases o transferides al vi per autòlisi. L'aparició de l'alcohol actua com a agent desnaturalitzant i la temperatura de emmagatzament i el pH també influeixen a la seva solubilitat (Feuillat, 1995). Els tractaments que més influeixen sobre la concentració de proteïnes són la filtració (Ayestaran i col., 1995) i la clarificació, ja sigui de mostos o de vins. Els clarificants que tenen un efecte més fort sobre les proteïnes són la bentonita i els tanins, mentre que la resta de productes no tenen massa poder desproteïnitant (Moio i Addeo, 1989). Els tractaments criogènics del vi serveixen per eliminar l'excés de sals, però també redueixen la concentració de proteïnes (Dizy, 1993). Altres factors que afecten les proteïnes del vi són les condicions edàfiques (Bayly i Berg, 1967), el clima i el moment de la verema (Murphey i col., 1989b).

A l'actualitat les tècniques de clarificació i filtració que s'empren en els cellers són aplicades de manera sistemàtica i arbitrària. El tipus de tècnica o producte a aplicar són fruit de la rutina o de la moda. Les dosis dels additius estan escollides en funció d'assaigs realitzats en vins que no tenen perquè comportar-se igual als vins del nostre país. Per un

correcte condicionament dels vins de les varietats autòctones o forànies però sotmesos als condicionants del nostre país es fa necessari aprofundir en el coneixement de la fracció proteica i com influeixen els diferents processos de la vinificació sobre aquesta.

Una primera necessitat és implantar un mètode de separació de les proteïnes del vi i amb aquest mètode desenvolupat es podrà conèixer com influencia la vinificació en tots els seus aspectes en les diferents fraccions. De la mateixa manera es podrà veure els efectes de cada fracció sobre propietats que s'atribueixen a les proteïnes en general, com ara l'estabilitat col·loidal o la qualitat de l'escuma.

### **Objectius**

1. Posar a punt una tècnica de separació de proteïnes aplicable a vins, que permeti quantificar d'una manera repetitiva.
2. Observar els canvis que succeeixen en aquestes proteïnes al llarg del procés de vinificació de vins base per escumós.
3. Estudiar quins canvis es produeixen a la fermentació en barriques de roure a nivell de composició proteica.
4. Estudiar el comportament de les proteïnes a la maduració del raïm.
5. Aprofundir en l'estudi de la caracterització varietal de les proteïnes dels vins.

---

---

# Introducció.

---

---

## **Index de la introducció**

<b>1. Origen de les proteïnes en els mostos i vins. ....</b>	<b>7</b>
<b>2. Quantificació de la proteïna total en mostos i vins. ....</b>	<b>9</b>
2.1. Nitrogen total pel mètode de Kjendahl. ....	9
2.2. Mètode de Biuret. ....	10
2.3. Mètode de Lowry. ....	10
2.4. Espectres d'absorció UV. ....	10
2.5. Mètode de Bradford ....	11
2.6. Altres mètodes. ....	12
2.7. Resum de quantificació de diferents autors. ....	12
<b>3. Mètodes d'aïllament i concentració utilitzats en proteïnes del vi. ....</b>	<b>15</b>
3.1. Precipitació i centrifugació. ....	15
3.2. Diàlisi. ....	16
3.3. Filtració per gel o cromatografia d'exclusió molecular ....	17
3.4. Ultrafiltració. ....	17
<b>4. Mètodes de separació i caracterització de les proteïnes del most i vi. ....</b>	<b>19</b>
4.1. Cromatografia en columna oberta. ....	20
4.1.1. Filtració per gel o exclusió molecular. ....	20
4.1.2. Bescanvi iònic. ....	20
4.1.3. Altres rebliments ....	21
4.2. Cromatografia líquida de proteïnes (FPLC). ....	22
4.3. Cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC). ....	23
4.4. Electroforesi en gels de poliacrilamida. ....	25
4.5. Electroforesi capil·lar. ....	30
4.6. Estudis dels aminoàcids de les proteïnes dels vins. ....	34
<b>5. Factors que afecten a la concentració i distribució de les proteïnes. ....</b>	<b>37</b>
5.1. Efecte de la varietat vinífera. ....	37
5.2. Influència del clima. ....	37
5.3. Producció. ....	38
5.4. Maduració del raïm. ....	38
5.5. Verema. ....	38
5.6. Obtenció del most ....	38
5.7. Fermentació alcohòlica. ....	39
5.8. Tractaments postfermentatius. ....	41
5.9. Efecte de la cria i envelliment. ....	42
<b>6. Importància de les proteïnes sobre la qualitat dels vins. ....</b>	<b>43</b>
6.1. Estabilitat dels vins vers les proteïnes. ....	43
6.1.1. Mètodes de control de l'estabilitat. ....	45
6.1.2. Estabilització de les proteïnes termolàbils. ....	47
6.1.2.1. Proteases. ....	48
6.1.2.2. Clarificació. ....	49
6.1.2.3. Col·loides protectors. ....	53
6.2. Vins escumosos. ....	54
6.2.1. Mètodes per determinar la qualitat de l'escuma. ....	56
6.2.2. Influència de les proteïnes sobre l'escuma. ....	58
6.2.3. Efectes dels tractaments enològics. ....	60
6.3. Efectes de les proteïnes sobre l'anàlisi organolèptic dels vins. ....	61
6.3.1. Efectes sobre les aromes. ....	61
6.3.2. Efectes sobre el gust. ....	61

## **1. Origen de les proteïnes en els mostos i vins.**

Les substàncies proteiques dels vins poden tenir orígens diversos, el més normal és l'origen vegetal, es a dir, proteïnes que s'alliberin en el most al trencar-se el gra de raïm. Una altre font de proteïnes són les microorganismes que es desenvolupen en el raïm que provoquen les conegudes com malalties criptogàmiques. Altres microorganismes que es troben al most o vi alliberen substàncies proteiques bé per degradació o per secreció. Les substàncies més alienes que poden deixar proteïnes en suspensió o dissolució són alguns additius que s'hagin afegit al most o vi al llarg del seu procés d'elaboració.

Les proteïnes enzimàtiques provinents del raïm són les polifenol oxidases, les pectinases, les lipoxigenases, les proteases, etc (Jackson, 1994). Un altre grup de proteïnes que es pot trobar en els mostos, originaries de la baia, són les que actuen com a defensa dels atacs de les fongs patògens, restant en el vi i provocant alguns problemes d'estabilitat (Waters i col., 1996). També s'han identificat glucoproteïnes d'origen vegetal en mostos (Paetzold i col. 1990) i en vins (Waters i col., 1994c; Marchal i col., 1996).

Les proteïnes originades per microorganismes es podrien subdividir en les cedides per llevats i les alliberades pel fong filamentós *Botrytis cinerea*; els llevats aporten al vi manoproteïnes estructurals de la paret cel·lular i en el procés de degradació cel·lular postfermentativa conegut com autòlisi s'alliberen petits pèptids i proteases. Un dels efectes de la infecció del fong patògen *Botrytis cinerea* és l'enriquiment del most en una polifenol oxidasa anomenada Lacasa d'una gran resistència al diòxid de sofre i difícil d'eliminar.

Durant l'elaboració del vi s'addicionen com agents clarificants proteïnes d'origen animal que poden deixar residus (Watts i col., 1981). Aquestes proteïnes són la caseïna, generalment addicionada en forma de la seva sal potàssica, la gelatina, la cola de peix, l'albumina de sang i l'albumina d'ou. Aquestes dues últimes més utilitzades en vins negres, mentre que les dues primeres en blancs i rosats. La gelatina és el clarificant proteic més polivalent i àmpliament utilitzat.

La majoria de totes aquestes proteïnes tenen un punt isoelèctric (pI) més gran que el pH del vi en el que s'alliberen o s'addicionen, això implicarà que tinguin una carrega positiva neta, que tot i que ajuda a la seva solubilitat, també indueix a una reactivitat amb les substàncies amb densitat de carrega negativa del vi, particularment amb els compostos fenòlics. Els compostos fenòlics que poden reaccionar amb les proteïnes són els àcids fenòlics i sobretot els flavonoides. L'associació entre els polifenols i les proteïnes és un fenomen de superfície: existeixen interaccions molt fortes entre els anells aromàtics dels fenols i les zones hidrofòbiques de les proteïnes (Loomis, 1974).



A més també es formen ponts d'hidrogen entre els grups hidroxil dels fenols i els àtoms d'oxigen de l'enllaç peptídic. Altres tipus de reaccions amb menys importància són la unió covalent de les proteïnes amb les quinones i la interacció iònica (Vilter, 1990; Ricardo-da-Silva i col., 1991).

## **2. Quantificació de la proteïna total en mostos i vins.**

Els mètodes de determinació de proteïnes són derivats d'altres camps del coneixement pel que solen tenir problemes d'aplicació degut a la complex composició química del vi, que pot donar interferències. Així els mètodes que s'utilitzen en teixits animals que són poc sensibles o bé presenten interferències dels compostos fenòlics en el cas del vi (Potty, 1969; Brenna i Vecchi, 1990). Altres mètodes poden tenir interferències per massa molecular, al determinar com a proteïna altres substàncies nitrogenades de inferior massa molecular. En la majoria de mètodes hi ha un pas previ de purificació de la mostra i eliminació de la matriu (Correa i Polo, 1991).

La disparitat de mètodes fa que hi hagi un ampli ventall de valors; el contingut total de proteïna en vi blanc pot oscil·lar entre 10 i 275 mg/l segons el mètode emprat (Boulton, 1974). Diferents estudis troben valors entre 20 i 260 mg/l amb una mitjana de 116 mg/l pels vins de Califòrnia. Anelli (1977) estudia mostos italians i troba valors de proteïna entre 4,3 i 14,4 mg/l; observa que representen un  $2,05\% \pm 0,17$  del nitrogen total.

A continuació es descriuen els mètodes més utilitzats a la bibliografia per la determinació de proteïnes en vins.

### **2.1. Nitrogen total pel mètode de Kjendahl.**

La determinació del nitrogen total segons el mètode de Kjendahl es fa per mitjà d'una mineralització de la mostra amb àcid sulfúric en presència d'un catalitzador de seleni o mercuri. Quan la mostra està mineralitzada s'hi ajusta el pH fins a la neutralitat i es destil·la recollint l'amoníac sobre àcid bòric o àcid sulfúric en forma de sal amònica. En el cas de l'àcid bòric és valora amb clorhídric en presència de roig de metil i si es recull sobre sulfúric es valora l'excés d'àcid amb hidròxid sòdic i roig de fenol com indicador. Aquesta determinació fa una sobreestimació respecte a les proteïnes ja que en el vi també contenen nitrogen les vitamines, l'amoníac, els aminoàcids, els oligopèptids, les amines i els nitrats. Alguns autors proposen aïllar la proteïna i realitzar la determinació del nitrogen total sobre la fracció aïllada i multiplicar el resultat per 6,25 per expressar-ho com a proteïna, suposant que el contingut mitjà en nitrogen de les proteïnes dels mostos i vins és del 16% (Feuillat i col., 1972; Somers i Ziemelis, 1973; Amerine i Ought, 1974; Ribereau-Gayon i col., 1976). Tot i la precisió d'aquest mètode té el defecte de la seva lentitud.

## 2.2. Mètode de Biuret.

La reacció del Biuret està basada en la reacció característica de l'enllaç peptídic amb el sulfat de coure en medi alcalí. La intensitat de coloració depèn del nombre d'enllaços peptídics per gram de proteïna, però és independent de la seva massa molecular. Aquesta coloració presenta un màxim d'absorció a 545 nm. Però té el inconvenient de la interferència dels pèptids que causen una sobreestimació. Un altre font de sobreestimació és la reacció del  $\text{Cu}^{2+}$  amb els compostos fenòlics que, tot i no donar el mateix espectre d'absorció, influeix en la lectura de l'anàlisi.

La purificació prèvia de la mostra és imprescindible per la fiabilitat d'aquest mètode (Correa i Polo, 1991). Baily i Berg (1967), modifiquen el mètode restant a l'absorbència de la mostra i reactiu la deguda a la mateixa mostra sense el  $\text{CuSO}_4$  i troben resultats per mostos de raïm blanc entre 20 i 260 mg/l i per vins blancs de 30 a 275 mg/l.

## 2.3. Mètode de Lowry.

El mètode desenvolupat per Lowry el 1951 està basat en la capacitat dels complexos de coure i proteïna en reduir el reactiu de Folin Ciocalteu; ja el mateix autor cita la interferència dels compostos fenòlics (Lowry i col., 1951). Potty (1969) proposa una variació del mètode per proteïnes de plantes que consisteix en corregir el valor de l'anàlisi de Lowry (proteïnes i fenols) amb el valor que s'obté del reactiu de Folin sense afegir coure (fenols). Si les mostres tenen grans quantitats de fenols, l'autor aconsella precipitar i rentar amb etanol al 67% per eliminar els compostos fenòlics. Baily i Berg (1967) donen resultats de 500 mg/l en vins model i després de diàlisi observen que les concentracions són molt més baixes, atribuint la variació als petits pèptids. Resultats en vins Portuguesos donen valors entre 285 i 502 mg/l, prèvia separació dels col·loides per exclusió molecular en un gel Sephadex G-25 (Dorrestein i col., 1995), aquests valors tan alts poden ser deguts a polifenols adsorbits per les macromolècules (Correa i Polo, 1991; Waters i col., 1995b).

## 2.4. Espectres d'absorció U.V.

Degut a la gran quantitat de compostos que té el vi no es possible la detecció directa de les proteïnes per mitjà d'una lectura d'absorbència a 280 nm, longitud d'ona típica de detecció de proteïnes. Alguns autors, malgrat tot, utilitzen la lectura a 280 nm del pic que apareix en el volum d'exclusió d'una columna amb rebliment de Sephadex G-25 (Somers i Ziemelis, 1973). Aquest mètode està basat en la baixa contribució dels compostos fenòlics a l'espectre ultravioleta dels vins blancs (Somers i Ziemelis, 1972).

S'ha de fer una calibració prèvia que els autors realitzaren amb albúmina bovina i amb la mesura del nitrogen total (mesurat pel mètode Kjendahl) i multificant pel factor 6,25. Les concentracions de proteïna en vins trobada estan entre 50 i 840 mg/l. Tyson i col. (1981) i Interesse i col. (1987) utilitzen un mètode semblant, però amb columnes d'exclusió molecular en cromatografia líquida d'alta eficàcia. També han utilitzat la cromatografia líquida d'alta eficàcia Dubordieu i col. (1986), amb dues columnes d'exclusió montades en sèrie, però amb diferents talls d'exclusió molecular. Aquests autors mesuren els polisacàrids per l'índex de refracció i la proteïna a 225 nm i es quantifica calibrant amb albúmina de sèrum boví (ASB). Els autors donen valors de 346 mg/l per un vi blanc en rama i de 29 mg/l per un vi estabilitzat. Els valors de proteïna obtinguts pels mètodes espectrofotomètrics de lectura directa són tots molt elevats probablement degut a la interferència d'altres compostos, possiblement polisacàrids (Correa i Polo, 1991).

### 2.5. Mètode de Bradford.

El mètode proposat per Bradford (1976) utilitza el colorant blau brillant de Coomassie G-250 per quantificar la proteïna present en una solució. Quan el blau brillant de Coomassie G-250 s'uneix a la proteïna forma un complex de color blau amb un màxim d'absorció a 595 nm. Aquest reactiu ha tingut gran acceptació en tots els camps. Fou usat directament sobre la mostra per Hsu i Heatherbell (1987a) amb valors de 58 mg ASB/l per mostos i de 29 mg ASB/l en vins. En un treball de Murphey i col. (1989a) troben que la velocitat de formació del complex proteïna-blau brillant de Coomassie G-250 en vins és més lenta que en altres tipus de mostres, com a conseqüència de l'unió del grups carregats de les proteïnes amb compostos fenòlics. Segons aquests autors, donada la complexitat d'aquesta interacció, el temps de reacció òptim depèn del tipus de vi; de totes maneres recomanen un temps d'incubació de 55 minuts a temperatura ambient. Altres autors observen una interferència entre les proteïnes i els compostos fenòlics (Delcour col., 1981; Brenna i Vecchi, 1990), pel que Brenna i Vecchi proposen un mètode de separació prèvia amb Sephadex G-25, aïllant la proteïna dels polifenols, que són retinguts per grossària i hidrofobicitat. Aquests mateixos autors observen que el temps de reacció no influeix ja que l'absorbència gairebé no canvia entre 10 i 80 minuts, mentre que la lectura del espectrofotometre augmenta al incrementar el ratio mostra respecte reactiu, verificant-ho entre un rang de 20 al 80% de mostra. En alguns treballs es troben variacions en la relació volumètrica entre la mostra i el reactiu (Waters i col., 1991), altres treballs modifiquen les condicions de reacció alcalinitzant la mostra cinc minuts abans de l'addició del reactiu (Dawes i col., 1994).

Una comparació entre el mètode de Bradford i el de Lowry prèvia precipitació en etanol de la mostra es troben valors entre 42 i 13 mg/l pel primer mètode i d'entre 47 i 278 mg/l pel segon (Weetall i col., 1984). Pel mètode de Bradford, Gonzalez-Lara i col. (1989) troben concentracions en mostos de varies zones d'Espanya d'entre 15 i 45 mg ASB/l i Dizy (1993) entre 40 i 70 mg ASB/l en mostos de Malvar, varietat típica de la Denominació d'Origen *Vinos de Madrid*. En vins base per escumosos de la Denominació d'Origen Cava s'obtenen concentracions entre 20 i 50 mg/l per mostos i entre 6 i 16 mg/l per vins (Pueyo i col., 1993).

## 2.6. Altres mètodes.

Yokotsuka i col. (1978) proposen la utilització del negre de Amido 10B per la determinació de la quantitat de proteïnes en suc de fruites, mostos i vins; les mostres s'han de sotmetre abans a una separació que els autors feien amb àcid tricloroacètic o amb àcid perclòric, trobant resultats semblants. Lamikanra (1987 i 1988) determina el  $\alpha$ -amino nitrogen amb ninhidrina i ho assimila a proteïna total.

Un altre mètode consisteix en determinar la quantitat de proteïna per la suma del aminoàcids, que es quantifiquen per cromatografia líquida d'alta eficàcia, previ aïllament i hidròlisi àcida (Yokotsuka i col., 1977; Belleville i col., 1993). La detecció i quantificació dels aminoàcids es poden determinar conjuntament per varis mètodes: el mètode de Soerensen; la reacció amb ninhidrina o la reacció amb 1 fluoro-2,4 dinitrobenzè (DNFB). També es pot quantificar amb cromatografia líquida d'alta eficàcia i detector de fluorescència, fent els corresponents derivats fluorescents de cada aminoàcid.

Waters i col. (1991) comparen les concentracions obtingudes pel mètode de Bradford i per la suma dels aminoàcids prèvia hidròlisi àcida. En aquest treball es veu una baixa reactivitat de diferents fraccions proteiques del vi, separades per precipitació amb sulfat d'amòni, vers el blau brillant de Coomassie G-250 respecte al mateix càlcul de la concentració per la suma d'aminoàcids. Les dades del Bradford oscil·len entre un 20% i un 50% respecte el valor calculat per la suma d'aminoàcids, segons la fracció proteica separada. Altres autors troben que moltes proteïnes donen poca coloració amb la reacció de Bradford respecte a l'albumina de sèrum bovina (Read i Northcote, 1981).

## 2.7. Resum de quantificació de diferents autors.

En aquesta taula es resumeixen les concentracions de proteïnes així com la metodologia emprada. Les concentracions estan expressades en mg/l, utilitzant com a estàndard albumina de sèrum boví en el cas de les mesures fetes amb recta de calibrat.

Varietat vinífera	most	vi	Referència	Metodologia
Chardonnay	85-100	108 2-6 89-105 52 8 7	Feuillat i col., 1995 Brissonnet i Maujean, 1991 Bayly i Berg, 1967 Lubbers i col., 1995 Malvy i col., 1994 Marchal i col., 1996	Bradford diàlisi+Bradford modificat diàlisi+Biuret modificat ultrafiltració+Lowry/ Bradford Bradford
Sauvignon	9 80	27 72 79	Anelli, 1977 Hsu i Heatherbell, 1987a Bayly i Berg, 1967 Feuillat i col., 1995	dessalat+Kjeldahl Bradford diàlisi+Biuret modificat Bradford
Sémillon	11 55	30	Anelli, 1977 Bayly i Berg, 1967	dessalat+Kjeldahl diàlisi+Biuret modificat
Riesling	9 40 39-49 68-110	2 28-34 39-80 30 28-36	Yokotsuka i col., 1977 Anelli, 1977 Yokotsuka i col., 1978 Hsu i col., 1987 Murphey i col., 1989b Flores i col., 1990 Hsu i Heatherbell, 1987b	TCA+ negre amido 10A dessalat+Kjeldahl suma aminoàcids Bradford Bradford Bradford Bradford
Gewürztraminer	77 69-118	41 44-59 54-62 65-100 52-60 260	Hsu i Heatherbell, 1987a Hsu i Heatherbell, 1987b Hsu i col., 1987 Murphey i col., 1989b Flores i col., 1990 Dawes i col., 1994	Bradford Bradford Bradford Bradford Bradford Bradford modificat
Garnatxa	1-2 15-19		Correa i col., 1988 Gonzalez-Lara i col., 1989	Diàlisi+Bradford Bradford
Ull de llebre	3 10-27		Correa i col., 1988 Gonzalez-Lara i col., 1989	Diàlisi+Bradford Bradford
Airen	1-5 15-28		Correa i col., 1988 Gonzalez-Lara i col., 1989	Diàlisi+Bradford Bradford
Macabeu	3 21 23-38	7-13	Correa i col., 1988 Gonzalez-Lara i col., 1989 Pueyo i col., 1993	Diàlisi+Bradford Bradford Bradford
Xarel·lo	3-4 41-50	14-16	Correa i col., 1988 Pueyo i col., 1993	Diàlisi+Bradford Bradford
Parellada	20-42	6-7	Pueyo i col., 1993	Bradford
Malvar	50	31-45	Pueyo i col., 1993	Bradford
Zalema	26		Gonzalez-Lara i col., 1989	Bradford
Pedro ximenez	45		Gonzalez-Lara i col., 1989	Bradford
Cabernet sauvignon	22-30	70	Gonzalez-Lara i col., 1989 Yokotsuka i col., 1994	Bradford diàlisi+microkjeldahl
Merlot	45	48	Gonzalez-Lara i col., 1989 Yokotsuka i col., 1994	Bradford diàlisi+microkjeldahl
Pinot noir		77	Yokotsuka i col., 1994	diàlisi+microkjeldahl
Pinot blanc		95	Bayly i Berg, 1967	diàlisi+Biuret modificat
Sylvaner	90	70 20	Bayly i Berg, 1967 Hsu i Heatherbell, 1987b	diàlisi+Biuret modificat Bradford
Muscat Bayle A		44-57	Yokotsuka i col., 1994	diàlisi+microkjeldahl
Arinto		287	Dorrestein i col., 1995	desalatge+Lowry
Bical		422	Dorrestein i col., 1995	desalatge+Lowry
Fernao pires		503	Dorrestein i col., 1995	desalatge+Lowry
Vital		285	Dorrestein i col., 1995	desalatge+Lowry
Colombard	90		Bayly i Berg, 1967	diàlisi+Biuret modificat

Varietat vinifera	most	vi	Referència	Metodologia
Muscat:				
Moscatel	40-41		Gonzalez-Lara i col., 1989	Bradford
Higgins	33		Lamikanra, 1987	ninhidrina
Carlos	79	14	Lamikanra i Inyang, 1988	ninhidrina
Canelli	80	72	Bayly i Berg, 1967	diàlisi+Biuret modificat
Welder	133	30	Lamikanra i Inyang, 1988	ninhidrina
d'Alexandrie		113	Waters i col., 1992	Bradford modificat
	260	233	Bayly i Berg, 1967	diàlisi+Biuret modificat
		269	Somers i Ziemelis, 1973	dessalat+UV 280 nm



### **3. Mètodes d'aïllament i concentració utilitzats en proteïnes del vi.**

Tal com s'ha vist en el punt anterior la majoria dels mètodes de quantificació precisen un aïllament previ de la fracció de proteïna del vi o most; arribant a tenir més importància per la quantificació la bona separació de la fracció proteica que la reacció de quantificació en sí. Així com per la posterior separació de les proteïnes s'aïllen del medi a fi de concentrar-les. Algunes d'aquestes tècniques es poden utilitzar combinades.

#### **3.1. Precipitació i centrifugació.**

Aquest mètode consisteix en afegir al vi o most un agent precipitant i separar després per mitjà de centrifugació. En alguns casos els agents precipitants han de mantenir intacta l'estructura de la proteïna per realitzar estudis de la seva natura. Els agents més utilitzats són l'etanol, l'acetona, el sulfat amònic, l'àcid tricloroacètic i l'àcid perclòric. Tots els mètodes de precipitació tenen el inconvenient de l'adsorció de compostos de baixa massa molecular, sobretot polifenols, que poden interferir en les anàlisis (Waters i col., 1995a).

L'acetona i l'etanol presenten el inconvenient de la poca selectivitat, ja que també precipiten altres col·loides com els polisacàrids. Usseglio-Tomasset i Di Stefano (1977) precipiten amb etanol mostos, vins i medis sintètics per estudiar llurs col·loides. Altres autors precipiten els col·loides per determinar la concentració de proteïna al residu per mètodes que tenen interferències de pèptids i/o aminoàcids (Weetall i col., 1984; Feuillat i col., 1988; Feuillat i col., 1989). Aquesta precipitació també s'utilitza per glucoproteïnes, com a mètode preparatiu per una posterior separació d'aquestes (Belleville i col., 1993; Waters i col., 1994a; Santoro 1995). Tots aquests treballs precipiten les proteïnes amb una concentració d'etanol alta, que a la mostra final va del 70-80 % (v/v). Altres autors, en l'estudi de petits pèptids, utilitzen etanol per retirar del medi els col·loides d'alta massa molecular i evitar interferències (Moreno-Arribas i col., 1996). L'acetona es utilitza en fred (1:8 v/v) sobre mostres prèviament separades per electroforesi i extreïdes del gel per una posterior sequenciació (Santoro, 1995).

El sulfat amònic és un altre agent precipitant molt utilitzat, tot i que sempre ha d'anar lligat a una altra tècnica per separar la sal de les proteïnes. Koch i Sajak (1959) féren un dels primers treballs sobre proteïnes de vins i mostos utilitzant el sulfat amònic per aïllar les proteïnes. Radola i Richter (1972) ho empren en mostos seguit de ultrafiltració (porus nominal 10 kDa) per purificar el precipitat. Laminkara (1987) i Ollivier i col. (1987) treuen el sulfat d'amoni per mitjà de diàlisi amb l'objectiu de caracteritzar les proteïnes del raïm muscadelle i de most de Sauvignon respectivament.

Paetzold i col. (1990) precipiten amb sulfat amònic al 80% de la seva saturació (0,56 g/ml), treuen la sal amb una columna de Sephadex G-25 i liofilitzen després, obtenint 122 mg de pes sec amb 1 litre de most. Aquesta precipitació també es pot fer d'una manera fraccionada, afegint quantitats creixents de sulfat d'amoni des del 60% (0,39 g/ml), 65% (0,43 g/ml) i 70% (0,47 g/ml) de la saturació; recollint els precipitats de cada pas i el sobrenadant del 70% es concentra per ultrafiltració prèvia diàlisi i així es separen varies fraccions en un Muscat d'Alexandria (Waters, i col., 1991). Els mateixos Waters i col. (1992; 1993) precipiten amb sulfat d'amoni al 70% (0,47 g/ml) de la saturació, dessalen i concentren amb un dispositiu de ultrafiltració per centrifugació Centricon 10 (Millipore®). En un altre situació, analitzant les proteïnes en vins negres, concentren el vi amb rotavapor a baixa temperatura (menys de 40°C) abans de precipitar les proteïnes a una concentració del 80% de la saturació. El precipitat es centrifuga, dialitza contra aigua i liofilitza amb un rendiment de 20,6 mg/l (Yokotsuka i col., 1994).

Alguns treballs utilitzen altres agents precipitants com l'àcid tricloroacètic en mostos i vins dialitzats (Yokotsuka i col., 1977) o directament en mostos (Ayestaran i col., 1995). L'àcid perclòric com a agent precipitant dona resultats semblants a l'àcid tricloroacètic (Yokotsuka i col., 1978). La bentonita, un producte enològic molt utilitzat com a adjuvant de clarificació, també es pot considerar com un agent per aïllar les proteïnes del medi i després estudiar-les; el procediment es tractar el vi amb bentonita a dosi màxima per retirar totes les proteïnes del vi, una vegada separat el precipitat amb bentonita s'hi extreuen les proteïnes amb un tampó TRIS (pH 8,2; 0,1M) que conté 5% de clorur sòdic, es centrifuga la mostra i el sobrenadant que conté les proteïnes del vi es dialitza (Lamikanra i Inyang, 1988).

### 3.2. Diàlisi.

La diàlisi és un procés de preparació de la mostra amb fins sobretot preparatius, amb l'objectiu d'evitar les interferències de les substàncies de baixa massa molecular. Aquest mètode té l'avantatge de seleccionar la grandària molecular mínima de les substàncies retingudes, en funció del porus escollit de la membrana. La desavantatge principal és la dilució de la mostra, que després s'haurà de concentrar per algun altre mètode.

Els primers treballs on la diàlisi és el mètode d'aïllament de les proteïnes de vins i mostos són els de Moretti i Berg (1965), Baily i Berg (1967). En ells s'estudiava el problema de les precipitacions proteiques dels vins. També Radola i Ritchter (1972) l'utilitzaren per a caracteritzar les proteïnes de mostos, compararen aquest aïllament després de precipitar amb sulfat d'amoni i la ultrafiltració, sense trobar diferències significatives.

Una tècnica per concentrar després de la diàlisi és la osmosi inversa, per introducció dels sacs dialitzats en una solució al 20% de polietilenglicol (massa molecular 20 kDa), obtenint un concentrat que es pot acabar de concentrar per rotavapor a baixa temperatura (Correa i col., 1988; González-Lara i col., 1989; Correa-Gorospe i col., 1991; Brissonnet i Maujean, 1993). Una alternativa és la liofilització (Moio i Addeo, 1989; Brissonnet i Maujean, 1991; Pueyo i col., 1993; Yokotsuka i col., 1994). En treballs de separació de proteïnes per electroforesi capil·lar la diàlisi es fa contra el tampó d'elució i no es necessari concentrar la mostra ja que a la columna s'aconsegueix el mateix efecte amb tampons de menys conductivitat (Ledoux, i col., 1992; Luguera i col., 1997).

### 3.3. Filtració per gel o cromatografia d'exclusió molecular.

La filtració per gel amb un suport que tingui un volum d'exclusió de 4-5 kDa permet separar les substàncies més grans d'aquesta massa molecular de la resta de compostos del vi. Els gels utilitzats són els Sephadex G-25, i sobre la fracció d'exclusió s'hi realitzen les determinacions de proteïna (Somers i Ziemelis, 1973; Brenna i Vecchi, 1990). També es pot utilitzar com a tècnica preparativa per purificar la mostra (Waters i col., 1990; Dorrestein i col., 1995), concentrant per liofilització (Paetzold i col., 1990). Feuillat i col. (1972) i Anelli (1977) determinen el nitrogen proteic com el nitrogen total de la fracció exclosa per cromatografia sobre Sephadex G-25, coincidint en que el nitrogen proteic és entre 1,7 i 2% del total. Un altre gel utilitzat a la bibliografia és el Sephadex LH-20, molt utilitzat per la separació de polifenols (Escribano-Bailón i col., 1992; Waters i col., 1994a), que dona resultats similars al G-25 però l'elució és més lenta (Brenna i Vecchi, 1990).

### 3.4. Ultrafiltració.

La ultrafiltració permet separar en funció de la massa molecular dels components de la mostra. Aquesta tècnica es pot realitzar en filtració a través de membranes de fibra de vidre o bé per filtració tangencial amb membranes plàstiques o de ceràmica. En el cas dels vins permet concentrar la fracció col·loidal per caracteritzar-la (Weetall i col., 1984; Feuillat i col., 1988; Waters i col., 1994a; Pellerin i col., 1994; Dawes i col., 1994). Utilitzant membranes de diferents porus nominals, que van dels 1000 als 50000 Da es pot separar el vi en varies fraccions i analitzar-ne l'estabilitat (Hsu i col., 1987c; Waters i col., 1991). Altres autors determinen el nitrogen total de la fracció concentrada previ rentat (Lurton, 1988). El vi ultrafiltrat per una membrana de 10 kDa de porus nominal es considera lliure de col·loides, amb el qual es pot fer un test d'estabilitat proteica per l'addició de les diferents fraccions de proteïna del concentrat (Waters i col., 1991; 1992; 1993). Malvy i col. (1994) estudien per un procediment semblant la influència de les proteïnes sobre la formació d'escuma en vins base de la Champagne.

Altres treballs analitzen la interacció de les macromolècules separades per ultrafiltració amb els aromes (Lubbers i col., 1993). Aquesta tècnica és el pas final d'altres processos de separació, com la precipitació amb sulfat amònic, per dessalar i concentrar la mostra (Waters i col., 1995a; Waters i col., 1995b) o després de la diàlisi (Marchal i col., 1996).

La ultrafiltració s'utilitza a nivell industrial com una operació per substituir la clarificació; les membranes de separació són orgàniques i tenen un porus de 50 kDa. Aquesta tècnica millora els resultats de l'estabilització tartàrica, però no estabilitza els vins blancs vers les precipitacions proteiques. A nivell organolèptic no es veuen diferències significatives, tot i els empobriments en col·loides i materia colorant (Serrano i col., 1988). Tot i així aquest procediment de clarificació té un ús minoritari en tractaments de vins d'alta qualitat.

#### **4. Mètodes de separació i caracterització de les proteïnes del most i vi.**

La separació i caracterització de les proteïnes en enologia s'ha realitzat per dos fonaments principals: les tècniques de cromatografia líquida i les d'electroforesi. De cromatografies líquides es poden distingir, segons les pressions de treball, tres tipus:

- a. Cromatografia líquida en columna oberta. S'elueix a pressió atmosfèrica.
- b. Cromatografia líquida a baixa pressió, coneguda com FPLC. Les pressions de treball són 10-15 bar. De molta utilitat per la separació de macromolècules.
- c. Cromatografia líquida a alta pressió, coneguda com HPLC. Les pressions de treball són 100-150 bar.

Les tècniques de electroforesi, que es caracteritzen per fraccionar la mostra a través d'un camp elèctric, es poden separar segons el suport utilitzat en dos tipus:

- a. Les tècniques d'electroforesi que utilitzen com a suport els gels de poliacrilamida, molt utilitzada per la variabilitat de tall de porus en funció dels percentatges d'acrilamida i bisacrilamida a la fabricació del gel. El diàmetre de porus implica un impediment estèric que separa les proteïnes segons la seva mobilitat electroforètica. En aquest cas, en que es parla d'electroforesi nadiua, la mobilitat electroforètica es funció de la relació carrega-massa de la proteïna: a més carrega més mobilitat i a més massa més impediment estèric, per tant menys mobilitat. Si s'addicionen substàncies desnaturalitzants que augmenten la carrega proporcionalment a la massa molecular com ara el dodecilsulfat de sodi (SDS) la mobilitat sols depèn de la massa, aquesta és la electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE). També es poden afegir tampons que produeixen un gradient de pH a través del gel, de manera que les proteïnes perden la mobilitat quan arriben a una zona de pH igual al seu punt isoelèctric; aquesta tècnica s'anomena isoelectroforesi o també isoelectroenfocament.
- b. La tècnica més moderna per caracteritzar les proteïnes del vi és l'electroforesi capil·lar, que separa dins d'una columna capil·lar de silici fos, modificable segons convingui.

Les propietats físico-químiques que serveixen per separar les proteïnes i polipèptids són la massa, la carrega, i la hidrofobicitat, en menys mesura. També la presència d'alguna interacció específica amb una part de la proteïna es pot utilitzar per separar aquesta molècula, com succeeix amb les manoproteïnes (Dale, 1991). L'anfoteritat de les proteïnes fa que puguin variar la seva carrega en funció del pH del medi en el que estan i que tinguin un pH en el que no tenen carrega, que s'anomena el punt isoelèctric i és característic de cada proteïna.

#### 4.1. Cromatografia en columna oberta (baixa pressió).

La cromatografia en columna oberta és un dels primers mètodes utilitzats per separar les proteïnes. Tot i la seva lentitud i la baixa resolució presenta les avantatges de tenir un gran ventall de medis de separació i el seu caràcter preparatiu permet utilitzar-la en la majoria de casos com a tècnica prèvia a una total caracterització. Els gels més utilitzats a la bibliografia són els d'exclusió molecular i les reïnes de bescanvi iònic.

##### 4.1.1. Filtració per gel o exclusió molecular.

Els gels d'exclusió molecular permeten separar les macromolècules segons la seva massa molecular. En l'àmbit de les proteïnes aquesta cromatografia té varies aplicacions: la purificació de la mostra, la determinació de masses moleculars i l'estudi de distribucions de masses moleculars. La primera aplicació s'ha descrit a l'apartat 3.3., té un caràcter totalment preparatiu ja sigui per determinar la concentració total de proteïna o per fraccionar la mostra *a posteriori*. Les proteïnes dels vins es separen per aquesta tècnica amb diferents objectius; per veure la influència del contacte del vi amb el solatge de fermentació i la clarificació dels mostos, es separen les diferents fraccions en Sephacryl 300 i troben proteïnes de massa molecular entre 10 i 12 kDa provenint probablement de la hidròlisi de glucoproteïnes de la paret cel·lular dels llevats (Feuillat i col., 1989); separant per Sephacril CL-6B es troba també una glucoproteïna de massa molecular 400 kDa rica en manosa i que es suposa originària del llevat (Charpentier i Freyssinet, 1989). En l'àmbit de la cerveseria, Dale i col. (1989) separen la fracció proteica amb un gel Sephadex G-75 en tres fraccions: una de massa molecular més gran de 60 kDa, on s'hi troben proteïnes derivades del blat i també proteomananes de la paret cel·lular del llevat i dues fraccions més d'entre 60 i 40 kDa i 40 i 20 kDa ambdues provenint dels cereals. Estudien la composició dels aminoàcids presents i suggereixen aquest mètode de separació seguit de la composició aminoacídica per control de frau en cerveseria. El fraccionament en un gel Sephadex G-100 permet separar dos pics, recollir-los i seguir analitzant-los per altres mètodes (Yokotsuka i col., 1994). Waters i col. (1994) utilitzen un rebliment de Sephacryl S-400 com a pas final per purificar una manoproteïna que estabilitza el vi respecte el trencament proteic (del francès *casé protéique*).

##### 4.1.2. Bescanvi iònic

En la cromatografia de bescanvi iònic les matrius presenten carregues positives (cromatografia de bescanvi aniònic) o negatives (cromatografia de bescanvi catiònic). A la taula 1 es poden veure els grups carregats més habituals.

bescanvi catiònic	grup funcional
Carboximetil (CM-)	$-OCH_2COO^-$
Fosfo	$-PO_4H_2^-$
Sulfopropil (SP-)	$-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$

bescanvi aniònic	
Aminoetil (AE-)	$-OCH_2CH_2NH_3^+$
Dietilaminoetil (DEAE-)	$-OCH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Quaternari aminoetil (QAE-)	$-OCH_2CH_2N^+(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3$

Taula 1: grups carregats més habituals en bescanvi iònic.

La anfoteritat de les proteïnes permet usar les dues tècniques per la separació, en funció del pH de treball. Aquestes tècniques poden tenir un caràcter preparatiu o analític. Waters i col. (1994) utilitzen el bescanvi aniònic i catiònic en un protocol de purificació d'una manoproteïna. En el primer bescanvi aniònic sobre DEAE-Sepharosa separa cinc fraccions (Pellerin i Brillouet, 1992) i en el segon sobre S-Sepharosa, en un estadi més alt de purificació, separa en tres fraccions.

#### 4.1.3. Altres rebliments.

L'isoelectroenfocament en columna o cromatoenfocament també ha estat utilitzada en enologia amb bon resultat. La tècnica consisteix en una reïna amb carregues positives i negatives a la qual a un pH inicial s'hi uneixen totes les proteïnes; per mitjà d'un gradient de pH es va separant cada proteïna segons llur pI. Anelli (1977) utilitza aquesta tècnica per fraccionar most de la varietat vinífera Malvasia Istriana, separa vuit fraccions en un rang de pH entre 2,5 i 8,7, les fraccions més abundants són les àcides, amb un màxim a pH 4,6. Marchal i col. (1996) troben en Chardonnay 2 fraccions amb un gradient de pH de 2,5 a 5. Una fracció que es separa en quatre proteïnes per SDS-PAGE amb pI de 2,5 i l'altre amb pI 3,9 amb dos grups de proteïnes segons la massa molecular. Tenint en compte que el vi tenia un pH de 3, la fracció pI 2,5 presentarà carrega negativa dins el vi.

Un darrer tipus de cromatografia emprat per la separació de glucoproteïnes és la cromatografia d'afinitat. Per mitjà d'un lligant específic s'uneixen una molècula o família de molècules; en el cas de les glucoproteïnes aquest lligant és la Conavalina A (Con A), una lectina aïllada del *Canavalia ensiformis*. La Con A té afinitat per molècules que continguin alfa-D-manosa, alfa-D-glucosa i molècules semblants amb grups hidroxil C3, C4 i C5 estèricament possibles. Aquesta aplicació la utilitzen en columna oberta per separar manoproteïnes de la resta de proteïnes (Waters i col. 1993, 1994a; Moine-Ledoux i col., 1997).

#### 4.2. Cromatografia líquida de proteïnes (FPLC).

La cromatografia líquida de proteïnes és una optimització de la cromatografia líquida en columna oberta, amb la diferència de treballar a pressió de 10 a 15 bar. A l'augmentar la pressió de treball els gels han d'ésser més rígids, però s'aconsegueix una millor resolució i rapidesa de separació. Les aplicacions d'aquesta tècnica són les mateixes que en columna oberta, la cromatografia d'exclusió molecular, la cromatografia de bescanvi iònic, la cromatografia d'afinitat, etc. Totes aquestes tècniques tenen un caràcter preparatiu i analític a la vegada.

Aquesta tècnica es pot utilitzar per separar col·loides per exclusió molecular amb diferents matrius, per bescanvi iònic, per fase reversa, per cromatografia d'interacció hidrofòbica i per cromatografia d'afinitat. En cerveseria Dale i Young (1992a) comparen la separació per exclusió molecular, amb el bescanvi aniònic en columna oberta i la HPLC en fase reversa amb els mateixos mètodes a pressions mitjanes (FPLC) observant els mateixos resultats. Amb el FPLC s'observa un augment de la resolució de les fraccions individuals, la reproductibilitat i la rapidesa de la separació. Els mateixos autors separen varies fraccions per FPLC amb una columna d'exclusió molecular Superose 12 i ho apliquen a l'estudi dels components de l'escuma de la cervesa (Dale i Young, 1992b).

En vi, per bescanvi aniònic s'arriben a separar parcialment 6 fraccions (Waters i col., 1992). Guilloux-Benatier i Feuillat (1993) amb una Superose 6 (columna d'exclusió molecular) elueixen tots els col·loides proteics en un sol pic mentre que separen els col·loides glúcics en 4 fraccions. En un treball de 1993, Waters i col. aïllen una manoproteïna que té funcionalitat com a col·loide protector, per mitjà d'un protocol que comença amb una cromatografia d'afinitat en Con A en una columna oberta i després utilitza FPLC per separar per bescanvi aniònic, on separa tres fraccions, una de les quals té efectes de col·loide protector. Aquesta fracció la purifica amb una cromatografia de bescanvi catiònic, a on aconsegueix separar un pic, que es comprova que és el col·loide protector. El mateix autor separa parcialment vuit fraccions per cromatografia aniònica per estudiar la relació entre la presència polifenols associats o de glúcids lligats a la proteïna i la seva degradabilitat per mitjà de proteases (Waters i col., 1995b). Dorrestein i col. (1995) treballen amb bescanvi aniònic i catiònic, utilitzant diferents gradients salins i pH amb pobre resolució, però amb l'avantatge de ser una tècnica no destructiva respecte l'electroforesi.

Les reïnes de cromatoenfocament també s'han utilitzat en FPLC com a eina per la separació i determinació dels punts isoelèctrics de les proteïnes. En mostos de Sauvignon es separen 7 fraccions, amb punts isoelèctrics entre 9 i 4, amb predomini de les fraccions àcides



(Paetzold i col., 1990). A la varietat vinífera gewürztraminer, una varietat amb gran quantitat de proteïna i coneguda pels problemes d'estabilitat que presenta (Murphey i col., 1989b), s'aconsegueixen separar per cromatoenfocament 16 pics majoritaris en un gradient de pH de 7 a 4 (Dawes i col., 1994).

També amb aquesta cromatografia líquida s'han emprat altres suports, com ara la fase reversa; en cerveseria s'ha utilitzat per separar pèptids (Dale, 1991), Coghlan i col. (1992) separen polipèptids segons aquest fonament per caracteritzar agents escumants i obtenen un gran nombre de fraccions.

#### 4.3. Cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC).

La utilització de la cromatografia líquida d'alta eficàcia per quantificar les proteïnes de vins i mostos es senyalada per Tyson i col. (1981), que separen per cromatografia d'exclusió molecular. Utilitzant la mateixa tècnica Dubourdieu i col. (1986) posen a punt un mètode de separació basat en dues columnes instal·lades en sèrie. La primera columna porta un rebliment d'un gel de poliacrilamida que separa la mostra per exclusió molecular. Aquest, amb una massa molecular d'exclusió de 3000 Da, fa un dessalat de la mostra i passa a una segona columna que fa una separació per exclusió molecular. La segona columna té una massa molecular d'exclusió de 70 kDa per les proteïnes globulars, que permet separar les proteïnes del vi en quatre fraccions. La primera fracció és la de proteïnes que surten en el volum d'exclusió, amb una massa molecular més gran de 70 kDa. La segona fracció correspon a una massa molecular al voltant de 66 kDa i els dos últims pics corresponen a 29 i 25 kDa, són els majoritaris però els autors no els aconsegueix separar bé.

Un altre mètode trobat a la bibliografia separa, amb una columna de filtració per gel, una mostra prèviament purificada i concentrada per ultrafiltració (Waters i col., 1990). Aquest mètode aplicat a un vi de Muscat d'Alexandria separa dues fraccions de proteïna, una a una massa molecular de 120 kDa i una altre més abundant que es pot resoldre parcialment en dos pics de 23 i 10 kDa. Aquest mateix treball verifica, per electroforesi en gels de poliacrilamida desnaturalitzant amb dodecilsulfat de sodi, que la fracció de 120 kDa està constituïda per tres proteïnes de 64, 37 i 24 kDa, que en estat natiu s'associen en una sola. La segona fracció aïllada revela al menys 10 bandes entre 36 i 10 kDa, amb pics majoritaris a 32, 25 i 21 kDa (Waters i col., 1990). Aquesta tècnica es presenta com poc resolutive davant d'altres per aquests compostos, però amb l'avantatge de mantenir les estructures natives de les proteïnes. També es pot utilitzar com a tècnica preparativa per acabar de caracteritzar les fraccions separades.

Santoro (1995) caracteritza les proteïnes de les varietats Pinot, Chardonnay i Verdeca per fase inversa amb un gradient d'acetonitril. Separa 8 pics en un most de Chardonnay i després de hidròlisi avalua el percentatge d'aminoàcids hidrofílics i hidrofòbics. Troba algunes diferències entre els mostos i els vins corresponents però no observa diferències varietals. A una proteïna àcida de 28 kDa que es troba en totes les mostres analitzades li atribueix un possible paper en l'enterboliment de vins després de l'embotellat. Amb aquesta tècnica s'aconsegueix un elevat poder de resolució, ja que al comprovar els pics per electroforesi s'observa un alt grau de puresa. Waters i col. (1996) utilitzen aquesta tècnica per purificar proteïnes que prèviament havien separat per bescanvi aniònic, separant la fracció amb més carrega en dues proteïnes.

Una propietat que caracteritza les proteïnes és la hidrofobicitat, això ha fet que alguns autors hagin separat les proteïnes segons aquesta propietat, en columnes de interacció hidrofòbica. S'obtenen fins a vint fraccions proteiques diferents. En l'estudi de vins escumosos s'observa un enriquiment de les proteïnes més hidrofòbiques a l'escuma (Brissonet i Maujean, 1993).

Una altre utilitat de les tècniques de separació per cromatografia líquida d'alta eficàcia es la separació de petits pèptids, presents també en altres begudes fermentades com ara la cervesa. En aquest camp Dale i Young (1989) utilitzen el permeat de ultrafiltració de varies cerveses, separen la fracció peptídica dels compostos d'alta massa molecular, dels aminoàcids i dels àcids nucleics amb una cromatografia en columna amb rebliment Sephadex LH-20 (volum exclusió 5000 Da) i els fragments peptídics els caracteritzen per cromatografia líquida d'alta eficàcia en fase inversa (columna Vydac C<sub>18</sub>) amb gran resolució. En una revisió posterior el mateix Dale (1991) comenta la eficàcia d'aquesta separació i aconsella la detecció dels pèptids a longituds d'ona entre 210-230 nm., això limita els eluents a utilitzar i és una avantatge per la cromatografia en fase inversa, per la transparència a l'ultravioleta de l'àcid trifluoroacètic i dels solvents orgànics normalment utilitzats en aquesta tècnica. Aquest mètode de Dale i Young (1989) l'han aplicat en vins Acedo i col. (1994) i separen tres fraccions per filtració per gel. Al separar aquestes fraccions per HPLC observen que els pèptids que troben en el vi són tots molt polars i de baixa massa molecular, donant una mala resolució. Els autors milloren el mètode amb un canvi d'eluent i detectant per fluorescència els ortophtalaldèhid (OPA) derivats dels pèptids, així aconseguixen una bona separació de les fraccions. A la vegada determinen els aminoàcids i fan una estimació de la mitjana d'aminoàcids per cada fracció, que es de 15 per la fracció eluïda primer en la filtració per gel, cinc per la segona i tres per la tercera.

El mateix grup separa els pèptids utilitzant un altre mètode preparatiu: es precipiten els compostos d'alta massa molecular amb etanol i el sobrenadant es concentra i es separa amb Sephadex G-10 (volum exclusió 700 Da) obtenint dues fraccions peptídiques, que s'analitzen per cromatografia líquida d'alta eficàcia en fase inversa. Aquest estudi fet sobre Cava troba un augment dels petits pèptids a la primera fermentació, que no varia després de la segona fermentació en ampolla i que comença a augmentar des dels 9 fins als 15 mesos i després disminueix segurament degut a la seva hidròlisi en aminoàcids. A la vegada observen a l'envelliment en ampolla un augment dels pèptids hidrofòbics respecte els hidrofílics, que es pot relacionar amb l'estabilització de l'escuma que té lloc en l'envelliment (Moreno-Arribas i col., 1996).

#### 4.4. Electroforesi en gels de poliacrilamida.

Sense cap mena de dubte les tècniques electroforètiques són les que més dades han aportat sobre les característiques de les proteïnes presents en mostos i vins. Els paràmetres experimentals dels que depèn la resolució són el suport utilitzat, el sistema de tampons i la intensitat de cap elèctric que fa migrar les proteïnes. Els suports que s'han emprat són el paper, els gels d'agarosa i especialment els gels de poliacrilamida, degut a la gran resolució que presenta al poder controlar a voluntat el diàmetre de porus variant la concentració d'acrilamida i bis-acrilamida, que influeix per impediment estèric a la migració de les proteïnes. Una vegada separades les proteïnes es detecten per mitjà de les tincions amb Blau brillant de Coomassie, nitrat de plata, àcid periòdic i reactiu de Schiff o amb transferències a membranes de nitrocel·lulosa i posteriors reaccions sobre aquesta.

La electroforesi en gels de poliacrilamida separa segons diferents criteris les proteïnes del vi, donant lloc als tres tipus d'electroforesi més utilitzades:

1. Electroforesi nadiua (PAGE). Aquesta tècnica separa segons la relació carrega-massa; les proteïnes amb més mobilitat seran les de petita grandària i molta carrega. L'avantatge d'aquest mètode resideix en separar les proteïnes sense desnaturalitzar, però la desavantatge és que no aporta molta informació, ja que té la mateixa mobilitat una proteïna de baixa massa molecular poc carregada que una de gran massa amb molta carrega.
2. Electroforesi amb agents desnaturalitzants (SDS-PAGE). En el procés de separació d'aquesta tècnica s'inclou un agent desnaturalitzant que s'uneix a les proteïnes proporcionalment a la seva grandària. La sal de sodi de dodecilsulfat (SDS) és el producte més utilitzat, tot i que en electroforesi a baixa temperatura (4°C) s'utilitza la sal de liti (LDS) per la seva elevada solubilitat (Hsu i Heatherbell, 1987a).

Per aconseguir una bona adhesió es bull la mostra en presència de 2-mercaptoetanol i dodecilsultat de sodi. Es precisen 1,5 mg de SDS per cada mg de proteïna. Aquesta tècnica té la desavantatge de desnaturalitzar la mostra, pel que no es pot utilitzar com a preparativa. Al carregar les proteïnes segons la seva grandària, totes tenen la mateixa relació carrega/massa, la separació es per criteris estèrics, es a dir per massa molecular. Per aquest motiu juga un paper molt important el diàmetre de porus del gel per la separació d'una barreja de proteïnes, que s'aconsegueix variar per mitjà de canvis en el percentatge d'acrilamida i bis-acrilamida. Hi ha també la possibilitat de fer gels amb gradients de tamany de porus, per la separació de molècules molt heterogènies.

3. Isoelectroenfocament sobre gels de poliacrilamida (IEF-PAGE). En aquesta tècnica es separen les diferents proteïnes segons el seu punt isoelèctric. Abans de la separació s'acondiciona el gel amb un gradient de pH, que s'aconsegueix amb unes substàncies anfòteres anomenades anfolits. Les proteïnes de la mostra migren a través del camp elèctric mentre tinguin carrega, quan arriben al seu punt isoelèctric perden la carrega i per tant la seva mobilitat. L'isoelectroenfocament dona informació sobre el caràcter àcid o bàsic de les proteïnes d'una mostra. Aquesta tècnica es pot combinar amb la SDS-PAGE i obtenir informació del caràcter de les proteïnes i del seva massa molecular, és el que s'anomena electroforesi bidimensional.

Una vegada separades per electroforesi les proteïnes d'un most o vi s'ha de revelar la placa de poliacrilamida per veure les diferents bandes. Existeixen varies tincions possibles, les més utilitzades són la de blau brillant de Coomassie segons el mètode de Hames (1985), més assequible; la de nitrat de plata, més sensible i la d'àcid periòdic-Schiff que és exclusiva per glucoproteïnes (Allen i col., 1972; Waters i col., 1993). Altres revelats es fan per transferència a membranes de nitrocel·lulosa i tractament amb Conavalina A i peroxidases (Hsu i Heatherbell, 1987a; b; Hsu i col., 1987).

Un dels primers estudis sobre la fracció proteica de mostos i vins data del 1959 i el realitzaren Koch i Sajak; aquests autors varen comprovar que les proteïnes dels mostos i dels vins estan constituïdes per una barreja heterogènia que es pot separar per electroforesi en funció de les seves propietats físico-químiques. El suport utilitzat fou el paper, en els resultats separaren varies bandes, amb dues majoritàries i atribuïren les diferències entre els mostos a la varietat de raïm d'origen. Baily i Berg (1967) arriben a separar amb PAGE en tubs 10 bandes en mostos, pel mateix mètode Radola i Richter (1972) troben fins a 15 bandes de proteïna en varietats austríaques, amb diferències entre varietats sols en la intensitat d'algunes d'elles.

Són Yokotsuka i col. (1977) el primer en utilitzar el dodecilsulfat de sodi per proteïnes de mostos i vins. Varen trobar bandes entre 11 i 28 kDa prèvia tinció amb blau brillant de Coomassie. Però una sèrie de treballs que han marcat la caracterització de proteïnes en vins i mostos han estat els de Hsu i Heatherbell (1987a; b) i Hsu i col. (1987). Aquests autors separen proteïnes de raïm, most i vi de gewürztraminer i Riesling amb LDS-PAGE i IEF-PAGE bidimensional, seguit de tinció amb nitrat de plata i detecció de glucoproteïnes per mitjà de transferència a membranes de nitrocel·lulosa i reacció amb lectines. A la separació per masses moleculars observen 35 fraccions en el raïm entre 11,2 i 120 kDa i 24 bandes entre 11,2 i 65 kDa en el most i vi de la varietat vinífera gewürztraminer, 3 de les quals són glucoproteïnes (12,6, 25 i 28 kDa). En el Riesling troben 41 bandes entre 11,2 i 190 kDa en raïm i 25 fraccions en el most i en el vi de 11,2 a 65 kDa, amb sols dues glucoproteïnes a 25 i 28 kDa. A la separació per punt isoelèctric observen en les dues varietats viníferes predomini de proteïnes àcides, amb pI entre 4 i 6.

En mostos i vins de Welder, Carlos i Higgins, de la família de la vinífera Muscat, es troben més proteïnes d'alta massa molecular, entre 14 i 100 kDa i punts isoelèctrics entre 5,6 i 7,5; en aquest treball la separació es fa per electroforesi bidimensional IEF SDS-PAGE i tinció amb nitrat de plata (Lamikanra, 1987). Sitters (1988) compara el fraccionament de Pinot noir segons la massa molecular amb el fraccionament per punt isoelèctric i troba més bandes per aquest últim criteri. Murphey i col. (1989) estudien la distribució molecular per tinció amb blau brillant de Coomassie de la varietat gewürztraminer i troba 6 o 7 fraccions entre 11 i 70 kDa, amb bandes molt intenses a 20-23 i 34-40 kDa. Amb la varietat vinífera Riesling detecten de 4 a 7 bandes, amb masses moleculars de 12,4 a 88,1 kDa; la banda més intensa es troba a 20-23 kDa. En el mateix treball es fa la determinació dels punts isoelèctrics per IEF-PAGE per les dues varietats i es veuen de 8 a 10 bandes per la primera i de 6 a 9 per la segona; en ambdues hi bandes des de pH 3 a pH 9 amb predomini de les fraccions àcides.

L'isoelectroenfocament en gel ha estat estudiat en un gradient de pH de 2,5 a 10 i tinció amb blau brillant de Coomassie per Moio i Addeo (1989) en varietats italianes. Els autors troben de 15 a 20 fraccions diferents per cada varietat vinífera, sense un comportament varietal. El 70% de les fraccions tenen un punt isoelèctric entre 3,5 i 5,5. Paetzold i col. (1991) separen en un most de Sauvignon, en un primer estadi per cromatoenfocament i després per SDS-PAGE i tinció amb nitrat de plata, 7 fraccions de diferent massa molecular entre 18 i 60 kDa, les fraccions entre 19 i 25 kDa es corresponen a més d'una proteïna, que difereixen en el seu pI.

En una sèrie de treballs en mostos i vins australians de la varietat vinífera Muscat Gordo Blanco (Muscat d'Alexandria) Waters i col. (1990) aconseguixen separar les proteïnes en 13 fraccions segons SDS-PAGE visualitzades amb nitrat d'argent; aquest fraccionament es fa prèvia separació amb HPLC d'exclusió molecular preparativa en dues fraccions. Una fracció amb una massa molecular aparent de 120 kDa es separa en tres (64, 37 i 24 kDa) per electroforesi, pel que es suposa que són tres subunitats d'una mateixa proteïna en estat nadiu. La segona fracció amb una massa molecular de 23 a 10 kDa per HPLC es separa en 10 fraccions per SDS-PAGE en un rang de 36 a 10 kDa, predominant les bandes de 32, 25 i 21 kDa, resultats que concorden amb les dades de Hsu i Heatherbell (1987a) i les de Lamikanra (1987). També Waters i col. en un treball de l'any 1991 observen que la banda de 63 kDa es una glucoproteïna al separar per massa molecular i tenyir amb àcid periòdic-Schiff. En un treball més recent aquests mateixos autors separen primer, per bescanvi aniònic nou fraccions, i d'aquestes nou fraccions s'observen set masses moleculars diferents, de 13 a 34 kDa (Waters i col., 1995b).

A la caracterització dels vins base per Champagne per mitjà de SDS-PAGE i tinció per nitrat de plata s'observen 5 bandes entre 9,6 i 60 kDa, amb la majoria de bandes entre 20 i 30 kDa, aquestes dades també coincideixen amb el treball de Hsu i Heatherbell. A la separació per IEF-PAGE s'obtenen 6 bandes de 3,5 a 7,6, amb la majoria entre 3,3 i 6; dades que concorden amb la majoria d'autors (Brissonet i Maujean, 1993). Marchal i col. (1996) aporten més dades sobre aquests vins per mitjà de tinció amb àcid periòdic-Schiff i cromatografia d'afinitat. Els autors verifiquen que al menys 7 fraccions de proteïnes de Chardonnay entre 14 i 64 kDa tenen una part glúcica, algunes d'elles provenint de la planta ja que es troben en el most. Berthier i col. (1996) en un estudi de preparats enzimàtics comercials separen, per IEF-PAGE i tinció amb blau brillant de Coomassie, mostos de Chardonnay i Pinot noir. En un gradient de pH entre 2,5 i 5 localitzen les proteïnes de les dues varietats entre 3,3 i 4,9; amb lleus diferències entre les dues varietats, aquests resultats són consistents amb els que es troben a la bibliografia.

Les glucoproteïnes també han estat estudiades en vins negres japonesos per Yokotsuka i col. (1994), separant les proteïnes per PAGE preparativa per posterior caracterització per SDS-PAGE i IEF-PAGE de les bandes. S'obtenen 6 fraccions per PAGE tenyint amb blau brillant de Coomassie i totes donen positiu a la presència de polisacàrids per tinció amb àcid periòdic-Schiff, que corresponen a dues masses moleculars, 25,5 i 30 kDa i 5 punts isoelèctrics diferents entre 3,6 i 4,7. En el mateix treball es compara el percentatge de cada banda tenyida amb el percentatge que s'obté per la suma d'aminoàcids de cada banda i s'observa una inconsistència deguda a la reacció del blau brillant de Coomassie diferent amb cada banda, a la vegada que subestima la concentració en altres casos de concentracions conegudes de proteïna.

Aquestes dades són concordants amb les de Waters i col. (1991), que es troba en el mateix a la determinació de la proteïna total pel mètode de Bradford . També Waters i col. (1994) aïllen un manoproteïna d'un vi negre, trobant per SDS-PAGE que la massa molecular està al voltant de 420 kDa, aquesta manoproteïna està formada per un 30% de proteïna i un 70% de carbohidrats a on el sucre principal és la manosa, sucre típic de la paret del llevat (Ballou, 1992). Aquests autors observen que aquesta manoproteïna no es tenyeix amb blau brillant de Coomassie i que sols ho fa amb àcid periòdic-Schiff tal com havia descrit Fevert & Ballou el 1985.

Un treball més recent, on es separen per cromatoenfocament sobre FPLC les proteïnes de gewürztraminer, s'obtenen 35 bandes individuals per isoelectroenfocament amb tinció de plata, de les quals la majoria tenen un pI inferior a 5. La distribució de masses moleculars és molt més limitada, es separen 13 bandes entre 13 i 35 kDa. A més, es veu una bona correlació entre el total de proteïna mesurat pel mètode de Bradford i la absorbència a 280 nm monitoritzada en el cromatoenfocament (Dawes i col., 1994).

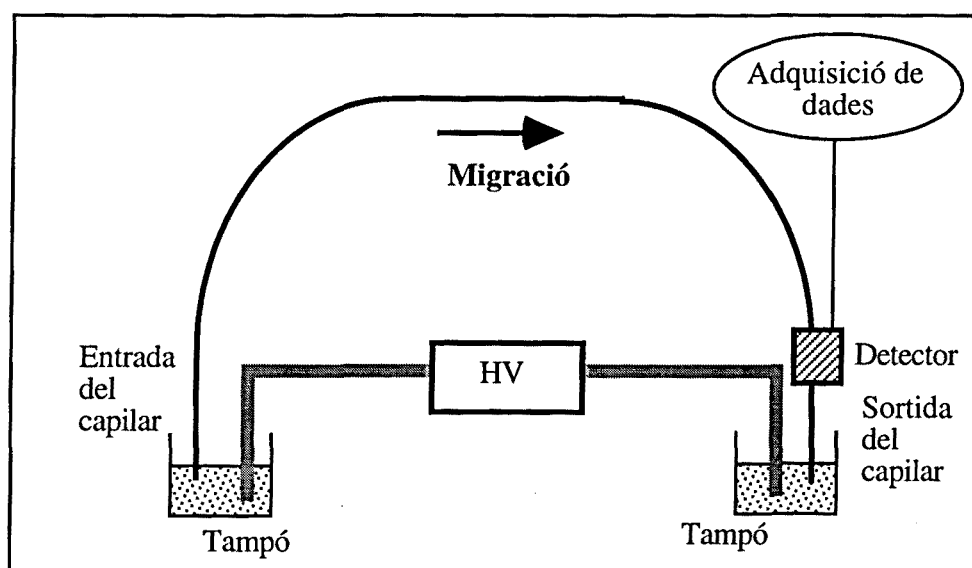
En un estudi en vins portuguesos s'observa el perfil electroforètic de masses moleculars de quatre varietats autòctones, amb masses moleculars de 15,5 a 69 kDa i sis bandes comuns en tots els vins, mentre que alguna varietat arriba a les onze fraccions (Dorrestein i col., 1995). Santoro (1995) analitza la fracció proteica tant sota el concepte de massa molecular com de pI en vins del sud d'Itàlia, de les varietats viníferes Chardonnay, Verdeca i Pinot noir. Troba en totes les varietats un mateix patró de massa molecular, entre 6 i 200 kDa amb una banda molt intensa a 28 kDa. La diferència entre varietats està en la intensitat relativa de les diferents bandes. Segons el punt isoelèctric es separen de 5 a 12 bandes dividides en dos grups: les molt àcides, més abundants, amb un pI entre 3,6 i 4,8 i un altre minoritari de 5 a 9, amb poques variacions degudes a la fermentació i la varietat.

Espanya és un país amb gran importància vitivinícola, amb moltes varietats viníferes autòctones. Aquesta riquesa ha interessat a la comunitat científica i existeixen treballs de caracterització de les proteïnes de mostos i vins del país per electroforesi sobre gels de poliacrilamida; Correa i col. (1988) analitzen la separació sense agents desnaturalitzants, amb SDS i isoelectroenfocament, tenyeixen amb blau brillant de Coomassie i nitrat de plata. El treball separa les proteïnes dels mostos de tres varietats viníferes blanques i dues negres: Airen, Macabeu, Xarel·lo, Garnatxa i Ull de llebre respectivament. Observa que hi ha bandes que sols es revelen pel nitrat de plata i d'altres que sols pel blau brillant de Coomassie, si bé el nombre de bandes és semblant bé es separi per PAGE o per SDS-PAGE i es tenyeixi qualsevol dels dos mètodes. Les masses moleculars trobades estan entre els 15 i els 43 kDa, amb domini de les fraccions entre 17 i 25 kDa; els punts isoelèctrics entre 3,5 i 6, amb predomini dels més baixos.

En un treball de González-Lara i col. (1989) es fa una aproximació a mostos de més varietats viníferes, amb separació per SDS-PAGE i IEF-PAGE i tenyint amb blau brillant de Coomassie. La separació per masses moleculars s'observen tres grups, 65-67 kDa, 20-35 kDa i 11,5-15 kDa. Les fraccions majoritàries estan al grup intermig doncs arriben al 80 % del total, aquestes dades concorden amb les de Hsu i Heatherbell (1987a). Els punts isoelèctrics trobats estan entre 8,5 i 3,8, amb una clara concentració a la franja àcida, entre 4,3 i 3,8. Aquestes dades coincideixen amb les de Gorospe i col. (1991), que separa les proteïnes de les varietats base per la producció de Cava, Macabeu, Xarel·lo i Parellada; les proteïnes es troben entre 20 i 40 kDa i amb punts isoelèctrics entre 4,3 i 5,1. Del mateix grup, en una sèrie de treballs posteriors (Pueyo i col., 1993; Dizy, 1993) apliquen els anàlisis per electroforesi en les tres condicions esmentades, tenyint amb Blau brillant de Coomassie en mostos i vins de les varietats blanques Malvar, Macabeu, Xarel·lo i Parellada. Per PAGE separen de 5 a 8 bandes, per SDS-PAGE es tenen el mateix nombre entre 14 i 94 kDa amb bandes més intenses al voltant dels 25-35 kDa. el isoelectroenfocament separa les proteïnes en un nombre variable de bandes de 5 a 14, amb punts isoelèctrics entre 3 i 5,6.

#### 4.5. Electroforesi capil.lar.

L'electroforesi capil.lar (EC) és una família de tècniques bastant recents que, per mitjà de columnes capil.lars de silici fosa, aconseguix separar amb gran eficàcia molècules petits i grans. Aquesta separació s'aconsegueix gràcies a l'aplicació de grans diferències de potencial entre els caps de la columna, que genera sobre el tampó i les espècies iòniques un flux electroforètic i electroosmòtic a través del capil.lar. La configuració bàsica (figura 1) consta del capil.lar, una font d'alt voltatge, dos elèctrodes, dos recipients pels tamps i un detector ultravioleta.



**Figura 1:** configuració bàsica d'una electroforesi capil.lar.



La electroforesi capil·lar comprèn diferents tècniques segons les característiques operatives i separatives. Aquestes són:

- a* Electroforesi capil·lar zonal. Aquesta tècnica també es coneix com electroforesi capil·lar de solució lliure, és la forma més simple de EC. El mecanisme de separació està basat en les diferències entre la relació carrega-massa. El tampó ha d'ésser homogeni i la diferència de potencial constant. La mobilitat electroforètica és directament proporcional a la carrega neta, factor que depèn del pH, i inversament proporcional a la viscositat i al radi de Stokes de la partícula. Els capil·lars són de sílici fos pretractats amb hidròxid sòdic per assegurar que estigui total i uniformement carregada. Aquest tractament es fa sovint per assegurar la separació uniforme. A pH alt el flux electroosmòtic augmenta, el pH també és important en molècules anfòteres, com a norma es treballa a un pH dues unitats per sobre o sota del  $pK_a$  de l'analit. Els tampons poden ser salts o molècules anfòteres, quan es volen tenir conductivitats baixes. Es poden emplear additius per modificar la mobilitat electroforètica. Algunes variants d'aquesta EC redueixen o eliminen el flux electroosmòtic per mitjà de rebliments a la columna. La EC zonal és molt útil per separar pèptids i proteïnes, també per separar ions i petites molècules amb carrega. Es pot assimilar a la electroforesi en gels de poliacrilamida nadiua.
  
- b* Isoelectroenfocament. Aquesta tècnica és anàloga al isoelectroenfocament en gels de poliacrilamida. En ambdues tècniques les molècules es mouen en un camp elèctric mentre estan carregades, aturant-se quan esdevenen neutres. el isoelectroenfocament es corre en un gradient de pH, a on el pH alt és a l'ànode i el baix és al càtode. Aquest gradient s'aconsegueix amb una sèrie de substàncies químiques anfòteres que s'anomenen anfolits portadors. A l'aplicar el voltatge els anfolits es separen en el capil·lar generant un gradient de pH al llarg del capil·lar. A diferència de la EC zonal els tampons són diferents, al càtode hi ha un tampó més bàsic que l'anfolit amb un punt isolèctric més alt mentre que a l'ànode el tampó ha de tenir pH més baix que l'anfolit més àcid. En aquesta EC s'ha de suprimir el flux electroosmòtic, per aquest motiu les parets del capil·lar són recobertes amb metilcelul·losa o poliacrilamida. El poder de resolució d'aquesta tècnica s'ha calculat en 0,02 unitats de pH. Les tres fases de el isoelectroenfocament són carrega, enfocament i mobilització cap al detector; aquest darrer pas no es necessari en tècniques clàssiques, on es fa una tinció. La carrega es fa barrejant la mostra amb els anfolits apropiats i entra a la columna per pressió o fent el buit. L'enfocament de les mostres té lloc en un camp elèctric de 500-700 V/cm i intensitats de menys de 1  $\mu$ A. Per evitar agregacions de proteïnes es poden utilitzar surfactants no iònics (Triton X-100) o modificadors orgànics com el glicerol o l'etilenglicol que minimitzen aquest fenomen.

La mobilització s'aconsegueix cap a qualsevol tampó per l'addició de clorur de sodi en aquell tampó, al produir-se una variació de pH en el capil·lar i mou els anfolits i la mostra separada cap al tampó. La detecció es sol fer a 280 nm ja que els anfolits solen absorbir en el rang del ultravioleta baix. Aquesta tècnica s'aplica en la separació de proteïnes, encara que no es massa adequada per les molt hidrofòbiques.

- c Electroforesi capil·lar en gel. Aquesta tècnica utilitza capil·lars amb rebliments de gels de poliacrilamida i nous polímers més estables als elevats camps elèctrics aplicats. La composició del gel serveix com a tamís molecular per aconseguir separacions per grandària. Hi ha dues classes de gels: els gels físics, que tenen una estructura porosa per entrecreuament de polímers tipus hidroxipropilmetilcel·lulosa o similars i els gels químics que formen una estructura porosa per enllaços covalents entre els polímers. Aquests són polímers menys rígids, que no permeten massa canvis de tampons una vegada el gel està format. Els gels solen ser de poliacrilamida, amb concentració variable segons la resolució i el rang de masses moleculars que es vulgui separar. En aquesta tècnica el voltatge és un factor limitant ja que camps superiors a 500 V/cm poden causar degradacions al rebliment pel calentament del capil·lar. Hi ha dues aplicacions principals d'aquesta electroforesi capil·lar: la separació de proteïnes i la de fragments d'àcids nucleics. Per la separació de proteïnes es fa servir el mateix principi que per electroforesi en plaques de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants; per mitjà de SDS totes les proteïnes tenen la mateixa relació carrega-massa, donat que el SDS és aniònic la migració es cap a l'ànode. Per mitjà de calibrat es pot determinar la massa molecular. La injecció ha d'ésser electrocinètica doncs si es fes per pressió podria provocar l'extrusió del gel. La mostra es desnaturalitza amb SDS al 1% i 2-mercaptoetanol al 2% a 90 °C durant 30 minuts. La separació de ADN es fa en gels de poliacrilamida amb porus molt oberts per separar fragments de restricció i grans oligonucleòtids, mentre que per la separació de deoxioligonucleòtids s'ha de disminuir la grandària de porus. Serveix també pel control de puresa d'oligonucleòtids sintètics. La EC en gels millora contínuament amb la sortida al mercat de nous rebliments i nous tampons amb més eficàcia, que la fan una eina indispensable per la seqüenciació.
- d Isotacoforesi. Aquesta tècnica s'utilitza amb èxit amb capil·lars sense rebliment on pot existir flux electroosmòtic o es suprimeix amb hidroxipropilmetilcel·lulosa. El sistema de tampons és heterogeni, el capil·lar s'omple amb un electròlit que té una mobilitat més gran que les mostres i després s'introdueix la mostra, una vegada aquesta ha entrat el capil·lar s'introdueix en el tampó que conté un electròlit de baixa mobilitat, més petita que qualsevol de la mostra. La separació té lloc entre els dos electròlits, segons la seva mobilitat. Aquesta tècnica permet separar cations i anions, però no en un mateix anàlisi.

La detecció es realitzava per conductivitat, però també es pot fer per absorbència a l'ultravioleta. Aplicacions d'aquesta tècnica són la separació de ions o la preconcentració abans d'una EC zonal.

- e Electroforesi capil·lar electrocinètica micel·lar. Aquesta tècnica és semblant a la cromatografia líquida en fase reversa, es basa en la utilització de substàncies que formen micel·les. Aquestes substàncies s'anomenen surfactants, poden ser aniònics, catiònics, anfòters o no iònics. Els dos primers són els més utilitzats, en especial l'aniònic SDS, ja que és fàcil de purificar i molt barat. El mecanisme de separació, en el cas del SDS com a surfactant, està basat en que a pH neutre o lleugerament àlcali el flux electroosmòtic és molt fort en direcció al càtode mentre que les micel·les carregades negativament es mouen cap a l'ànode; com a resultat la velocitat de migració del solvent és més lenta. La micel·la contribueix a la separació per la capacitat de transportar al seu interior analits hidrofòbics i d'interaccionar amb els cations formant parelles iòniques; segons l'afinitat per la micel·la de l'analit és més o menys retrasat respecte el flux total. L'ordre d'elució és anions, molècules neutres i cations. Els anions elueixen primer degut a que la repulsió electrostàtica amb les micel·les els fa estar sempre a la fase mòbil, les molècules neutres elueixen després degut a la interacció hidrofòbica amb les micel·les mentre que els cations són els darrers degut a la forta interacció electrostàtica. Tot i així pot haver-hi canvis en l'ordre en el cas de cations poc carregats o de molècules molt hidrofòbiques. L'aplicació d'aquesta tècnica és la separació de molècules petites.

Degut a la novetat d'aquestes tècniques no existeixen massa treballs de separació de proteïnes per electroforesi capil·lar aplicats a l'enologia. El primer treball (Ledoux i col., 1992a) separa les proteïnes de Sauvignon en 7 pics, la mostra es prèviament dialitzada (sacs de diàlisi de 6-8000 Da de porus) i es troben 216 mg de ASB/l per la suma de tots els pics. Les condicions de la separació són: tampó àcid cítric 20 mM pH 2,5, injecció hidrodinàmica, tensió aplicada 10 kV, temperatura 25 °C i detecció a 200 nm. Aquests mateixos autors observen una diferenciació varietal per aquest mètode entre els perfils de Sauvignon, Sémillon i Muscadelle, a la vegada que en determinen l'estabilitat tèrmica de cada fracció (Ledoux i Dubourdiu, 1992; 1994). Luguera i col. (1997) apliquen aquesta tècnica i troben unes condicions de separació òptimes a pH 8 i 12 kV. Comparen la separació obtinguda amb una separació de la mateixa mostra amb electroforesi nadiua en gels de poliàcrilamida i tinció amb blau de Coomassie i nitrat de plata. Conclouen que la EC dona resultats comparables a la PAGE, però és més sensible i té més resolució.

En enologia electroforesi capil·lar s'ha aplicat també per anàlisi d'àcids orgànics, diòxid de sofre, àcid sòrbic, àcid ascòrbic, cations i anions (Kenney, 1991; Trenerry, 1995; Lazzarelli i col., 1996); també per compostos fenòlics (Garcia-Viguera i Bridle, 1995; Gil i col., 1995) o glúcids com la sacarosa, glucosa i fructosa (Klockow i Paulus, 1996).

#### 4.6. Estudis dels aminoàcids de les proteïnes de vins i mostos.

Un últim pas per la caracterització de les proteïnes de vins i mostos és determinar els aminoàcids que les componen i en la seqüència en la que estan. La composició aminoacídica s'ha usat com eina de caracterització des dels treballs de Koch i Sajak (1959). Anelli (1977) hidrolitza les proteïnes que ha separat per cromatografia d'exclusió amb HCl 6N en tubs tancats al buit durant 24 h. a 110 °C. Troba 18 aminoàcids presents en l'anàlisi de les proteïnes de mostos de 14 varietats viníferes, amb una composició qualitativa homogènia. Una vegada quantificats veu que es manté la homogeneïtat, els aminoàcids més abundants són l'àcid aspàrtic, l'àcid glutàmic, la serina, la treonina i la  $\alpha$ -alanina. La prolina, l'aminoàcid més abundant en els vins (Boulton i col., 1996), es troba en poca concentració i amb variacions entre varietats; també estan en quantitats variables intermitges glicina, leucina, fenilalanina, tirosina. Metionina, histidina, cisteïna i arginina es troben en quantitats variables. El mateix treball d'Anelli separa les proteïnes d'un most segons el punt isoelèctric i observa que hi ha aminoàcids que no varien la seva concentració en les diferents fraccions com la  $\alpha$ -alanina, arginina, àcid glutàmic, isoleucina, leucina, serina i valina; en canvi es correlaciona amb el pI la concentració de lisina, histidina,  $\beta$ -alanina, àcid aspàrtic i fenilalanina. No observa correlació amb la prolina. En un treball posterior (Paetzold i col., 1990) on també es fa un fraccionat segons el pI i l'anàlisi d'aminoàcids d'un most de Sauvignon no es troben massa variacions entre les diferents fraccions, però els aminoàcids trobats coincideixen amb els d'Anelli.

També Waters i col. (1991) troben una composició d'aminoàcids molt semblant als autors anteriors, en un conjunt de fraccions proteiques separades segons la solubilitat al sulfat amònic. Observen una gran presència d'aminoàcids àcids i també abundància dels aminoàcids alifàtics glicina, alanina, serina i treonina; especialment aquests dos últims els troba en més quantitat en una fracció rica en carbohidrats. Això és significatiu ja que la serina i la treonina són els aminoàcids involucrats en la les unions O-glucosídiques de les glucoproteïnes a les plantes. En un treball posterior, els mateixos autors (Waters i col., 1992), a la caracterització de proteïnes respecte la seva estabilitat en el vi observen una elevada proporció d'àcid aspàrtic i glutàmic en les proteïnes inestables, però no hi troben cap tret característic que les distingeixi.

En un següent estudi, Waters i col. (1993) aïllen una proteïna que confereix estabilitat col·loidal al vi, comproven que es tracta d'una manoproteïna d'elevada massa molecular i a la composició de la part proteica observen un elevat percentatge de serina (31%) i treonina (13%), amb quantitats menors de glicina, àcid aspàrtic i glutàmic (9% cada un).

La presència de la serina i la lisina confirma la unió amb la part glúcica via O-glucosídica, tot i que també s'han descrit unions a través d'asparagina i di-N-acetilglucosamina, amb una seqüència Asn-X-Ser/Thr. Sembla ser que les dues vies són possibles doncs els autors confirmen l'existència de hexosamines a la manoproteïna. Confirma l'origen levurià de la manoproteïna els percentatges molt semblants de serina i treonina que troben a una manoproteïna estructural de la paret de llevat Frevert i Ballou (1985). Basat en l'estudi de Waters i col. (1993), es purifica una manoproteïna a partir d'un vi negre i s'observa que la part glúcica de la macromolècula coincideix amb el model proposat per Ballou (1982) per les manoproteïnes de paret cel·lular dels llevats mentre que la part proteica en difereix per excés. La manoproteïna aïllada conté el doble (30%) de proteïna que la descrita pels llevats (12%); a més hi ha discrepàncies en composició d'aminoàcids ja que hi ha diferència en la prolina, glicina i l'àcid aspàrtic (Waters i col., 1994a).

En una glucoproteïna d'origen vegetal es troben alanina, àcid aspàrtic, glicina, leucina, valina i àcid glutàmic en quantitats del 8 al 12% cada un. En menys quantitat també s'hi troba treonina i serina (Belleville i col., 1994). També en un estudi sobre precipitats en vins negres comprova la presència de proteïnes i els aminoàcids més abundants són la glicina, l'àcid aspàrtic/asparagina, la serina i la treonina (Waters i col., 1994b). Yokotsuka i col.(1994) observen una composició aminoacídica semblant en les sis fraccions que separa per PAGE preparativa; les proteïnes són riques en àcid aspàrtic, treonina, serina, àcid glutàmic i glicina mentre que els aminoàcids bàsics són escassos. Suggereix l'elevada quantitat de treonina, serina i aspàrtic/asparagina com a llocs per la unió covalent de fraccions no proteiques, com una prova més de que són glucoproteïnes.

Santoro (1995) caracteritza les proteïnes després de separar-les per HPLC en fase reversa. Troba un equilibri entre els aminoàcids polar i no polars, entre els polars destaquen la serina i els àcids glutàmic i aspàrtic mentre que la leucina, valina i en alguns casos la prolina són els no polars més abundants. També hi ha quantitats significants d'aminoàcids no polars hidrofílics com la lisina i alanina.

Waters en un treball de 1995 separa les proteïnes d'un vi blanc per verificar la resistència a la proteolisi amb una tècnica de bescanvi aniònic, n'obté 9 fraccions i observa que totes les fraccions contenen gran quantitat d'àcid aspàrtic/asparagina, i en menor quantitat glicina, alanina, serina, treonina i àcid glutàmic. Tot i així descriu algunes diferències entre fraccions respecte la quantitat de treonina, prolina i arginina (Waters i col., 1995b).

Un treball sobre la caracterització de les proteïnes de vi base de Champagne de la varietat vinífera Chardonnay troba sis aminoàcids principals que són alanina, àcid aspàrtic/asparagina, glicina, prolina, serina i treonina. Aquestes dades coincideixen amb les anteriors a excepció de la prolina. El mateix treball constata la presència de hidroxiprolina, que és un aminoàcid característic de les arabinogalactano proteïnes, que són glucoproteïnes provinents del raïm (Marchal i col., 1995). En un treball posterior on intervé el mateix autor no s'observa cap diferència de composició entre les proteïnes de Chardonnay i Pinot noir; a on els aminoàcids principals són els mateixos que en el treball anterior, amb la inclusió de l'àcid glutàmic amb un 7,2% mentre que en el treball anterior era del 6,7%.

Pel que fa als estudis sobre pèptids més petits, de 3 a 15 residus, els resultats coincideixen amb els trobats a la bibliografia per proteïnes. Els aminoàcids més abundants són la lisina, serina i alanina pels pèptids més grossos; els més petits presenten els mateixos aminoàcids i, a més, la lisina i els àcids glutàmic i aspàrtic (Acedo i col., 1994).

La seqüenciació de les proteïnes dels vins no es troba a la bibliografia tret de dues excepcions; en el treball de Santoro (1995) seqüencia tres fragments aminoterminals sense cap objectiu aparent més que la caracterització, troba molts residus serina i àcid glutàmic i aspàrtic. Més interessant és el treball de Waters i col. (1996), que comprova una gran homologia entre seqüències de fragments de proteïnes del vi amb altres proteïnes vegetals com les thaumatines i les quitinases, conegudes per les seves propietats de defensa davant atacs externs. Aquestes proteïnes les sintetitzen les plantes com a defensa davant atacs de fongs patògens, són cercades pel seu potencial com agents biocontroladors. Les proteïnes amb aquesta funció són resistents a la proteolisi i al pH àcid al igual que les proteïnes del vi; serien produïdes davant d'atacs de patògens. Cvetkovic i col. (1997) han observat en proteïnes amb efectes contra els patògens aïllades a partir d'ordi una inhibició sobre la fermentació de la cervesa, exercint sobre les poblacions de *Saccharomyces cerevisiae* una incidència letal. Aquest efecte desapareix al llarg del procés d'elaboració de la cervesa degut al tractament tèrmic al que es sotmet el most abans de la fermentació.

## **5. Factors que afecten a la concentració i distribució de les proteïnes.**

La concentració i distribució de proteïnes està afectada per multitud de factors des de la brostació del cep fins al consum del vi. Aquests factors es poden dividir en ambientals o naturals, quan no depenen de l'home i en tecnològics quan degut a la tècnica d'elaboració emprada la concentració i distribució de proteïnes es veu afectada. Malgrat tot aquesta classificació és difícil ja que l'elaboració del vi és un procés acotat per la tecnologia i per això es proposa un diferenciació dels factors en ordre cronològic.

### **5.1. Efecte de la Varietat vinífera.**

La varietat vinífera influeix molt significativament a la concentració de proteïnes del most i del vi resultant. Algunes varietats produeixen molta més quantitat de proteïnes que altres. Particularment les varietats molt aromàtiques com el Muscat, el gewürztraminer o el Riesling (Lamikanra i Inyang 1988; González-Lara i col., 1989; Feuillat i col., 1995). De totes maneres no és possible identificar varietats segons el seu patró proteic per tècniques electroforètiques, però es troben diferències de concentració entre bandes de les diferents varietats (Pueyo i col., 1993), Dorrestein i col. (1995) observen un perfil de masses moleculars molt semblant per quatre varietats portugueses, les proteïnes majoritàries són les mateixes a totes les varietats. Tampoc s'han trobat diferències entre varietats en la composició d'aminoàcids de les seves proteïnes (Anelli, 1977).

Coincidint amb les dades de Pueyo i col. (1993) en PAGE nadiua i SDS-PAGE, no s'observa diferència en diferents varietats viníferes en el nombre de bandes per isoelectroenfocament, però si en la intensitat d'aquestes (Moio i Addeo, 1989).

### **5.2. Influència del clima.**

Les condicions climàtiques com la insolació i la pluviometria així com la natura del sòl poden influir en la concentració de proteïnes de mostos i vins, variant la seva concentració i distribució d'un any a l'altre. Paetzold i col. (1990) observen diferències entre un most de Sauvignon de la collita del 88 i 89. A la separació per cromatoenfocament el primer any troba 7 fraccions mentre que el segon any en troba 10, amb tres fraccions en comú els dos anys. Dizy (1993), en canvi, no observa diferència entre dos anys consecutius en el perfil electroforètic per PAGE nadiua mentre que la concentració incrementa de 43 a 73 mg de ASB/l. Yokotsuka i col. (1994) estudia 12 anyades observant que a partir del 7 any la concentració de proteïnes en vins negres japonesos es constant.

### 5.3. Producció.

La productivitat de la vinya influeix de manera clara a la concentració de proteïna; a menys producció per cep s'obté més concentració de proteïna en el most (Feuillat i col., 1995).

### 5.4. Maduració del raïm.

Kock i Sajak (1959) no detecten proteïnes en el raïm abans de la verolació. Sembla que la seva presència comença a ser detectable després del verolat i es correlaciona amb el pH i l'acumulació de sucres a la baia (Murphey i col., 1989b; Paetzold i col., 1990). A la vegada els vins elaborats a partir de mostos més madurs tenen més concentració de proteïnes i apareixen proteïnes que no es detecten en el vi de raïm més verd. (Murphey i col., 1989b). A la maduresa, les proteïnes representen del 2 al 3 % del nitrogen total del raïm (Anelli, 1977). La part de la baia que presenta més quantitat de proteïna és la pell, amb un 10 al 15 % del seu pes (Ribéreau-Gayon i Peynaud, 1976). Tot i això hi ha alguns treballs que no observen correlació entre la quantitat de proteïna i la quantitat de sucre en el most (Correa i col., 1988; González-Lara i col., 1989).

### 5.5. Verema.

La verema es pot realitzar de la manera tradicional a ma o bé amb veremadores, que són màquines que fan caure els grans per mitjà de vibracions o cops suaus al cep. S'ha postulat que el contacte del most amb la pell augmenta la concentració de proteïna (Paetzold i col., 1990). Degut a que les veremadores provoquen el trencament del 55% de grans en el millor dels casos, amb una alliberació de most del 11 al 26% la maceració pelicular serà inevitable i influirà en l'augment de la proteïna del most, aquests resultats s'agregen en el cas de veremes amb atacs de patògens i en el cas de màquines arrossegades (Chaler, 1991).

### 5.6. Obtenció del most.

Una vegada el raïm arriba al celler existeixen varies opcions per extreure el most: es pot premsar tot seguit sencer (raïm i rapa), es pot derrapar i premsar tot seguit o bé es derrapa i es deixa unes hores de contacte de la pell amb el most per solubilitzar substàncies aromàtiques o precursors d'aquestes procedint després al premsat (aquest procés es coneix conegut com maceració pelicular). En un estudi de Paetzold i col. (1990) s'observa un increment de proteïna en mostos obtinguts prèvia maceració pelicular, aquest increment és d'entre el 50 i el 100%. A la vegada és detecta l'aparició d'una proteïna de 10 kDa. El procés d'augment té importància fins les 10 primeres hores de contacte.



S'observa un efecte d'extracció de proteïnes al sulfitar la pasta de verema a dosi de 20 mg/l. El mateix estudi posa en evidència l'efecte de premsar verema sencera o derrapada, a escala de laboratori i industrial. Els mostos obtinguts a partir del premsat de verema derrapada alliberen quasi quatre vegades més proteïnes que la verema sencera.

El primer procés que té lloc per l'obtenció del most és el premsat, en el premsat fraccionat segons la pressió aplicada a la premsa s'observa un augment de proteïnes al incrementar la pressió d'extracció. Aquest fenomen s'explica pel fet que a la pell és on hi ha més concentració de proteïnes (Feuillat i col., 1995). Una vegada s'obté el most es produeix una clarificació natural per sedimentació. En aquesta fase s'observa una activitat proteolítica que degrada parcialment les proteïnes del most. En el cas de les termovinificacions, que és un tipus d'elaboració de vins negres on s'extreu més color al calentar la pasta de verema, es constata un augment del nitrogen total, cosa que farà pensar en la termoestabilitat d'aquests enzims. Les proteases del raïm estan associades a les parts sòlides i a la polpa, això podria explicar la baixada d'activitat una vegada el most s'ha decantat, també s'observa inhibició al aparèixer l'alcohol (Fleet, 1994).

Un tractament comú utilitzat per la clarificació o desfangament de mostos és l'addició d'enzims pectolítics o pectinases, aquests enzims hidrolitzen les pectines del most disminuint la seva viscositat. La disminució de la viscositat afavoreix la sedimentació dels sòlids en suspensió. Aquests complexos enzimàtics presenten activitat poligalacturonasa, pectina liasa i pectinometil esterasa com a majoritàries; però s'ha observat que també tenen activitat proteasa en assaigs de laboratori sobre caseïna marcada. Tot i així s'ha comprovat que aquesta activitat no es presenta sobre les proteïnes naturals dels mostos (Berthier i col., 1996). Aquest desfangament es pot realitzar d'una manera forçada filtrant dels mostos per filtre rotatiu al buit després del premsat. Al passar els mostos a través de les terres filtrants d'aquests aparells s'observa una disminució del nitrogen proteic d'un 86% en una Garnatxa per l'elaboració de rosat i d'un 66% en un most de Macabeu (Ayestaran i col., 1995).

### 5.7. Fermentació alcohòlica.

La fermentació alcohòlica implica una davallada de la concentració de nitrogen proteic (Hsu i Heatherbell, 1987a; Ayestaran i col., 1995). La disminució es pot explicar per tres fenòmens: desnaturalització, precipitació amb compostos fenòlics o cations metàl·lics i hidròlisi per proteases. La disminució de proteïnes a la fermentació es variable segons la varietat vinífera, des d'un 25% per un Chardonnay, 30% en Verdeca i 45% en Pinot noir (Santoro, 1985) fins a un 60% per un Muscat (Lamikanra i Inyang, 1988) o del 25 al 50% a la varietat Malvar (Dizy, 1993).

La relació entre la quantitat de proteïna entre un most i el seu vi sembla venir influïda pel pH, el gewürztraminer a un pH de 3,2 la disminució és mínima, mentre que aquesta augmenta a pH superior o inferior (Murphey i col., 1989b).

Moio i Addeo (1989) demostren que una part de les proteïnes del most són desnaturalitzades i precipiten, augmentant aquesta precipitació amb el contingut en polifenols del vi. Per demostrar-ho fermenta el most amb diferents temps de contacte amb la pell i observa una disminució de la proteïna soluble a l'augmentar el temps de maceració, observació que es comprova pel fet que els vins negres sempre tenen menys proteïna que els blancs (Lamadon, 1989).

Els perfils electroforètics en SDS-PAGE de mostos i els respectius vins donen resultats contradictoris, hi ha més coherència pel que fa al isoelectroenfocament. Hsu i Heatherbell (1987a) troben el mateix nombre de bandes en most i vi per SDS-PAGE. Per Dizy (1993) a la fermentació desapareixen les bandes de massa molecular més elevada, en canvi no observa diferències en el perfil de punts isoelèctrics. Santoro (1995) observa un comportament dispar entre les varietats Verdeca, Chardonnay i Pinot noir al llarg de la vinificació en l'anàlisi dels perfils de masses moleculars, les tres varietats es comporten igual respecte el punt isoelèctric de les seves proteïnes, doncs les més bàsiques tendeixen a desaparèixer a la fermentació; a la separació segons la hidrofobicitat per HPLC en fase reversa observa diferències entre els mostos i els respectius vins, però no entre les diferents varietats; aquestes dades, junt amb la composició aminoacídica semblant, fan pensar en un origen o funció comú. Marchal i col. (1996) aïlla dos grups de glucoproteïnes a 25 i 60 kDa en un most i comprova que no sofreixen cap modificació a la fermentació.

Els llevats alliberen al mitjà manoproteïnes d'origen parietal durant la fermentació (Llauberes i col., 1987; Waters i col., 1993; Waters i col., 1994a) però tot i així no compensen la quantitat de proteïna inicial. S'ha vist que com més pobre és el most en col·loides més n'allibera el llevat, la hipòtesi de treball és que la presència de col·loides en el medi podria canviar el mecanisme de síntesi de la paret cel·lular dels llevats, que té lloc al citoplasma del llevat (Guilloux-Benatier i col., 1995).

No s'han observat variacions de perfil proteic en funció dels inòculs ni en funció de la presència o absència de diòxid de sofre a la fermentació (Pueyo i col., 1993).

Alguns autors han suggerit l'afavoriment de la fermentació de les proteïnes per la capacitat de les macromolècules d'absorbir inhibidors de la fermentació (Ollivier i col., 1987), com ara els àcids decànics i octànics i llurs corresponents esters (Lafond-Lafourcade i col., 1984).

### 5.8. Tractaments postfermentatius.

En l'elaboració estandarditzada d'un vi, una vegada s'ha acabat la fermentació alcohòlica, es traspalsa i s'hi addiciona diòxid de sofre en el cas d'un vi blanc o en vins negres es realitza la fermentació malolàctica abans de l'addició de diòxid de sofre. Una vegada fet això es realitza una clarificació amb proteïnes d'origen animal i bentonita, amb aquesta operació s'eliminen sòlids en suspensió i en dissolució. En aquest moment de l'elaboració es treuen del vi les proteïnes inestables; en els cellers es realitza un test d'estabilitat al vi i segons el tipus de vi es fa un tractament clarificant amb les dosis més adequades per impedir enterboliments posteriors.

Després de la clarificació es sol filtrar el vi a través de terres d'infusoris i aquest vi, amb aparença clara s'estabilitza respecte a l'excés d'àcid tartàric i potassi i calci per mitjà d'un tractament criogènic. Aquest tractament consisteix en baixar la temperatura fins a la quasi congelació durant un temps determinat i després tornar a filtrar el vi per retenir tots els cristalls formats; degut a la dependència de la constant de solubilitat de la temperatura precipiten les sals de tàrtar de potassi, de calci i sobretot el hidrogenàrtar de potassi. A escala industrial es solen simular al laboratori les condicions de clarificació escollides i donat que una part de la proteïna pot precipitar en el tractament criogènic, es segueix tot el procés fins al final a nivell de laboratori, fent el test d'estabilitat proteica no sols al vi clarificat sinó també al vi "passat pel fred".

La fermentació malolàctica està afavorida per l'alliberació de manoproteïnes de les parets del llevat durant la fermentació alcohòlica. Aquesta activació es deguda a dos factors: l'actuació com a agent destoxificant per fixació d'àcids grassos inhibidors dels bacteris làctics i per un paper nutricional dels bacteris làctics, que presenten una certa activitat peptolítica i glucosidàsica (Feuillat, 1994). La activitat peptolítica és nula a la fase de latència, apareix durant la fase exponencial de la multiplicació dels bacteris i presenta un màxim al final d'aquesta. A la fase estacionària s'observa una disminució ràpida. Aquesta activitat és més important que l'activitat glucosidàsica. En medis rics en macromolècules s'observa un augment d'aquestes activitats (Guilloux-Benatier i col., 1993).

La clarificació com a eina per estabilitzar el vi vers les proteïnes es tractarà en el punt de la influència de les proteïnes sobre la qualitat del vi (6.1.), mentre que a la filtració les proteïnes no tenen cap efecte colmatant degut a la seva estructura globular. També tenen una estructura semblant les proteïnes associades a arabinans, galactans i manans (Villettaz i col., 1987).

Per l'estabilització respecte a les sals de l'àcid tartàric s'ha vist que aquest tractament comporta una disminució quantitativa del 25% de la proteïna del vi (Dizy, 1993). En un estudi s'observa que les proteïnes que precipiten més amb aquest tractament són les proteïnes de menys de 20 kDa i les de més de 50 kDa, que en un anàlisi per PAGE nadiua són les que tenen més mobilitat electroforètica (Correa-Gorospe i col., 1991). S'ha observat un efecte inhibitori de la cristal·lització per part de les manoproteïnes mentre que les glucoproteïnes d'origen vegetal no influeixen a la formació dels cristalls de hidrogenotàrtar potàsic (Gerbaud i col., 1996).

### 5.9. Efecte de la cria i envelliment dels vins.

Lamikanra i Inyang (1988) suggereixen que les proteïnes dels vins poden estar involucrades en el enfosquiment dels vins blancs durant l'envelliment per reaccions de Maillard o anàlegues.

En vins negres s'ha estudiat la formació de precipitats en ampolla i es troba que una part del precipitat correspon a proteïnes intimament associades a polímers fenòlics. Sembla que aquests polímers reaccionarien amb els grups hidroxil de serina i treonina i els grups tiol de la cisteïna donant unions covalents que precipitarien; aquests precipitats augmenten a l'augmentar la concentració de proteïna, que es veu afavorida per la verema mecànica com s'indica en el punt 5.5 (Waters i col., 1994). En vins negres japonesos es veu un alt grau d'estabilitat proteica després de 7 anys d'envelliment (Yokotsuka i col., 1994).

## **6. Importància de les proteïnes sobre la qualitat dels vins.**

Tal com s'ha vist en l'apartat 5 les proteïnes es veuen influenciades per molts factors al llarg de la seva elaboració. Això pot ser important cara els enòlegs per fer vins amb una sèrie de criteris sabent com evolucionen tots els compostos químics del vi. Però l'objectiu final de qualsevol vi és el consum i el consumidor serà el jutge final del vi.

Des del punt de vista del consumidor final, el qual a la majoria del casos desconeix l'existència de proteïnes al vi, aquestes tenen una influència en el que es pot anomenar la qualitat del vi. La qualitat és un concepte de difícil explicació, però que Peynaud associa a sensacions de plaer; un vi serà de qualitat quan produeixi sensacions agradables a la vista, a l'olfacte i en boca. A la vegada aquesta sensació començarà al pensar en un vi i finalitzarà quan desapareixin els estímuls que ha provocat aquest (Peynaud, 1987). Aquesta influència s'ha delimitat a la bibliografia en tres camps: l'estabilitat de les proteïnes al llarg del temps, el paper de les proteïnes a la formació de l'escuma dels vins escumosos i les proteïnes dins de l'anàlisi organolèptic del vins. Dels tres camps, el més desenvolupat ha estat el primer, ja que les precipitacions degudes a les proteïnes són les més importants després de les precipitacions de sals cristal·lines, i més en enologia moderna on s'ha desterrat l'ús de ferro i coure que podien provocar precipitacions i enterboliments en favor de l'acer inoxidable com a material en contacte amb el vi (Jackson, 1994; Boulton i col., 1996). La recerca sobre l'escuma és un camp important per les begudes escumoses, tan les derivades del vi com a la cerveseria, àmbits on es troben molts treballs. L'últim aspecte es el menys estudiat, encara que els enòlegs sempre han observat una pèrdua d'aromes i de sedositat al anar empobrint els vins en col·loides per les successives fases d'abrillantament del vi (Miller i col., 1985).

### **6.1. Estabilitat dels vins vers les proteïnes.**

Una vegada el vi és embotellat pot aparèixer un enterboliment degut a la insolubilització de proteïna. Aquest problema va en detriment de la qualitat visual del vi, causant pèrdues econòmiques considerables; es dona en vins blancs pel contingut més elevat en proteïna que els negres. La majoria de les proteïnes del vi presenten carrega positiva, el moviment Brownià i l'associació amb aigua (hidratació) estableixen les proteïnes en dissolució; l'adsorció, desnaturalització o neutralització per bescanvi catiònic amb agents clarificants poden induir a la coalescència de les proteïnes i posterior precipitació. Una vegada el vi està a l'ampolla, la precipitació pot venir de combinacions amb tanins, amb metalls o principalment d'increments de temperatura.

La combinació de proteïnes amb tanins és coneguda. S'ha demostrat formació de precipitats per combinació entre tanins d'alta massa molecular (d'alt índex de polimerització) i proteïnes (Yokotsuka i col., 1983), però es requereixen gran quantitat de tanins poc polimeritzats per produir enterboliments. La resta de compostos fenòlics no són capaços de reaccionar amb les proteïnes, però si amb els petits pèptids d'entre 2000 i 5000 Da del vi (Waters i col., 1995a; Boulton i col., 1996). A baixa temperatura, en cas dels tractaments criogènics, també es formen unions inestables entre els tanins i les proteïnes que es poden retirar del vi per filtració.

Les precipitacions metàl·liques són degudes a la presència d'elevades quantitats de ferro (més de 8 o 10 mg/l) en el vi, que reaccionen amb els fosfats donant fosfat fèrric o amb els fosfats i proteïnes formant un complex. Si el vi té més de 0,5 mg/l de coure les proteïnes també hi poden reaccionar formant un precipitat polsós de color ataronjat que desapareix a l'obrir l'ampolla (Jackson, 1994). Aquestes precipitacions s'eviten pel control de metalls a la vinificació, impedit que el vi estigui en contacte amb qualsevol estri de coure o de ferro.

La desnaturalització tèrmica és la font de la majoria de precipitacions, molts autors separen les fraccions de proteïna i després observen la seva estabilitat al calentament, concluint que la proteïna que precipita és la inestable i la que s'ha de treure del vi. El primer que es va veure es que no hi ha una correlació entre la quantitat de proteïna inestable i el contingut total; Koch i Sajak (1959) troben dues fraccions de proteïques majoritàries, que es redueixen per efecte de la calor. Altres autors separen les diferents fraccions del vi i arriben a la conclusió que sols una part es responsable de la inestabilitat proteica (Moretti i Berg, 1965). En clarificacions amb gelatina i gel de sílice i ultrafiltrant després el vi, Millies (1975) observa que les proteïnes de menys de 10 kDa no intervenen a l'enterboliment, les de 10 a 30 kDa sols en part mentre que les de més de 30 kDa són les més inestables. Segons Hsu i Heatherbell (1987b) les proteïnes més inestables al tractament tèrmic són les de baixa massa molecular, de 12600 a 30000 Da, amb pI entre 4,1 i 5,8 i les glucoproteïnes. Lamikanra i Inyang (1988) observen en varietats viníferes tipus muscadine que la fracció làbil és la de més de 32 kDa. Davant de la variabilitat de resultats un treball de Dubourdiou i col. (1988) observen que la precipitació tèrmica afecta al conjunt de proteïnes del vi. Addeo i Moio (1989), en coherència amb els autors anteriors, observen que les proteïnes menys afectades pel tractament tèrmic són les de pI entre 3,5 i 5,5, que tot i així baixen un 42%. Paetzold i col. (1990) observen per un most que les proteïnes més inestables tenen punts isolèctrics discrets de 6,2; 5,6 i una darrera que té un pI superior a 9. Les tres fraccions tenen una massa molecular entre 18 i 25 kDa i totes són glucoproteïnes.

Waters i col. (1991) separen varies fraccions per mitjà de sulfat d'amoni en combinació amb ultrafiltració i observen per la tècnica de "back addition" (que es descriu al punt 6.1.1) que la fracció que contribueix més a la formació d'enterboliments té una massa molecular de 24 kDa i, en menys mesura la de 32 kDa. La separació de les proteïnes del vi per electroforesi capil·lar també ha estat una eina per caracteritzar l'estabilitat tèrmica, en la mesura que de les 7 fraccions que es separen per aquesta tècnica, es veu que totes minvent entre un 25 i un 75% menys la fracció amb menys mobilitat electroforètica, que és estable (Ledoux i Dubourdieu, 1992). Yokotsuka i col (1994) observa que les proteïnes estables al xoc tèrmic en vins negres són glucoproteïnes, confirmant la hipòtesi de que la glucosilació de les proteïnes els hi confereix estabilitat davant dels tanins i dels canvis de temperatura (Hagerman i col., 1986; Barbaric i col., 1987). Això ho confirmen Waters i col. (1995a) on demostren que les procianidines estan unides a les proteïnes solubles i termolàbils sols per unions febles ja que no sempre es troben als precipitats proteics, tot i que estan implicades ja que proteïnes que en vins model sense polifenols no precipiten si ho fan en vins. Dawes i col. (1994) separen les proteïnes d'un gewürztraminer en 5 fraccions segons el punt isoelèctric i observen que en tots les fraccions hi ha formació d'enterboliment. La diferència més notable és l'aspecte de la boira, ja que com més bàsica és la proteïna (pI més alt) més compacte és el sediment.

### 6.1.1. Mètodes de control de l'estabilitat.

El problema de l'estabilitat es pot enfocar des de dues perspectives: (a) l'estabilitat del vi respecte a les proteïnes que conté, que seria el punt de vista més comú i d'interès industrial; l'altre enfocament es més de laboratori de recerca, consisteix en (b) observar l'estabilitat d'una fracció de proteïna en un vi prèviament ultrafiltrat a un tall molecular de 10 kDa, de manera que es veu la estabilitat d'aquesta fracció *per se* respecte el vi sense altres col·loides que interfereixin.

(a) Les proves més usuals a realitzar per l'estabilitat proteica de vins son les següents:

1. Test tèrmic. Aquest assaig és el més utilitzat per observar possibles problemes d'instabilitat. El procediment es calentar mostres de vi a temps i temperatures variables segons els autors que van des de una hora a 90°C fins a dos dies a 50°C seguit de refredament per accelerar la precipitació. Es mesura l'augment de terbolesa.
2. Test de l'àcid tricloroacètic (TCA). Es prepara TCA al 55% en aigua i s'addicionen 5 ml d'aquesta solució a 50 ml del vi en qüestió. La barreja es calenta en aigua bullint durant dos minuts, es refreda a temperatura ambient i es mesura l'augment de terbolesa.

3. Bentotest. És una solució aquosa d'àcid fosfomolíbdic al 5%, 5% de sulfat de sodi, 0,25 % de glucosa i 15% d'àcid sulfúric concentrat. S'addicionen 5 ml d'aquesta solució a 50 ml de vi, s'agita durant un minut i es mesura la inestabilitat per el increment de terbolesa.
4. Sulfat amònic. S'utilitza una solució saturada de sulfat d'amoni. S'addiciona un 5% (v/v) a una mostra de vi i es calenta durant 7 hores a 55°C. Es refreda a temperatura ambient i es mesura el increment de terbolesa.
5. Etanol. Es barregen vi i etanol absolut en proporcions iguals, s'espera uns minuts perquè reaccionin i es llegeix la terbolesa; a baixes temperatures s'augmenta la sensibilitat de la prova.

En el cas de no disposar de nefelòmetre o turbidímetre, es pot utilitzar la lectura d'un espectrofotòmetre a longituds d'ona entre 540 i 650 nm.

Toland i col. (1996) comparen el test tèrmic, que es pot considerar com a patró per la seva ampla difusió, amb les altres proves (de la dos a la quatre); observen la variació de terbolesa en funció d'una addició creixent de bentonita amb els quatre assaigs.

El test que més s'aproxima al tèrmic és el del sulfat amònic, això es degut a que el sulfat amònic fa més un "salting out", que aglomera i precipita les proteïnes que no pas una desnaturalització massiva, a més va acompanyat d'un calentament, que simula més la precipitació deguda als canvis de temperatura que succeeix en un vi durant el seu magatzematge. En canvi, els altres dos tests desnaturalitzen la totalitat de proteïna present en el vi, donant les lectures nefelomètriques més altes, i per obtenir nefelometries considerades estables (13-14 NTU) s'ha de duplicar la dosi de bentonita.

El xoc tèrmic també ha estat discutit per la poca correlació entre les diferents versions, que indiquen que accelerar el procés no és el que succeeix a la realitat. Els assaigs més llargs, a 24 o 48 hores s'accelera la oxidació i condensació dels compostos fenòlics, que poden falsejar la prova per combinació amb els petits pèptids. Un altre problema a l'hora d'utilitzar aquest test és el fet de considerar el precipitat com a proteic i utilitzar sols bentonita com a agent clarificador, ja que en molts vins en dosis excessives de bentonita, precipiten altres molècules com ara els polisacàrids o polifenols, contribuint als artefactes (Boulton i col., 1996). El mateix autor proposa com a mètode alternatiu el cinquè, la utilització de l'etanol. Aquest test dona una concentració final d'etanol de 56% (v/v); a diferència de la prova que es fa per l'assaig de pectines i polisacàrids en que la concentració d'etanol final és de 80% (Ribéreau-Gayon i col., 1976). A aquesta concentració la terbolesa produïda és deguda a les proteïnes de la mostra, sense interferència d'altres factors.



(b) Mètodes utilitzats en recerca.

Un micromètode per observar l'estabilitat d'una fracció proteica caracteritzada ja sigui pel seva massa molecular, punt isoelèctric o composició és el que en anglès s'anomena una "back addition". Aquest mètode consisteix en addicionar solucions aquoses de proteïnes (0-50 µl) a una quantitat de vi (1050 µl) sense proteïnes que s'obté ultrafiltrant per una membrana 10kDa, es tapa en una atmosfera inert de nitrogen, es calenta 6 hores a 80°C i es deixa refredar de 12 a 16 hores a 4°C. L'augment de terbolesa en mesura per l'absorbència a 540 nm, corregint amb mostres a les quals no s'hi ha addicionat proteïna; els autors verifiquen el mètode amb albúmina de sèrum boví i ovoalbúmina obtenint una resposta lineal (Waters i col., 1990). Una modificació d'aquest mètode serveix per veure si a part de no precipitar, la proteïna addicionada té un efecte protector de la precipitació d'altres proteïnes del medi. La modificació consisteix en addicionar una proteïna que precipiti al vi ultrafiltrat, ja sigui albúmina de sèrum boví o bé proteïnes aïllades del vi que han donat positiu al test anterior (Waters i col., 1993). Dawes i col. (1994) proposen el tractament del vi amb 1600 mg/l de bentonita com a alternativa a la ultrafiltració per obtenir un vi sense col·loides.

Per veure la influència dels polifenols i macromolècules, alguns autors substitueixen el vi per un vi sintètic sense fenols ni polisacàrids, que és un tampó d'àcid tartàric (Dawes i col., 1994; Waters i col., 1995a).

#### 6.1.2. Estabilització de les proteïnes termolàbils.

Per retirar del vi les proteïnes inestables s'ha utilitzat tradicionalment la clarificació. Altres tècniques que s'han aplicat amb menys èxit són la ultrafiltració, el xoc tèrmic i el tractament amb proteases. Una alternativa per estabilitzar que es proposa cada vegada amb més força és la utilització de col·loides protectors, que solen ser glucoproteïnes.

El tractament per xoc tèrmic consisteix en calentar el vi a alta temperatura en curt espai de temps; després del tractament precipiten les proteïnes insolubles. Aquests tractaments tenen una efectivitat limitada i desigual, possiblement degut a la composició en polisacàrids del vi (Boulton, 1996).

La ultrafiltració va ser proposat com a alternativa a la clarificació per Hsu i col. (1987), que observen com la ultrafiltració és una tècnica tan efectiva com l'addició de bentonita per treure les proteïnes de mostos i vins.

En treballs posteriors d'aplicació en vins blancs s'observa que tot i retirar la majoria de proteïnes, els vins són inestables degut a que les febles quantitats que hi resten són de la fracció de baixa massa molecular; a més, al ultrafiltrar es treuen una bona part dels col·loides protectors (Flores i Heatherbell, 1988; Serrano i col., 1988). La falta de selectivitat d'aquest tractament el fa no compatible per l'obtenció de vins de qualitat (Aleixandre i Velez, 1991).

#### 6.1.2.1. Proteases.

Per estabilitzar el vi s'ha assajat el tractament amb peptidases amb molt poc èxit fins ara. Waters i col. (1990) proven 5 peptidases, comproven que les cinc són actives en un vi a 18°C. En medi a pH 3 durant 7 dies s'observa que les proteases són incapaces de degradar les proteïnes d'un most. El tractament en vi degrada parcialment les proteïnes però no l'estabilitza, en tres mesos s'observa que el requeriment de bentonita per estabilitzar-lo és un 30% menys, però el mateix resultat es troba en el vi control, potser degut a les proteases naturals del vi. Conclusions similars observen Ledoux i col. (1992a) a l'afegir un autolitzat de llevat amb gran activitat proteàsica a un vi inestable i verificar que no hi havia millora a la seva estabilitat proteica. La resistència a la proteolisi s'ha pensat que era deguda a la presència d'altres macromolècules com els polisacàrids o el compostos fenòlics, però en estudis posteriors demostren la resistència a la proteolisi de les proteïnes del vi és una propietat intrínseca (Waters i col., 1992).

També s'ha postulat que la resistència a la proteolisi podia ser deguda a la glicosilació de les proteïnes (Semino i col., 1985), però no hi ha acord entre el grau de glicosilació de les proteïnes del vi. Així mentre Paetzold i col. (1990), Yokotsuka i col. (1991) o Marchal i col. (1996) suggereixen una alta proporció de proteïnes glicosilades altres autors com Hsu i Heatherbell (1987a) o Waters i col. (1991) en troben una o dues. En treballs posteriors s'ha observat que la proteolisi no es donava ni en glucoproteïnes ni en proteïnes sense grup prostètic (Waters i col., 1995b).

La proteolisi té lloc de manera natural en el vi però no s'ha identificat cap proteasa, tret de les de llevats. S'ha observat que els llevats són capaços d'utilitzar les proteïnes del most com a única font de nitrogen per l'addició a medis mínims de proteïnes del vi desnaturalitzades (Conterno i Delfini, 1994) i Sato i col. (1997) han vist que els enzims proteolítics carboxipeptidasa i especialment la proteasa A de *Saccharomyces cerevisiae* són actius a fora la cel·lula. Aquesta activitat no seria suficient com per degradar les proteïnes del vi degut a la poca quantitat d'enzim alliberat i a la termolabilitat d'aquests enzims.

### 6.1.2.2. Clarificació.

La clarificació dels vins ha estat utilitzada tradicionalment en enologia per llevar-hi col·loides, sòlids en suspensió i fenols. Quan la tecnologia de purificació de proteïnes no estava desenvolupada s'addicionaven els clarificants amb el producte que els contenia; així s'utilitzava sang de bou per clarificar amb albúmina de sang, llet descremada per clarificar amb caseïna o clares d'ou batudes per clarificar amb albúmina d'ou. Aquests tres clarificants mencionats, també anomenats coles, reaccionen amb els compostos fenòlics del vi i flocculen precipitant. Per retirar l'excés de proteïnes, ja siguin del vi o d'un clarificant addicionat prèviament s'utilitzaven els tanins. Els tanins són productes normals del metabolisme dels vegetals amb una funció de defensa; són presents a la pell i el pinyol del raïm; aquests són els tanins condensats o procianidines. Pels tractaments del vi s'utilitza un altre tipus de taní anomenat hidrolitzable o pirogàlic que s'extreu d'agalles i de fustes riques en tanins. Els tanins hidrolitzables estan formats per una molècula glúcica en la que alguns dels grups hidroxil estan substituïts per àcid gàlic o àcid elàgic. Són totalment solubles en l'aigua i la massa molecular està compresa entre 750 i 3000 Da.

La principal propietat és la possibilitat de combinar-se amb proteïnes, el que explica la seva astringència. Per aquesta raó són utilitzats per la clarificació de vins. Els tanins tenen una acció de combinació amb altres polímers, com els polisacàrids i també són capaços de precipitar alcaloides. La utilització de tanins és incompatible amb la d'enzims per la seva natura proteica. Els tanins s'utilitzen en indústries agroalimentàries per refinar el greix animal, clarificació del sucre vers les proteïnes i ferro, com saboritzants o additiu alimentari. Els millors tanins per fins enològics són els extrets a les agalles, que es formen degut a picades d'insectes en arbres de la família de les terebentines i els de fusta de roure *Limousin* o d'*Allier* després de ser sotmès a un procés de secat de varis mesos. També se n'obtenen del pinyol del raïm prèvia extracció de l'oli. El principi d'extracció és relativament simple; després de moldre la matèria primera existeixen tres solvents amb els que s'obtenen tres tipus de tanins: tanins a l'aigua, a l'alcohol i a l'éter.

El tractament dels vins amb tanins tendeix a disminuir ja que a vegades hi ha petits canvis organolèptics en el vi i augments de l'astringència per tanins que queden en solució. Una solució per aquest problema és la immobilització dels tanins en suports sintètics. Weetall i col. (1984) lliguen àcid tànic a un suport de sílici porosa i obtenen disminucions del 48 al 86% a la concentració de proteïnes conseguint vins estables. També disminueix la concentració de fenols, mentre que no es veuen afectats ni els pèptids ni els àcids. En un altre treball (Powers i col., 1988) immobilitzen proantocianidines que extreuen de pinyol i utilitzen com a suport agarosa.

Obtenen perfils d'extracció de proteïnes amb forma sigmoidal, que fan concloure que en el vi hi ha dues fraccions de proteïna pel que fa a la seva capacitat de reaccionar amb els tanins; pel que fa a la operativitat industrial d'aquesta tècnica no es pot ser massa optimista ja que després de 15 a 17 volums del llit de columna, aquesta perd la capacitat de lligar proteïnes.

L'ús dels tanins per clarificar vins amb proteïnes inestables va estar desplaçat per la bentonita, agent àmpliament utilitzat a la actualitat. La bentonita és una argila d'origen volcànic descoberta el 1888 a Fort-Benton, Wyoming, (U.S.A.) i d'aquí el seu nom. Ha estat utilitzada tradicionalment per l'estabilització de vins blancs des dels anys trenta. Esta composta per silicats d'alumini naturals hidratats; formats en un 75 % com a mínim, de montmorillonita. És inert químicament i innòcua per l'organisme. Al pH del vi presenten carrega electrostàtica negativa, i adsorbeixen les proteïnes i els antocians, ambdós carregats positivament. La seva reactivitat es deguda al bescanvi catiònic. Tenen la capacitat d'absorbir gran quantitat d'aigua (inflar-se), cations i canviar les bases. Per l'obtenció de bentonita es parteix d'un mineral, rarament pur, i s'activa amb àcid sulfúric o àlcalis a alta temperatura; també s'hi pot realitzar un bescanvi de cations, parlant aleshores de bentonites activades. A tall d'exemple al passar una bentonita càlcica natural a un sòdica, per l'addició de carbonat sòdic, augmenta la taxa d'inflament (àrea de bescanvi) de 2 a 15.

La seva estructura tridimensional (figura 2) consisteix en un apilament en fulles, cada una de les quals té tres capes; una capa d'octàedres entre dues capes de tetràedres. Els tetràedres estan units per àtoms d'oxigen i en el seu centre hi ha àtoms de silici i alumini en ocasions. Els octàedres s'intercalen entre els tetràedres, contenen un àtom de magnesi o alumini que estan lligats a àtoms d'oxigen o a radicals hidroxil que conformen l'aigua de constitució, a la cristallització de la malla elemental. L'absència de cations als octàedres i el reemplaçament per àtoms d'alumini i magnesi implica un deficit de carregues positives, de manera que la superfície de la fulla té carrega negativa; que farà que hi hagi repulsió entre les fulles.

La separació entre les fulles s'anomena distància interfoliar, es determinable per difracció de raigs X. La superfície que queda entre les fulles s'anomena superfície interna d'adsorció i l'espai entre dues superfícies s'anomena espai interfoliar; a aquest espai es situen els cations de canvi hidratats, que influeixen en la distància interfoliar. Els cations de canvi determinen el tipus de bentonita, així es parla de bentonites sòdiques i càlciques quan a la natura es troben en aquest estat i de càlciques activades quan es fa el canvi de bentonita càlcica a sòdica per rentat amb carbonat sòdic. Les bentonites sòdiques i sobretot les càlciques activades tenen una capacitat de hidratació (taxa d'inflament) més gran que les càlciques.

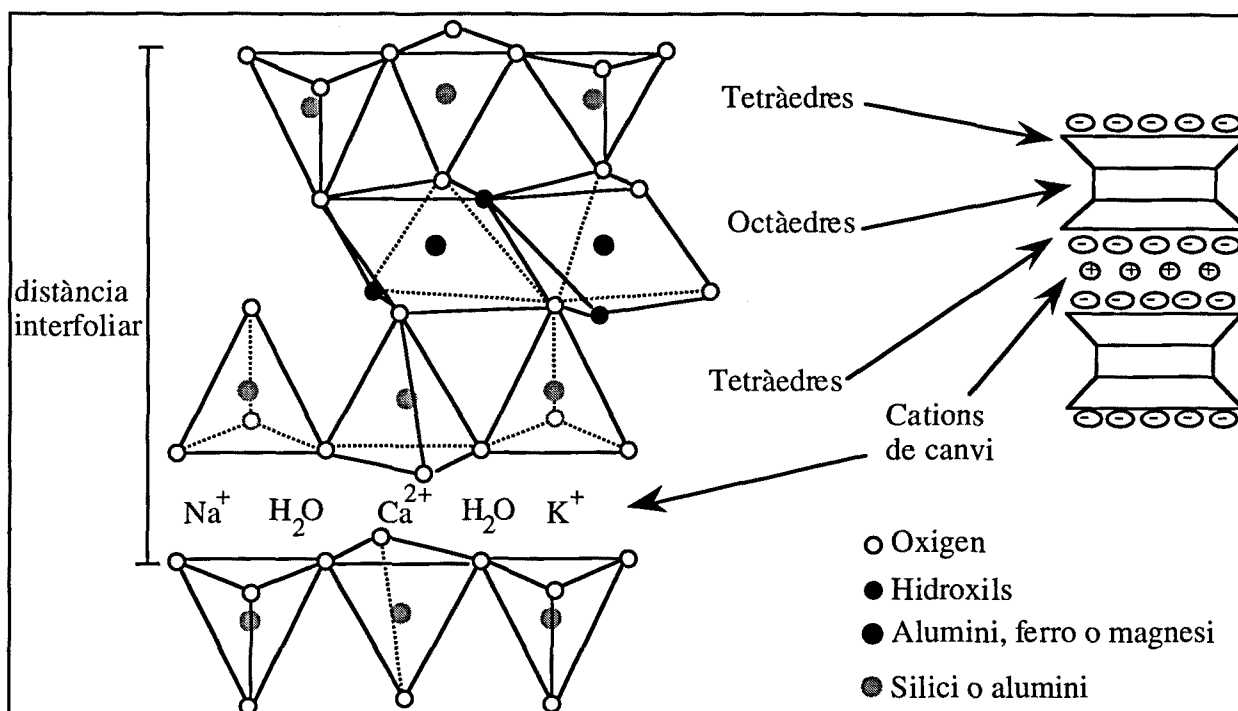


Figura 2: esquema de la bentonita segons Maujean (1983).

Les bentonites més utilitzades en enologia són les càlciques activades; les propietats que es busquen a les bentonites són variables segons la utilització que s'en faci, les característiques principals buscades són:

- Capacitat desproteïtzadora
- Capacitat decolorant.
- Filtrabilitat del vi tractat.
- Volum del sediment.
- Clarificació, nefelometria del vi tractat.

Quan s'hagi de clarificar un vi respecte les proteïnes s'utilitzarà una bentonita que desproteïtzi molt, amb poc volum de sediment; en el cas de la clarificació d'un vi escumós es buscarà una bentonita poc desproteïtzant però amb bon efecte clarificador, ja que com s'explicarà en el punt 6.2. les proteïnes juguen un paper fonamental a l'estabilitat de l'escuma en els vins escumosos (Maujean, 1993; Poinssaut i Hardy, 1995a, b, c; Lubbers i col., 1995; Gössinger i col., 1997).

La cinètica de reacció de les proteïnes amb la bentonita ha estat estudiada per Blade i Boulton (1988); aquests autors verifiquen una ràpida adsorció de les proteïnes, en 30 segons s'assoleix l'equilibri. Comproven que no influeix la temperatura, sols lleugerament el contingut de proteïna del vi, el pH i el contingut en etanol.

El factor principal per la capacitat d'adsorció és la natura de la bentonita, les bentonites sòdiques adsorveixen dues vegades més que les càlciques per unitat de pes.

La seva capacitat desproteïtzadora ja la estudien Kock i Sajak (1959) a la separació per electroforesi d'una mostra tractada vers la control; observant una millora a l'estabilitat proteica segons el test del xoc tèrmic. Hsu i Heatherbell (1987b) tracten amb bentonita vins inestables de les varietats viníferes Gewüzstraminer, Riesling, Sauvignon blanc i Sylvaner, els quatre són estables quan la concentració de proteïna és de 5 mg/l, independentment de la concentració inicial. Les proteïnes més resistents a ser eliminades per la bentonita són les de 11,2, una de 25 kDa i 60 kDa mentre que les més fàcilment eliminades són les de masses moleculars intermitges, de 32 a 45 kDa; comproven que el vi estable és el que no té proteïnes a la zona de baixa massa molecular entre 11 i 25 kDa. En el vi estable detecten una fracció a 28 i 60 kDa. Les proteïnes que primer retira la bentonita, segons aquest treball, són les de pI més alt (de 5 a 8), mentre que les més inestables són les de 4,1 a 5,8. Això implica que els tractaments han de ser més exhaustius, i a l'estabilitzar amb bentonita es trauran abans proteïnes que no estan implicades a l'enterboliment. Sembla que la maduresa del raïm no influeix significativament a la quantitat de bentonita necessària per estabilitzar un vi (Murphey i col., 1989b). No està clara la reacció de la bentonita amb les proteïnes en funció de seu pI; les proteïnes més sensibles al tractament a la bentonita són les de pI més elevat segons Paetzold i col. (1990), ja que a dosi de 40 g/hl desapareixen però les fraccions més inestables al xoc tèrmic necessiten dosi molt més elevades. Per Dawes i col. (1994), la bentonita no demostra una preferència d'adsorció segons el pI de les proteïnes.

Per raons organolèptiques s'aconsella fer el tractament desproteïtzant ja en el most (Casp, 1991), amb l'avantatge d'adsorbir també enzims oxidàsics i mantenir el color disminuint les dosis de diòxid de sofre (Main i Morris, 1994), de totes maneres Gössinger i col. (1997) observa augmentent a la concentració de ferro, que tot i no ser perilloses (3 mg/l) poden catalitzar reaccions d'oxidació. També s'ha comprovat que al utilitzar bentonites en mostos s'allarguen les fermentacions degut a l'empobriment en col·loides (Guilloux-Benatier i Feuillat, 1993; Feuillat, 1994).

Ledoux i col. (1992a) relacionen la taxa de desproteïtzació mitjançant bentonita amb la mobilitat electroforètica per electroforesi capil·lar. Les fraccions amb més mobilitat s'eliminen quantitats febles com ara 25 g/hl de bentonita, mentre que les de menys mobilitat necessiten dosis més elevades. El mateix treball troba una fracció que no es veu afectada per la bentonita i observa que conté una part glúcica lligada a la proteïna. Lubbers i col. (1995) verifiquen la estabilitat de les manoproteïnes respecte la bentonita.

Per Moio i Addeo (1989) la bentonita és el millor agent clarificant, mentre que no observen capacitat desproteïtzadora en altres clarificants utilitzats en el vi com ara la gelatina, el caseinat potàssic i una mica en el caolí. En suc de poma també s'ha estudiat l'efecte desproteïtzant de la bentonita, reduint a la vegada l'oxidació (Siebert i Lynn, 1997).

### 6.1.2.3. Col·loides protectors.

En enologia es disposa de productes que s'anomenen col·loides protectors. Són substàncies que tenen la propietat d'inhibir les precipitacions en el vi. Un exemple és l'àcid metatartàric, producte que s'obté per polimerització de l'àcid tartàric a alta temperatura, que inhibeix la precipitació de tàrtars al baixar la temperatura del vi. Una altre substància és la goma aràbiga, fabricada a base d'un polisacàrid, té la capacitat d'estabilitzar el color en vins negres joves, inhibint la precipitació de la matèria colorant. També es venia observant que la fermentació en barrica i la posterior conservació del vi sobre els llevats durant uns mesos, donava vins més estables vers la precipitació proteica (Boulton i col., 1996). Degut a l'augment del temps de contacte (més de quatre mesos) entre el vi i els llevats que l'han fermentat es produeix el fenomen de l'autolisi. L'autolisi consisteix en una autodegradació enzimàtica dels llevats després de la seva mort. Les conseqüències principals sobre els vins són els canvis organolèptics i l'augment de la concentració de macromolècules del vi. Aquest es degut a les manoproteïnes originàries de la degradació de la paret del llevat per les endo- i exo- $\beta$ (1-3)Glucanases. L'alliberació depèn de la soca de llevat, del temps de contacte i de la temperatura (Llauberes i Dubourdeiu, 1987; Fleet, 1994).

El paper d'aquestes manoproteïnes en vins tranquils ha estat aclarit per Ledoux i col. (1992a), que observen a la separació per electroforesi capil·lar que la fracció més termoestable té un alt contingut de polisacàrids; al conservar el vi sobre els llevats de fermentació el vi guanya en estabilitat proteica i comproven que aquesta es deguda a les manoproteïnes parietals. La demanda de bentonita del vi per estabilitzar-se baixa a la meitat (Ledoux i Dubourdeiu, 1992, Ledoux i col., 1992b).

La funció estabilitzadora de les glucoproteïnes ja es va veure en un vi sense criança amb els llevats, on s'observava una fracció que contenia una glucoproteïna detectada per SDS-PAGE amb tinció amb àcid periòdic-Schiff de 63 kDa junt amb altres de massa molecular més elevada que no havien entrat en el gel separador tenia un efecte protector sobre el medi (Waters i col., 1991). En un treball posterior s'aïlla i purifica una manoproteïna d'un vi blanc que tampoc havia sofert una criança sobre llevats, observant que té un efecte protector sobre la resta de proteïnes del vi i fins i tot sobre albúmina de sèrum boví.

De fet s'ha vist que la síntesi de les manoproteïnes té lloc al citoplasma del llevat durant la fermentació i no tota la manoproteïna sintetitzada s'utilitza per la construcció de la paret, una part es solubilitza en el mitjà (Llauberes i Dubourdiou, 1987). El mecanisme d'actuació d'aquesta manoproteïna consisteix en disminuir la grandària de partícula de l'enterboliment més que prevenir la precipitació de les proteïnes. Perquè es vegi la boira el diàmetre de partícula ha d'ésser més gran de 5  $\mu\text{m}$ , en un vi tèrbol les partícules tenen un diàmetre de 15  $\mu\text{m}$ , al anar afegint manoproteïna s'observa que aquest arriba a les 5  $\mu\text{m}$  desitjades. La composició d'aquesta manoproteïna és de 96% de carbohidrats i un 4% de proteïna, els sucres predominants són la manosa (78%) i glucosa (13%) i els aminoàcids predominants són la serina (31%) i la treonina (13%), la massa molecular és molt elevada, més gran de 100 kDa (Waters i col., 1993). Més tard Waters i col. (1994a) purifiquen una altre manoproteïna d'un vi negre, amb les mateixes propietats contra l'enterboliment. Aquesta té una massa molecular de 420 kDa, amb un 70% de carbohidrats i un 30% de proteïna trobant-se en el vi a una concentració de 0,007%.

També es troba activitat protectora en una arabinogalactano proteïna (AGP) d'origen vegetal que representa el 0,1% dels polisacàrids totals del vi. Aquesta té una massa molecular de 210 kDa, amb un 13% de proteïna. S'observa que si es degrada la part proteica perd la propietat de protecció dels enterboliments (Waters i col., 1994c). Pellerin i col. (1994) troben aquesta propietat en l'additiu gomes d'*A. senegal* i *A. seyal*, que està constituïda per una barreja de arabinogalactanes i AGP; també en una AGP de poma.

La estabilització tartàrica també es pot assolir a través d'un preparat comercial introduït en el mercat amb el nom de Mannostab™ que s'obté per la digestió enzimàtica de parets de llevat a dosi de 10 a 25 g/hl de vi. Aquest producte està fet a base de manoproteïnes d'entre 30 i 50 kDa, que tenen un 15% de proteïna i un 85% de carbohidrats, essent el 100% manosa (Moine-Ledoux i col., 1997).

## 6.2. Vins escumosos.

L'estudi del despreniment de diòxid de carboni és d'interés per les indústries alimentaries de begudes amb gas. En algunes begudes es persegueix l'efervescència com les aigües minerals amb gas; en altres la escuma completa a sobre de tota la superfície del contenidor i no massa efervescència, que seria el cas de les cerveses. Els vins escumosos es situen al mig, ha d'existir efervescència i escuma combinades.

Els vins escumosos, tal com el seu nom indica, es caracteritzen per un despreniment continuat de diòxid de carboni en el que els experts denominen rosaris ( en francès *perlage*).



Es considera com un factor qualitat que aquest despreniment formi a la part superior de la copa, tocant al vidre, una corona de bombolles que té un aspecte cremós.

Això implica que les bombolletes de gas que es van desprendre, quan arribin a la interfase líquid-aire, no esclatin sinó que vagin en direcció radial cap a la corona per augmentar la quantitat d'escuma a la corona i es fonguin allí.

Per la formació d'una bombolla espontàniament es necessari que tingui un radi mínim (radi crític). La pressió interna de la bombolla ha de ser almenys igual que la del vi perquè no es redissolgui, pel que el radi crític ha de ser gran; per tant, la possibilitat que es formin bombolles espontànies és pràcticament nul·la. Les bombolles es formen, gairebé en la totalitat, per nucleació induïda homogènia o heterogènia. La nucleació homogènia es produeix per mitjà de microbombolles estabilitzades a la interfase líquid-gas formades a la agitació de les ampolles al manipular-les; s'estabilitzen degut a que a la interfase hi ha concentracions més elevades de surfactants, poc solubles en el vi. La nucleació heterogènia es produeix per microcavitats de pols de suro, de llevats, de cristalls de bitartrat, però sobretot a la superfície del vidre de l'ampolla (Maujean, 1989).

La freqüència de formació de bombolles depèn de les característiques de la cavitat de nucleació, de la capacitat d'humectació i de la velocitat de transferència del CO<sub>2</sub>. Les bombolles es mouen en ascensió a través del líquid, augmentant el radi i la pressió degut a la disminució de pressió. La grandària de les bombolles depèn de la tensió superficial i de la pressió (Llei de Laplace), del radi de la microcavitat, de la freqüència en que es formin. El temps en que una bombolla arribi a la superfície del líquid depèn de la diferència de densitats líquid-bombolla, de la viscositat del medi, de la grandària de la bombolla i de la distància, segons la llei de Stokes (Polo, 1996).

La escuma és un fenomen termodinàmicament inestable que depèn de la difusió del diòxid de carboni, formació i destrucció de bombolles. Per la formació de la bombolla s'han de vèncer les forces que impedeixen la seva formació, la forma esfèrica és la més estable al tenir una relació superfície/volum més petita. La destrucció de l'escuma és el resultat de tres processos físics: el drenatge, que és flux de líquid de l'escuma a la superfície del líquid; la coalescència, resultat de la ruptura de les parets de les bombolles i l'envelliment de Ostwald, degut a la difusió de gas entre bombolles seguint la llei de Laplace (Maujean, 1989; Bamforth, 1993; Weaire, 1995).

### 6.2.1. Mètodes per determinar la qualitat de l'escuma.

Per la mesura de la qualitat de l'escuma en vins escumosos s'utilitzen mètodes que avaluen la cinètica del despreniment del diòxid de carboni, mètodes basats en la mesura de la quantitat d'escuma i la seva persistència, mètodes basats en la en l'anàlisi de la imatge de l'escuma i mètodes basats en la conductivitat de l'escuma.

Els mètodes basats en la cinètica de despreniment formulen equacions que s'ajusten a la cinètica de sortida del gas, podent calcular una constant de velocitat del fenomen. Per vins escumosos amb la mateixa quantitat de CO<sub>2</sub>, el que tingui la constant més petita serà el que alliberi més lentament el gas i en conseqüència serà el més persistent i de més qualitat (Polo, 1996). Maujean i col. (1988) han desenvolupat un aparell (figura 3) que permet calcular la cinètica de despreniment per la mesura del volum d'una solució àcida desplaçada pel gas que s'ha després de l'ampolla. En aquest aparell els escumosos de més qualitat els temps de despreniment són més llargs.

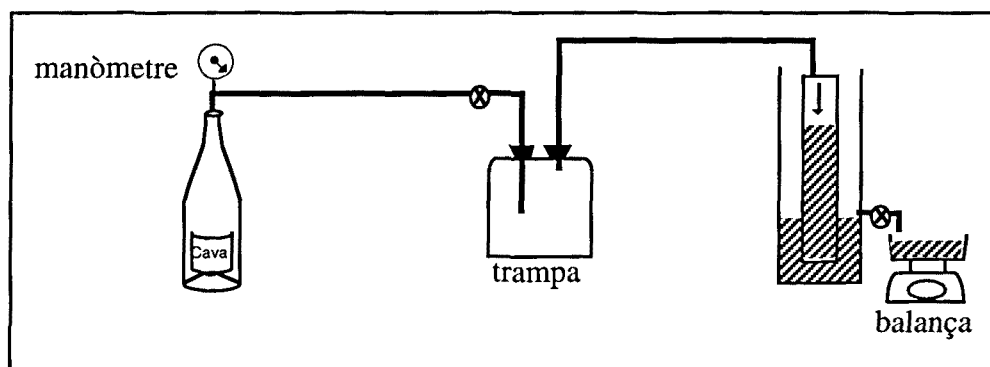


Figura 3: Esquema de l'equipament emprat per Maujean (1983).

Els mètodes basats en la quantitat d'escuma i la seva persistència són els més utilitzats, es poden aplicar en els vins base abans de la segona fermentació per beure el seu potencial doncs està correlacionat amb el de l'escumós resultant (Maujean i col., 1990). Aquests mètodes estan fonamentats en l'estudi de l'escuma com una propietat física d'un líquid, que ha de ser independent de l'aparell i de la quantitat de líquid. Fou primer Bikerman (1938) qui primer va utilitzar el fonament que s'ha anat millorant amb el temps però que segueix vigent: consisteix en un tub cilíndric amb el fons de vidre porós, a través de la qual passa una corrent de diòxid de carboni i provoca la formació d'escuma. Rudin (1957) el va utilitzar en cerveseria i observa que l'escuma de cervesa es colapsa seguint un comportament logarítmic. Edwards i col. (1982) varen utilitzar aquest sistema en vins per primera vegada, mesurant el volum de líquid retingut a l'escuma.

Pueyo i col. (1995) utilitzen el mètode de Bikerman millorat, agafant com a dades l'alçada màxima d'escuma i el temps de colapsament. Però la tècnica més automatitzada i que representa el refinament més gran és el Mosalux™ (figura 4), comercialitzat per l'Station Cœnotecnique de la Champagne, desenvolupat per Maujean i col. (1990) seguint el mateix fonament.

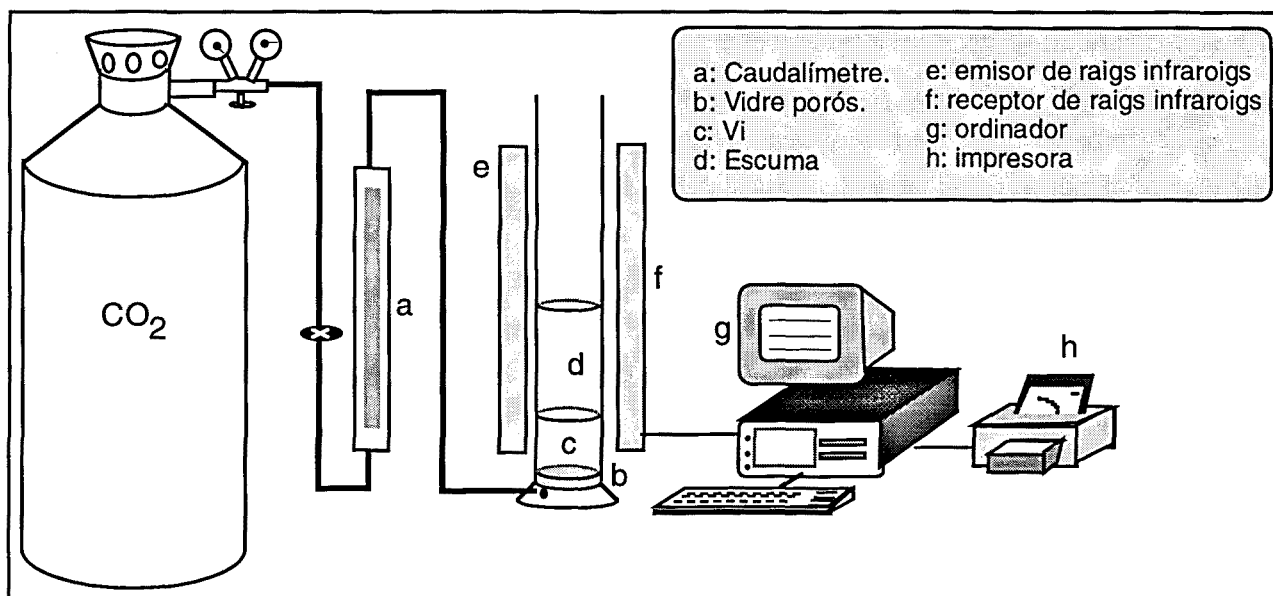


Figura 4: Esquema del Mosalux.

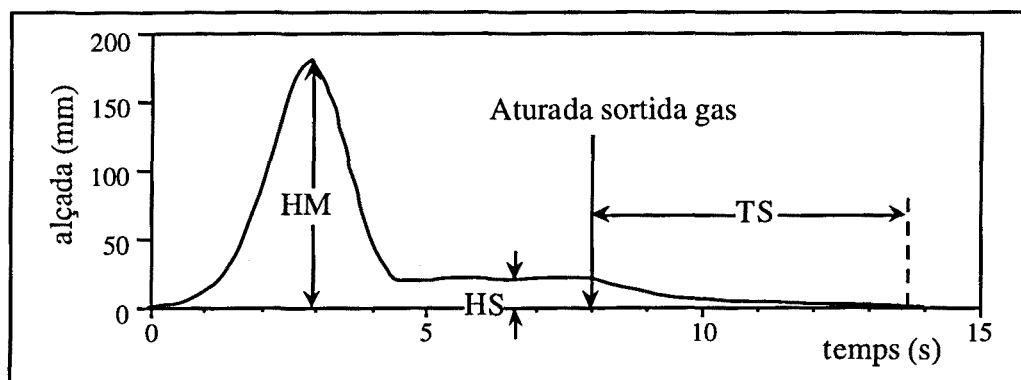


Figura 5: Corba típica d'evolució de l'escuma.

En aquest aparell l'alçada d'escuma es mesura per mitjà d'una cel·lula fotoelèctrica en funció del temps i el temps de colapsament de l'escuma després d'aturar el flux de CO<sub>2</sub>. Es determinen tres paràmetres principals (figura 5).

Aquests paràmetres són:

- Escumabilitat (HM): correspon a l'alçada màxima de l'escuma observada en els primers minuts després del degasat artificial. És l'escuma més o menys seca, que es forma al omplir una copa.

- Estabilitat de l'escuma (HS): és l'escuma que hi ha en regim estacionari, correspondria als rosaris que es desprenen a la copa una vegada plena.
- Temps de desaparició total (TS): representa el temps des que s'atura la sortida de carbònic fins que desapareix l'escuma. S'assimila a l'estabilitat de l'escuma en una copa.

Robillard i col. (1993) proposen nous paràmetres amb més significància, defineixen l'expansió (E), la estabilitat de l'escuma ( $L_F$ ) i el coeficient de Bikerman ( $\Sigma$ ). La expansió és la relació entre el volum d'escuma format i el volum de vi a un temps determinat. La estabilitat determina la vida mitjana de l'escuma formada, sense formació de nova escuma i el coeficient de Bikerman és la mitjana de la vida mitja de les bombolles en estat estacionari.

Els mètodes de visió artificial funcionen primer per la percepció de la informació per mitjà de càmares de vídeo i després es tracta aquesta informació amb un sistema informàtic. Es mesuren el nombre i volum de les bombolles a la superfície del líquid, l'amplada de les bombolles a la corona i el colapsament de l'escuma (Viaux i col., 1994).

Els mètodes basats en la conductivitat consisteixen en provocar una escuma i després mesurar la conductivitat a través d'aquesta; les corbes de caiguda de conductivitat donen informació de les propietats de drenatge i estabilitat de l'escuma. Aquests mètodes s'han utilitzat en l'anàlisi de cerveses (Clark i col., 1991; Clark i Wilde, 1994).

### 6.2.2. Influència de les proteïnes sobre l'escuma.

Per identificar els compostos que influeixen a la formació i estabilitat de l'escuma es treballa amb un Mosalux modificat en que es recull l'escuma produïda i s'analitzen els seus components vers els del vi original; d'aquesta manera s'observa que l'escuma s'enriqueix en proteïnes (del 8 a 30%), polisacàrids (10%) i ferro (del 5 a 15%). El paper de les proteïnes no és sorprenent ja que com a surfactants es col·louen a la interfase amb la part hidrofòbica cap el gas i la part hidrofílica cap a la fase aquosa; el polisacàrids apareixen degut al augment de viscositat que provoquen en el medi disminuint el drenatge (Maujean i col., 1990; Brissonet i Maujean, 1991). En un estudi posterior per determinar quina propietat caracteritza les proteïnes implicades a la formació i estabilitat de l'escuma es veu que la hidrofobicitat permet separar les proteïnes que estan a l'escuma de les que estan al líquid residual mentre que la massa molecular o el punt isoelètric no són criteris bons (Brissonet i Maujean, 1993). Aquestes dades corroboren les obtingudes per Bamforth (1985) que també observa una participació més important de les proteïnes hidrofòbiques que de les hidrofíliques en escumes de cervesa. Mohan i col. (1992) per mitjà de tècniques d'immunolectroforesi, comproven que la capacitat de formar complexos entre proteïnes o amb la inclusió de polisacàrids es un factor estabilitzant de l'escuma.

Coghland i col. (1994) també afegeixen a la hidrofobicitat la capacitat d'agregar-se com un factor estabilitzant de l'escuma en assaigs d'additius en escumes.

En un estudi utilitzant barreges d'un vi ultrafiltrat i el concentrat corresponent amb el vi de base s'observa que els paràmetres de escumabilitat tenen un comportament discordant. L'alçada màxima (HM) es veu molt afectada en cas de disminuir la quantitat de proteïna encara que fos de 1 mg/l, en canvi si s'enriqueix respecte a la concentració inicial del vi aquesta no augmenta el paràmetre HM, aquest resultat fa pensar que les bombolles formades en els primers 40 segons són poc estables degut als fenòmens de difusió i convecció i al haver-hi molta coalescència amb una quantitat mínima de proteïna l'alçada és estable. Aquest comportament no es produeix al analitzar l'alçada en fase estacionària (HS) i el temps de manteniment de l'escuma (TS), on s'observa una correlació clara entre la concentració de macromolècules i el valor del paràmetre (Malvy i col., 1994).

Aquest fenomen resta en part incomprès degut a que, a part de compostos favorables a la formació d'escuma, n'hi ha de desfavorables, com ara els alcohols i els lípids. L'alcohol es l'agent que governa les interaccions gas-líquid i actua en la adsorció d'altres surfactants; a l'addicionar lípids a un vi no s'observen diferències a la qualitat de l'escuma, tampoc s'observen en solucions model amb elevada graduació alcohòlica, mentre que la mateixa addició en solucions de baixa graduació (2%) els lípids destrueixen l'escuma. Es conclou que l'etanol serà capaç de dissoldre els lípids allunyant-los de la interfase gas-líquid (Dussaud i col., 1994; Robillard, 1995). Una altre explicació podria ser l'existència de proteïnes lligants de lípids, que ja s'han descrit en cerveseria (Clark i Wilde, 1994).

En un estudi sobre caves de la comarca del Penedès, utilitzant el Mosalux, Andrés-Lacueva i col. (1996) observen un comportament d'escumabilitat diferent segons la varietat que sigui el Cava, resultats que ja havien vist Bosch i col. (1989) i Comelles i col. (1991) per altres tècniques, així com una sinèrgia al barrejar varies varietats viníferes; també observen variacions durant la cria, augmenta TS i disminueix HM; valors que concorden amb el de Maujean i col. (1990). Una explicació a aquest augment de l'estabilitat de l'escuma podria ser l'augment de petits pèptids amb caràcter hidrofòbic durant la cria originaris del llevat, que han observat Moreno-Arribas i col. (1996).

Unes altres molècules amb una part proteica i una glúcica són les manoproteïnes, que s'alliberaran durant la cria de l'escumós sobre el llevat, també juguen un paper en l'augment de la estabilització de l'escuma (Feuillat i col., 1988); també ha estat comprovada la seva capacitat com a emulsionadors (Cameron i col., 1988). Concorden amb aquests resultats els obtinguts per Silva (1987) Silva i col. (1990).

La explicació a aquest fenomen seria que les manoproteïnes es col·locarien amb la part proteica a la interfase segons la seva hidrofília i la part polisacàrida al líquid augmentant la viscositat i per tant retardant el procés de destrucció per drenatge de l'escuma (Bamforth, 1985).

### 6.2.3. Efectes dels tractaments enològics.

S'ha comprovat que la filtració en condicions esterilitzants a un diàmetre de porus més petit de 0,45  $\mu\text{m}$  afecta als paràmetres de l'escuma segons estudis amb el Mosalux (Robillard i col., 1993) i estudis de visió artificial (Viaux i col., 1994).

Els tractaments amb bentonita, per la seva repercussió sobre la concentració de proteïnes coneguda ja des de 1959 pels treballs de Kock i Sajak i la seva inespecificitat (Dawes i col., 1995) jugarà un paper fonamental a l'escumabilitat. Maujean i col. (1990) constaten un efecte negatiu dels tractaments amb carbó vegetal decolorant més important que la bentonita a dosis iguals sobre l'escumabilitat (HM), però millora la estabilitat de l'escuma (TS) mentre que la bentonita no ho fa; aquesta discrepància es podria explicar per l'adsorció d'àcids grassos que desestabilitzin l'escuma per part del carbó activat. També observen que el tractament amb bentonita fet en un vi es tres vegades més desproteïnitant que fet a un most. Un efecte molt més petit s'observa en els tractaments amb bentocaseïnes, tan de disminució de proteïna com d'escumabilitat.

L'efecte de la soca de llevat respecte a les propietats escumants va ser estudiada per Feuillat i col. (1988) i varen observar l'augment de col·loides totals en els vuit primers mesos després del tiratge fins a multiplicar per tres la concentració del vi base, aquest augment va ser el mateix per les tres soques que es varen testar. En un treball posterior on es comparen 14 soques de llevat, els classifiquen en: fortament, mitjanament i poc escumants; no observen correlació entre la quantitat de proteïna cedida pel llevat i la capacitat escumant de cada soca (Bagot i col., 1989).

Altres autors observen a nivell sensorial diferències segons la soca de llevat i els adjuvants de clarificació utilitzats a la segona fermentació, així es constata que els alginats no donen tan bon resultat com la bentonita, a part de formar un volum de sediments que dificulten el procesament de l'escumós (Gerbi i col. 1990).

### 6.3. Efectes de les proteïnes sobre l'anàlisi organolèptic dels vins.

D'una manera general es pot dir que les macromolècules del vi influeixen en la qualitat organolèptica d'aquest. S'ha observat que els tractaments de clarificació, quan s'eliminen un 30% de les macromolècules, influeixen negativament a la persistència aromàtica. A la vegada, l'enriquiment dels vins en macromolècules que provenen del contacte amb els baixos fins de fermentació tenen un efecte positiu sobre la qualitat organolèptica del vi.

#### 6.3.1. Efectes sobre les aromes.

Les interaccions entre les manoproteïnes alliberades pel llevat i les proteïnes naturals del raïm amb substàncies aromàtiques com són la  $\beta$ -ionona (olor a violeta) i l'hexanoat d'etil (olor afruitat) s'han evidenciat, sobretot en el cas de la  $\beta$ -ionona. Es postula que per mitjà d'interaccions per pont d'hidrogen amb els esters i sobretot hidrofòbiques pels compostos apolars com la  $\beta$ -ionona. S'ha vist que la major part de proteïnes tenen capacitat de fixació d'aromes mentre que els polisacàrids n'augmenten la volatilitat (Voilley i col., 1990; Lubbers i col., 1993). Altres treballs també observen una millora de l'aroma de vins conservats sobre baixos fins de fermentació, però ho atribueixen a l'alliberament d'aminoàcids ja que comparen la quantitat d'aminoàcids alliberats amb la preferència organolèptica (Ariizumi i col., 1994).

Existeix un tipus d'elaboració de vins negres a on es raïm sencer es col·loca en un medi anaerobiòtic abans de premsar i d'aquesta manera s'obtenen vins més aromàtics, aquesta elaboració rep el nom de Maceració Carbònica i es típica de la denominació d'origen Beaujolais francesa o d'alguns vins joves de D.O.C. La Rioja. S'ha vist que durant aquest període d'anaerobiosi té lloc la síntesi de polipèptids a les cel·lules del raïm, i tot i que no es coneix encara el paper d'aquests compostos, podrien estar implicats a la formació d'aromes i la millora organolèptica d'aquests vins en general (Tesniere i col., 1994).

#### 6.3.2. Efectes sobre el gust.

El gust dolç d'algunes proteïnes ha estat esbrinades en proteïnes presents a fruites de l'arbust africà *Thaumatococcus danielli*, d'on s'ha aïllat la thaumatina I i s'ha visualitzat el seu funcionament (Edens i col., 1982; Suami i col., 1997). Waters i col. (1996) han observat que almenys una proteïna del vi té una seqüència homòloga a la thaumatina i per tant es possible que la seva presència permeti correlacionar-se amb el gust dolç.





---

# **Resultats i discussió. Capítol 1.**

---

## **Índex.**

1. Estudi del mètode de separació i quantificació.....	83
1.1. Estudi del mètode de determinació de proteïnes.....	85
1.2. Estudi de la diàlisi.....	86
1.3. Separació per exclusió molecular.....	87
1.4. Separació per bescanvi catiònic.....	92
1.5. Metodologia de quantificació.....	97
1.6. Conclusions del capítol 1.....	99

## 1. Estudi del mètode de separació i quantificació.

Per la separació de la mostra primer es va estudiar la composició d'aquesta en varis vins segons la tècnica més poderosa de la que es disposava: l'electroforesi, separant segons el pes molecular (SDS-PAGE) o segons el punt isoelèctric (IEF). Els resultats es veuen a la figura 10.

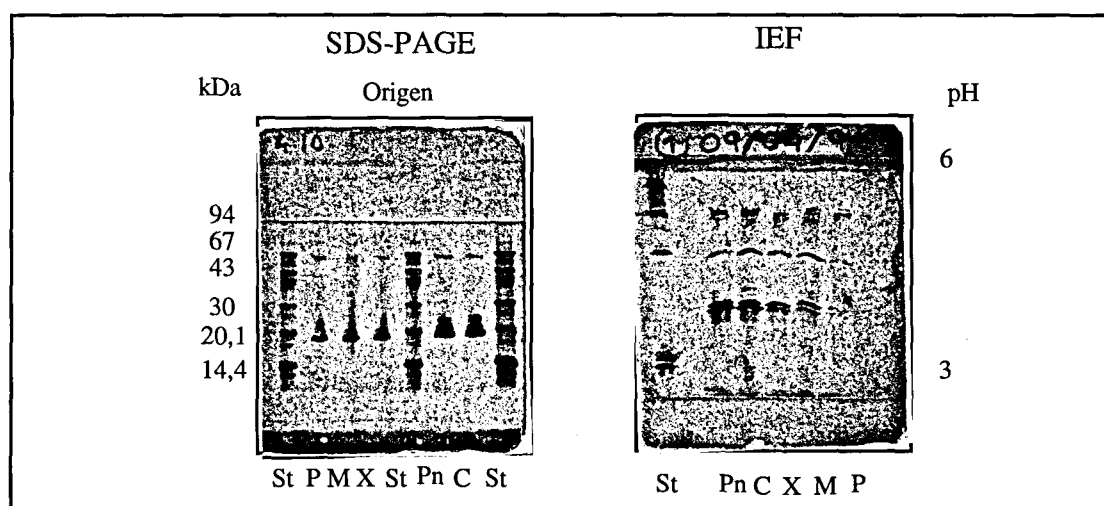


Figura 10: Electroforesi de mostres de vi per caracterització prèvia. St són els estàndards, Les mostres coincideixen amb les inicials de cada varietat, excepte el Pinot noir que és Pn.

Els resultats que s'obtenen per SDS-PAGE dels vins de les cinc varietats viníferes estudiades (figura 10) donen resultats molt semblants, amb la presència d'una banda discreta de 60 kDa i una banda gruixuda entre 20 i 30 kDa, que a vegades en divideix en varies.

Les dades que es troben pels nostres vins coincideixen amb els de la bibliografia. Hsu i Heatherbell (1987a; b) troben resultats semblants als nostres però al treballar amb Gewürztraminer, una varietat amb més quantitat de proteïna, tenen més bandes, però amb una distribució semblant. També concorda amb les dades de Waters i col. (1990), que troba una proteïna a 63 kDa i varies entre 20 i 35 kDa, per un Moscatell. Paetzold i col. (1991), en un estudi amb la varietat vinífera Sauvignon, observen una distribució igual a la nostra, amb una fracció a 60 kDa i un conjunt de bandes entre 18 i 30 kDa. Dubourdiou i col. (1986) amb la mateixa varietat separen per HPLC una fracció a més de 70 kDa que nosaltres no trobem, però la resta coincideix; amb una proteïna a 66 kDa que es minoritària, i dos pics majoritaris a 25 i 29 kDa.

Autors que analitzen les mateixes varietats viníferes que les seguides en el nostre treball observen resultats semblants. Brissonet i Maujen (1993) confirmat després per Marchal i col. (1996) troben bandes entre 10 i 60 kDa amb la majoria entre 20 i 30 kDa en

vins de Chardonnay. Berthier i col. (1996) troben resultats semblants per Pinot noir, a la vegada que observa la seva estabilitat davant d'enzims proteàsics. Correa i col. (1988) estudien les proteïnes de mostos de Macabeu i troben una distribució molecular entre 16 i 30 kDa; en un treball posterior González-Lara i col. (1989) troben un perfil molt semblant al nostre, amb una banda a 70 kDa que representa el 6% del total, la resta en tres bandes de 35, 29 i 23 kDa que representen el 6, 63 i 24% respectivament de la proteïna total segons una anàlisi per densitometria del gel. En un treball posterior Correa-Gorospe i col. (1991) analitzen els perfils proteics de Macabeu, Xarel·lo i Parellada. En les tres varietats el 90% de les proteïnes estaven entre 20 i 39 kDa i la resta entre 60-70 kDa. En les mateixes varietats Pueyo i col. (1993) troben que les bandes més intenses estan entre 25 i 35 kDa.

Pel que fa a l'isoelectroenfocament, tal com es pot veure a la figura 10, totes les bandes estan a la franja més àcida, amb predomini de bandes entre 3 i 4,5; tanmateix no hi ha diferències en funció de la varietat vinífera. Les dades que s'han obtingut en aquest treball són plenament concordants amb la bibliografia per les varietats estudiades (Hsu i Heatherbell, 1987a; b; Moio i Addeo, 1989; Polo i col., 1990; Paetzold i col., 1991), amb la majoria de les bandes a la zona més àcida, entre pH 2,5 i 5,5. Aquestes mateixes dades es troben en vins de les varietats viníferes estudiades en aquest treball com Chardonnay i Pinot noir (Brissonnet i Maujean, 1991; Marchal i col., 1996; Berthier i col., 1996) o en les varietats autòctones Macabeu, Xarel·lo i Parellada (González-Lara i col., 1989; Gorospe i col., 1991; Pueyo i col., 1993; Dizey, 1993).

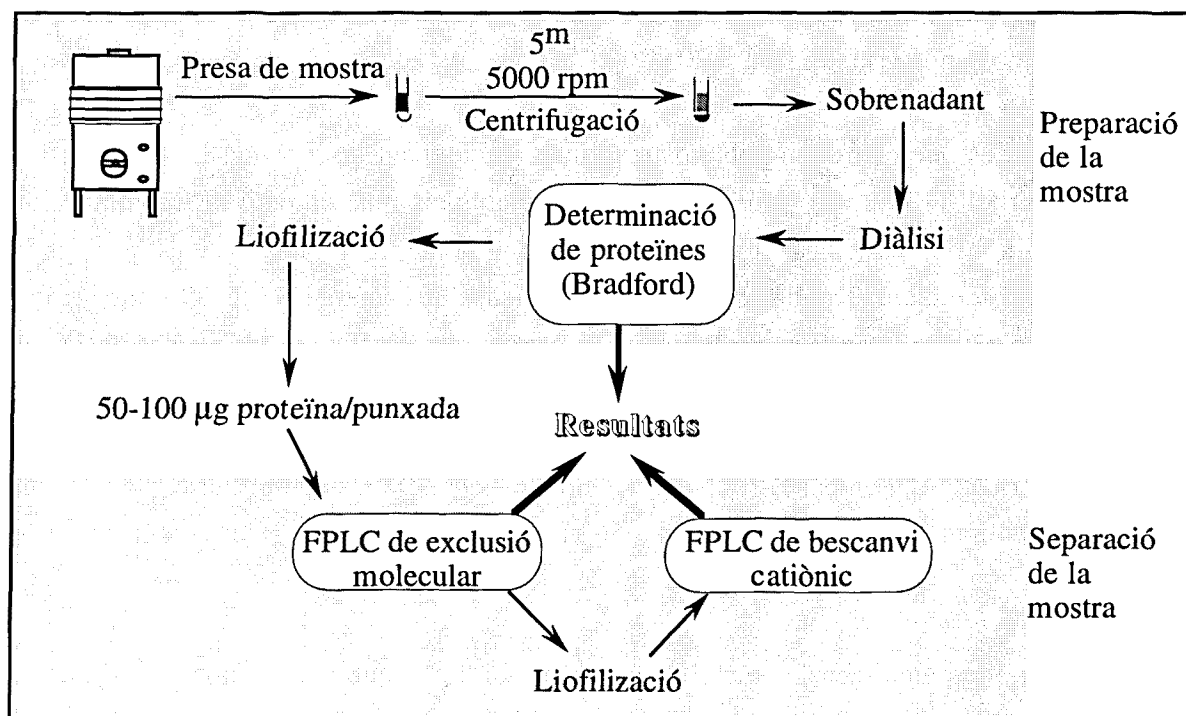


Figura 11: Esquema de separació proposat.

Com es pot observar aquestes tècniques són semiquantitatives, requereixen un bon tractament de la imatge i estan molt subjectes a la manipulació de la mostra, dilucions, etc.... A banda, aquestes tècniques no permeten recollir les fraccions separades per posteriors assaigs. Amb el precedent d'aquests resultats es va buscar una sistemàtica de separació amb un equipament de FPLC; que permetia una bona resolució, el fraccionament i recuperació de les fraccions. A la vegada es volia trobar un bon mètode per quantificar, sense les variabilitats que es troben per la electroforesi i minimitzant la preparació de la mostra. L'esquema de separació que es va aplicar fou el descrit a la figura 11. En aquest mètode es fa una determinació de proteïna total a la mostra dialitzada, es liofilitza i es separa la mostra per dos criteris amb cromatografia líquida de proteïnes: massa molecular i càrrega elèctrica.

Abans d'aplicar aquest mètode de separació de les proteïnes a experiments es va comprovar la validesa i repetibilitat del mètode per una sèrie d'estudis individuals de cada part del procés.

### 1.1. Estudi del mètode de determinació de proteïnes.

En estudis previs s'havien rebutjat altres mètodes com el Lowry (Lowry i col., 1951) per manca de sensibilitat (Lamadon, 1989; Brissonnet i Maujean, 1991), a més a la bibliografia estan descrits interferències deguts als compostos fenòlics (Lowry i col., 1951).

Es va optar pel mètode de Bradford per la gran sensibilitat (1µg/ml), rapidesa del mètode i poc volum de mostra necessari, que permetia fer cada anàlisi per triplicat sense consumir massa mostra. La mostra es prenia després de la diàlisi i abans de liofilitzar. El temps de reacció va ésser de 30 a 45 minuts, tot i que Murphey i col. (1989a) aconsellen 55 minuts. Aquests mateixos autors també observen diferències entre la reactivitat segons la varietat. En els nostres assaigs no s'ha trobat diferències entre la lectura a 30 i 60 minuts, coincidint amb les dades de Vecchi i Brenna (1990).

Els resultats que s'obtenen pels vins estudiats estan en concordància amb els de la bibliografia, amb dades al voltant dels 5 a 10 mg/l en vins no estabilitzats (en rama).

També es va fer un estudi de la linealitat de l'anàlisi per addició d'un patró intern d'albúmina de sèrum boví en diferents quantitats. Les dades de la figura 12 estan fetes per triplicat i els errors de les barres corresponen a la desviació estàndard. En l'ajust per mínims quadrats es recupera un 89,4% de la mostra afegida.

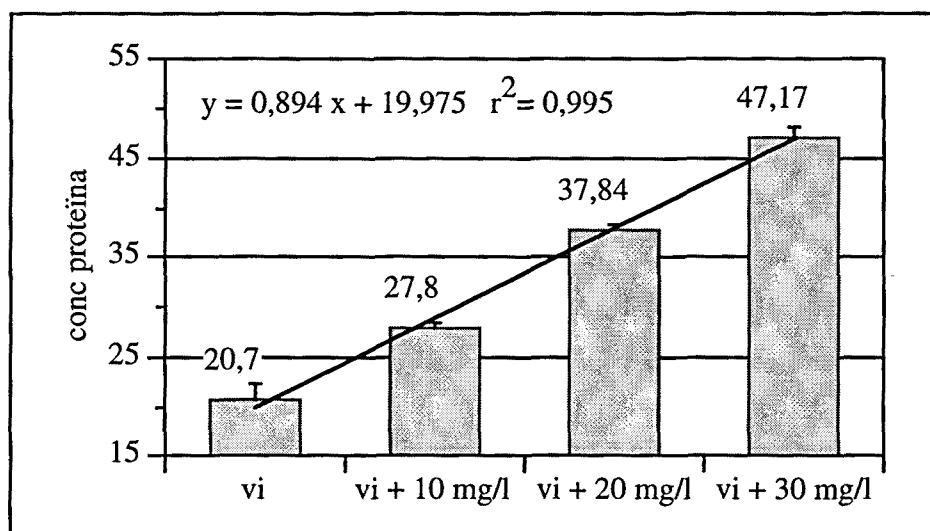


Figura 12: Recuperació de diferents addicions de BSA a una mostra de vi segons el mètode de Bradford amb diàlisi prèvia.

Sembla que el vi tingui la capacitat de fer disminuir 3 mg/l d'albumina de sèrum boví addicionada en totes les mostres, potser degut a l'adsorció en el sac de diàlisi. Tanmateix el mètode és lineal amb un bon coeficient de correlació.

### 1.2. Estudi de la diàlisi.

Per comprovar la repetibilitat de la diàlisi és va omplir cinc sacs de diàlisi amb 15 ml d'un vi. Després de 72 hores de dialitzar contra aigua desionitzada es va recollir la mostra, mesurant per pesada l'increment de volum, que és el mètode utilitzat en tot el treball.

Pes després dialisi (g)	Concentració dialitzat ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentració en el vi ( $\mu\text{g/ml}$ )
18,8	$8,3 \pm 0,4$	$10,4 \pm 0,5$
17,6	$7,7 \pm 0,4$	$9,1 \pm 0,3$
18,7	$7,8 \pm 0,3$	$9,7 \pm 0,4$
17,7	$7,7 \pm 0,4$	$9,2 \pm 0,4$
17,8	$7,7 \pm 0,4$	$9,1 \pm 0,4$

Taula 5: Estudi de la diàlisi. Les dades de concentració són la mitjana de quatre mostres  $\pm$  la desviació estàndard.

Els resultats donen una mitjana de  $9,5 \pm 0,6$  (error estàndard), que són significativament iguals al fer el tractament estadístic de l'anàlisi de la varianza.

### 1.3. Separació per exclusió molecular.

#### Caracterització de la separació.

Una vegada la mostra estava liofilitzada en un eppendorf es resuspèn en un volum de tampó acetat amònic 0,3 M. El volum de resuspensió depèn de la concentració proteica de la mostra, des de 3 ml en el cas dels mostos a la maduració fins a 0,3 ml en el cas de la Parellada a l'estadi vi en rama. El perfil de la separació, monitoritzant l'absorbència a 280 nm, que s'obtenia era tal com es pot veure a la figura 13. S'obtenen quatre pics característics i aplicant la recta de calibrat es veien les seves masses moleculars (taula 6).

Per la caracterització de cada fracció el primer que es va fer fou la resposta al blau brillant de Coomassie G-250 amb el reactiu de Bradford. Es van punxar 50 µl de mostra i es recolliren els pics en quatre fraccions, una vegada liofilitzades es resuspenen en 600 µl d'aigua bidestil·lada i 150 µl de reactiu de Bradford, llegint al cap de 30 minuts. Tal com era de suposar per les dades de pes molecular comparades amb les de la bibliografia, les fraccions amb volum de retenció 1,14 i 1,47 varen ser els que donaren positiu en aquest anàlisi, mentre que els altres dos varen donar negatiu.

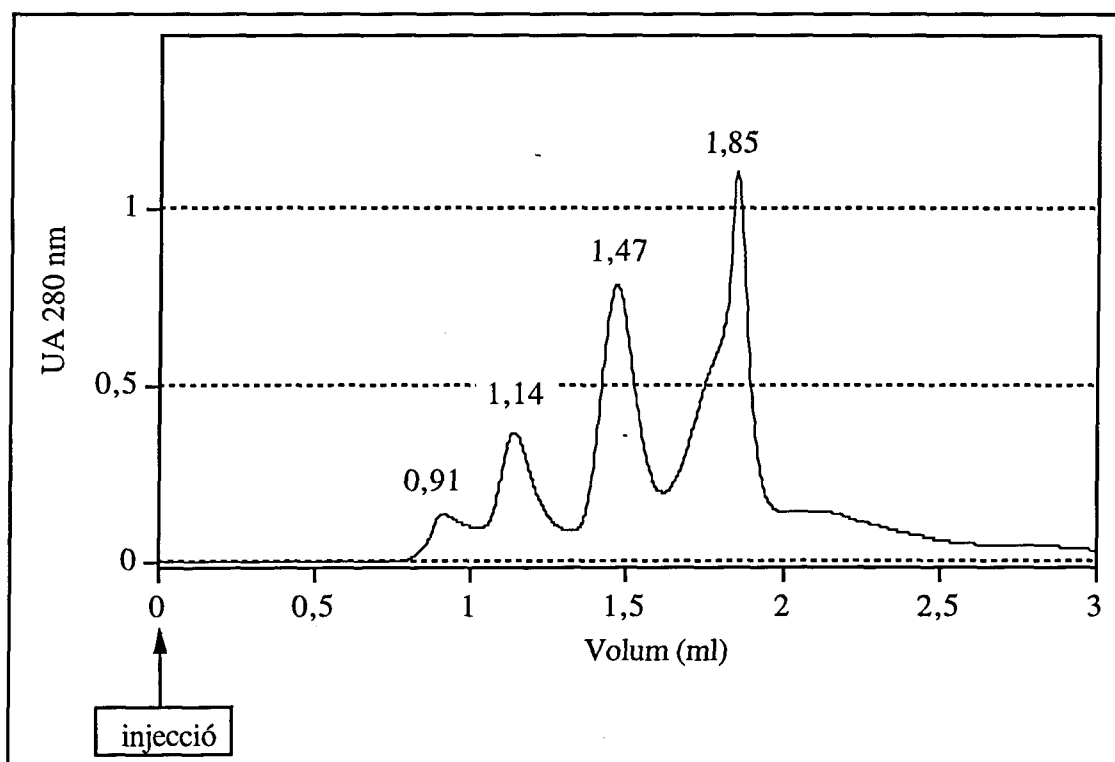


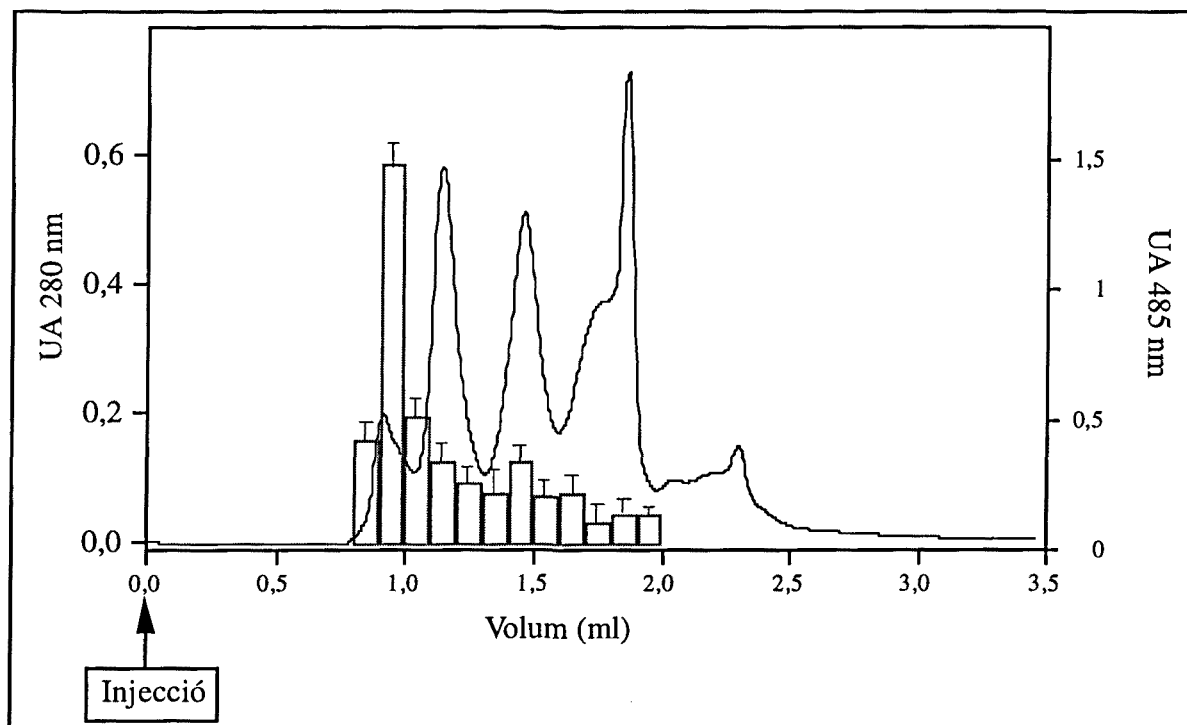
Figura 13: Filtració per exclusió molecular amb la columna Superdex-75.

volum retenció (ml)	començament del pic (ml)	acabament del pic (ml)	pes molecular (kDa)	rang de pesos moleculars (kDa)
0,91	0,8	1,03	129,5	> 82,1
1,14	1,03	1,32	82,1	82,1 - 27,3
1,47	1,32	1,62	15,4	27,3 - 8,7
1,85	1,62	2,71	3,6	< 8,7

**Taula 6:** pesos moleculars dels pics que es separen per cromatografia d'exclusió amb la columna Superdex-75.

A la fracció d'exclusió (0,91 ml) era de suposar trobar-hi sobretot polisacàrids, ja que són col.loides d'alt pes molecular (Dubourdieu i col., 1981; Martí i De La Torre, 1989; Brillouet i col., 1989). Per comprovar-ho es va fer la determinació dels glúcids totals per una modificació del mètode de Dubois i col. (1956) descrita a l'apartat 2.4.

La determinació es realitza per triplicat en fraccions de 0,25 ml recollides a partir del volum d'exclusió (0,8 ml); a la figura 14 es representa la separació per exclusió molecular i en diagrama de barres superposat els sucres totals de cada fracció i la desviació estàndard de la mesura de tres separacions.



**Figura 14:** fraccionament per exclusió molecular i sucres totals.

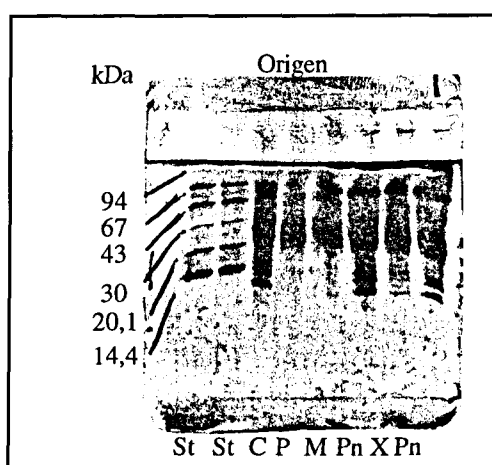


Les fraccions amb més contingut en sucres totals eren les d'alt pes molecular, en el pic d'exclusió. Les fraccions que corresponien al pic dos i tres són més petites, però també contenien sucres.

L'últim pic es va observar que variava molt el seu volum d'elució i area per diferents mostres. Tot i que la mostra estava dialitzada i, per tant no podia haver-hi substàncies de baix pes molecular, aquest pic corresponia a una massa moleculars més petita de 11 kDa, que era la grandària de tall de la membrana de cel.lulosa utilitzada per la diàlisi. L'aparició d'aquest pic generava dues hipòtesis:

- a. Degradació de les proteïnes de la mostra en pèptids més petits. Aquesta hipòtesi s'havia de provar però era bastant improbable ja que la degradació de les proteïnes del vi es molt difícil, tal com descriu (Waters i col., 1996) així com a la proteolisi per possibles proteases presents o addicionades a la mostra (Waters i col., 1990; Ledoux i col., 1992a)
- b. La possibilitat que durant la diàlisi no s'hagués eliminat compostos de baix pes molecular, com ara compostos fenòlics, que quedessin units a les proteïnes per interaccions electrostàtiques o hidrofòbiques. Al fer la separació per exclusió molecular a pH aproximat de 8 i alta força iònica (300 mM) respecte a la que es pot trobar normalment en el vi (aproximadament 100 mM), aquests compostos es separarien de les proteïnes, més hidrofíliques que els compostos fenòlics i s'eluirien més tard; també els compostos fenòlics més hidrofòbics podrien tenir elucions molt retrasades degut a interaccions amb la matriu, tot i que el fabricant de la columna diu que no n'hi ha.

Per verificar la hipòtesi *a* es va fer una electroforesi (SDS-PAGE) amb gels High Density<sup>®</sup> i tinció de plata (figura 15).



**Figura 15:** Electroforesi en gel *High Density*. La simbologia és la mateixa que a la figura 10.

Aquests gels estan optimitzats per la separació de petits pèptids fins a 1000 Da. Es va aplicar la mostra i no es va veure cap banda al rang de menys de 8 kDa. D'altra banda es podia pensar que no serien pèptids doncs les proteïnes del vi estan habituades al medi àcid i a la presència d'un agent desnaturalitzant com és l'etanol, pel que la degradació es difícil.

Per verificar la hipòtesi *b* es va monitoritzar l'absorbència a 320 nm paral·lelament a la 280 nm. Somers i Ziemelis (1972) donen la longitud d'ona 230 nm com a característica per detectar els àcids fenòlics. Tal com es veu a la figura 16 el pic amb volum d'elució 1,85 ml absorbeix a les dues longituds d'ona, confirmant el fet que les proteïnes tenen adherits compostos fenòlics no sols al precipitar-les (Correa i Polo, 1991) sinó també al dialitzar. Aquests compostos es separarien en un medi més bàsic i d'alta força iònica.

Posteriorment assaigs amb substàncies fenòliques que es troben en mostos i vins, com la catequina i l'àcid gàlic, varen donar volums d'elució molt alts respecte a molècules petites com l'aigua, que es detectava per conductivitat. A tall d'exemple per l'àcid gàlic el volum d'elució era de 3,54 ml. Això fa pensar que els pics que s'eluen després del pic 3 siguin substàncies de la família dels compostos fenòlics amb interaccions inespecífiques amb la columna que fan retrassar la seva elució respecte la seva massa molecular.

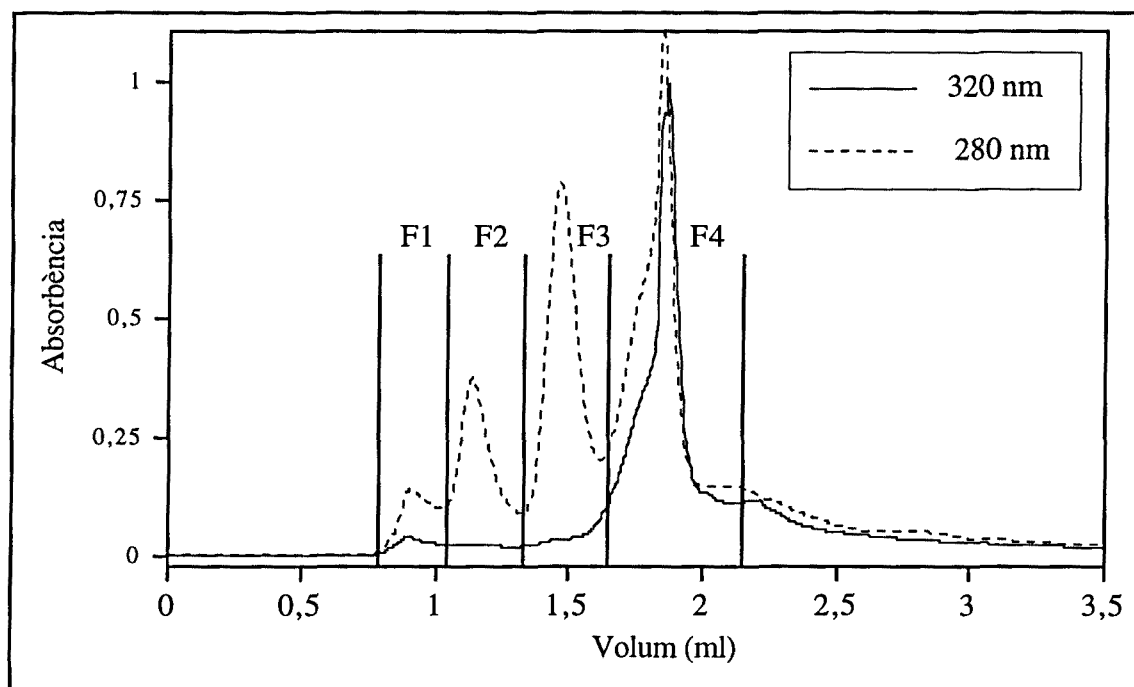
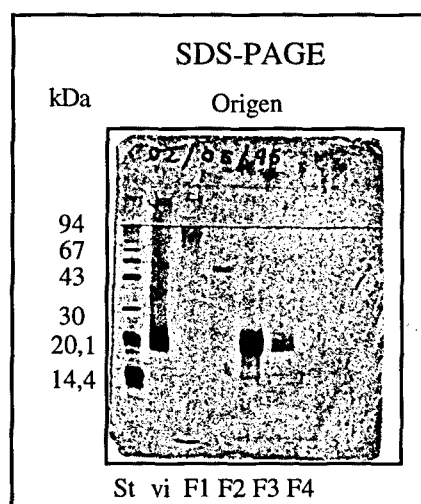


Figura 16: Separació per exclusió molecular monitoritzant a 280 i 320 nm.

Per acabar de completar la nostra hipòtesi de separació es va realitzar una electroforesi SDS-PAGE amb tinció de plata de les quatre fraccions que es separen a la figura 16. Per aquest mètode vàrem aconseguir identificar a quina fracció hi havia proteïna i el seu pes molecular per comparació amb els estàndards. La figura 17 mostra aquesta la placa d'electroforesi i verificà que sols els pics 2 i 3 corresponien a proteïnes; en el cas de la fracció F2 correspon a una banda de 60 kDa mentre que la F3 correspon a una taca, que no s'aprecia com a una sola banda, i molt més intensa, de pes molecular entre 20 i 30 kDa.



**Figura 17:** Electroforesi de les quatre fraccions separades per exclusió molecular. St són els estàndards de massa molecular, vi és la mostra de vi concentrada i Fi són les fraccions.

### Repetibilitat

Per observar la repetibilitat d'aquesta separació es va punxar 50 µl d'una mostra de Pinot noir a l'estadi de vi en rama cinc vegades, monitoritzant la separació a 280 i 320 nm. Els resultats es varen comparar estadísticament i no es varen trobar diferències significatives, tal com es reflexa a la taula 7.

	volum elució (ml)	àrea mitjana (ml·mUA 280 nm)	Error estàndard de les cinc mesures
<b>fracció F1</b>	0,91	24	2 (8%)
<b>fracció F2</b>	1,13-1,14	62	3 (4,8%)
<b>fracció F3</b>	1,45-1,47	122	3 (2,5%)
<b>fracció F4</b>	1,84-1,85	205	19 (9,2%)

**Taula 7:** estudi de la repetibilitat de la separació per exclusió molecular.

#### 1.4. Separació per bescanvi catiònic.

Per la separació de les fraccions proteiques obtingudes per exclusió molecular s'ha d'eliminar el tampó d'elució, doncs per la seva força iònica impediria que s'enganxés a la columna de bescanvi iònic. La manera escollida ha estat la liofilització per la seva rapidesa, economia i capacitat de processar moltes mostres alhora. L'única limitació de la liofilització es la necessària volatilitat del tampó utilitzat en la primera separació, factor que va influir a l'elecció de l'acetat amònic com a eluent. En canvi, per l'elecció de l'eluent del bescanvi iònic va influir la transparència a 230 nm i el pH. L'elecció del pH va venir derivada de les instruccions del fabricant de la columna que aconsellava mantenir un pH almenys una unitat inferior o superior al pI de la proteïna. Es varen fer proves de bescanvi aniònic amb una columna Mono Q<sup>®</sup> i els resultats foren desencisadors, com s'ha vist a la bibliografia (Dorrestein i col., 1995). Segons diversos autors (Hsu i Heatherbell, 1987a; Correa i col., 1988; Gorospe i col., 1991; Dawes i col., 1995) els pI de les proteïnes del vi estan a la franja àcida, entre 3 i 5 majoritàriament. Tenint en compte aquestes dades i l'isoelectroenfocament realitzat a les nostres mostres (figura 10) es va decidir treballar a pH 2, tot i que era el límit de treball de la columna. Per aconseguir pH 2 es va seleccionar un tampó inicial d'àcid acètic 50 mM acidificat al pH escollit amb àcid clorhídric al 10% (v/v). La separació es va fer amb un gradient del mateix tampó amb 1M de clorur sòdic.

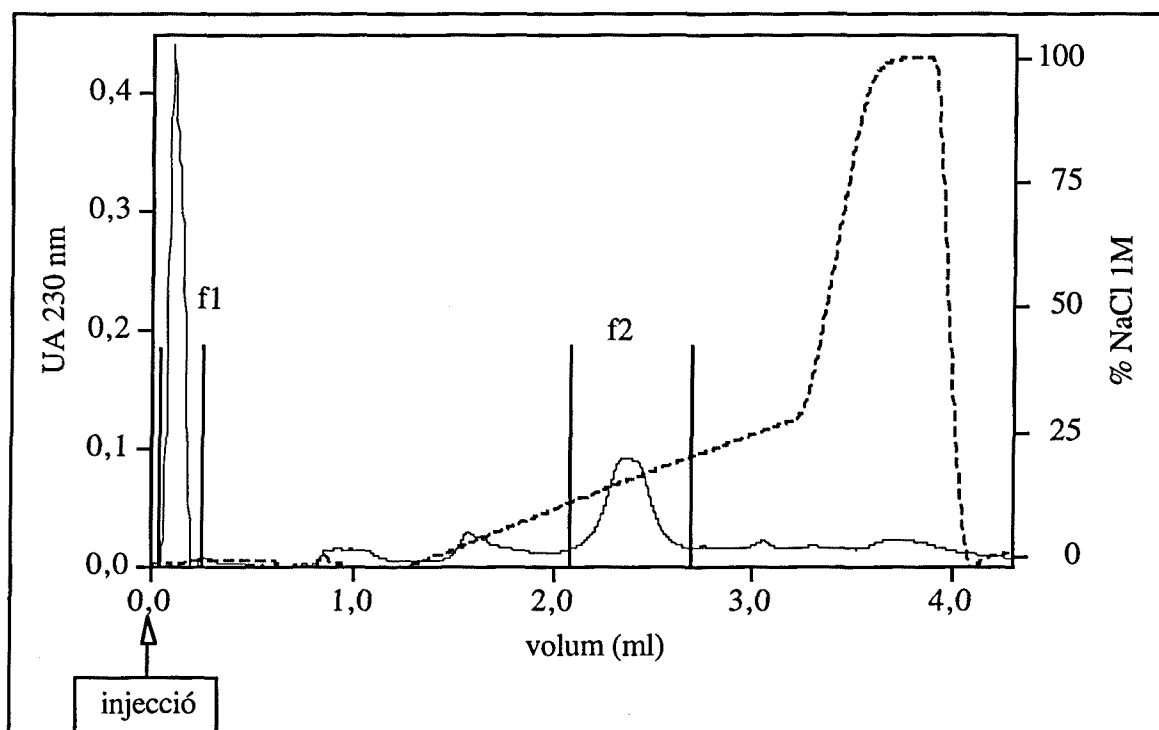
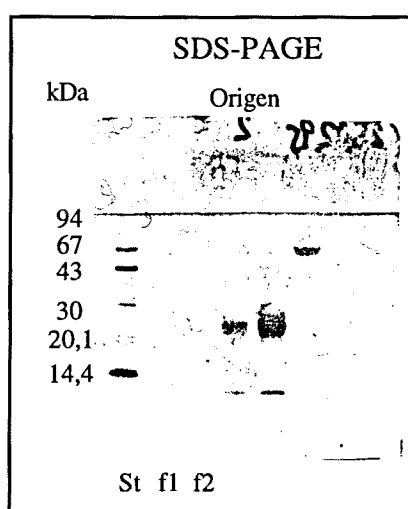


Figura 18: Cromatograma típic de la fracció F2 al separar per bescanvi catiònic.

La separació de la fracció F2 per bescanvi catiònic tenia un perfil típic amb un pic al punxar la mostra i un altre a un volum de 2 a 2,5 ml (figura 18). En alguns casos apareixien petits pics atribuïbles a contaminacions de la fracció F3, ja que els volums d'elució coincidien amb aquells.

Per comprovar la composició proteica de les fraccions f1 i f2 es va fer una electroforesi (SDS-PAGE) junt a la F2, observant que la f1 no presenta cap banda a la tinció per nitrat de plata i la f2 correspon a la proteïna de 60 kDa trobada originàriament en el vi (figura 19). La composició de la f1 no va ser estudiada, però es pot deduir la presència de polisacàrids, ja detectats a la separació per tall molecular.



**Figura 19:** SDS-PAGE de les fraccions obtingudes per bescanvi catiònic de la F2.

Al fraccionament del pic F3 per bescanvi catiònic s'obtenen un nombre variable de pics, junt amb una fracció que no s'enganxa a la columna. Per identificar els pics es varen fer servir dues tècniques: la determinació de la proteïna total segons el mètode de Bradford i la electroforesi (SDS-PAGE). Per il·lustrar aquesta separació a la figura 20 es presenta el cromatograma corresponent al fraccionament de la mostra Pinot noir en estadi vi en rama. Es varen fer dues separacions per obtenir suficient mostra per cada determinació de proteïna. En aquestes separacions es col·lectaren fraccions de 0,25 ml cada vegada. A fi i efecte de comparar l'absorbència a 230 nm amb les dades de proteïna obtingudes amb el reactiu de Bradford, el mateix programari de l'equip de FPLC permet sumar les absorbències a 230 nm dels cromatogrames i obtenir una representació per histogrames de l'absorbència per les mateixes fraccions.

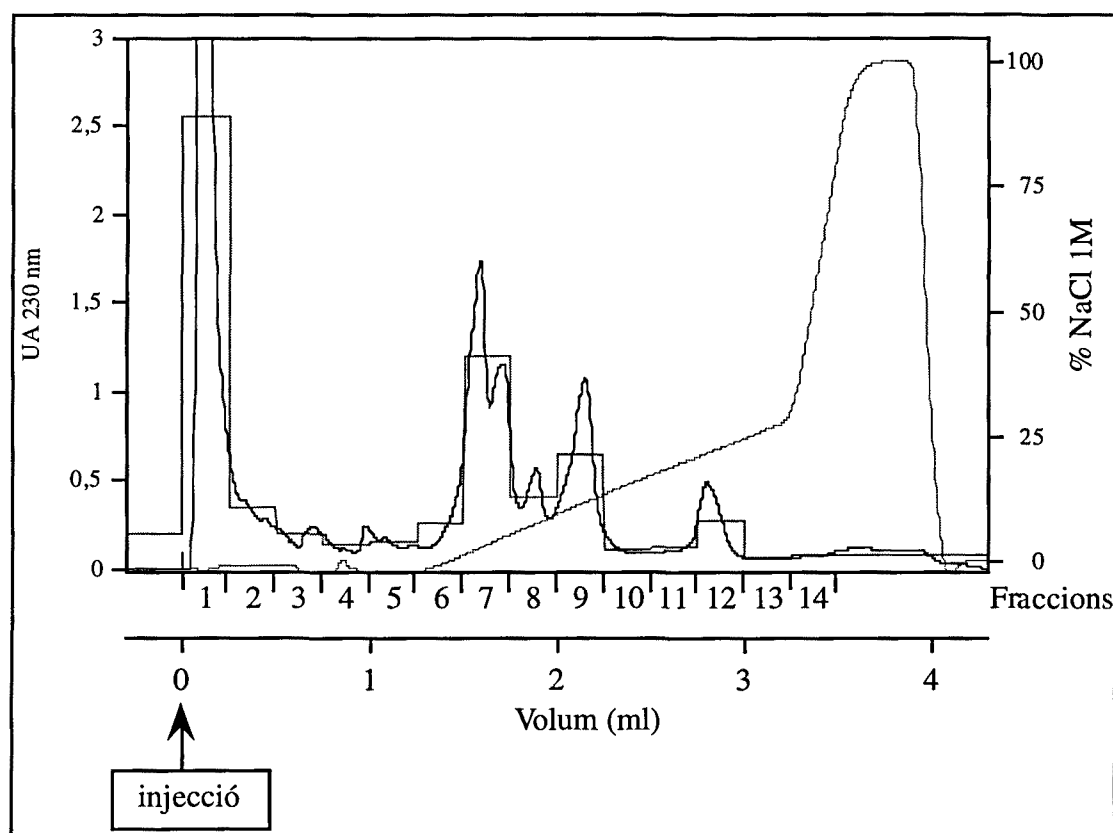


Figura 20: Separació de la fracció F3 per bescanvi catiònic. El diagrama de barres superposat correspon a l'histograma de l'àrea dels pics detectats a 230 nm.

A les fraccions de 0,5 ml (per la suma dels dos *runs*) es va addicionar el reactiu de Bradford i revelar el contingut proteic per l'absorbència a 595 nm. Aquestes dades es compararen amb els histogrames corresponents a l'absorbència a 230 nm (figura 21) i es pot veure que la fracció que no s'enganxa a la columna no són proteïnes segons la determinació de Bradford. També s'observa una irregular reactivitat entre les diferents fraccions, que es podria relacionar amb la composició aminoacídica. Tanmateix Waters i col. (1991) observen que el reactiu de Bradford reacciona d'una manera irregular amb les diferents proteïnes del vi, en comparació amb la determinació per hidròlisi proteica i suma d'aminoàcids.

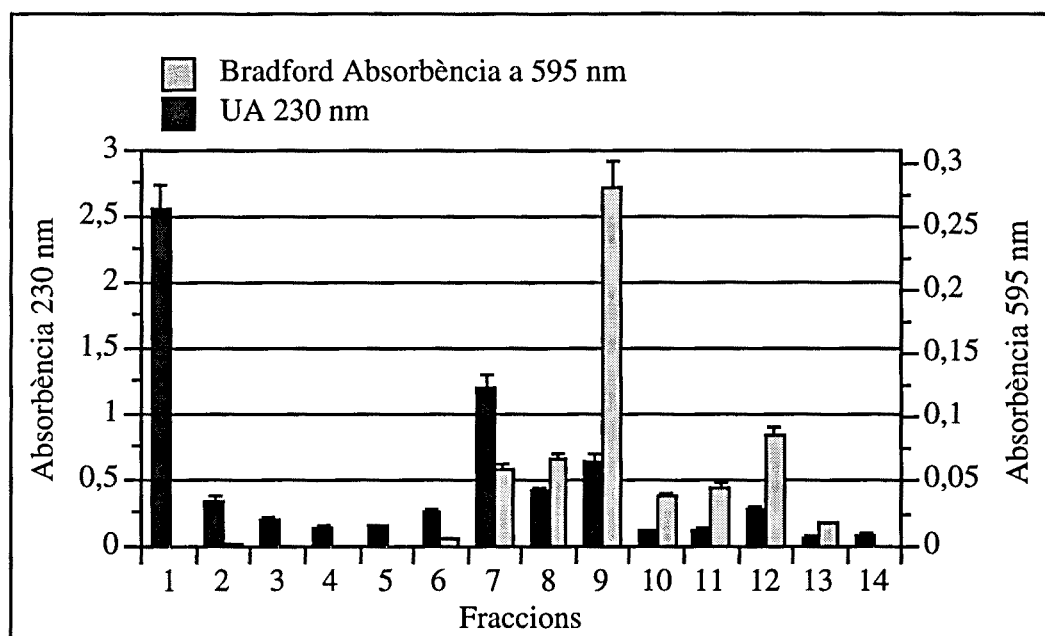


Figura 21: comparació per diagrama de barres entre l'absorbència a 230 nm i el micromètode de Bradford.

Per verificar l'existència de proteïna en tots els pics es va decidir utilitzar la electroforesi amb tinció de nitrat de plata. Per aquesta tinció es va fer una altra separació de la fracció F3 per bescanvi catiònic recollint en fraccions els pics detectats.

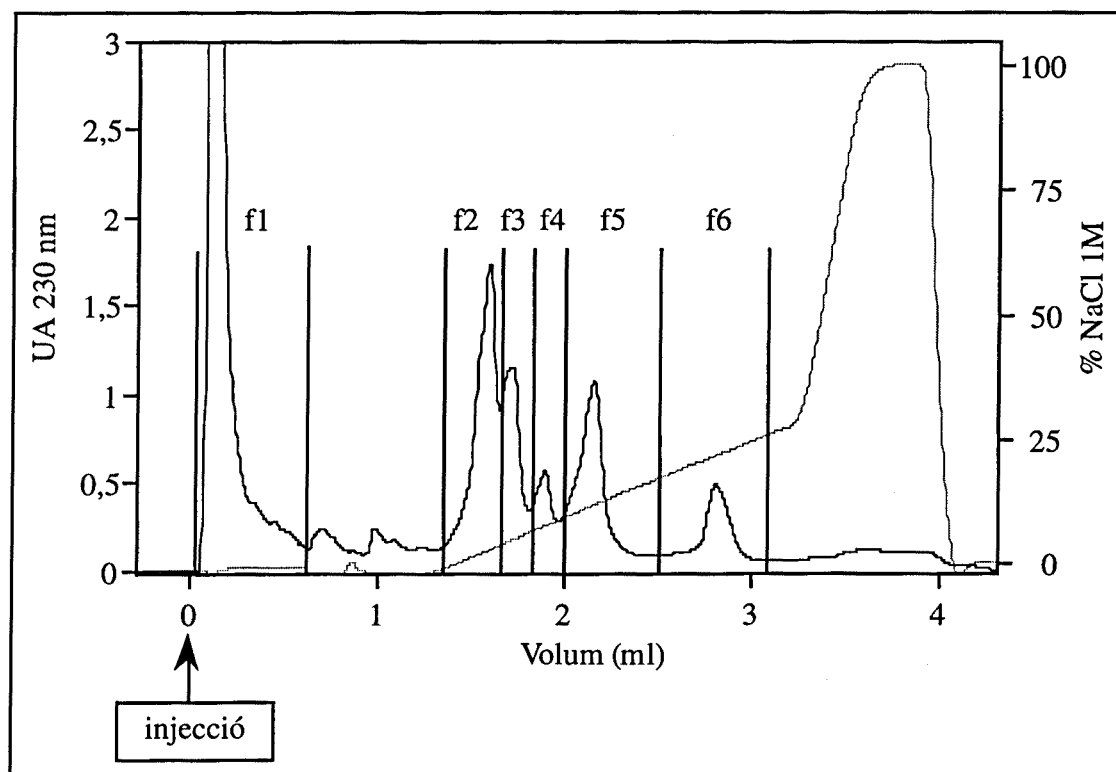
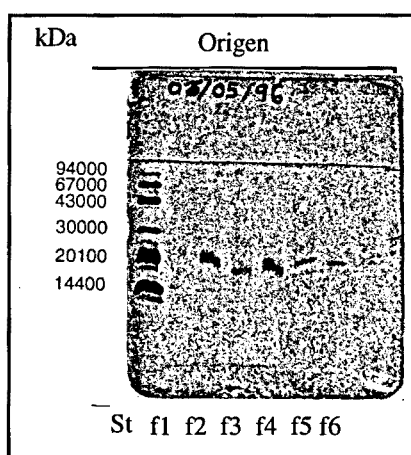


Figura 22: Recollida de fraccions de la F3 per posterior electroforesi.

Es varen separar 6 fraccions (figura 22), que es concentraren per evaporació a 25°C i, tal com es veu a la figura 23, tots corresponien a proteïnes a excepció de la primera fracció. A la separació per massa molecular es veuen totes les proteïnes dins el rang abans descrit de 20 i 30 kDa.



**Figura 23:** electroforesi (SDS-PAGE) de les fraccions recollides al cromatograma de la figura 22.

### Repetibilitat de la separació

La repetibilitat d'aquest mètode es va fer amb tampons amb la mateixa composició però preparats diferents dies i amb diverses fraccions F3 de la mateixa mostra d'origen, en aquest cas Chardonnay vi en rama. En aquest cas els errors són més grans degut a que s'arrossega l'error de la separació per exclusió molecular. Les dades es donen en percentatge degut a les pèrdues de mostra després de tot el procés d'obtenció de la F3.

	volum elució relatiu (ml)	% àrea mitjana (ml·mUA 230 nm)	Error estàndard de les cinc mesures
<b>fracció F1</b>	1,55-1,57	18,2	0,7 (3,8%)
<b>fracció F2</b>	1,65-1,7	35,0	0,5 (1,5%)
<b>fracció F3</b>	1,77-1,83	9,9	1,3 (13%)
<b>fracció F4</b>	1,81-1,89	13,2	1,2 (9,1%)
<b>fracció F5</b>	2,30-2,38	12,4	1,5 (12,1%)
<b>fracció F6</b>	2,85-2,95	11,3	1,2 (10,6%)

**Taula 8:** Anàlisi estadística de la separació per bescanvi catiónic.



### 1.5. Metodologia de quantificació.

La figura 24 resumeix l'esquema de treball per obtenir les dades de quantificació de les proteïnes de most i vi. En aquest treball s'han aplicat dos mètodes de càlcul de la concentració proteica en funció de la concentració de la mostra. Les mostres de la collita 95, que han estat les mostres de vinificació i les de fermentació en barrica, s'ha seguit el mètode de càlcul *a*, mentre que per les mostres del seguiment de la maduració de la collita 96 s'ha emprat el mètode *b*.

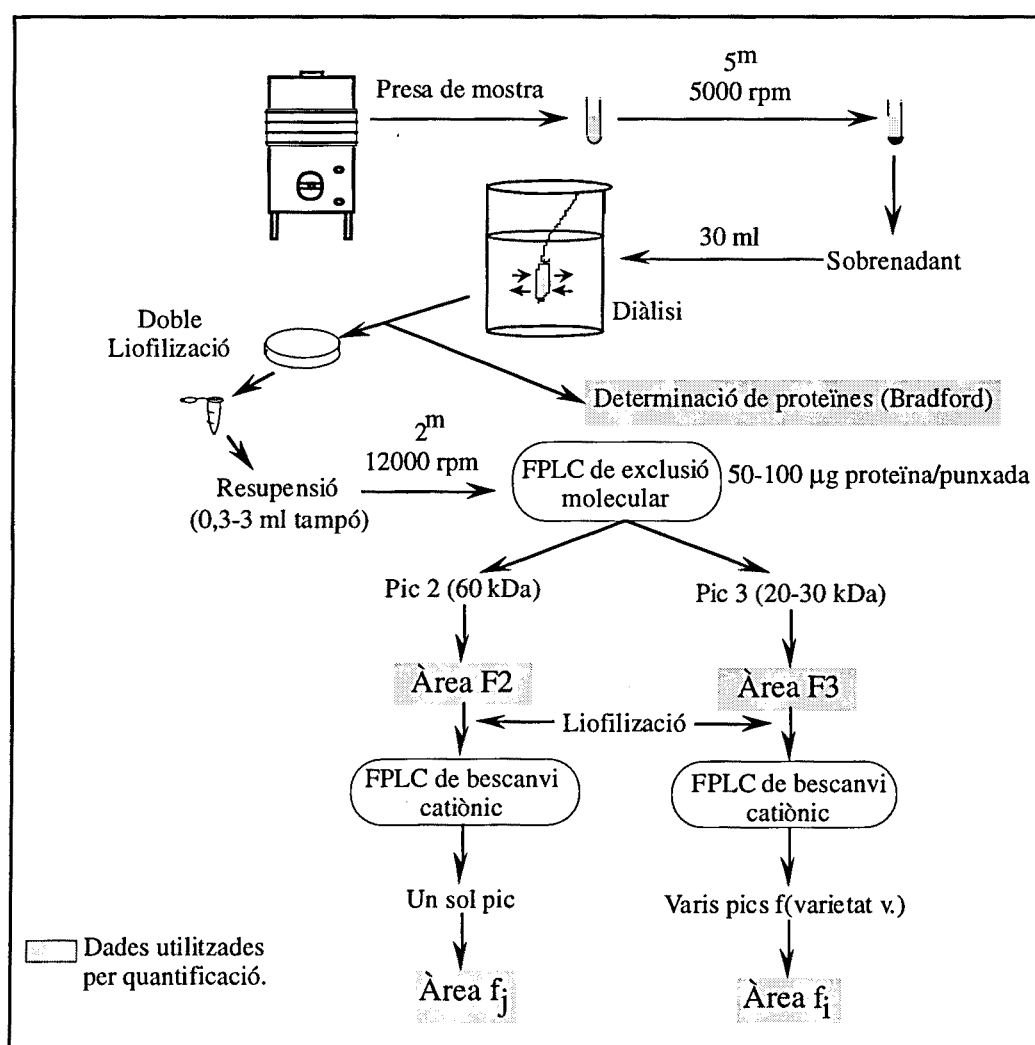


Figura 24: Esquema de treball per la separació i quantificació.

Abans de comentar els mètodes cal descriure el procés de separació: una vegada liofilitzada la mostra es concentra de manera que apliquéssim a la columna Superdex-75 de 50 a 100 µg de proteïna, segons les dades de concentració de proteïna. La dada de la concentració i el volum punxat s'ha de tenir en compte a l'hora de fer els càlculs. A la separació per exclusió molecular les proteïnes es concentren en dos pics. Les àrees d'aquests

dos pics (F2 i F3) són també dades que s'utilitzen pel càlcul. A la separació per bescanvi catiònic s'obtenen un altre grup de dades ( $f_j$  i  $f_i$ ) que també s'empraran pel càlcul.

- a. Aquest mètode de càlcul del pes de cada fracció aïllada es basa en aplicar els percentatges de cada àrea a la concentració trobada a la determinació de proteïnes pel mètode de Bradford. D'aquesta manera s'obté una concentració per F2 i F3 proporcional a la seva àrea. Aquest mètode no utilitza les dades del bescanvi catiònic de la fracció F2 ja que en tots els casos aquesta fracció correspon a una sola proteïna. En el cas de la F3 s'obté un nombre variable de pics ( $f_j$ ), que sembla funció de la varietat. Per determinar les concentracions d'aquests pics s'assumeix una resposta igual per tots a 230 nm i es torna a fer una assignació percentual de l'àrea de cada pic sobre la concentració calculada per F3.

Aquest sistema de quantificació s'ha emprat per resoldre els problemes de pèrdua de mostra al llarg del procés analític. Degut a la baixa concentració de proteïnes, una petita pèrdua o error es magnifica en el cas de utilitzar un calibrat extern. Una solució a aquest problema podria ser utilitzar un patró intern, però degut a la poca resolució i la natura de la mostra no vàrem trobar una substància que fes aquesta funció.

- b. L'altre mètode de quantificació consisteix en utilitzar un calibrat en el bescanvi catiònic amb una proteïna que doni un pic ben resolt. En aquest treball utilitzàrem el quimiotripsinogen A i vàrem referir els resultats a mg/l d'aquesta proteïna. Les dades per obtenir els resultats foren les àrees de  $f_j$  i  $f_i$  i es va prescindir de les dades de la exclusió molecular i sense la quantificació de la proteïna total pel mètode de Bradford.

La utilització del sistema de càlcul per patró extern es va utilitzar a la maduració donat que la mostra de partida tenia una concentració proteica més elevada, això implicava concentrar menys la mostra per aplicar els 50-100 µg de proteïna per injecció i per tant els errors a la manipulació eren més petits.

### 1.6. Conclusions del capítol 1.

1. La separació de les proteïnes del vi mitjançant exclusió molecular dona lloc a dos pics (de 60 i 30 kDa) que corresponen exactament a les bandes obtingudes per PAGE-SDS.
2. La separació per bescanvi catiònic del pic 2 dona lloc en tots els casos a un sol pic, el que confirma que es tracta d'una sola proteïna de 60 kDa de massa molecular.
3. A la separació per bescanvi catiònic del pic 3 s'obtenen un nombre variable de pics segons la varietat vinífera, el que confirma que es tracta d'un conjunt heterogeni de proteïnes de massa molecular semblant i diferent càrrega elèctrica.
4. Aquest mètode presenta l'avantatge respecte les tècniques electroforètiques d'una més elevada precisió i repetibilitat. A més, permet recuperar la mostra fraccionada per posteriors anàlisis.





0,100-89460



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**  
**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA**

---

**APLICACIÓ DE TÈCNIQUES DE CROMATOGRÀFIA  
LÍQUIDA DE PROTEÏNES (FPLC) A L'ESTUDI DE  
VINS BLANCS.**

---

663.253 Can <sup>(NP)</sup>

Memòria presentada per  
**JOAN MIQUEL CANALS I BOSCH**  
per optar al grau de Doctor en Ciències Químiques  
sota la Direcció del Dr. Fernando Zamora Marín  
EXCLÒS DE PRÉSTEC



---

## **Resultats i discussió. Capítol 2.**

---

**Índex.**

2. Elaboració dels vins base per escumós. ....	103
2.1. Característiques dels vins. ....	103
2.2. Concentracions i evolució de la proteïna total.....	106
2.3. Evolució de les fraccions separades per exclusió molecular. ....	108
2.4. Separació de la fracció de baixa massa molecular per bescanvi catiònic. ....	112
2.5. Conclusions del capítol 2. ....	126

## **2. Elaboració dels vins base per escumosos.**

En aquest capítol es presenten els resultats de l'estudi de l'evolució dels perfils proteics al llarg d'una vinificació de vi base per escumós. Les zones més importants del món productores dels vins escumosos naturals segons la metodologia tradicional o mètode xamanyès són la Champagne i la regió del Cava. Les varietats escollides varen ser les principals varietats d'aquestes zones: Pinot noir, Chardonnay, Macabeu, Xarel·lo i Parellada. Tal com es senyalava en l'apartat 1.4 dels materials i mètodes el mostreig es va realitzar just després del premsat, que correspon a la mostra 1. La mostra 2 es va agafar després del desfangament, es a dir, de l'eliminació dels sòlids en suspensió. La mostra 3 correspon al vi en rama i es va prendre al final de la fermentació. Al final del procés de condicionament del vi base, amb vi estabilitzat abans del tiratge es va prendre la mostra 4.

La justificació d'aquesta presa de mostres està en els paràmetres fonamentals de la vinificació que influeixen en la concentració de proteïnes, tal com s'ha vist a la introducció. Aquests són el desfangament, la fermentació i l'estabilització. Es pot trobar a faltar una mostra més dins de la fase d'estabilització, que compren clarificació i tractament pel fred; però en un estudi global com aquest s'ha volgut veure més una evolució al llarg de tota la vinificació que no pas l'efecte d'un tractament específic.

### **2.1. Característiques dels vins.**

#### *Elecció de la data de verema*

Per l'elecció de la data de verema es varen fer controls de maduració (figures 21 a 25) per determinar el moment òptim de verema i l'evolució posterior del gra. Per un seguiment global de la maduració es varen deixar alguns ceps de cada varietat vinífera sense collir, dels quals es prenia la mostra. Es varen seguir el grau alcohòlic provable, l'acidesa total i el pes de 100 grans.

En alguns gràfics de maduració s'observa el fenomen conegut com a sobremaduració (Ribéreau-Gayon i col., 1976). Aquest consisteix en un augment de la concentració de sucres i àcids per una deshidratació de la baia, amb la disminució del pes de 100 grans corresponent. El comportament més estrany és el de la Parellada, varietat vinífera a la que l'evolució del volum del gra no segueix la mateixa seqüència que les anteriors. En aquesta varietat es produeix un augment brusc del volum del gra; això pot ser atribuïble a les pluges ( $3 \text{ l/m}^2$ ) del dia 25 de setembre, encara que també poden ser dades erràtiques degudes al volum de gra tan elevat. Aquest fenomen no va afectar als vins elaborats ja que es va



veremar molt a prop del pes màxim del gra com es pot veure comparant les dates de verema amb els gràfics de maduració.

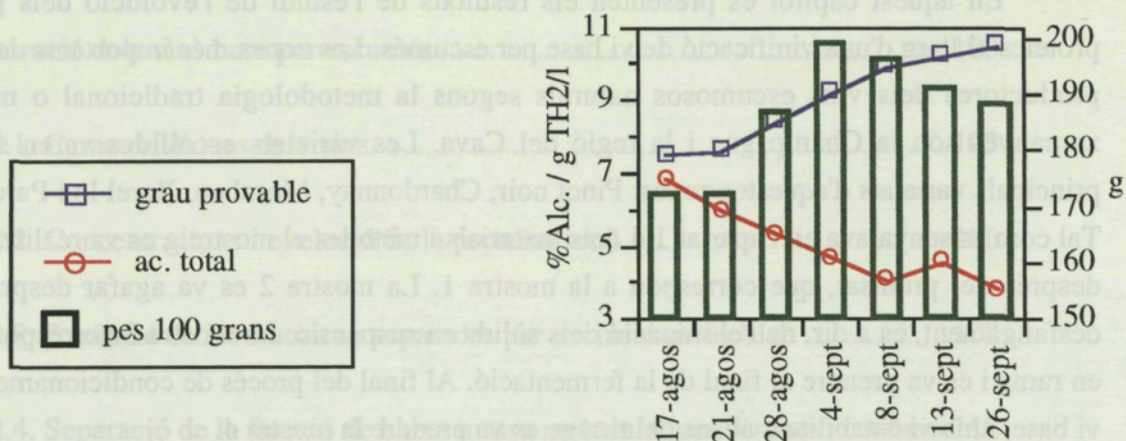


Figura 23: Maduració del Macabeu.

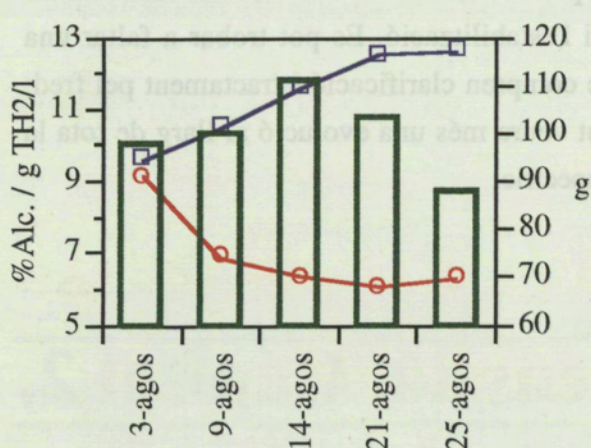


Figura 21: Maduració del Pinot noir.

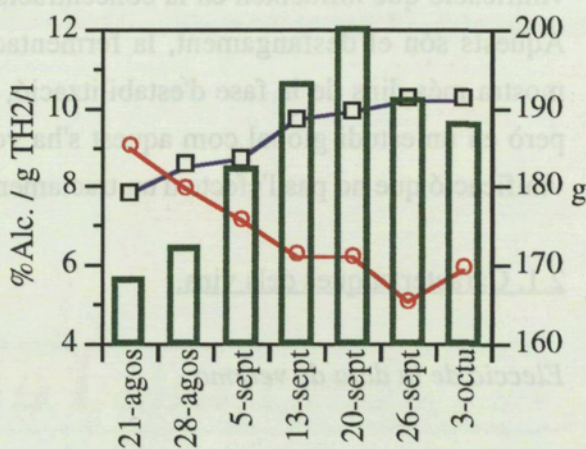


Figura 24: Maduració del Xarel·lo.

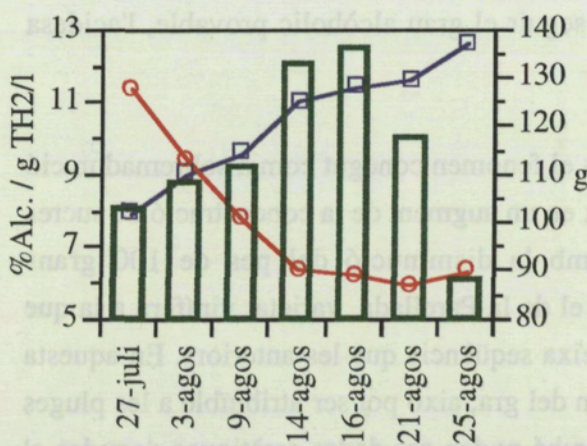


Figura 22: Maduració del Chardonnay.

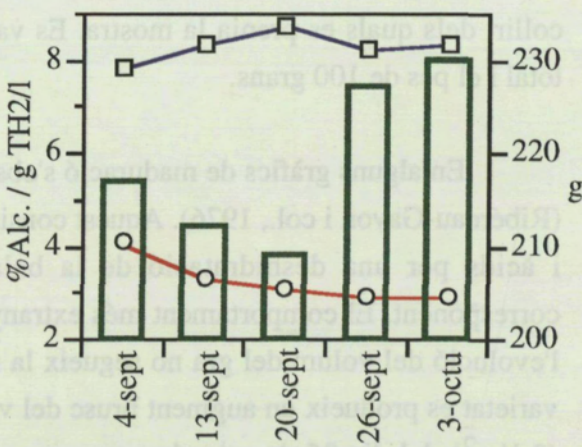


Figura 25: Maduració de la Parellada.

A la taula 9 es resumeixen les dades de verema, es pot comprovar que el conjunt de la verema està una mica més verd (menys grau i més acidesa) que la mostra agafada pel control de maduració.

	Pinot noir	Chardonnay	Macabeu	Xarel·lo	Parellada
Data verema (dia/mes)	14/8	16/8	8/9	15/9	25/9
Grau provable (% alc. v/v)	10,9 ± 0,3	10,8 ± 0,3	9,1 ± 0,1	9,9 ± 0,1	8,3 ± 0,1
Acidesa total (g TH <sub>2</sub> /l)	8,7 ± 0,2	8,2 ± 0,2	6,4 ± 0,4	7,5 ± 0,1	4,5 ± 0,1

**Taula 9:** Dades de verema de les cinc varietats. Els valors corresponen a la mitja de les tres mostres amb la desviació estàndard.

### Característiques dels vins.

En els vins no es van caracteritzar massa paràmetres, ja que no eren objecte de l'estudi. Els anàlisis realitzats varen ésser els mínims per garantir la qualitat dels vins; es mesuraren al final de la fermentació, els sucres totals, el grau alcohòlic adquirit, el diòxid de sofre total i lliure. En el vi estabilitzat l'acidesa volàtil i el diòxid de sofre total i lliure. Aquestes dades reflexen a la taula 10.

	Pinot noir	Chardonnay	Macabeu	Xarel·lo	Parellada
Sucres totals (g/l)	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,1 ± 0,2
Grau alcohòlic (% alc. v/v)	10,70 ± 0,20	10,58 ± 0,10	10,30 ± 0,20	10,25 ± 0,15	9,45 ± 0,10
Diòxid de sofre lliure final(mg/l)	10 ± 2	12 ± 5	9 ± 2	16 ± 3	10 ± 3
Diòxid de sofre total final (mg/l)	132 ± 14	126 ± 5	119 ± 11	156 ± 7	124 ± 9
Acidesa volàtil real (g àcid acètic/l)	0,33 ± 0,05	0,40 ± 0,2	0,30 ± 0,03	0,36 ± 0,03	0,39 ± 0,05

**Taula 10:** caracterització dels vins. Mitja de tres vinificacions ± desviació estàndard.

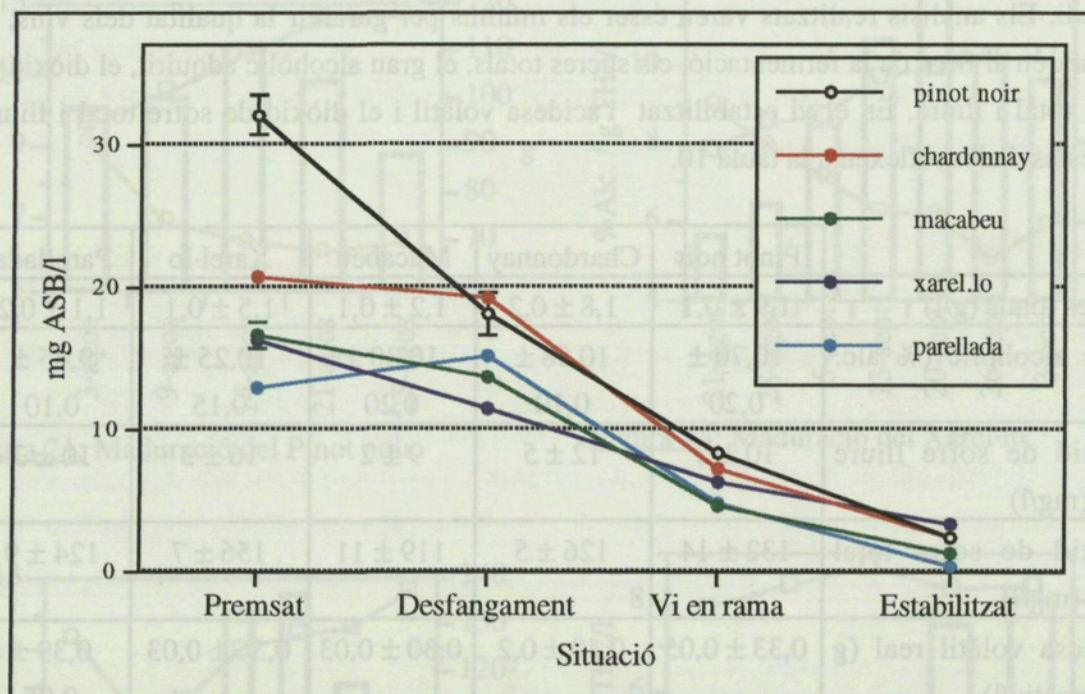
Cal fer esment que les dades de diòxid de sofre total potser són una mica elevades per l'elaboració de vins escumosos, doncs el màxim admés són 170 mg/l. Això es degut a la major aireació en l'elaboració en microvinificacions. Una altra dada que pot sobtar és l'augment de grau alcohòlic entre el most i el vi en el Macabeu i Parellada; en ambdós casos es va addicionar sucre, operació coneguda com xaptalització, per obtenir graus alcohòlics d'acord a les condicions normals de vinificació. Aquesta operació es fa habitualment en



zones nòrdiques com la Champagne, alguns estudis de la fracció proteica de vins base ho fan per obtenir vins el més propers possible a la realitat (Marchal i col., 1996).

## 2.2. Concentracions i evolució de la proteïna total.

Les dades de concentració de proteïna al llarg de la vinificació estan reflexades al gràfic de la figura 26. Com es pot observar la varietat amb més contingut proteic a l'extracció del most després del premsat és el Pinot noir (32 mg/l), seguit del Chardonnay (21 mg/l), Macabeu i Xarel·lo en similar concentració (16 mg/l) i Parellada (12 mg/l) clarament per sota. Aquestes dades permeten observar una correlació entre la grandària del gra de raïm i el contingut inicial en proteïnes del most. Els resultats són consistents amb la bibliografia (Ribéreau-Gayon, 1976), que indica que la màxima concentració de proteïnes està a la part de la baia més propera a la pell. Les varietats de gra petit tenen una relació superfície vs. volum més gran, per tant les proteïnes alliberades per volum de most seran més elevades.



**Figura 26:** Evolució del contingut proteic total a la vinificació a les cinc varietats. Cada situació és la mitjana de tres vinificacions  $\pm$  error tipus.

A la taula 11 es representen les variacions significatives ( $p < 0,05$ ) segons el test de Scheffe al llarg de la vinificació. El tractament estadístic està fet pels estadis de cada varietat i no preten comparar valors entre diferents varietats.

	Pinot noir	Chardonnay	Macabeu	Xarel·lo	Parellada
Premsat	A	A	A	A	A
Desfangament	B	A	B	B	B
Vi en rama	C	B	C	C	C
Estabilitzat	D	C	D	D	D

**Taula 11:** Diferències entre els diferents estadis de vinificació per cada varietat vinífera. El canvi de lletra implica diferència significativa ( $p < 0,05$ ).

Una vegada trets els sòlids per mitjà del desfangament es veu una disminució significativa de la proteïna total a excepció del Chardonnay i de la Parellada. En el Chardonnay s'observa una disminució però no és significativa, mentre que la Parellada té un augment de concentració inexplicable segons la bibliografia. Les disminucions en les 3 varietats restants tampoc tenen una correlació, ja que mentre el pinot disminueix un 44%, el Macabeu ho fa en un 18% i el Xarel·lo en un 30%. La disminució més important és la del Pinot noir, aquesta pot venir afectada per la utilització de carbó actiu, un adsorbent de substàncies colorants que podria adsorvir proteïnes del most (Jackson, 1994). Tot i això la hipòtesi més sòlida és la disminució per reacció amb tanins del most degut a la presència d'una major concentració de polifenols al ésser una varietat amb color (Glories, 1978).

A la bibliografia no s'especifica si les concentracions obtingudes pel most són abans o després del desfangament, mentre que es veu en aquest treball una disminució significativa excepte en el Chardonnay i Parellada. Aquesta disminució es pot explicar per l'acció de proteases lligades a les parts sòlides del raïm (Fleet, 1994) i també per la reacció amb els polifenols tal com es veu en el Pinot noir. Per mostos de Chardonnay s'observen concentracions més elevades que les d'aquest treball (Feuillat i col., 1995). En les varietats autòctones González-Lara i col. (1989) troba valors concordants en Macabeu; Pueyo i col. (1993) també coincideix en els valors de mostos de Macabeu, Xarel·lo i Parellada. En canvi, en estudis de Correa i col. (1988) i de Correa-Gorospe i col. (1991) es troben valors molt baixos per Macabeu i Xarel·lo.

Després de la fermentació es constata una disminució significativa en totes les varietats, fenomen descrit a la bibliografia (Hsu i Heatherbell, 1987a; Murphey i col., 1989b; Dzy, 1993). La disminució es diferent en totes les varietats viníferes i no té cap relació amb la concentració proteica, aquesta dada l'han observat diferents autors amb valors des d'un 25% en el cas de Chardonnay fins a un 45% en Pinot noir (Santoro, 1995); Lamikanra i Inyang (1988) observen una disminució d'un 60% en Muscat. En el nostre treball les concentracions de proteïna totals en aquest estadi es troben en un rang més estret: de 4,6 a

8,2 mg ASB/l. La fermentació, probablement degut a la presència d'etanol com a agent desnaturalitzant, té una funció nivelladora de concentració entre totes les varietats viníferes.

Una vegada el vi està estabilitzat les concentracions de proteïna estan entre 0,2 i 3,2 mg ASB/l. El Xarel·lo és la varietat vinífera amb més contingut proteic mentre que la Parellada és la que té el contingut més baix. Així no hi ha una correlació entre el contingut proteic en el most i el vi estabilitzat. Dizy (1993) observa en vins de la varietat Malvar que el vi estabilitzat té un 75% de proteïna respecte el most. En aquest treball aquest percentatge és d'un 10% de mitjana, oscil·lant entre un 2% per la Parellada i un 20% pel Xarel·lo.

Per la varietat Pinot noir Yokotsuka i col. (1994) troba 77 mg ASB/l, valor molt més alt que el nostre tot i que no especifica si el vi està estabilitzat. Pel Chardonnay no hi ha acord entre diferents autors, doncs Bayly i Berg (1967), Lubbers i col. (1995) o Feuillat i col. (1995) troben valors molt alts, d'entre 50 i 100 mg ASB/l si bé utilitzen mètodes diferents com la reacció del Biuret, l'assaig de Lowry o el Bradford directe. Altres treballs, com els de Brissonnet i Maujean (1991), Malvy i col. (1994) o Marchal i col. (1996) troben valors de concentració del mateix ordre que els nostres. Per les varietats autòctones de vins base per Cava estabilitzats, els resultats són diversos; en un article de Correa-Gorospe (1991) troben concentracions de 1,6 a 1,8 mg ASB/l, coincidint amb les del nostre treball. Pueyo i col. (1993) troben concentracions més elevades (de 6 a 16 mg ASB/l); tanmateix aquests autors no dialitzen la mostra al determinar la proteïna total, pel que aquestes dades podrien estar sobrestimades per interferències amb polifenols.

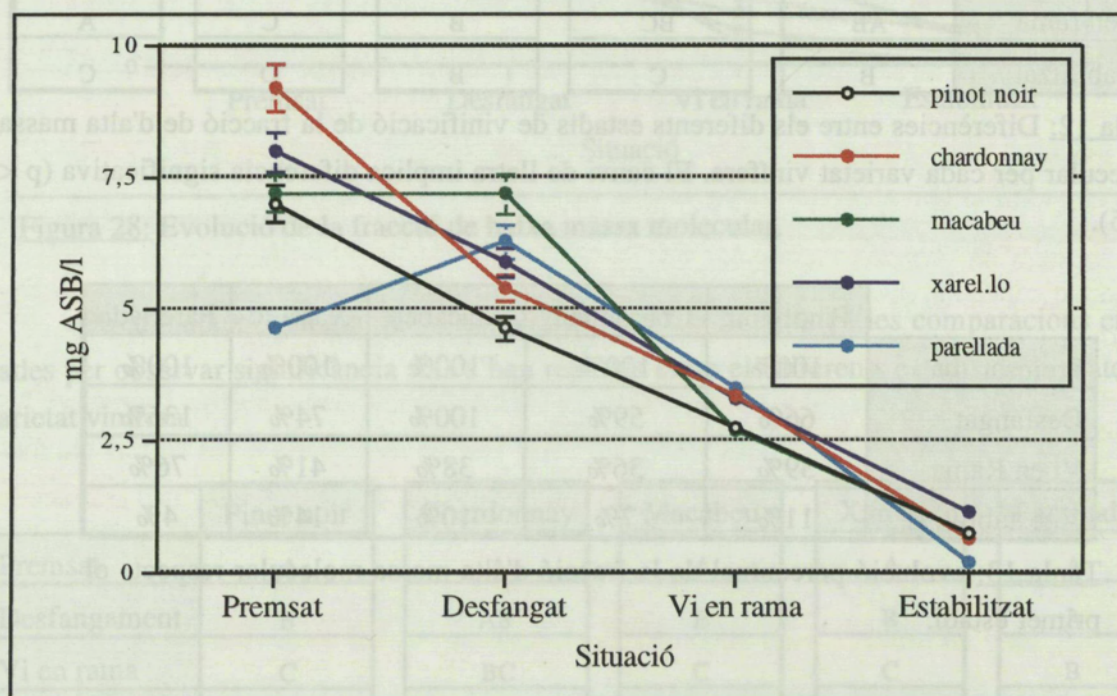
### 2.3. Evolució de les fraccions separades per exclusió molecular.

Com s'ha vist en el capítol 1 l'exclusió molecular permet separar les proteïnes dels vins i mostos en dues fraccions: una fracció de pes molecular de 60 kDa (anomenada F2) i una altre de 20 a 30 kDa (F3). Aquestes dues fraccions s'han calculat tal com s'indica a l'apartat a del punt 1.5 d'aquesta discussió; aplicant les àrees de les fraccions percentualment al valor de concentració total de proteïna determinada sobre la mostra dialitzada. De la mateixa manera que a la proteïna total, en aquest cas es veu com les dues fraccions disminueixen la seva concentració al llarg de la vinificació.



### Fracció d'alta massa molecular.

La fracció d'alta massa molecular disminueix significativament en totes les varietats entre el most acabat de premsar i el vi estabilitzat. Tot i la tendència a disminuir la concentració en els diferents estadis de vinificació (figura 27), aquesta no és significativa en tots els casos, com es veu a la taula 12. El Xarel·lo és la única varietat que disminueix significativament en tots els estadis de vinificació. La Parellada és la varietat amb un comportament més estrany, doncs tendeix a augmentar la concentració en el segon estadi, fenomen que no es explicable, pot ser atribuïble a un error a la presa o manipulació de la mostra.



**Figura 27:** Evolució de la fracció de d'alta massa molecular. Mitja de tres vinificacions  $\pm$  error tipus.

La disminució de les bandes d'alta massa molecular durant la fermentació ha estat constatada per Hsu i Heatherbell (1987a), que la atribueix a hidrolisi, desnaturalització o precipitació; també Dazy (1993) ho ha observat a la varietat vinífera Malvar.

A l'estabilització del vi, la fracció de 60 kDa és més estable que la de baixa massa molecular segons la bibliografia (Hsu i Heatherbell, 1987b); Waters i col. (1991) observen que la fracció de 63 kDa és soluble fins i tot a una concentració de sulfat d'amoni de 0,47 g/ml. En el nostre treball, aquesta estabilitat és funció de la varietat, tot i que en el vi estabilitzat el màxim que es troba és un 14% del que hi havia en el most, en el Xarel·lo.

A l'evolució percentual de cada varietat al llarg de la vinificació s'observa que la fracció d'alta massa molecular disminueix menys que la de baixa massa molecular en totes les varietats excepte en el Xarel·lo i Chardonnay (comparant les dades de les taules 13 i 15).

A la taula 12 és pot observar l'evolució estadística de la fracció d'alta massa molecular. L'anàlisi està feta individualment per cada varietat vinífera.

	Pinot noir	Chardonnay	Macabeu	Xarel·lo	Parellada
Premsat	A	A	A	A	A
Desfangament	AB	B	A	B	AB
Vi en rama	AB	BC	B	C	A
Estabilitzat	B	C	B	D	C

Taula 12: Diferències entre els diferents estadis de vinificació de la fracció de d'alta massa molecular per cada varietat vinífera. El canvi de lletra implica diferència significativa ( $p < 0,05$ ).

	Pinot noir	Chardonnay	Macabeu	Xarel·lo	Parellada
Premsat	100%	100%	100%	100%	100%
Desfangat	66%	59%	100%	74%	135%
Vi en Rama	39%	36%	38%	41%	76%
Vi estabilitzat	11%	7%	10%	14%	4%

Taula 13: evolució percentual de la fracció d'alta massa molecular respecte el primer estadi.

#### Fracció de baixa massa molecular.

La fracció de baixa massa molecular disminueix entre el most premsat i el vi estabilitzat, encara que en alguns estadis no es trobin diferències significatives. La diferència més marcada està a la fermentació, procés després del qual la concentració de proteïnes d'entre 20 i 30 kDa disminueixen per assolir valors del 15 al 36% dels valors inicials.

Alguns autors (Hsu i Heatherbell, 1987a) constaten un augment d'aquestes proteïnes després de la fermentació que en aquest treball no s'ha vist; en canvi es veu una tendència a augmentar a la Parellada i el Chardonnay després del desfangat, que d'acord amb Fleet (1994), podria ser deguda a l'acció de proteases.



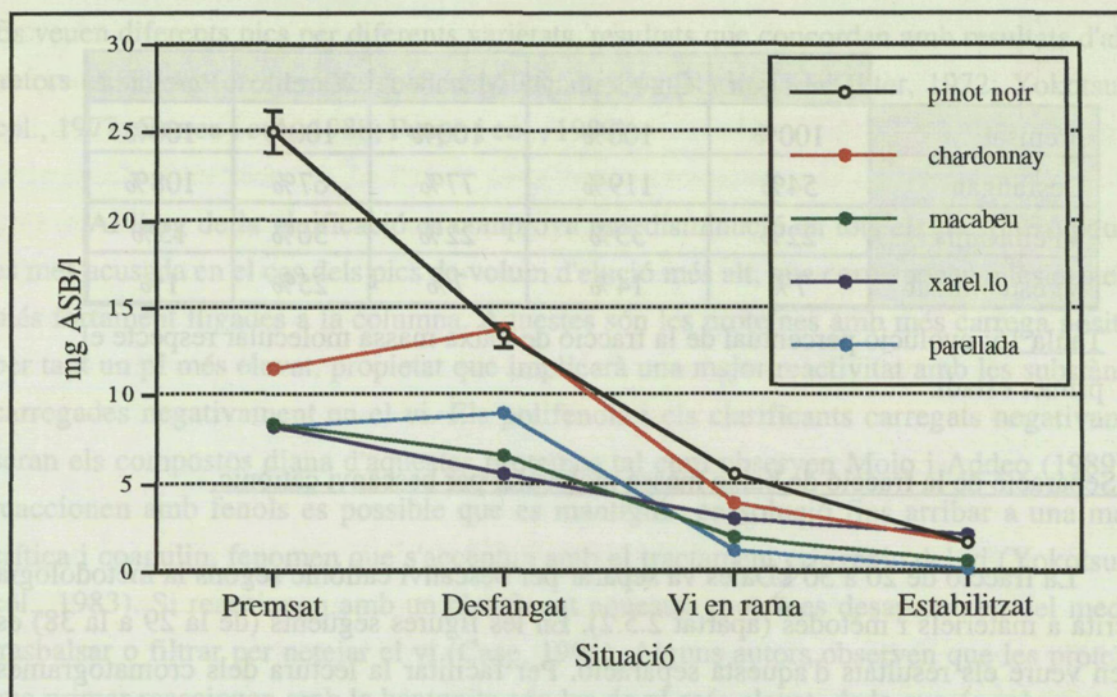


Figura 28: Evolució de la fracció de baixa massa molecular.

De la mateixa manera que a les taules 11 i 12, a la taula 14 les comparacions entre dades per observar significància sols s'han realitzat entre els diferents estadis de la mateixa varietat vinífera.

	Pinot noir	Chardonnay	Macabeu	Xarel.lo	Parellada
Premsat	A	A	A	A	A
Desfangament	B	AB	B	B	A
Vi en rama	C	BC	C	C	B
Estabilitzat	C	C	C	C	B

Taula 14: Diferències entre els diferents estadis de vinificació de la fracció de baixa massa molecular per cada varietat vinífera. El canvi de lletra implica diferència significativa ( $p < 0,05$ ).

Hsu i Heatherbell (1987b) observen un decrement molt fort de les proteïnes de massa molecular entre 20 i 30 kDa en el tractament estabilitzador amb bentonita. En el nostre treball no hi ha un comportament igual per tots els vins, així mentre hi ha varietats viníferes com el Chardonnay i Xarel.lo que conserven més del 10% de la proteïna inicial, per les altres tres varietats les quantitats són inferiors, i en el cas de la Parellada sols es manté el 1% de la proteïna inicial.



	Pinot noir	Chardonnay	Macabeu	Xarel·lo	Parellada
Premsat	100%	100%	100%	100%	100%
Desfangat	54%	119%	77%	67%	108%
Vi en Rama	22%	33%	22%	36%	15%
Vi estabilitzat	7%	14%	7%	25%	1%

**Taula 15:** evolució percentual de la fracció de baixa massa molecular respecte el primer estadi.

#### 2.4. Separació de la fracció de baixa massa molecular per bescanvi catiònic.

La fracció de 20 a 30 kDa es va separar per bescanvi catiònic segons la metodologia descrita a materials i mètodes (apartat 2.5.2). En les figures següents (de la 29 a la 38) es poden veure els resultats d'aquesta separació. Per facilitar la lectura dels cromatogrames obtinguts s'ha normalitzat l'absorbència per cada varietat vinífera respecte les dades de concentració de proteïna calculades per la fracció F3 segons la cromatografia d'exclusió molecular. A la vegada s'ha donat a l'absorbència més alta de la situació inicial de la vinificació (es a dir el premsat) el valor 1. Tots els valors es normalitzen segons aquest criteri i d'aquesta manera s'obvia el problema de la concentració de la mostra. Tanmateix les concentracions de totes les mostres foren suficients perquè les absorbències de tots els pics detectats estiguessin en un rang de 0,1 i 1,5 UA a 230 nm per evitar la presència d'artefactes.

Pel càlcul de les concentracions de cada pic s'integraren els cromatogrames obtinguts, amb un mínim d'un cromatograma per dipòsit i estadi de la vinificació; d'aquesta manera es va disposar de almenys tres concentracions per cada pic en cada estadi i es va poder obtenir la mitjana i l'error tipus, que es representen a les figures 30, 32, 34, 36 i 38. El mètode càlcul seguit fou el descrit al apartat a del punt 1.5. de resultats i discussió, segons els percentatges de cada pic respecte l'àrea total de pics i aquesta dada s'aplicà al valor de concentració prèviament trobat per la fracció F3, calculada al punt 2.3. d'aquest capítol.

Observant els cromatogrames de la separació s'observa un nombre variable de pics a la vinificació en funció de la varietat vinífera, des de 5 en el cas del Macabeu fins a 8 pel Xarel·lo. Aquestes dades són semblants a les que troben Hsu i Heatherbell (1987a), que per isoelectroenfocament separen una banda de 28 kDa en 5 fraccions amb diferent carrega en un vi de Gewürztraminer; també Waters i col. (1995b) troben 10 bandes entre 14 i 34 kDa per SDS-PAGE en un vi de la varietat vinífera Muscat.

Es veuen diferents pics per diferents varietats, resultats que concorden amb resultats d'altres autors en electroforesi sobre gels de poliacrilamida (Radola i Ritchter, 1972; Yokotsuka i col., 1977; Correa i col., 1988; Pueyo i col., 1993).

Al llarg de la vinificació es comprova una disminució en tots els pics, però aquesta es més acusada en el cas dels pics de volum d'elució més alt, que corresponen a les proteïnes més fortament lligades a la columna. Aquestes són les proteïnes amb més carrega positiva, per tant un pI més elevat, propietat que implicarà una major reactivitat amb les substàncies carregades negativament en el vi. Els polifenols i els clarificants carregats negativament seran els compostos diana d'aquestes proteïnes tal com observen Moio i Addeo (1989); si reaccionen amb fenols es possible que es mantinguin en solució fins arribar a una massa crítica i coagulin, fenomen que s'accentua amb el tractament criogènic del vi (Yokotsuka i col., 1983). Si reaccionen amb un clarificant aquestes proteïnes desapareixen del medi al trasbalsar o filtrar per netejar el vi (Casp, 1991). Alguns autors observen que les proteïnes que primer reaccionen amb la bentonita són les de pI més elevat, dada que és coherent amb els nostres resultats (Hsu i Heatherbell, 1987b; Paetzold i col., 1990; Dawes i col., 1994). Ledoux i col. (1992a), en estudis amb EC observen que les proteïnes amb més mobilitat electroforètica, per tant més carrega, s'eliminen amb quantitats molt febles de bentonita.

El fet de la no aparició de nous pics de baixa massa molecular a partir del most fa pensar que les proteïnes del vi siguin originàries de la baia i molt resistents a la degradació, descartant la hipòtesi de la hidròlisi en fragments més petits, que dona Santoro (1995) al trobar composicions semblants en totes les proteïnes. La fermentació implicarà principalment la desnaturalització i precipitació d'una part del contingut total de proteïna.

En canvi no seria selectiu de la carrega elèctrica i per tant els perfils trobat per isoelectroenfocament no variarien, tal com observa Dizy (1993). Marchal i col. (1996) han vist que la fracció de glucoproteïnes de 24-25 kDa i la de 60-66 kDa no sofreixen modificacions a la fermentació. Tanmateix la resistència a la degradació de les proteïnes del vi havia estat descrita en els treballs de Waters i col. (1990; 1995b; 1996). Cal esmentar la no detecció de manoproteïnes, que degut a la seva massa molecular (Frevert i Ballou, 1985) s'haurien perdut a la fracció d'exclusió de la separació per tall molecular al no ésser detectades per la baixa quantitat de proteïna en front de la major proporció de sucre; tot i que no era l'objectiu d'aquest treball.

S'observa que les varietats viníferes que tenen més concentració de proteïna al final de la vinificació són les que presenten més pics a la zona de baixa càrrega elèctrica (fins a 2,5 ml), mentre que les varietats amb menys pics en aquesta zona, la més conservada, tenen les disminucions més acusades.

Per la varietat vinífera Pinot noir es veuen un total de set pics, dels quals el 1 i 5 són els majoritaris; el pic 5 es desdoblava en dos en alguns estadis, però degut a que no s'ha conseguit resoldre bé es considera com a un de sol. Dels 7 pics el més minoritari ( el 6) desapareix a la fermentació. En el vi estabilitzat el pic 7 també desapareix i els pics 4 i 5 tenen una disminució percentual més gran que la resta.

En el Chardonnay es mantenen els sis pics al llarg de tota la vinificació. Els pics 5 i 6 són els més afectats per l'estabilització, mentre que la fermentació és el fenomen que afecta més a la concentració de proteïnes de tots els pics.

En el Macabeu apareixen cinc pics però el pic 2 té un pic enganxat que no es resol bé i s'integra dins d'aquest. Ala fermentació desapareixen els pics amb més carrega (4 i 5) i a l'estabilitzar el pic 3 es redueix a un 1% de la seva concentració inicial.

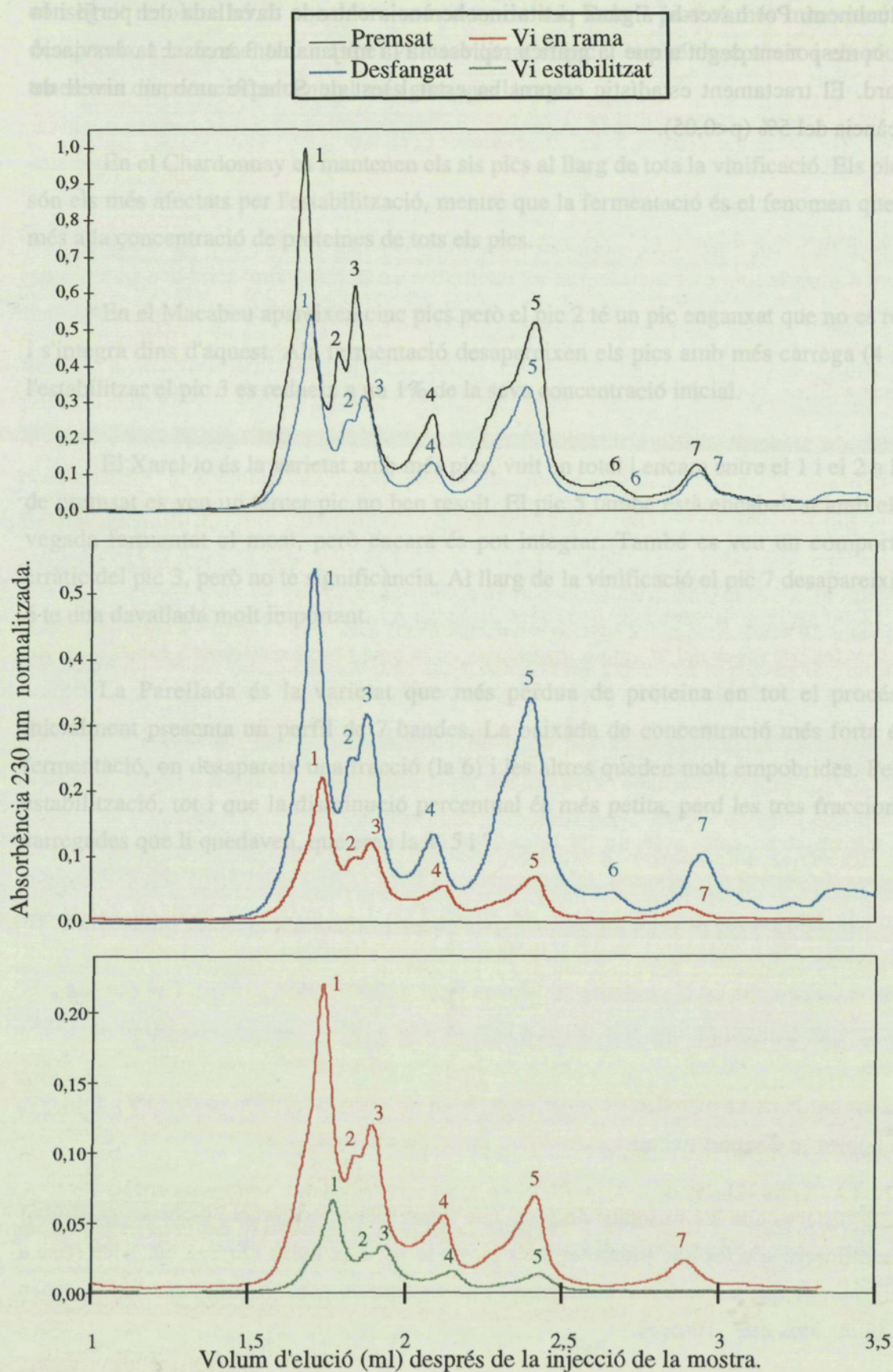
El Xarel·lo és la varietat amb més pics, vuit en total i encara entre el 1 i el 2 a l'estadi de premsat es veu un tercer pic no ben resolt. El pic 5 també està encalcat amb el 4 una vegada fermentat el most, però encara és pot integrar. També es veu un comportament erràtic del pic 3, però no té significància. Al llarg de la vinificació el pic 7 desapareix i el pic 6 té una davallada molt important.

La Parellada és la varietat que més pèrdua de proteïna en tot el procés però inicialment presenta un perfil de 7 bandes. La baixada de concentració més forta és a la fermentació, on desapareix una fracció (la 6) i les altres queden molt empobrides. Però a la estabilització, tot i que la disminució percentual és més petita, perd les tres fraccions més carregades que li quedaven, que eren la 4, 5 i 7.

A les properes pàgines hom pot observar a l'esquerra els perfils de la fracció 3 a les diferents fases de la vinificació, cada cromatograma té els pics marcats amb el mateix color que la línia corresponent. A la pàgina de la dreta es pot constatar l'evolució de cada pic individualment. Pot haver-hi alguna petita incoherència entre la davallada del perfil i la gràfica corresponent degut a que la gràfica representa la mitjana de 3 àrees  $\pm$  la desviació estàndard. El tractament estadístic emprat ha estat el test de Scheffe amb un nivell de significància del 5% ( $p < 0,05$ ).

**Pinot noir**

**Figura 29:** Perfils de la fracció de baixa massa molecular separats per bescanvi catiònic.



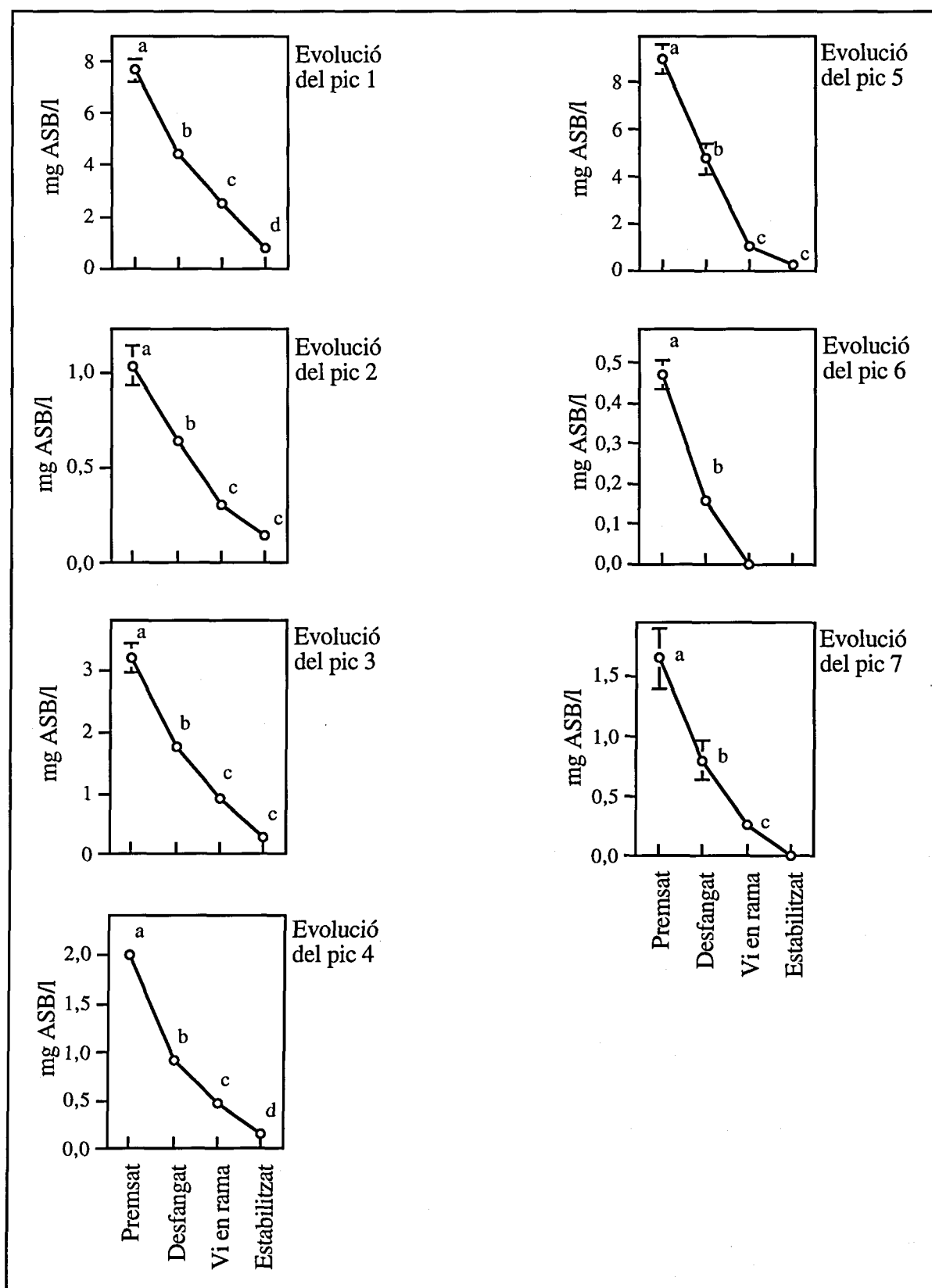
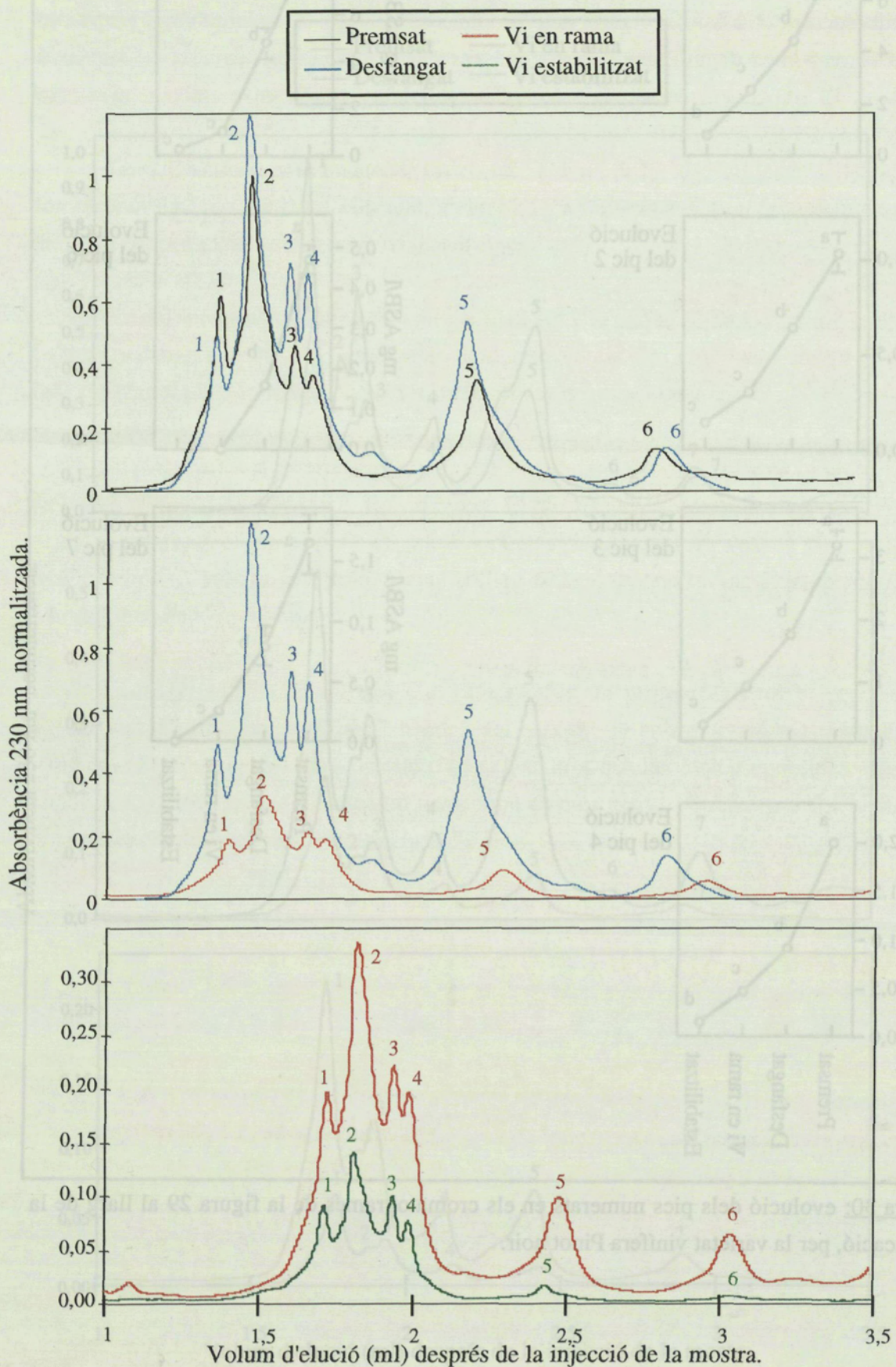


Figura 30: evolució dels pics numerats en els cromatogrames de la figura 29 al llarg de la vinificació, per la varietat vinífera Pinot noir.



Chardonnay

Figura 31: Perfils de la fracció de baixa massa molecular separats per bescanvi catiònic.



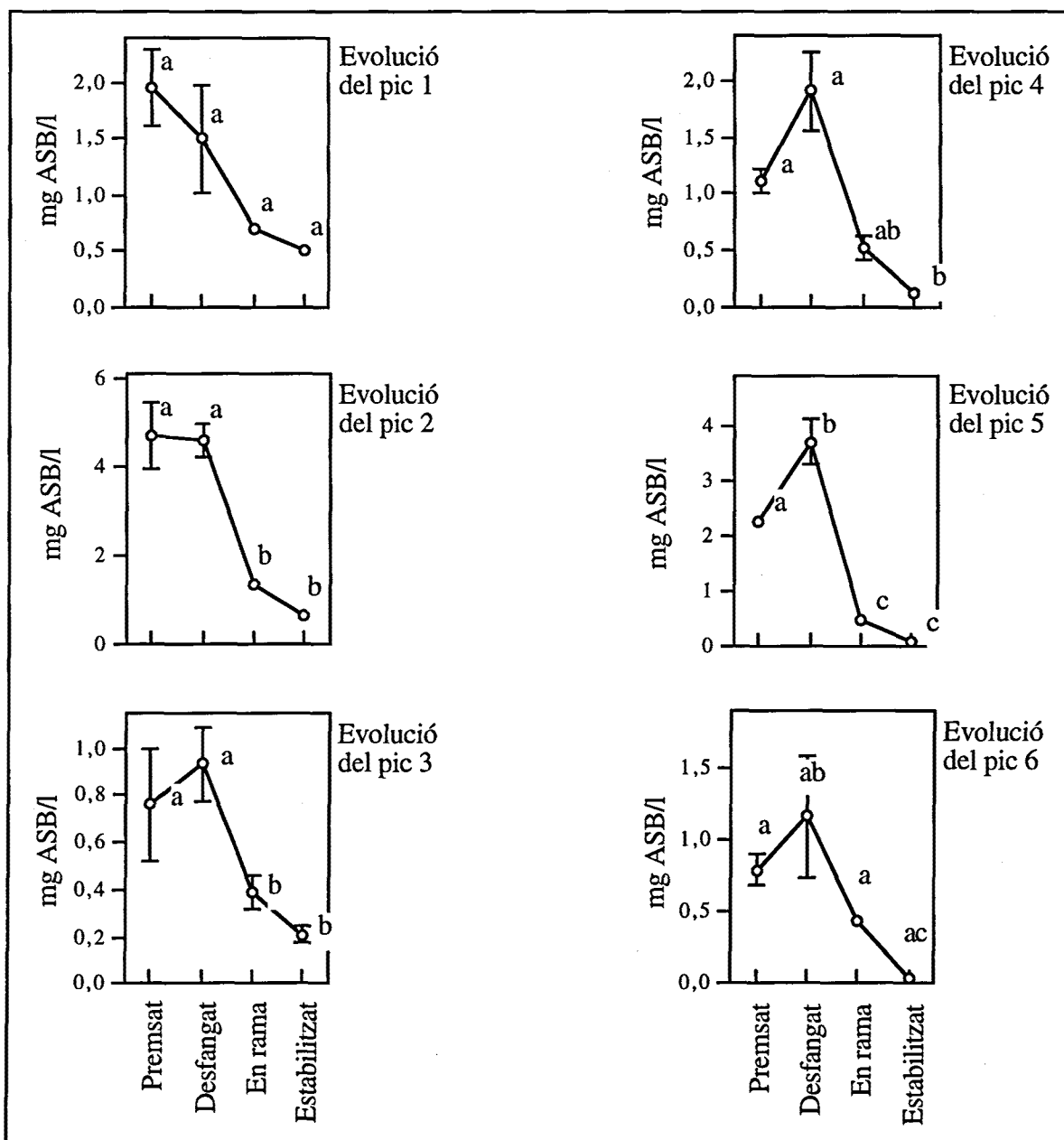
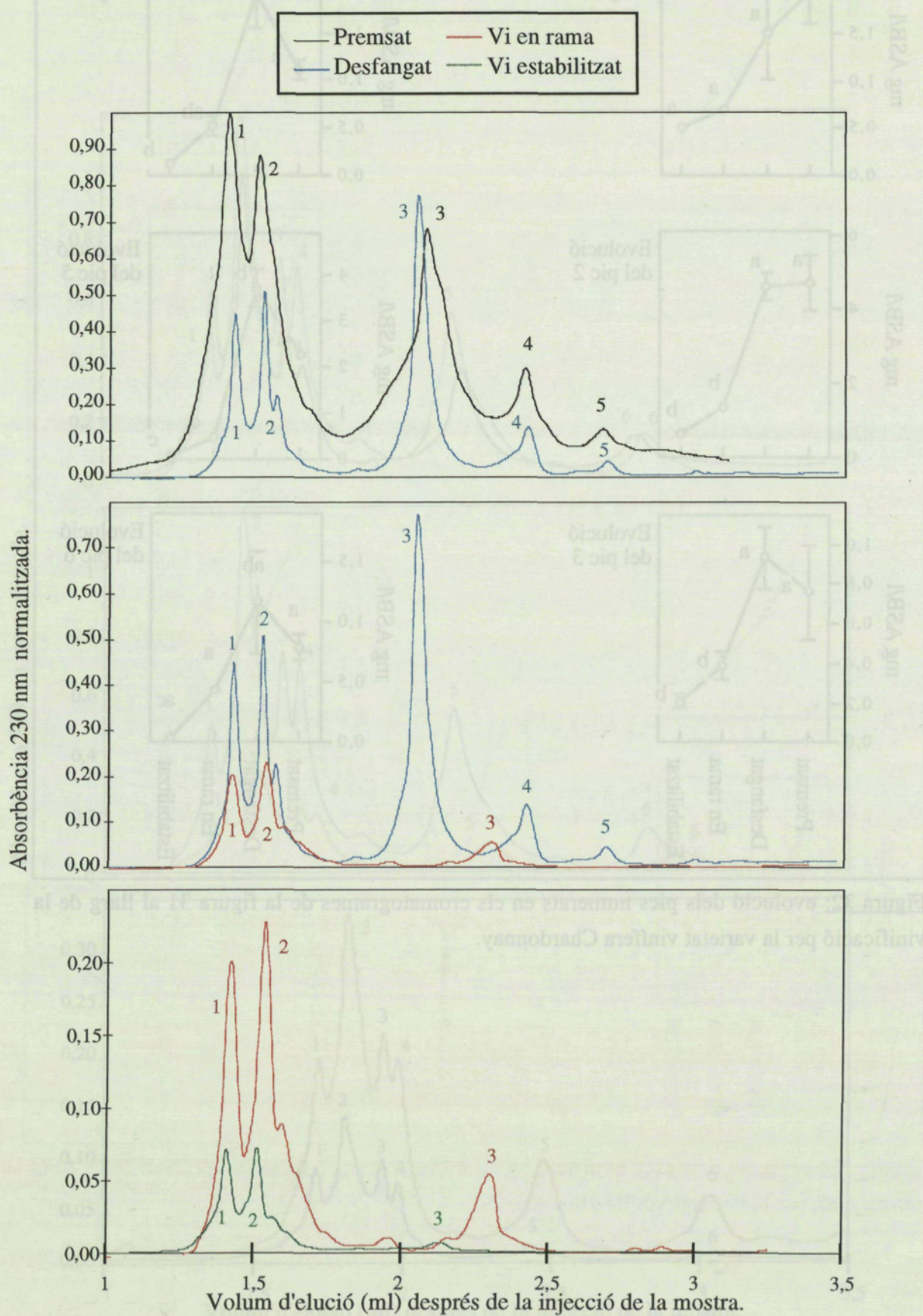


Figura 32: evolució dels pics numerats en els cromatogrames de la figura 31 al llarg de la vinificació per la varietat vinífera Chardonnay.



Macabeu.

**Figura 33:** Perfils de la fracció de baixa massa molecular separats per bescanvi catiònic.



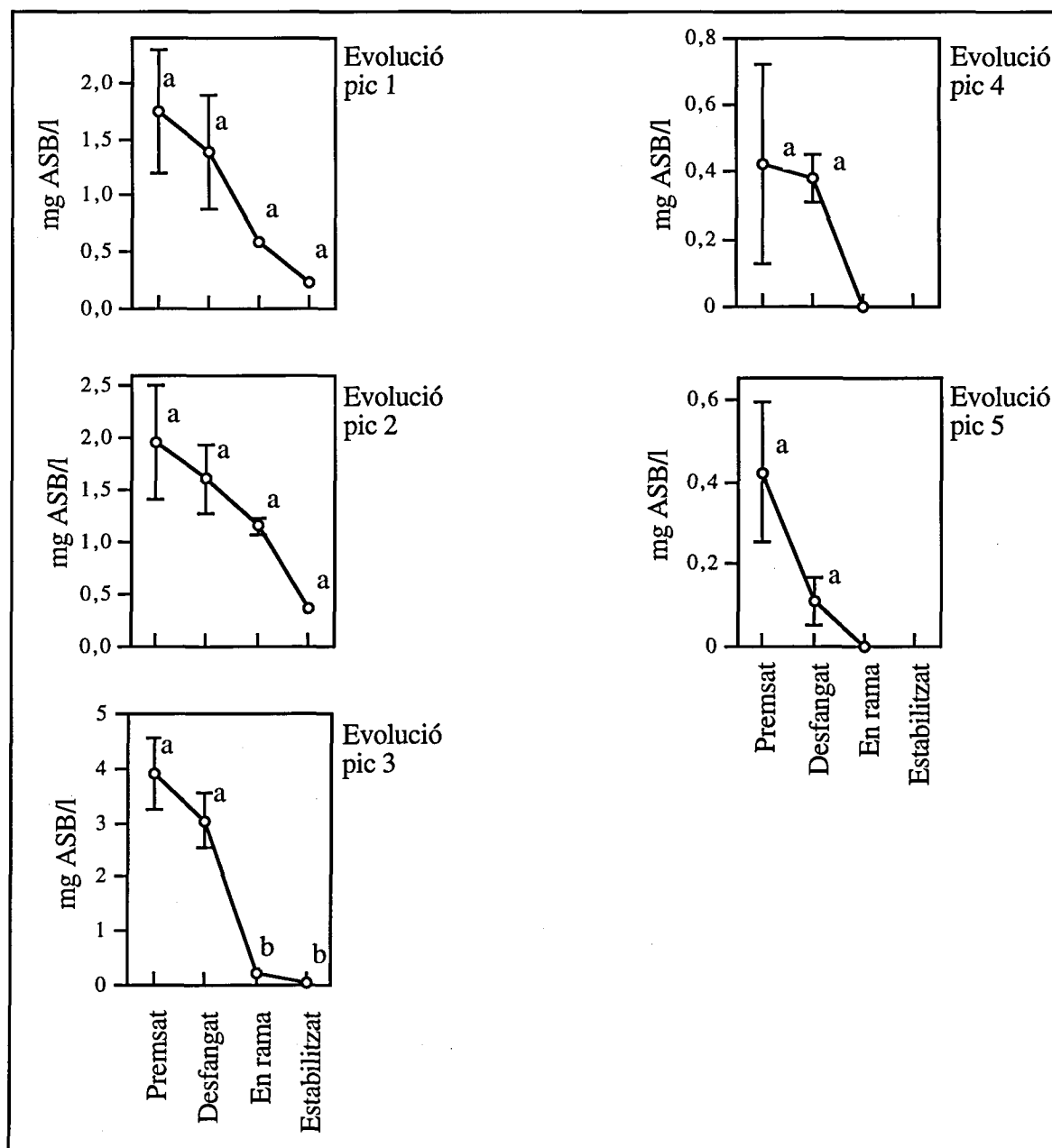
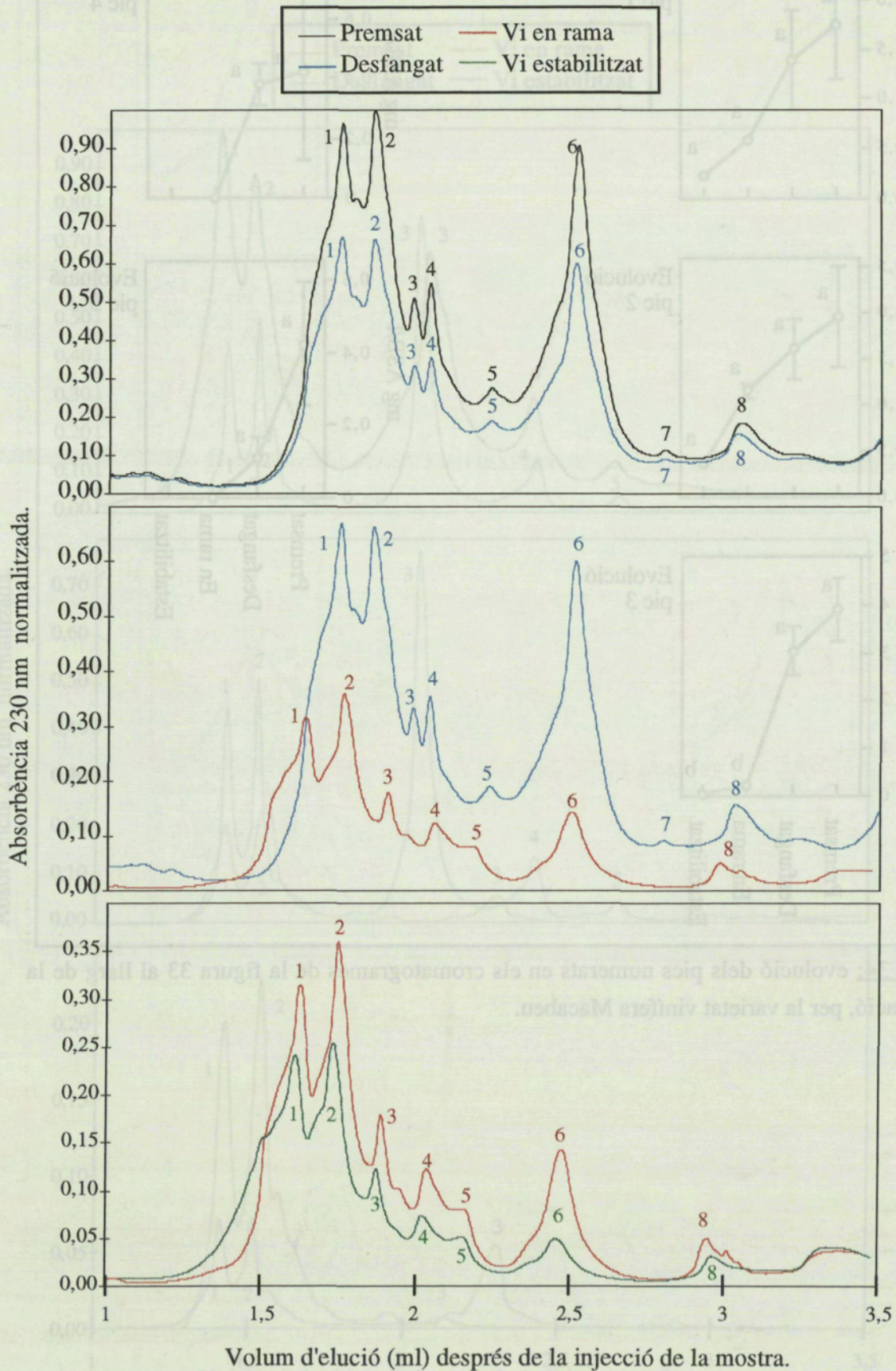


Figura 34: evolució dels pics numerats en els cromatogrames de la figura 33 al llarg de la vinificació, per la varietat vinífera Macabeu.



Xarel·lo

Figura 35: Perfils de la fracció de baixa massa molecular separats per bescanvi catiònic.



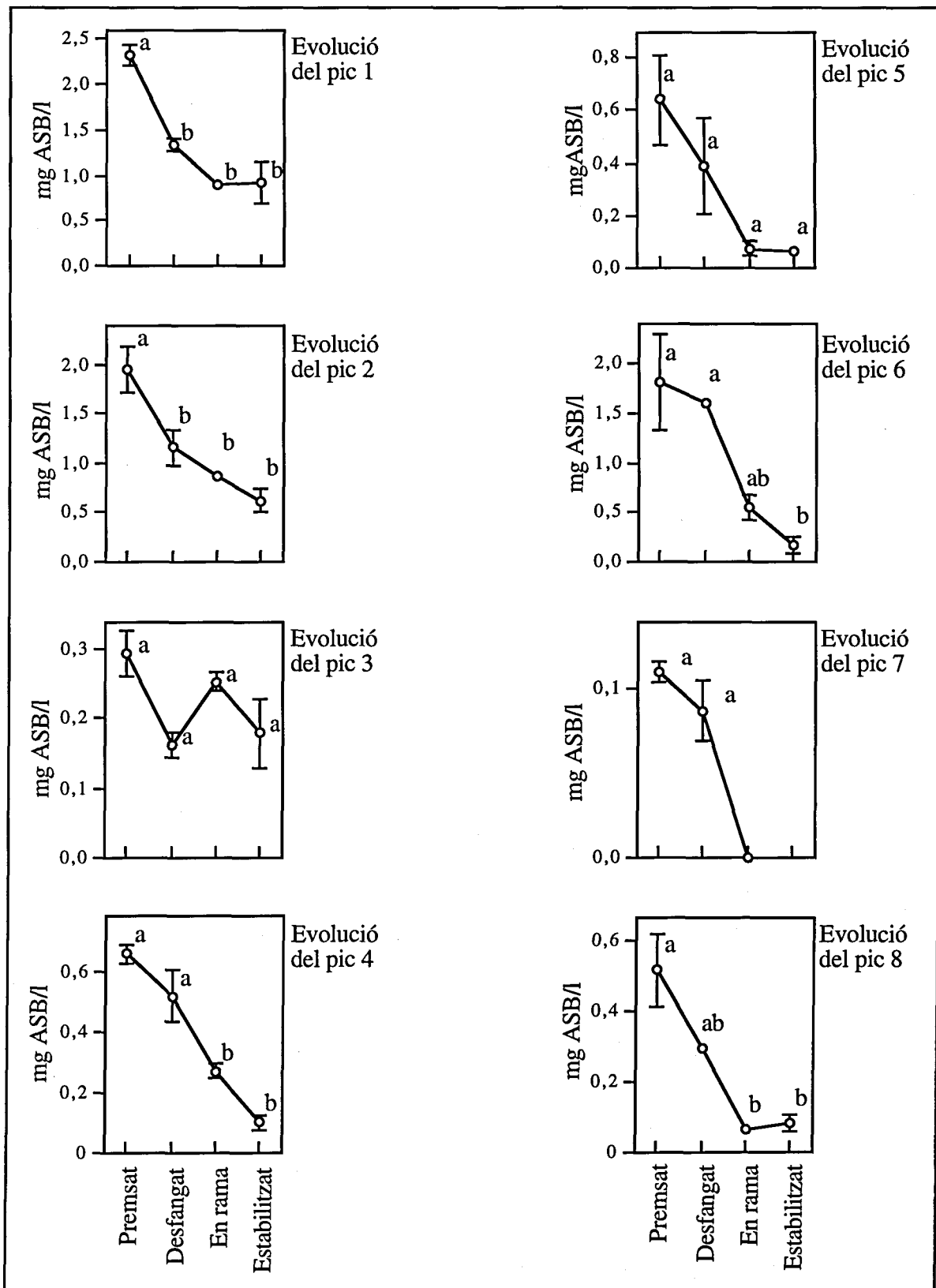
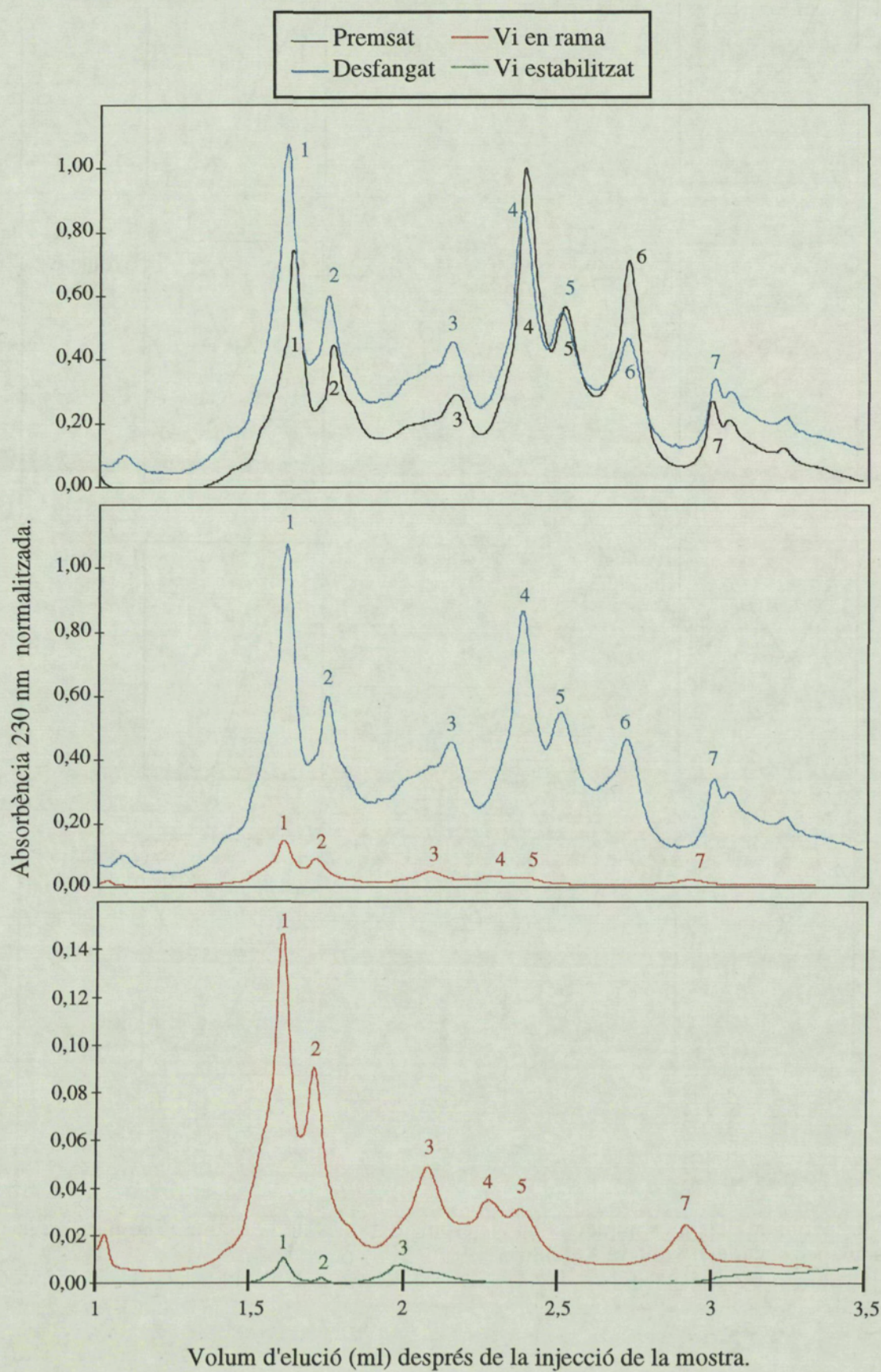


Figura 36: evolució dels pics numerats en els cromatogrames de la figura 35 al llarg de la vinificació, per la varietat vinífera Xarel.lo.



**Parellada**

**Figura 37:** Perfils de la fracció de baixa massa molecular separats per bescanvi catiònic.



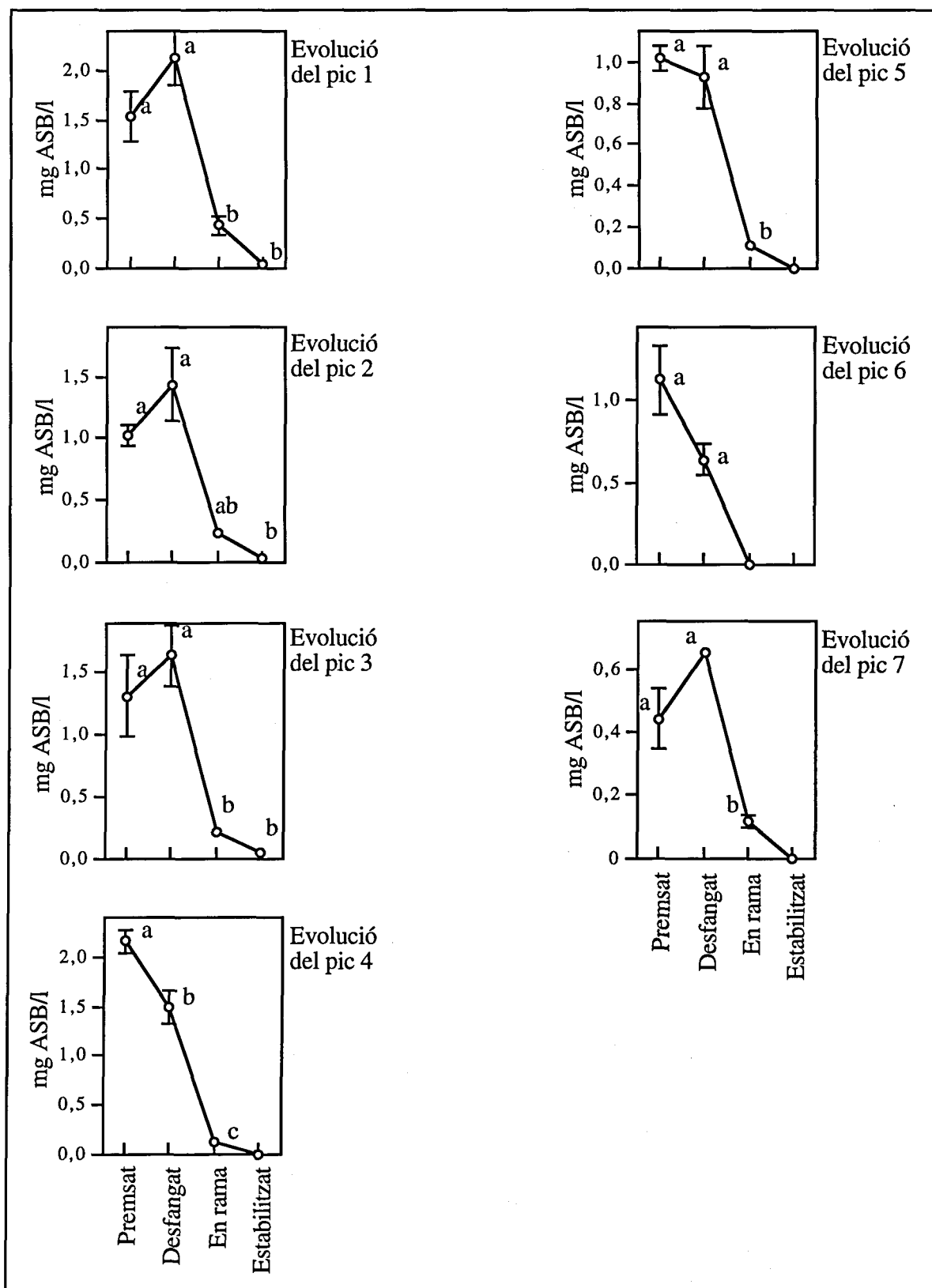


Figura 38: evolució dels pics numerats en els cromatogrames de la figura 37 al llarg de la vinificació, per la varietat vinífera Parellada.

### 2.5. Conclusions del capítol 2.

1. El procés de vinificació implica la disminució de la proteïna total i de les dues fraccions separades per exclusió molecular.
2. A la separació per bescanvi catiònic de la fracció de baixa massa molecular es veuen diferents perfils segons la varietat. S'observa una evolució semblant en els perfils al llarg de la vinificació de manera que desapareixen preferentment les fraccions amb més càrrega elèctrica. Aquesta desaparició es deguda a la reacció d'aquestes proteïnes amb les substàncies carregades negativament en el vi, com ara els polifenols i alguns clarificants, especialment la bentonita.
3. Totes les proteïnes d'entre 70 i 20 kDa que s'observen tenen un origen vegetal, ja que s'observen els mateixos pics en el most i en el vi, sense que la fermentació provoqui cap mena de hidròlisi.

---

## **Resultats i discussió. Capítol 3.**

---



**Índex.**

3. Vinificació en barrica .....	127
3.1. Evolució de la concentració total de proteïna. ....	129
3.2. Separació per exclusió molecular. ....	131
3.3. Separació per bescanvi catiònic. ....	133
3.4. Conclusions del capítol 3. ....	136

### **3. Vinificació en barrica.**

En aquest capítol l'objectiu és veure la influència de la fermentació i la posterior conservació en barrica en el contingut total i de cada una de les fraccions que es poden separar segons el mètode desenvolupat. Cal esmentar la limitació de mostra que hi ha cara a l'anàlisi estadístic del fenomen, doncs sols es va fer una vinificació en barrica i una en inoxidable per limitacions físiques de disponibilitat de barriques i de most. Tot i així el tractament de la mostra es va fer per triplicat tal com s'indica a la preparació de la mostra a materials i mètodes. S'obtenien 3 dialitzats dels quals es determinà la proteïna total per triplicat i de cada dialitzat, una vegada liofilitzat es separaren les proteïnes per exclusió molecular i bescanvi catiònic. Això permet treure conclusions estadístiques pel que fa a les mostres analitzades però fa difícil extrapolar a un comportament genèric.

Aquest assaig es va fer amb una sola varietat, que fou el Chardonnay; aquesta elecció es va fer per analogia amb altres zones elaboradores de vins fermentats en barrica així com per la elevada graduació alcohòlica natural d'aquesta varietat vinífera. La maduració d'aquesta varietat vinífera va ser diferent de l'escollida per l'elaboració de vins base per escumosos, doncs interesava una verema molt més madura. El grau alcohòlic probable buscat fou 12 - 13 % alc. (v/v), pel que la verema es realitzà el dia 22 d'agost de 1995.

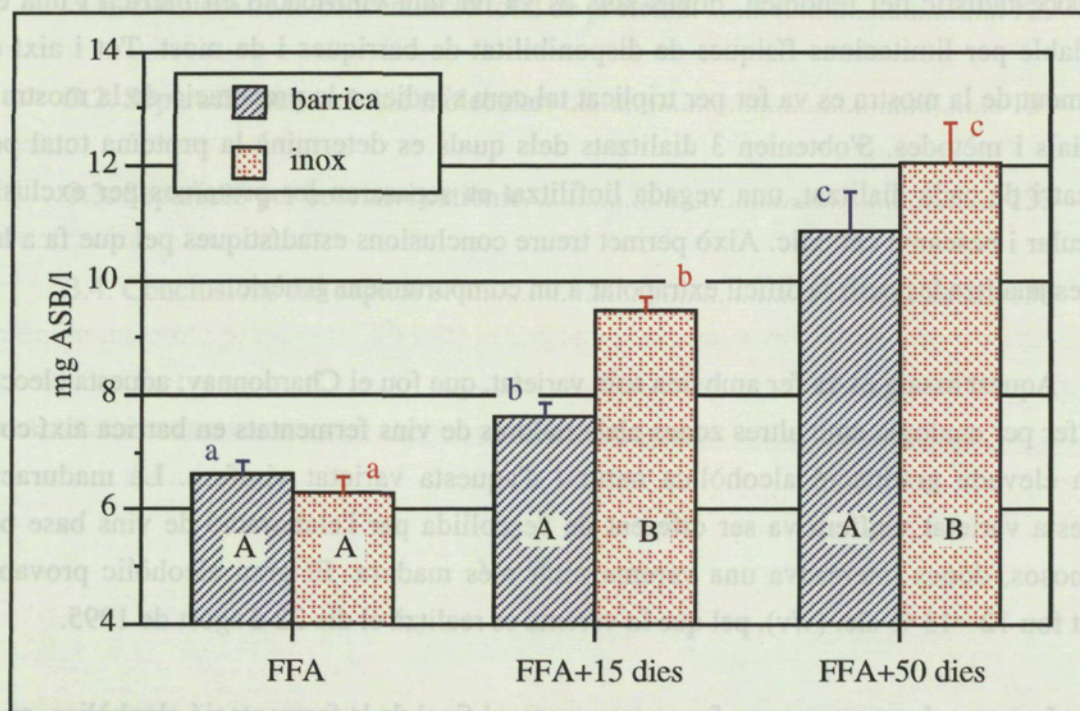
La presa de mostres es va fer en tres punts: al final de la fermentació alcohòlica, en el cas de la fermentació en dipòsit d'acer inoxidable la mostra es va prendre després del trasbals del final de la fermentació mentre que a la conservació en barrica aquest trasbals no es va realitzar; després de quinze dies de conservació en barrica o en dipòsit i al cap de cinquanta dies de conservació. El vi de les barriques es va remenar amb un bastó cada dues setmanes i les mostres de barrica es prengueren després de la primera i la tercera remenada.

#### **3.1. Evolució de la concentració total de proteïna.**

Aquest capítol, que es va dissenyar per veure l'efecte de la fermentació i posterior conservació en barrica d'un vi sobre la fracció proteica, però també ha resultat profitós per focalitzar l'evolució de les proteïnes en els cinquanta dies posteriors al trasbals de final de fermentació i abans dels processos d'estabilització. Aquests resultats poden completar els del comportament dels vins al llarg de la vinificació que es feia en el capítol anterior.

En una primera observació de la figura 39 es constata un augment significatiu, en cada estadi, de la concentració total de proteïnes; aquest augment es troba tant en el vi conservat en barrica com el conservat en el dipòsit. Si es comparen els dos sistemes de conservació es veu que l'efecte de la fermentació en barrica no canvia la concentració de

proteïnes en el vi, doncs inicialment la concentració es la mateixa en les dues condicions. Aquesta dada fa pensar en l'efecte predominant de la desnaturalització i precipitació sobre qualsevol altre fenomen, com en aquest cas seria la combinació amb tanins de la barrica nova. Però ja després de quinze dies hi ha una diferència significativa ( $p < 0,05$ ) entre la conservació en barrica i la conservació en acer inoxidable, favorable a aquesta última.



**Figura 39:** evolució de la concentració de proteïna després de la fermentació alcohòlica (mitja de 3 sacs de diàlisi  $\pm$  desviació estàndard). Les lletres minúscules indiquen diferència entre estadis segons el test de Scheffe ( $p < 0,05$ ) i les majúscules significància entre les condicions de conservació segons el test de Student a  $p < 0,05$ .

L'augment de concentració de proteïna en els dies posteriors a la fermentació alcohòlica es una dada que coincideix amb les de Dizy (1993) que troba increments de la concentració de proteïnes en el seguiment de dos anys; fins i tot aquesta autora troba concentracions de proteïna després de 40 dies de la verema més grans que la concentració inicial en el most. La concentració de proteïnes del most és una dada que en aquest treball es desconeix; tenint en compte que l'origen del raïm és el mateix que el Chardonnay veremat per escumós del capítol 2 però més madur, es pot suposar que la concentració seria superior als 20 mg/l, pel que en el nostre treball no s'observa un increment tan marcat. Dizy observa una disminució de concentració després d'aquest període, especialment després dels tractaments d'estabilització, tal com es veia en el capítol 2.

La conservació en barrica amb els baixos fins de fermentació, implica un fenomen d'autòlisi dels llevats en contacte amb el vi; aquest fenomen te lloc d'una manera visible en

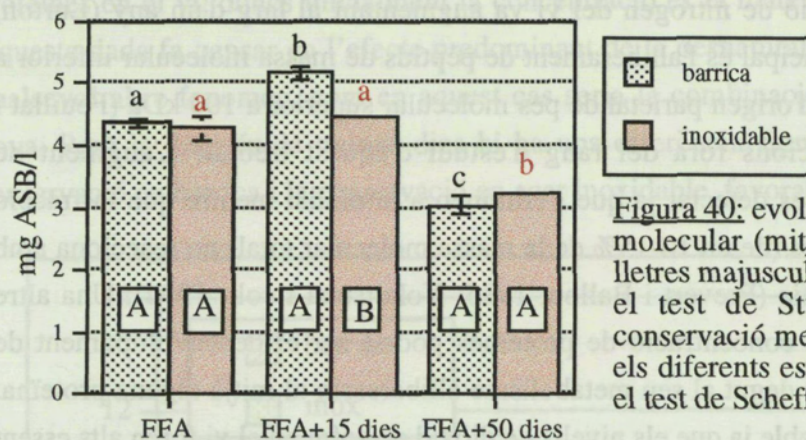


50 dies, però la concentració de nitrogen del vi va augmentant al larg d'un any (Lurton, 1988). La conseqüència principal és l'alliberament de pèptids de massa molecular inferior a 12 kDa i de manoproteïnes d'origen parietal de pes molecular superior a 100 kDa (Feuillat i col., 1989), ambdues fraccions fora del rang d'estudi d'aquest treball. L'augment de concentració de pèptids no es detecta ja que s'eliminen a la diàlisi mentre que la fracció proteica de les manoproteïnes (de un 10-15% de la massa molecular total) no reacciona amb el blau Brillant de Coomassie (Frevet i Ballou, 1985; Yokotsuka i col., 1994). Una altra hipòtesi de l'augment de la concentració de proteïnes podria ser el desenvolupament de bacteris làctics o acètics que degut al seu metabolisme alliberessin al mitjà alguna proteïna; aquesta hipòtesi es poc provable ja que els nivells de diòxid de sofre en el vi foren alts essent aquest un inhibidor del creixement de bacteris, a més, en el cas que hi hagués l'aparició d'una nova proteïna aquesta es detectaria per exclusió molecular o bescanvi catiònic. Aquest augment de proteïna també es podria explicar per resolubilització de la proteïna, tenint en compte les dades de la figura 39. Aquesta resolubilització seria inferior a la barrica per dues raons: degradació de part d'aquesta proteïna resolubilitzada deguda a les proteases del llevat alliberades al mitjà (Lurton, 1988) o bé desnaturalitzacions per unions amb tanins de la fusta.

### 3.2. Separació per exclusió molecular.

Per estudiar quines fraccions augmenten després de la fermentació, tan en barrica com al dipòsit d'acer inoxidable es procedí a la separació per exclusió molecular. Per aquest mètode es va obtenir el mateix perfil de separació; amb dues fraccions de proteïna i les mateixes característiques respecte el volum d'elució que l'anterior separació del capítol 2. A efectes de càlcul de concentracions s'emprà el mètode b proposat a l'apartat 1.5 del capítol 1.

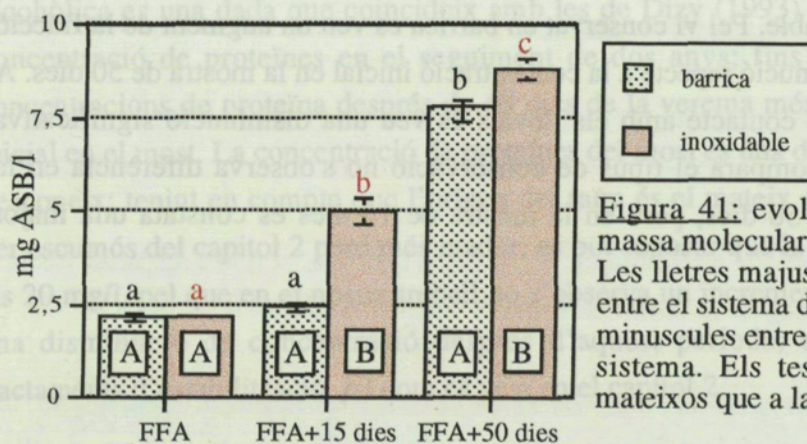
A la figura 40 es veu el comportament de la fracció d'alta massa molecular dins la barrica i en dipòsit d'inoxidable. Pel vi conservat en barrica es veu un augment de la fracció al cap de 15 dies i una disminució respecte a la concentració inicial en la mostra de 50 dies. A la mostra conservada sense contacte amb els llevats es veu una disminució significativa després de 50 dies. Si es compara el tipus de conservació no s'observa diferència en la mostra inicial ni al cap de 50 dies, però en la mostra de 15 dies es constata una major concentració a la barrica.



**Figura 40:** evolució de la fracció d'alta massa molecular (mitja  $\pm$  desviació estàndar). Les lletres majúscules indiquen significància amb el test de Student entre el sistema de conservació mentre que les minúscules entre els diferents estadis per cada sistema segons el test de Scheffe.

L'evolució de la concentració d'aquesta fracció a la conservació normal és diferent que la del total de la figura 39; la fracció de 60 kDa segueix una evolució decreixent per una possible precipitació. En canvi hi ha un augment estrany de la conservació en barrica als 15 dies, que als 50 dies acaba disminuint als mateixos valors que a l'altre tipus de conservació. La davallada es podria suposar deguda a enzims proteàsics del llevat alliberats al mitjà per la degradació del llevats, que és una de les conseqüències de la autòlisi. No es pot atribuir la disminució dels 50 dies a aquest factor ja que succeeix en les dues condicions de conservació.

A la fracció de baixa massa molecular es veu un augment significatiu en els 15 i 50 dies de conservació dins el dipòsit d'acer inoxidable. Un augment més moderat s'observa a la conservació en barrica, que sols es significatiu passats 50 dies. Es veu que la conservació en barrica empobreix aquesta fracció proteica respecte a la conservació normal. Aquest empobriment es pot explicar pels tanins del roure, que coagularien amb preferència les proteïnes de inferior massa molecular.



**Figura 41:** evolució de la fracció de baixa massa molecular (mitja  $\pm$  desviació estàndar). Les lletres majúscules indiquen significància entre el sistema de conservació mentre que les minúscules entre els diferents estadis per cada sistema. Els test de significància són els mateixos que a la figura 40.



L'augment de concentració es podria explicar per degradació no enzimàtica de la proteïna de 60 kDa o de la part proteica de les manoproteïnes. En el cas de l'origen levurià no s'explica l'augment a la conservació en dipòsit d'acer inoxidable i en l'explicació per degradació haurien d'aparèixer pics nous a la separació per bescanvi catiònic. Una altre possible explicació podria ser la resolubilització, desfavorida en el cas de la barrica per la presència dels tanins. Segons aquesta última hipòtesi després de la fermentació les concentracions de proteïna en barrica ja haurien de ser més baixes que al dipòsit; això no és així possiblement degut a que l'efecte desnaturalitzador de l'alcohol produït a la fermentació té un paper preponderant sobre els altres factors.

### 3.3. Separació per bescanvi catiònic.

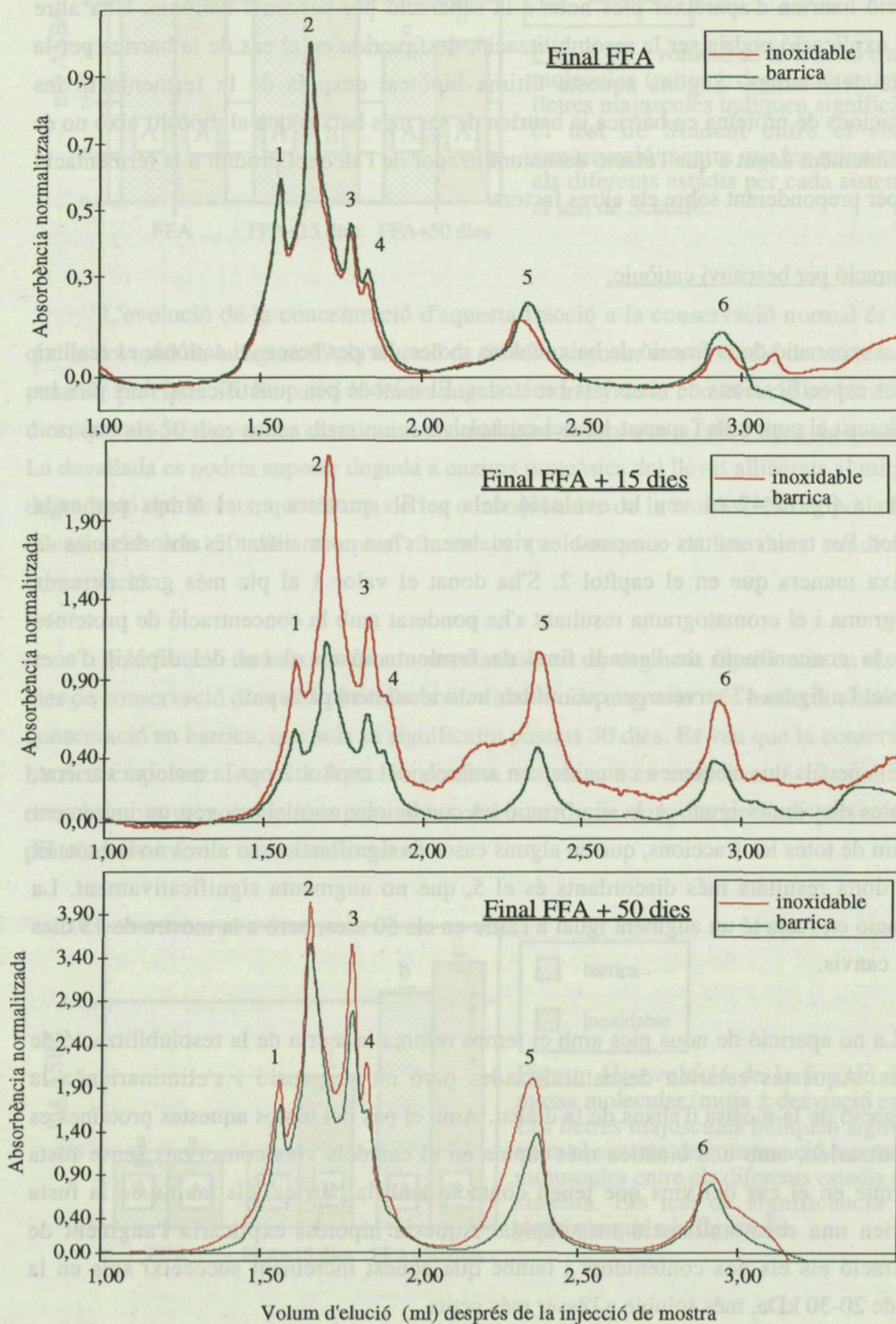
La separació de la fracció de baixa massa molecular per bescanvi catiònic es realitzà segons les especificacions de materials i mètodes. El mètode per quantificació dels pics ha estat el descrit al punt b de l'apartat 1.5 del capítol 1.

A la figura 42 es veu la evolució dels perfils proteics en el temps per cada contenidor. Per tenir resultats comparables visualment s'han normalitzat les absorbències de la mateixa manera que en el capítol 2. S'ha donat el valor 1 al pic més gran de cada cromatograma i el cromatograma resultant s'ha ponderat amb la concentració de proteïnes respecte la concentració de l'estadi final de fermentació en el cas del dipòsit d'acer inoxidable. La figura 43 serveix per quantificar individualment cada pic.

Els perfils que s'obtenen coincideixen amb els del capítol 2 per la mateixa varietat, amb 6 pics distribuïts igual. A la vinificació en condicions normals es veu un increment progressiu de totes les fraccions, que en alguns casos és significatiu i en altres no del tot. El pic que dona resultats més discordants és el 5, que no augmenta significativament. La conservació en fusta té un augment igual a l'altre en els 50 dies, però a la mostra de 15 dies no hi ha canvis.

La no aparició de nous pics amb el temps reforça la teoria de la resolubilització de proteïnes. Aquestes estarien desnaturalitzades però en suspensió i s'eliminarien a la centrifugació de la mostra d'abans de la diàlisi. Amb el pas del temps aquestes proteïnes es resolubilitzarien, amb una cinètica més ràpida en el cas dels vins conservats sense fusta mentre que en el cas del vins que tenen contacte amb la barrica, els tanins de la fusta impedirien una renaturalització més ràpida. Aquesta hipòtesi explicaria l'augment de concentració els dos contenidors i també que aquest increment succeeixi sols en la fracció de 20-30 kDa, més soluble a l'ésser més petita.

Figura 42: evolució dels perfils de la fracció de baixa massa molecular al llarg del temps en les dues condicions de conservació.





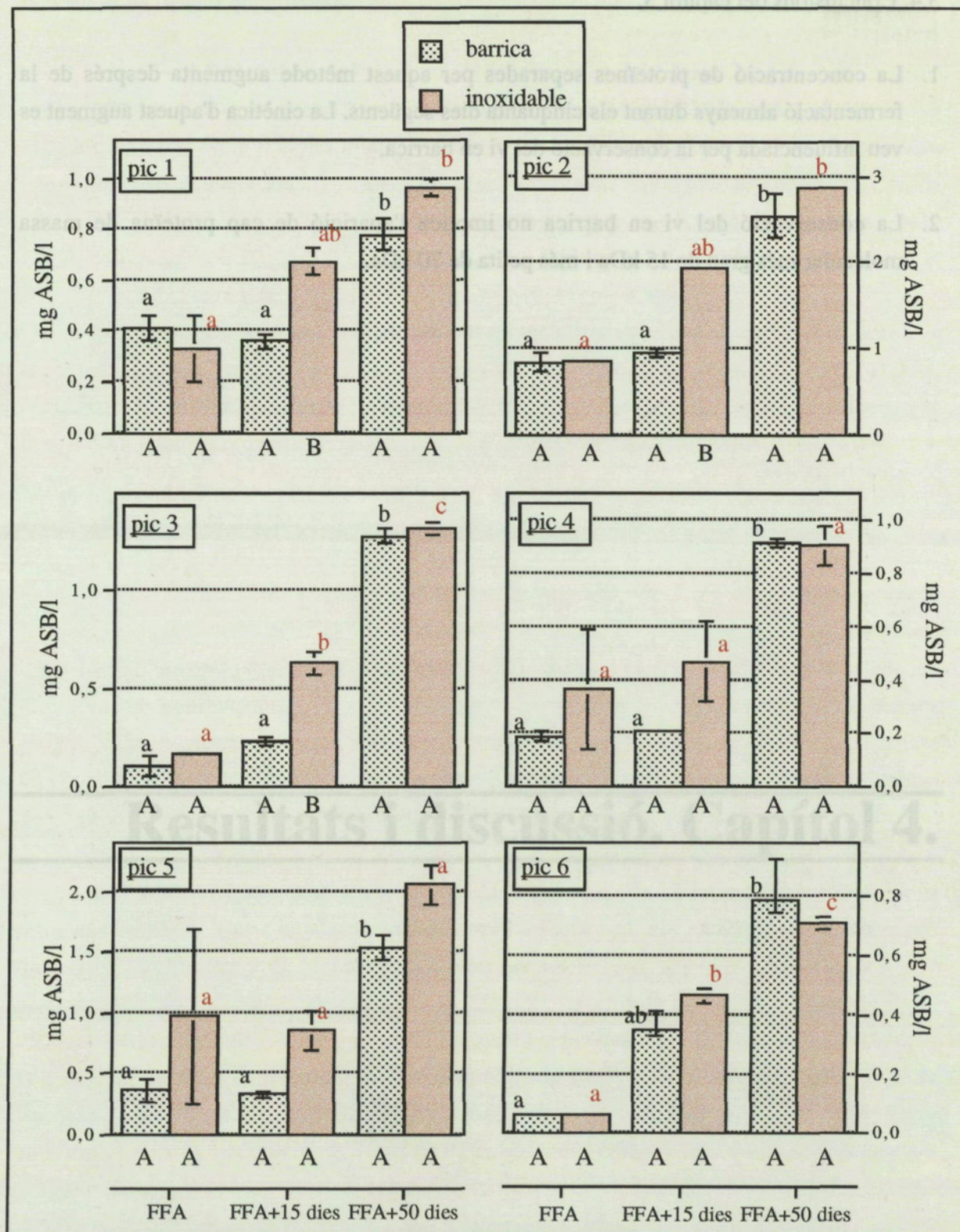


Figura 43: evolució quantitativa dels pics de la figura 42. Mitja  $\pm$  desviació estàndard amb l'estadística d'evolució entre estadis (en lletres minúscules) i entre condicions de conservació (en lletres majúscules). Els tests estadístics utilitzats per la comparació entre estadis ha estat el test de Scheffe amb una significància del 5% ( $p < 0,05$ ) i per comparar les condicions de conservació s'ha utilitzat el test d'Student amb el mateix nivell de significància.



### 3.4. Conclusions del capítol 3.

1. La concentració de proteïnes separades per aquest mètode augmenta després de la fermentació almenys durant els cinquanta dies següents. La cinètica d'aquest augment es veu influenciada per la conservació del vi en barrica.
2. La conservació del vi en barrica no implica l'aparició de cap proteïna de massa molecular més gran de 15 kDa i més petita de 70 kDa.



0,100-89460



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**  
**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA**

---

**APLICACIÓ DE TÈCNiques DE CROMATOGRÀFIA  
LÍQUIDA DE PROTEÏNES (FPLC) A L'ESTUDI DE  
VINS BLANCS.**

---

663.253 Can <sup>(NP)</sup>

Memòria presentada per  
**JOAN MIQUEL CANALS I BOSCH**  
per optar al grau de Doctor en Ciències Químiques  
sota la Direcció del Dr. Fernando Zamora Marín  
EXCLUS DE PRÉSTEC



---

## **Resultats i discussió. Capítol 4.**

---

**Índex.**

4. Estudi de maduració del raïm.....	137
4.1. Seguiment de la maduració. ....	139
4.2. Evolució de la proteïna total. ....	141
4.3 Evolució de les fraccions separades per exclusió molecular. ....	143
4.4. Evolució de les fraccions separades per bescanvi catiònic de la fracció de baixa massa molecular. ....	147
4.5. Conclusions del capítol 4. ....	160

#### **4. Estudi de maduració del raïm.**

L'anàlisi bibliogràfica de l'evolució de les proteïnes del raïm al llarg de la maduració ens mostra que molts poc autors han treballat aquest aspecte i que l'informació al respecte és molt escassa. A més, la majoria d'aquests treballs s'han fet amb raïms de diferents parcel·les que tenien una concentració de sucres diferent i en base a aquesta dada es correlaciona la concentració de sucre amb el contingut en proteïnes de la mostra (González-Lara i col., 1989).

Per aquesta raó, aquest estudi té com a objectiu fer un seguiment de les proteïnes durant el període de maduració del raïm. Per minimitzar efectes de climatologia i de terreny, les mostres es varen agafar de la mateixa parcel·la durant la collita 96. La presa de mostres es feu tal com s'indica al punt 2.1. de materials i mètodes.

##### **4.1. Seguiment de la maduració.**

Pel seguiment de la maduració de les 5 varietats viníferes estudiades es varen analitzar els paràmetres clàssics: acidesa total, grau alcohòlic provable i pes de 100 grans. L'evolució d'aquests paràmetres es presenten a les figures 44 a 48. En elles es pot veure que presenten un comportament típic, si bé aquest any es varen veure molt afectats per les pluges. Si analitzem aquests resultats es constata que a la collita 96, a diferència de la collita 95 (figures de la 21 a la 25), totes les varietats presenten un increment del pes de 100 grans, degut probablement a la gran disponibilitat d'aigua per part de la planta.

El Pinot noir no va patir els efectes de la sequera de l'any 95 i la maduració va venir retrasada respecte aquest any, amb una acidesa més alta i un grau alcohòlic provable més baix. El Chardonnay y el Macabeo van tenir un rendiment alcohòlic semblant a l'any anterior però amb acideses més elevades. El Xarel·lo, va tenir un avançament respecte l'any 95, presentant graus alcohòlics probables clarament superiors als de la collita precedent, si bé l'acidesa total es va mantenir a nivells semblants. La Parellada es va retrasar respecte l'any 95, amb graus alcohòlics probables més baixos i i acideses més altes que l'any anterior. A més la maduració de la Parellada es va veure compromesa per una pedregada a mig setembre.

La gran disponibilitat d'aigua, fruit de les nombroses pluges, també es posa en evidència pel fet de que en cap varietat s'observa una disminució significativa del pes de 100 grans com succeïa a la verema 95 al final de la maduració.

Les figures 44 a la 48 estan representades la mitja  $\pm$  desviació estàndard de les dades de pes de 100 grams, grau alcohòlic provable i acidesa total.

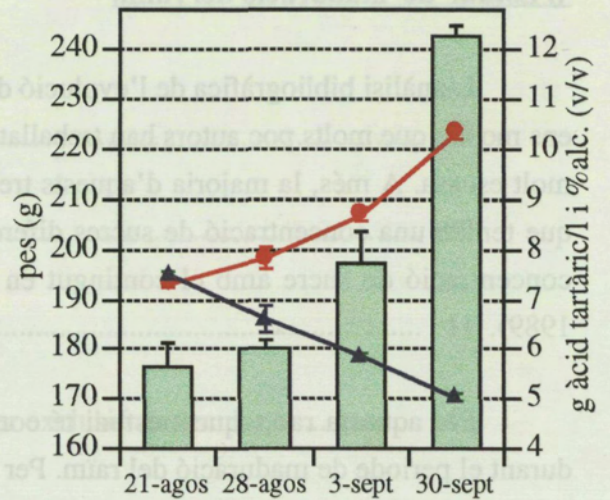
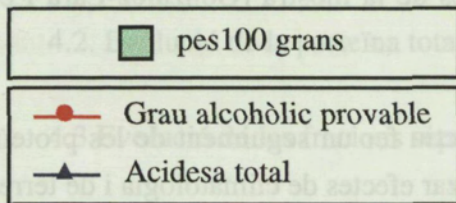


Figura 46: maduració del Macabeu.

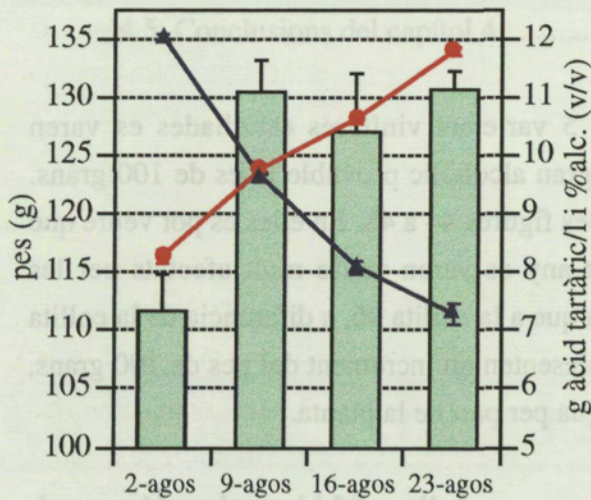


Figura 44: maduració del Pinot Noir.

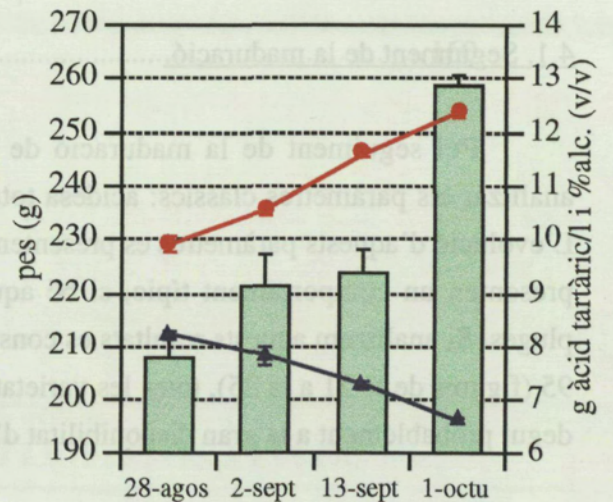


Figura 47: maduració del Xarel.lo.

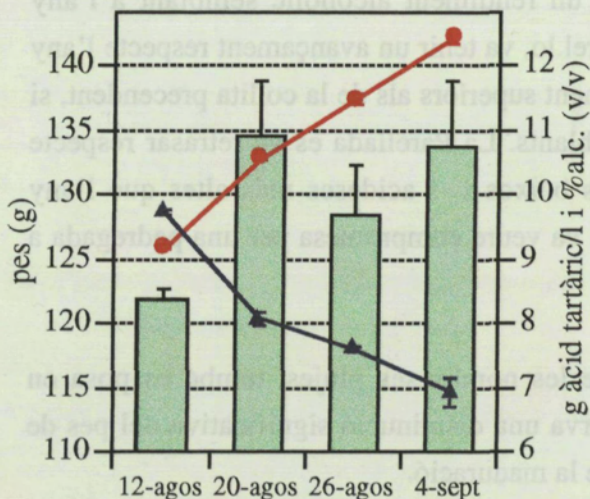


Figura 45: maduració del Chardonnay.

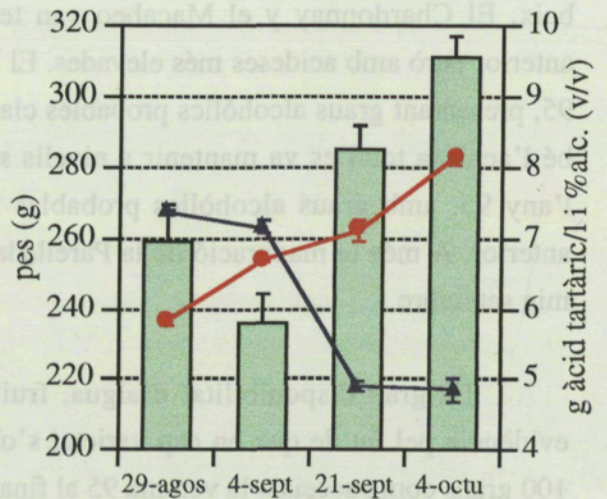


Figura 48: maduració de la Parellada.



#### 4.2. Evolució de la proteïna total.

La proteïna total s'ha avaluat en aquest capítol d'una manera diferent a com s'havia fet fins ara; això es degut a que les mostres, al tractar-se de most, presenten un contingut en proteïna més alt i no es precis concentrar la mostra més de 10 vegades. Al concentrar menys l'error comès es més petit i les àrees dels pics haurien de ser més repetitives. Degut a això la concentració es calcula segons el mètode indicat a l'apartat b del punt 1.5 de capítol 1, amb un patró extern de quimiotripsinogen A (QT A). Aquest patró s'ha realitzat amb diferents concentracions tenint en compte les àrees normals dels pics de treball i ajustant-les a una recta de calibrat.

La recta de calibrat s'ha aplicat als pics resultants de separar per bescanvi catiònic les fraccions 2 i 3 de la exclusió molecular. Per mitjà de la suma de totes les àrees es troba el valor de la proteïna total. L'àrea del pic que s'obté al cromatografiar la fracció 2 de la primera separació es considera com corresponent a la proteïna de la fracció d'alta massa molecular i la suma dels pics de la fracció 3 separada per bescanvi catiònic es considera com corresponent al total de proteïna de baixa massa molecular.

Els resultats s'expressen com a mg/l del patró utilitzat. Per comparar-les amb les dades precedents (expresades com mg ASB/l ) s'hauria de tenir en compte la diferent reactivitat del reactiu de Bradford amb el quimiotripsinogen A i comparar-la amb la de l'albumina de sèrum boví. Estudis previs de la resposta de diferents proteïnes al reactiu de Bradford (Bio-Rad, 1994) demostren que l'albumina de serum bovi dona lloc a una resposta colorimètrica 2,7 vegades més alta que el quimiotripsinogen A. Per tot això, per comparar les dades d'aquest capítol amb les dels capítols precedents o amb les d'altres treballs s'haurien de multiplicar per aquest factor. No obstant, com considerem més interessant l'evolució relativa dels nivells de proteïna que el seu valor absolut, hem considerat més correcte expressar les dades en funció del patró intern utilitzat.

La figura 49 representa l'evolució de la concentració total de proteïna durant la maduració. En totes les varietats s'observa un augment progressiu de la concentració de proteïnes; tot i que en algunes varietats no ho fa de manera significativa (taula 16). Aquestes dades coincideixen en termes generals amb la bibliografia. Murphey i col. (1989) observen un augment lineal de la concentració de proteïna total al llarg de la maduració en l'estudi de mostos de Riesling i Gewürztraminer. Altres autors no troben una correlació entre la maduració i la proteïna total (González-Lara i col., 1989). Cal assenyalar que les desviacions que s'observen en la tendència general d'augment de la concentració de proteïna que presenten algunes varietats podrien ésser degudes a les pluges de finals d'agost i setembre.

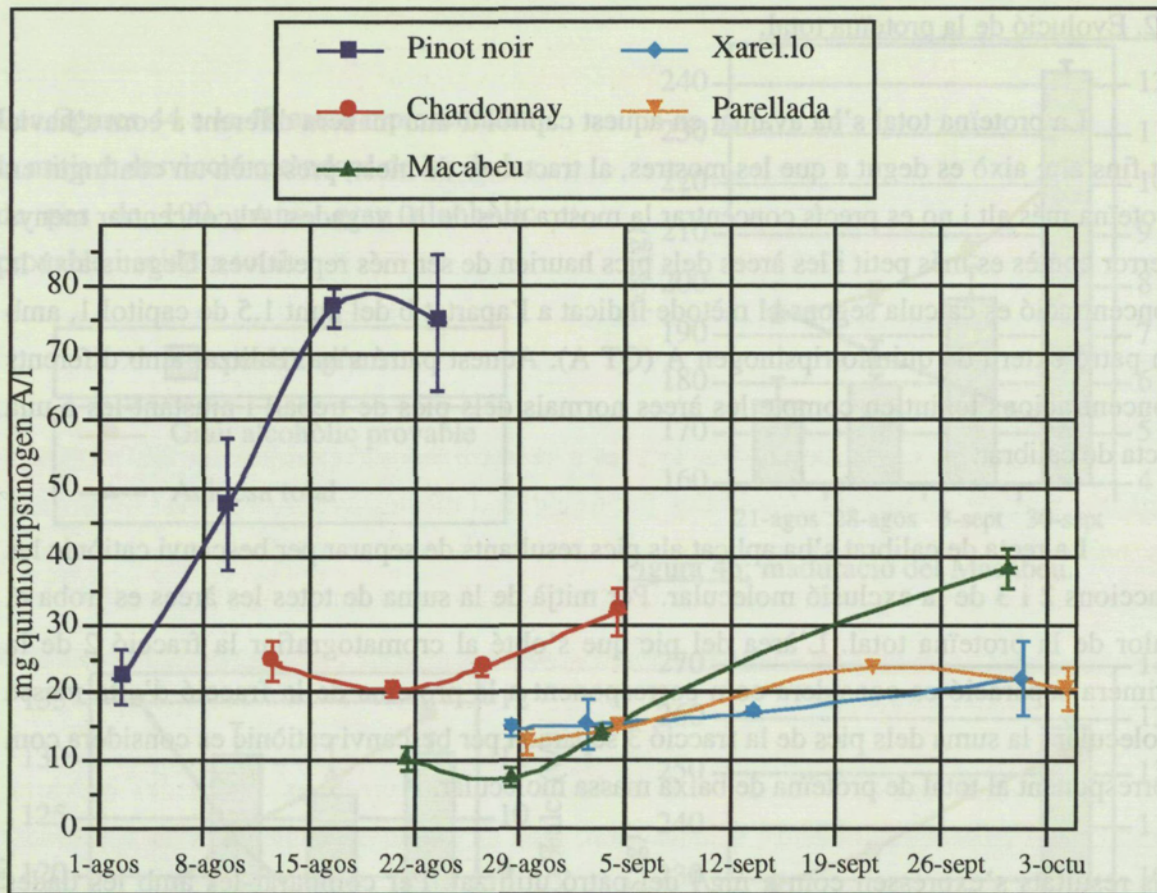


Figura 49: evolució del contingut de proteïnes en les cinc varietats. (Mitjana  $\pm$  desviació estàndard).

	Pinot noir	Chardonnay	Macabeu	Xarel.lo	Parellada
mostra 1	A	AB	A	A	A
mostra 2	B	AB	A	A	AC
mostra 3	C	ABC	A	A	B
mostra 4	C	AC	B	A	BC

Taula 16: Evolució estadística de la proteïna total per cada varietat individual. S'aplica el test de Scheffe a un 5% de significància ( $p < 0,05$ ).

Per tal d'esbrinar si existeix qualsevol tipus de correlació estadística entre l'evolució de la concentració de proteïna i els altres paràmetres descriptors de la maduració del raïm, s'ha realitzat l'anàlisi de correlació linial de Fisher, comparant la concentració proteica vers el pes de 100 grams, el grau alcohòlic provable i l'acidesa total expressada en àcid tartàric

A la taula 17 es presenten els valors del coeficient de correlació i el valor de p.



	variable	Coefficient de correlació lineal de Fisher	p
Pinot noir	Pes grans (g)	0,700	0,0165
	grau (% alc.)	0,920	<0,0001
	ATT (g/l)	- 0,923	<0,0001
Chardonnay	Pes grans (g)	0,032	0,9272
	grau (% alc.)	0,620	0,0557
	ATT (g/l)	- 0,540	0,1067
Macabeu	Pes grans (g)	0,956	0,0001
	grau (% alc.)	0,909	0,0007
	ATT (g/l)	- 0,754	0,0189
Xarel.lo	Pes grans (g)	0,767	0,0262
	grau (% alc.)	0,723	0,0425
	ATT (g/l)	- 0,648	0,0823
Parellada	Pes grans (g)	0,540	0,1071
	grau (% alc.)	0,693	0,0261
	ATT (g/l)	- 0,846	0,0021

**Taula 17:** correlacions entre la quantitat de proteïna i altres variables de la maduració a les diferents varietats. S'han sombrejat les variables amb correlació significativa ( $p < 0,05$ )

Tal com es veu en aquestes dades el grau alcohòlic probable presenta correlació significativa en totes les varietats estudiades excepte en el cas del Chardonnay. L'acidesa total també presenta una correlació significativa pel Pinot noir, Macabeu i la Parellada, mentres que el pes de 100 grans únicament es correlaciona significativament en el cas del Macabeu i del Xarel.lo. El conjunt d'aquests resultats sembla indicar que el paràmetre que millor es correlaciona amb la concentració proteica és el grau alcohòlic probable el corrobora els resultats de Murphey i col. (1989).

#### 4.3 Evolució de les fraccions separades per exclusió molecular.

A la separació per cromatografia d'exclusió molecular s'observa un comportament diferent per les dues fraccions estudiades (figures 50 a 54). Mentre la fracció de baixa massa molecular presenta un augment significatiu en totes les varietats, la fracció d'alta massa molecular està estabilitzada i sense una tendència clara.

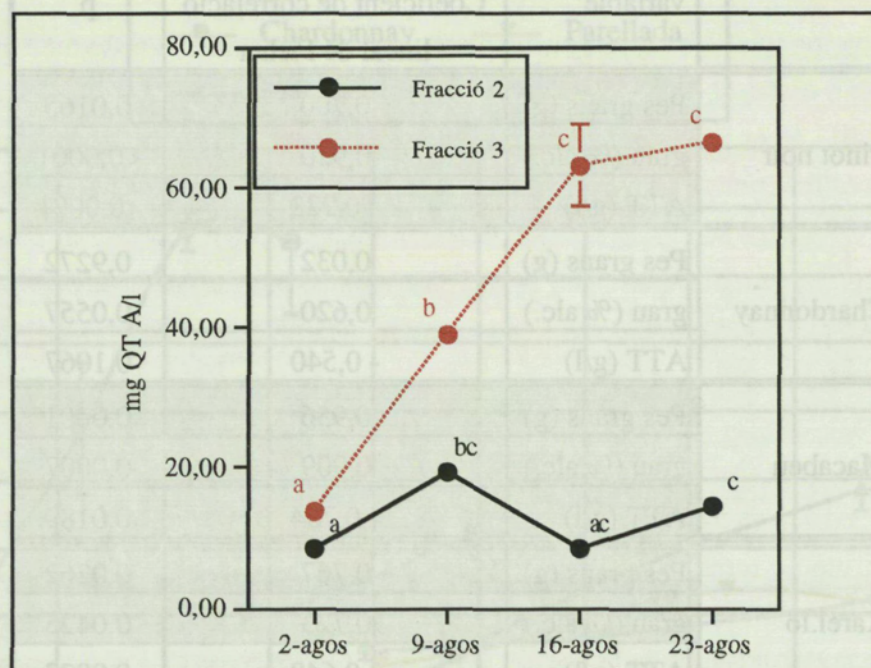


Figura 50: evolució de les fraccions de Pinot noir separades per exclusió molecular.

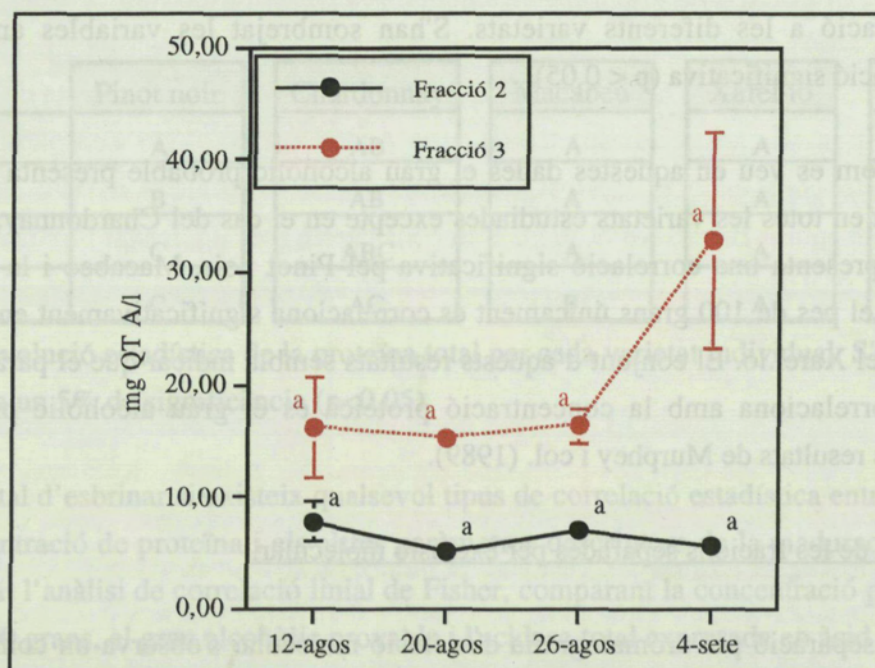


Figura 51: evolució de les fraccions de Chardonnay separades per exclusió molecular.



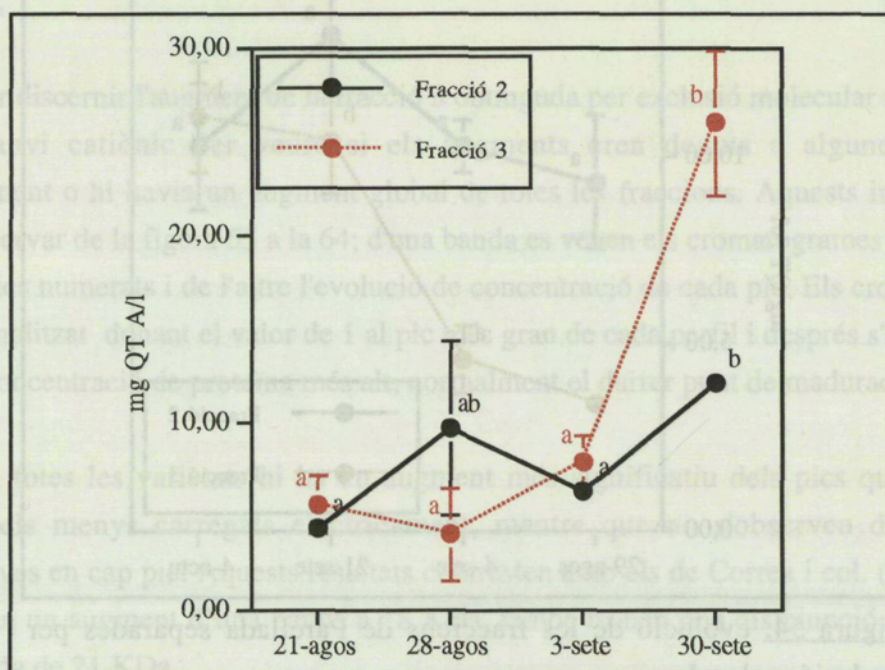


Figura 52: evolució de les fraccions de Macabeu separades per exclusió molecular.

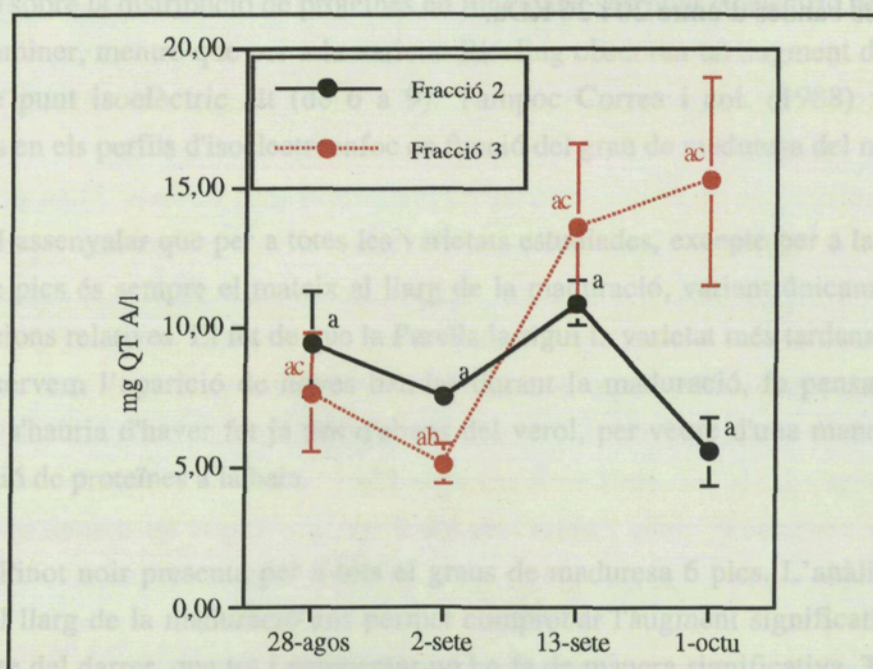


Figura 53: evolució de les fraccions de Xarel.lo separades per exclusió molecular.



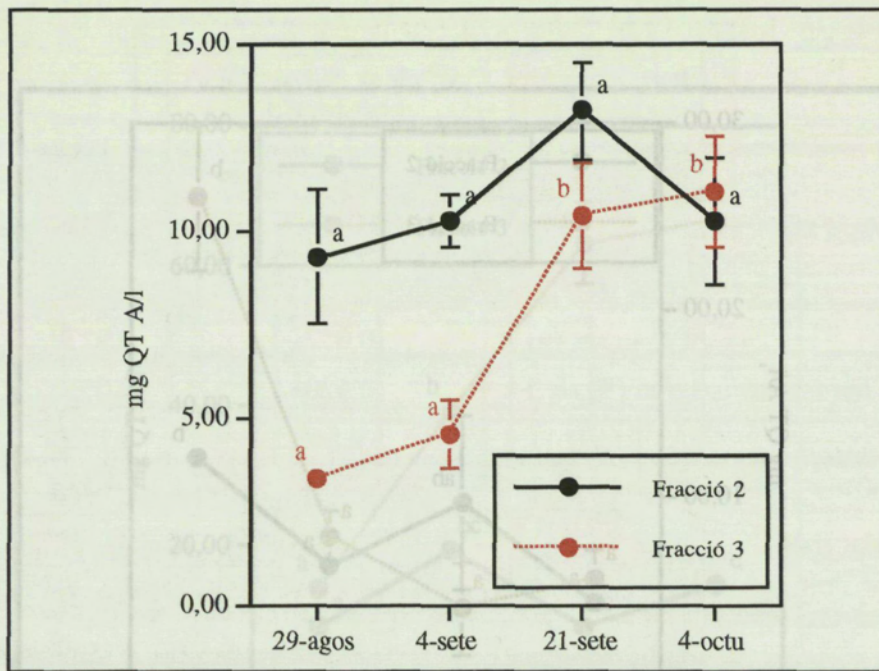


Figura 54: evolució de les fraccions de Parellada separades per exclusió molecular.

El conjunt d'aquests resultats concideix amb els de Murphey i col. (1989). Aquests autors determinen mitjançant tècniques electroforètiques que la banda d'alt pes molecular és manté constant al llarg del procés de maduració, mentre que observen un increment progressiu de les bandes d'entre 20 i 26 KDa.

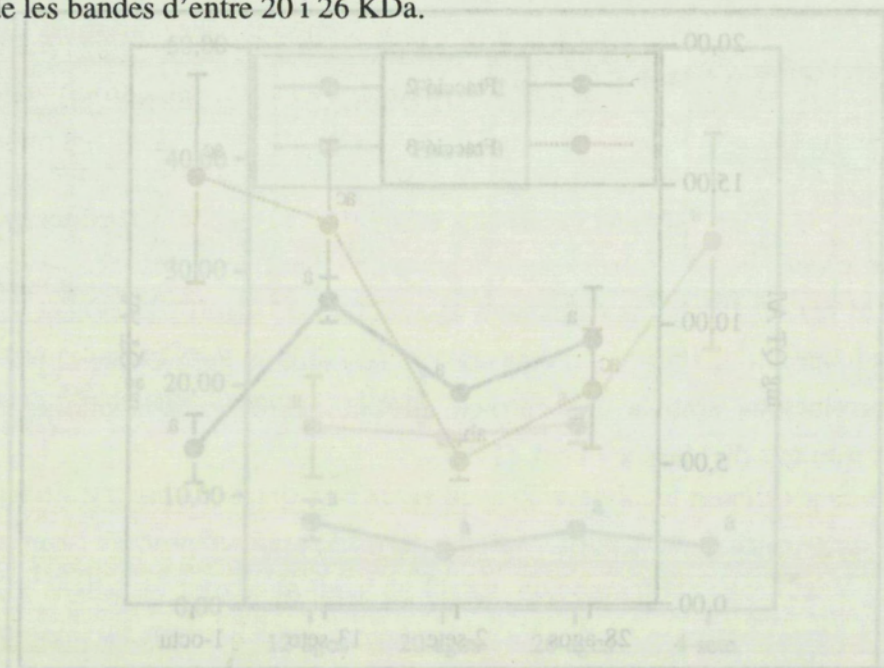


Figura 55: evolució de les fraccions de Parellada separades per exclusió molecular.

#### 4.4. Evolució de les fraccions separades per bescanvi catiònic de la fracció de baixa massa molecular.

Per discernir l'augment de la fracció 3 obtinguda per exclusió molecular es va separar per bescanvi catiònic per veure si els augments eren deguts a algunes proteïnes preferentment o hi havia un augment global de totes les fraccions. Aquests increments es poden observar de la figura 55 a la 64; d'una banda es veuen els cromatogrames normalitzats amb els pics numerats i de l'altre l'evolució de concentració de cada pic. Els cromatogrames s'han normalitzat donant el valor de 1 al pic més gran de cada perfil i després s'han referit al valor de concentració de proteïna més alt, normalment el darrer punt de maduració.

En totes les varietats hi ha un augment més significatiu dels pics que s'elueixen primer, dels menys carregats electricament, mentre que no s'observen disminucions significatives en cap pic. Aquests resultats contrasten amb els de Correa i col. (1988) que si bé detecten un augment d'una banda a 18 KDa, també troben una disminució significativa d'una banda de 21 KDa.

L'increment d'aquestes proteïnes amb poca càrrega implica l'augment de la concentració de les proteïnes amb punt isoelèctric baix. Aquestes dades no coincideixen completament amb les de Murphey i col. (1989), ja que no destaquen cap influència de la maduració sobre la distribució de proteïnes en funció del seu punt isoelèctric per a la varietat Gewürztraminer, mentre que per a la varietat Riesling observen un augment del nombre de bandes de punt isoelèctric alt (de 6 a 9). Tampoc Correa i col. (1988) van observar diferències en els perfils d'isoelectroenfoc en funció del grau de maduresa del most.

Cal assenyalar que per a totes les varietats estudiades, excepte per a la Parellada, el conjunt de pics és sempre el mateix al llarg de la maduració, variant únicament les seves concentracions relatives. El fet de que la Parellada sigui la varietat més tardana i que en ella si que observem l'aparició de noves bandes durant la maduració, fa pensar que aquest seguiment s'hauria d'haver fet ja des d'abans del verol, per veure d'una manera més clara l'acumulació de proteïnes a la baia.

El Pinot noir presenta per a tots el graus de maduresa 6 pics. L'anàlisi de la seva evolució al llarg de la maduració ens permet comprobar l'augment significatiu de tots els pics excepte del darrer, que tot i augmentar no ho fa de manera significativa. També es veu que el pic 5 són en realitat dues proteïnes molt semblants, que es resolen quan n'hi ha poca concentració però que l'augment del pic amb més càrrega fa que l'altre quedi com una espatlla d'aquest. També es pot observar que a partir del tercer punt les baies no han

acumulat més proteïna, doncs tots els pics són significativament iguals entre la tercera i la quarta mostra.

En els cromatogrames del Chardonnay s'observen 7 pics clarament diferenciats, si bé també es detecta la presència d'un pic després del pic 7 que apareix ja a la segona mostra i que desapareix al final de la maduració. No obstant, degut a la pobre resolució del mateix no s'ha quantificat. L'evolució dels diferents pics mostra la tendència general d'augment del contingut proteic de la majoria, si bé en els primers estadis de la maduració s'observen disminucions no significatives dels pics 5, 6 i 7, que probablement estiguin relacionades amb una dil·lució provocada per les importants plujes del dia 14 d'agost.

El Macabeu presenta en tots els estadis 6 pics, si bé es pot detectar la presència d'un nou pic entre el 5 i el 6 en l'últim estadi de la maduració. No obstant i degut a la pobre resolució del mateix i al fet de que no apareix en totes les repliques no s'ha quantificat. L'evolució dels diferents pics presenta un cert paral·lelisme amb disminucions no significatives al començament de la maduració i un posterior augment que només és significatiu en els pics 1, 2, 4 i 5. Aquesta tendència inicial de disminució podria estar relacionada també amb les plujes, ja que van caure més de 25 l/m<sup>2</sup>.

El Xarel·lo és la varietat a on s'observen més pics, concretament 9. En quant a la seva evolució es pot dir que mostra la tendència general d'augment progressiu, que ja hem observat en les altres varietats, si bé les variacions no sempre són significatives. No obstant, el pic 8 no presenta un increment amb el temps, mantenint-se sempre a nivells similars.

La Parellada, al ésser una varietat de maduració més tardana, s'han pogut veure l'aparició de pics. De fet en la primera presa de mostra només es detecten 4 pics, mentre que a partir de la segona mostra el nombre de pics diferenciats és de 6. Aquests dos pics són ben diferents, així un és de la zona més conservada (el pic 2), amb poca càrrega elèctrica, i per tant amb un punt isoelèctric proper al vi, mentre que l'altre apareix amb un temps de retenció més alt i per tant presentara un punt isoelèctric més elevat. L'evolució dels diferents pics és semblant a la de les altres varietats amb una tendència a l'augment en els darrers estadis de la maduració, amb l'única excepció del pic 6 que es manté sense canvis significatius.

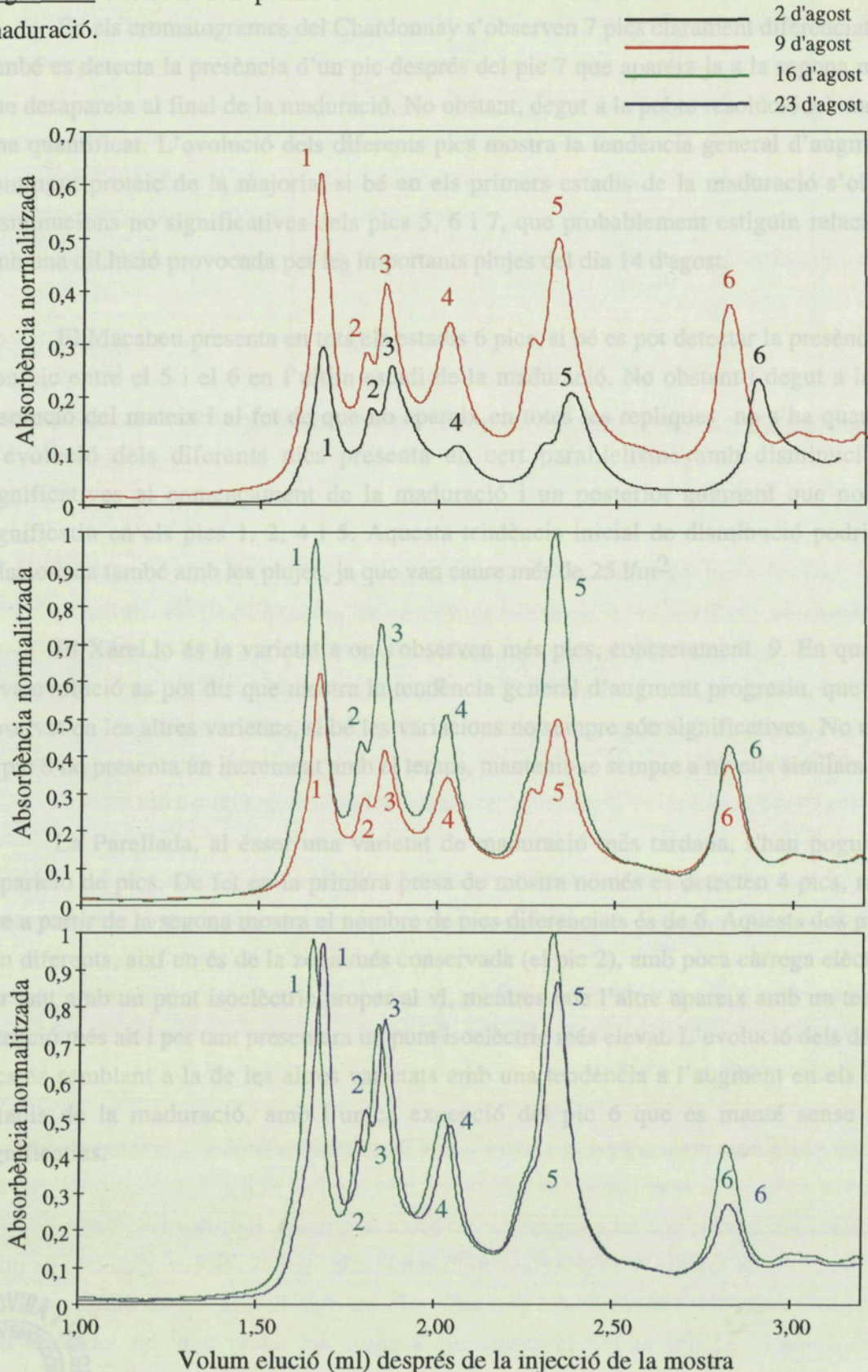






### Pinot noir

**Figura 55:** evolució dels perfils de la fracció de baixa massa molecular de Pinot noir a la maduració.



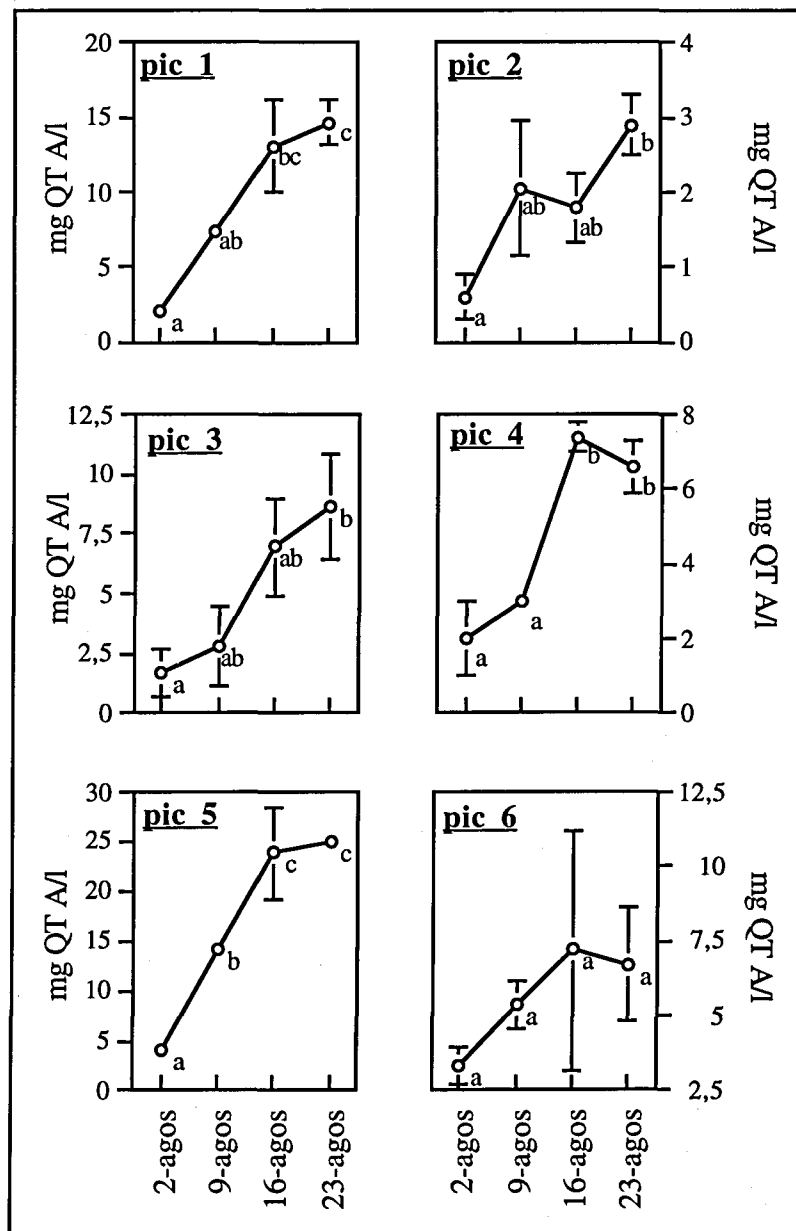
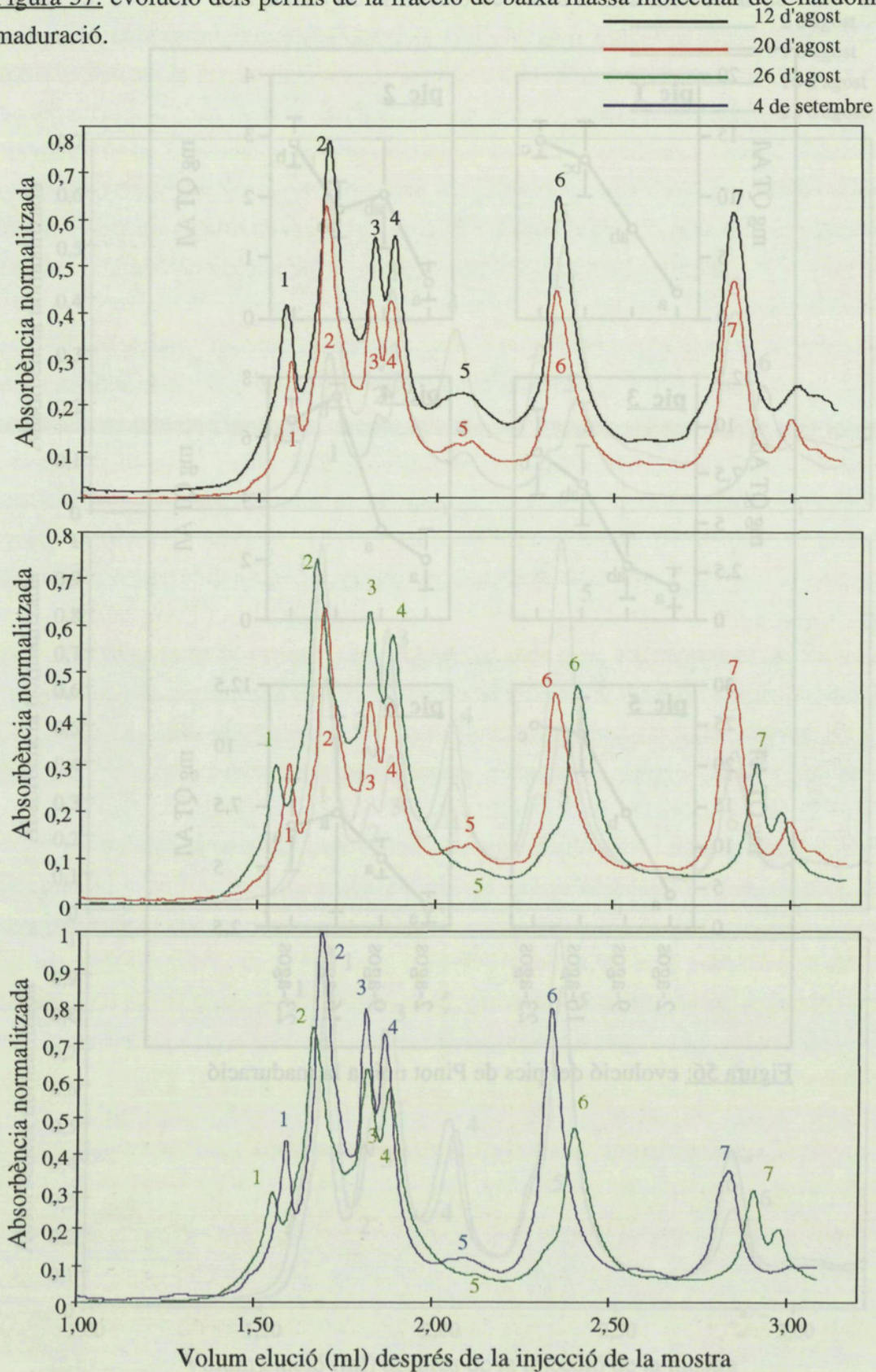


Figura 56: evolució del pics de Pinot noir a la maduració



## Chardonnay

Figura 57: evolució dels perfils de la fracció de baixa massa molecular de Chardonnay a la maduració.



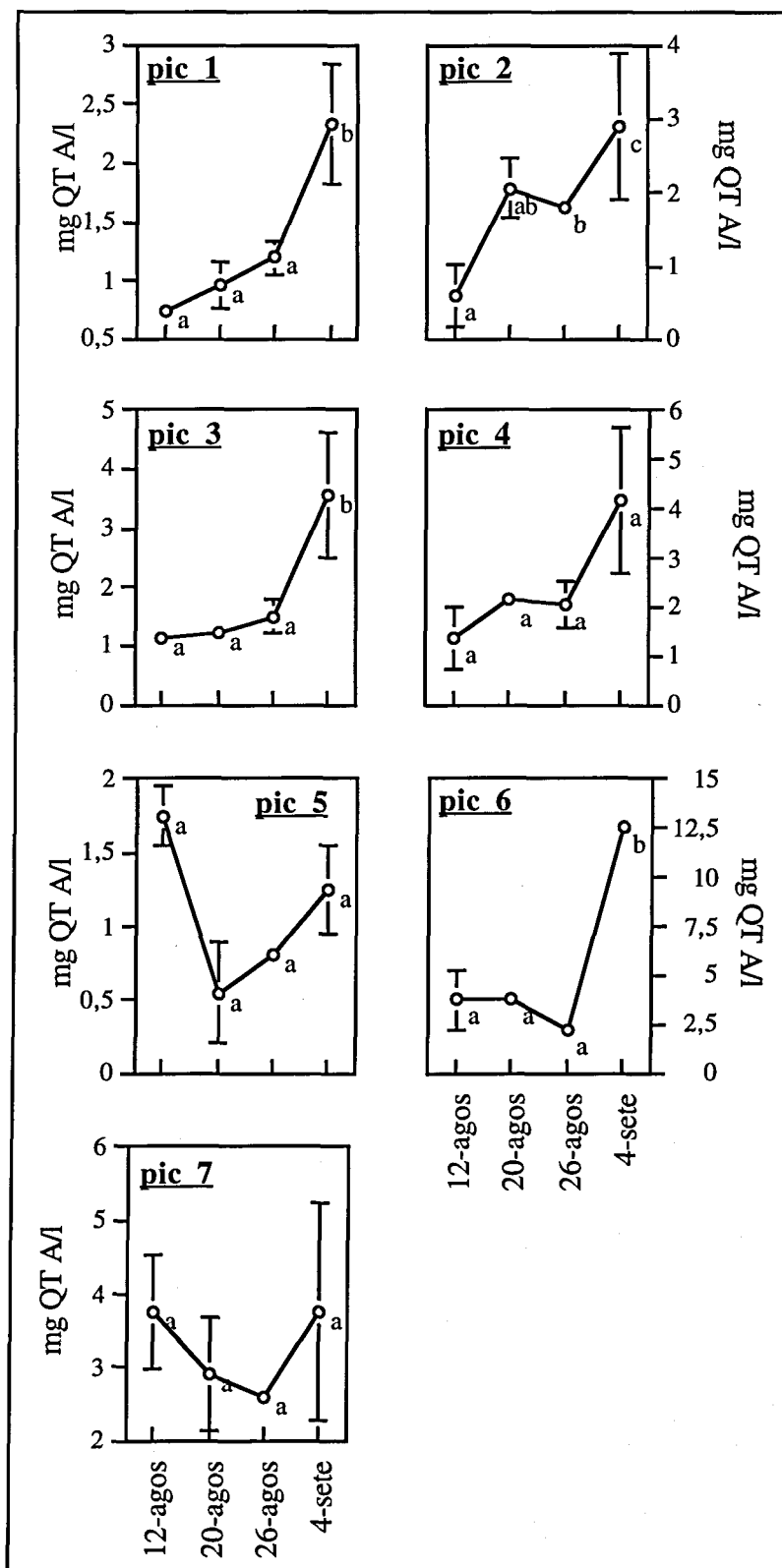
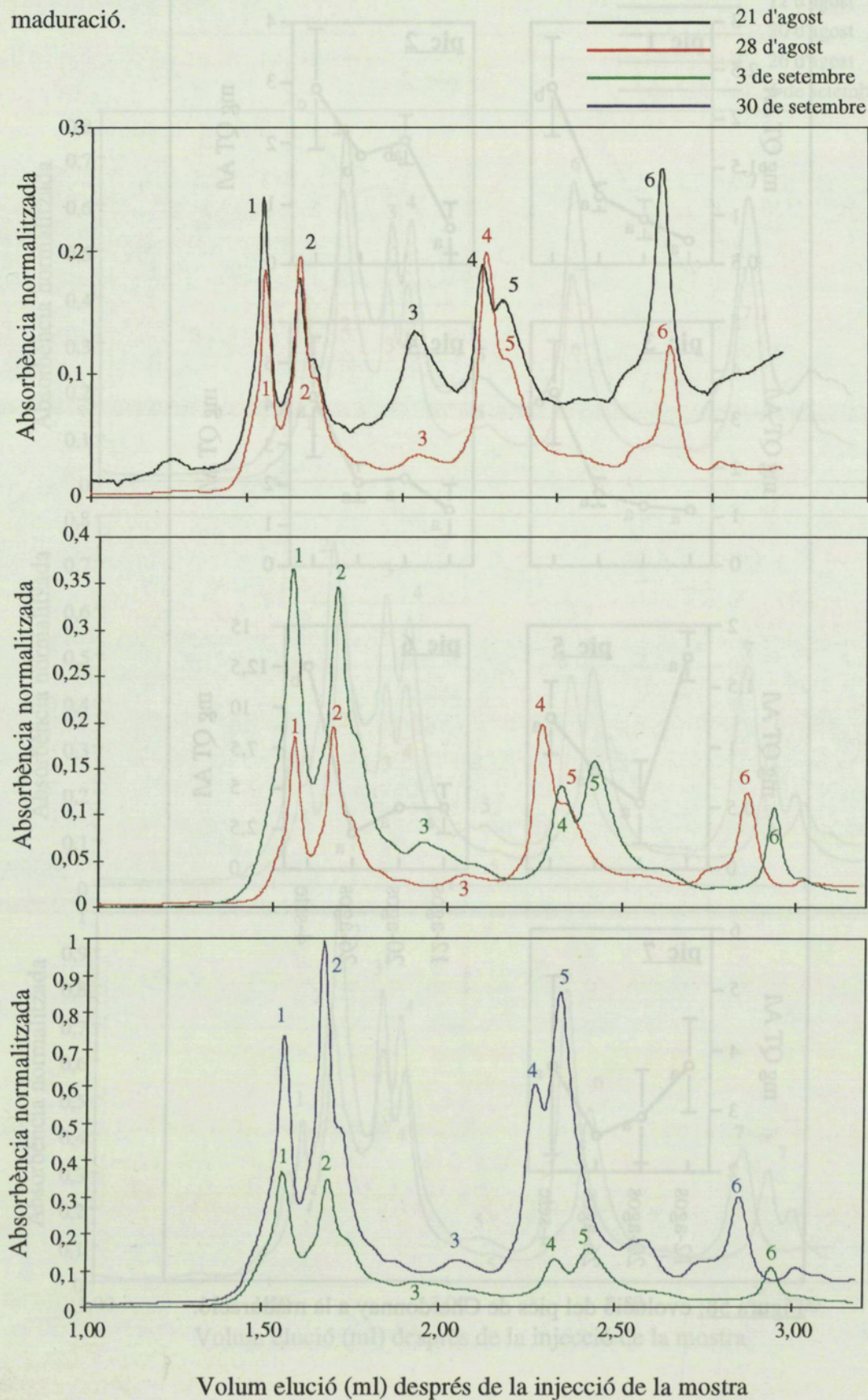


Figura 58: evolució del pics de Chardonnay a la maduració.



Macabeu.

Figura 59: evolució dels perfils de la fracció de baixa massa molecular de Macabeu a la maduració.





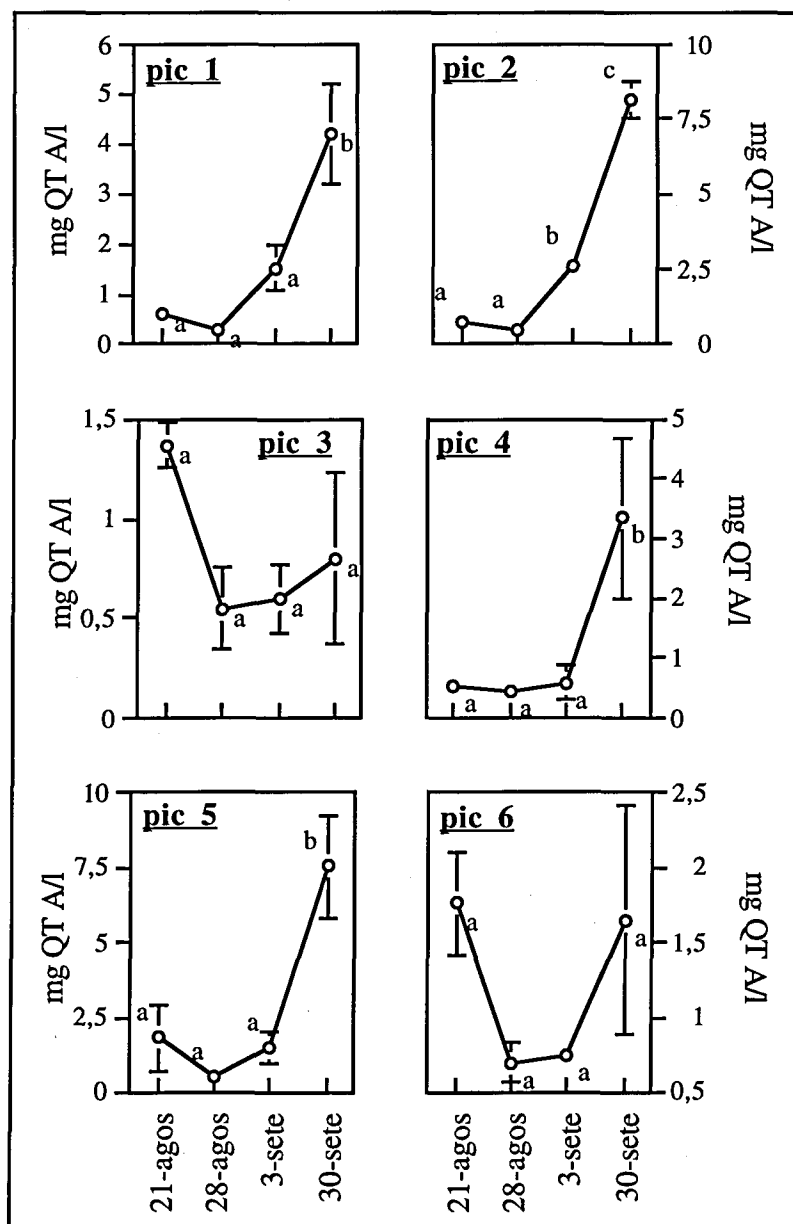
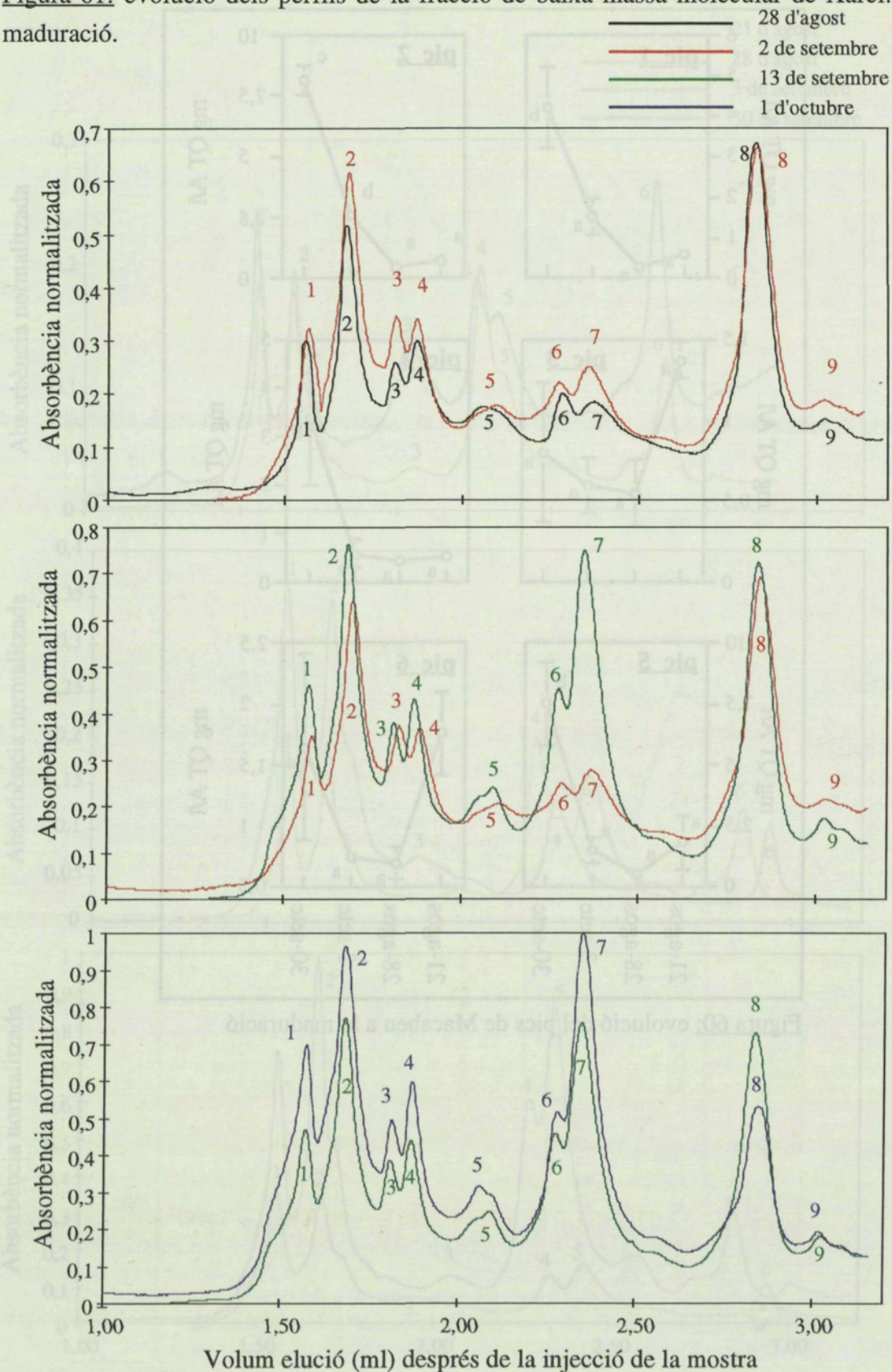


Figura 60: evolució del pics de Macabeu a la maduració

Xarel.lo.

Figura 61: evolució dels perfils de la fracció de baixa massa molecular de Xarel.lo a la maduració.



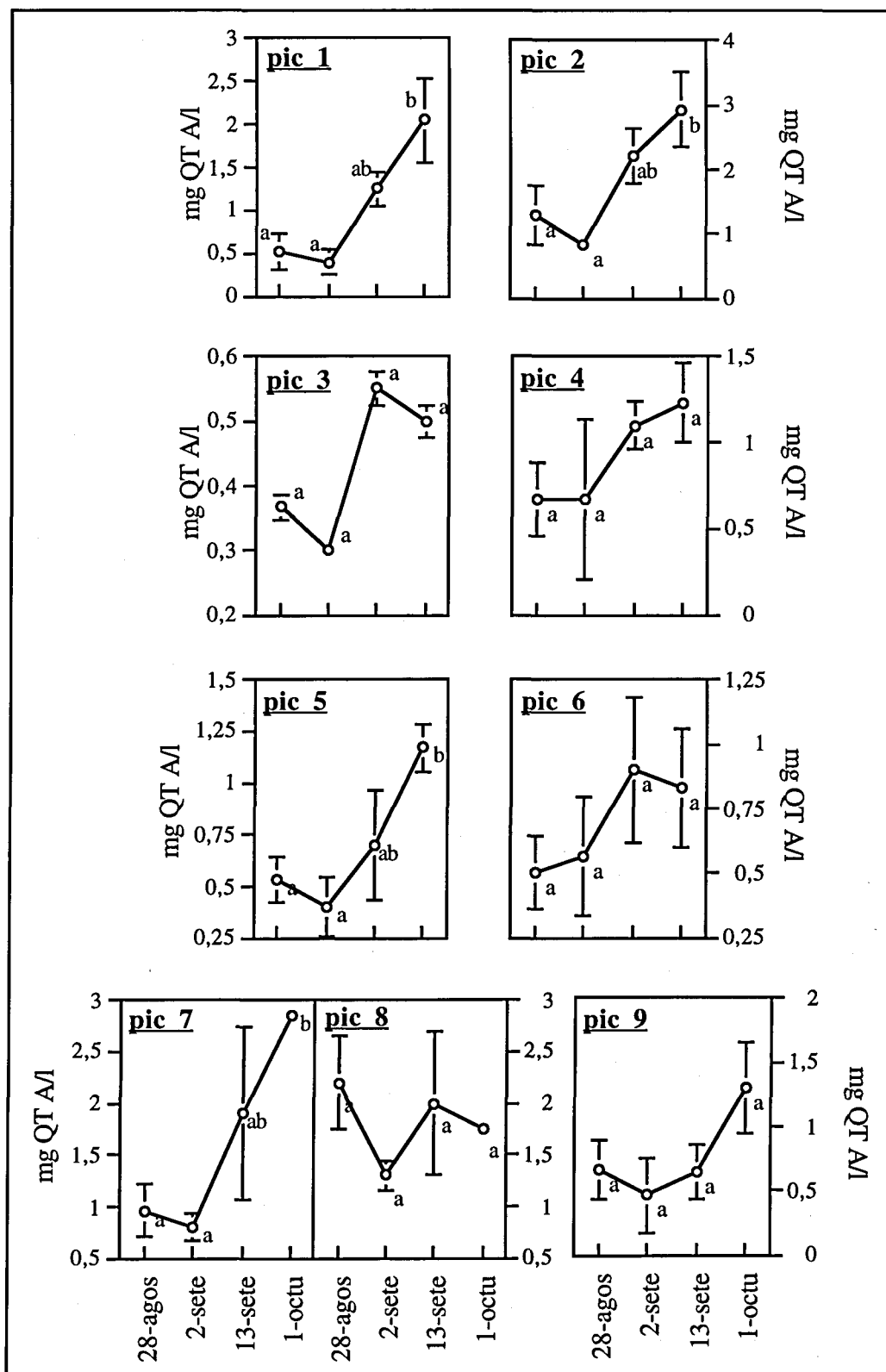
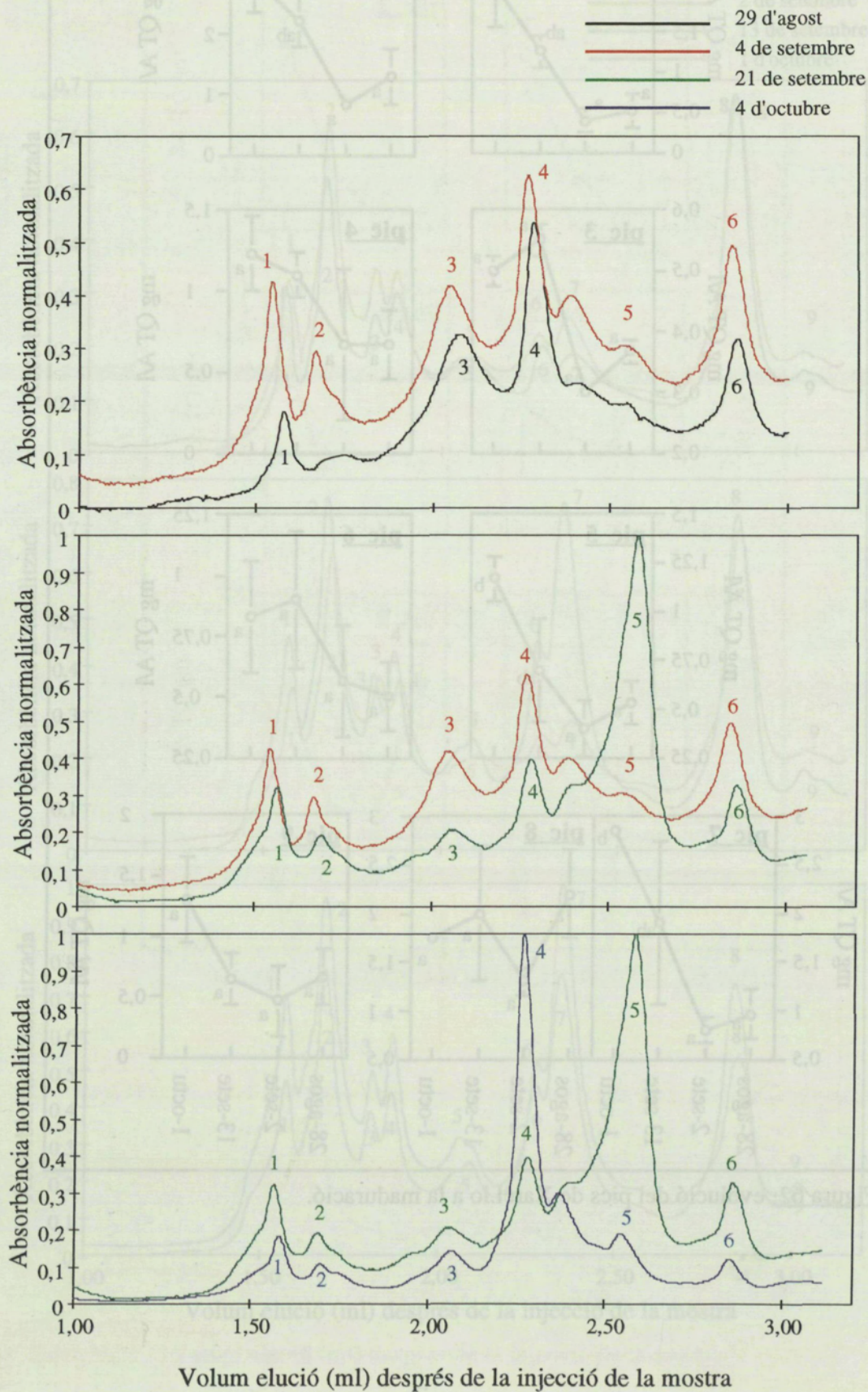


Figura 62: evolució del pics de Xarel.lo a la maduració.



Parellada.

Figura 63: evolució dels perfils de la fracció de baixa massa molecular de Parellada a la maduració.



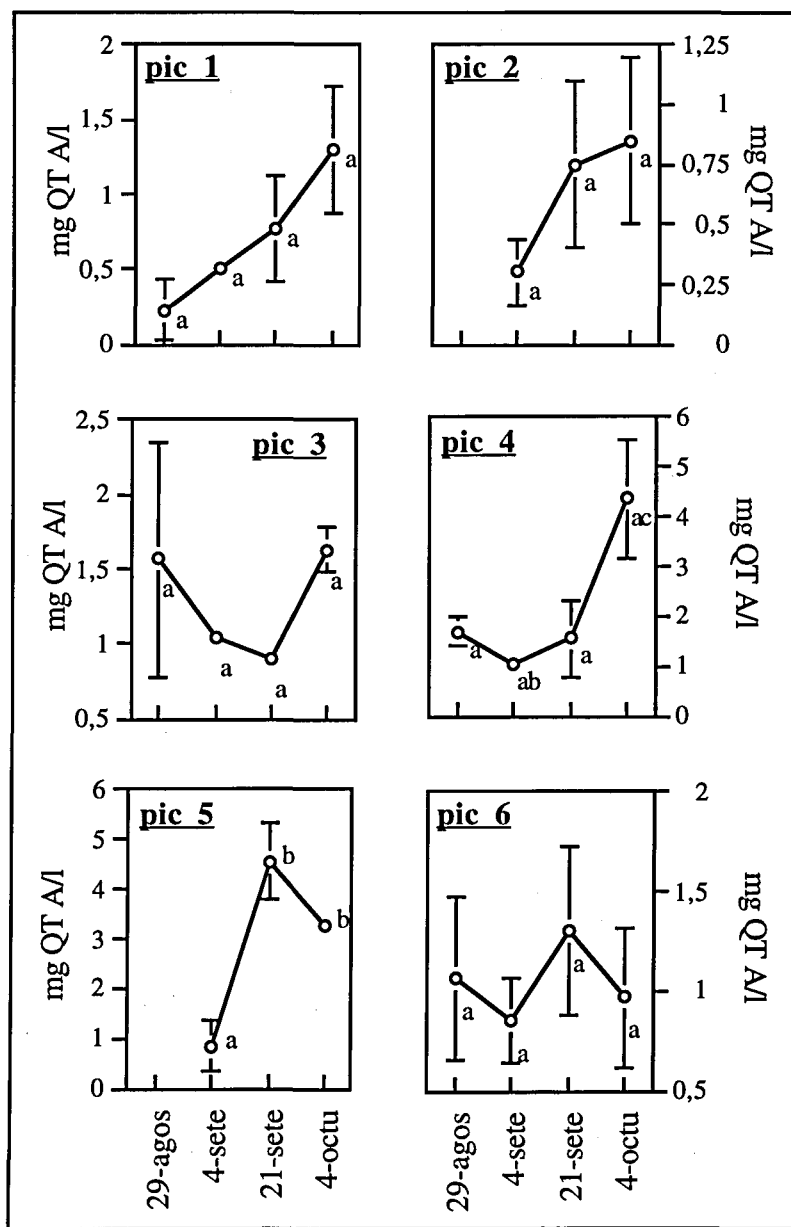


Figura 64: evolució del pics de Parellada a la maduració

#### 4.5. Conclusions del capítol 4.

1. La concentració de proteïna augmenta al llarg de la maduració en totes les varietats estudiades. Aquest augment progressiu de la concentració de proteïna presenta una correlació estadísticament significativa amb l'evolució del grau alcohòlic provable per a totes les varietats, excepte el Chardonnay.
2. Aquest augment es degut majoritàriament a les proteïnes de massa molecular al voltant de 30 kDa, mentre que la de 60 kDa es manté a nivells similars.
3. El conjunt de proteïnes d'entre 20 i 30 kDa no augmenten d'una manera uniforme sino que les de menys càrrega elèctrica augmenten significativament mentre que les de més càrrega, tot i augmentar, no ho fan de manera clara.



---

## **Resultats i discussió. Capítol 5.**

---



## **5. Identificació varietal**

La identificació de la varietat vinífera per la caracterització de les proteïnes del vi ha estat una qüestió àmpliament estudiada a la bibliografia cercada. La utilització de les proteïnes com a eina de caracterització varietal ha reeixit amb èxit a la classificació d'espècies de *Vitis* a través de l'estudi d'enzims del floema (Bachmann i Blaich, 1988) i foliars (Benin i col., 1988) per isoelectroenfocament.

Ja l'any 1959 Kock i Sajak observen diferències entre mostos de diferents varietats utilitzant com a suport la cromatografia de paper. Coincidint amb aquests autors, Radola i Richter (1972) diferencien mostos austríacs de varietats diferents per mitjà de PAGE, amb la separació de fins a 15 bandes. En varietats viníferes espanyoles Correa i col. (1988) detecten diferents bandes en diferents varietats, independentment de la maduresa de la mostra. González-Lara i col. (1988) troben perfils similars per PAGE-SDS en diferents varietats, amb la única diferència d'algunes bandes que podrien atribuir-se a la varietat vinífera. Pueyo i col. (1993) troben perfils diferents per Macabeu, Xarel.lo, Parellada i Malvar utilitzant la separació per electroforesi nadiua i PAGE-SDS, a la vegada també veuen diferències entre el most i el vi. Aquests mateixos autors no observen una caracterització per IEF.

En canvi, altres estudis tenen visions oposades de la diferenciació varietal per mitjà de les proteïnes del most o vi. Moretti i Berg (1965) van observar, en separacions fetes amb PAGE, una gran variabilitat entre l'origen, l'anyada i el nivell de maduració; aquesta variabilitat era molt més gran que la diferència entre varietats. En separacions per IEF no hi ha massa diferències en el perfil segons la varietat vinífera (Moio i Addeo, 1989). En un estudi de vins portuguesos Dorrestein i col. (1995) no aconseguen separar varietats pel perfil de masses moleculars, ja que totes tenen un perfil molt similar. Santoro (1995) arriba a les mateixes conclusions i entre varietats sols observa diferències a nivell d'intensitat d'algunes bandes.

Com es pot observar, a la bibliografia no hi ha acord per la caracterització varietal mitjançant el contingut proteic, tot i que sembla que tots els vins tenen una distribució de masses moleculars semblants. Les possibles diferències entre varietats són per l'aparició d'alguna banda o per la diferent intensitat d'algunes bandes.

perfils varietals en el primer any a la separació per bescanvi catiònic del conjunt proteïnes de baixa massa molecular, encara que no tenia perquè ésser atribuïble a la varietat vinífera.

Al comparar els perfils de separació per bescanvi catiònic de la fracció de 20-30 kDa a la maduració de l'any 96 amb els obtinguts pel most recent premsat de l'any 95 s'han observat una sèrie de semblances a les mateixes varietats viníferes en els dos anys i s'ha confirmat la diferència varietal suposada pel conjunt de cromatogrames de l'any 95. Aquestes diferències entre varietats permeten establir una certa classificació varietal, amb la precaució obligada degut al nombre reduït de mostres i el mateix origen de totes elles, tot i que la climatologia dels dos anys va ésser molt diferent.

A la figura 65 es poden veure els perfils de la fracció F3 separada per bescanvi catiònic de les cinc varietats viníferes estudiades en dos anys. Les mostres corresponen al most recent premsat en cas de la verema 95 i a la darrera mostra de maduració pel perfil de la collita 96. Tots els perfils s'han normalitzat a absorbència 1 per una millor comparació. Per l'anàlisi dels pics s'ha escollit una representació de barres de la mitjana de 3 cromatogrames, situant cada barra al volum d'elució del pic i l'alçada al percentatge d'aquest pic sobre el total de pics d'aquella fracció (figura 66).

De les dades d'aquestes figures es pot intuir una gran semblança entre els perfils dels dos anys. A la vegada es poden dividir les cinc varietats en tres famílies si considerem la distribució de pics que s'elueixen a la franja de 1,5 a 2 ml.

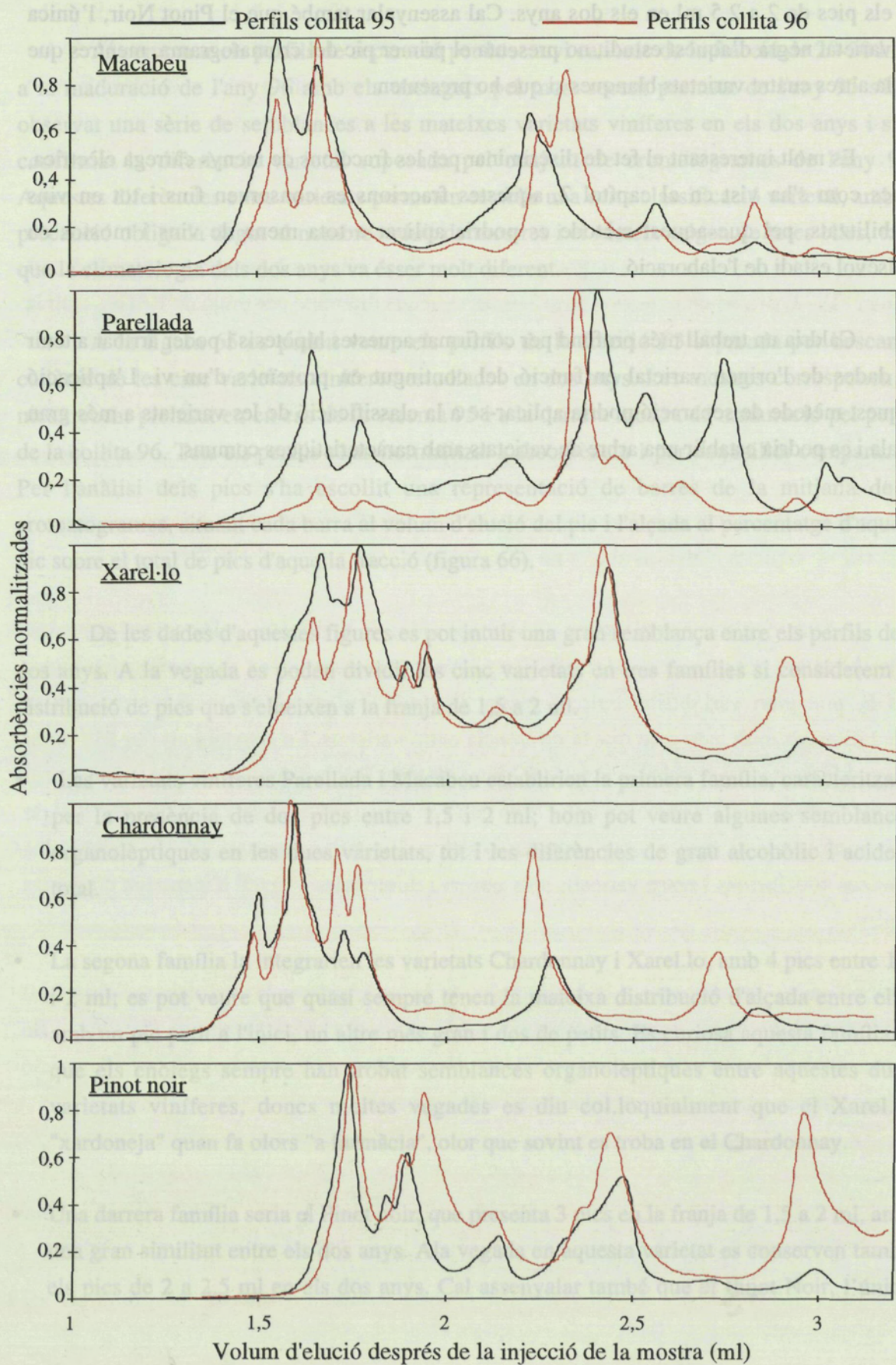
- Les varietats viníferes Parellada i Macabeu establirien la primera família, caracteritzada per la presència de dos pics entre 1,5 i 2 ml; hom pot veure algunes semblances organolèptiques en les dues varietats, tot i les diferències de grau alcohòlic i acidesa total.
- La segona família la integrarien les varietats Chardonnay i Xarel.lo, amb 4 pics entre 1,5 i 2 ml; es pot veure que quasi sempre tenen la mateixa distribució d'alçada entre ells, amb un pic petit a l'inici, un altre més gran i dos de petits. És curiosa aquesta família ja que els enòlegs sempre han trobat semblances organolèptiques entre aquestes dues varietats viníferes, doncs moltes vegades es diu col.loquialment que el Xarel.lo "xardoneja" quan fa olors "a farmàcia", olor que sovint es troba en el Chardonnay.
- Una darrera família seria el Pinot noir, que presenta 3 pics en la franja de 1,5 a 2 ml, amb una gran similitud entre els dos anys. A la vegada en aquesta varietat es conserven també els pics de 2 a 2,5 ml en els dos anys. Cal assenyalar també que el Pinot Noir, l'única

- Una darrera família seria el Pinot noir, que presenta 3 pics en la franja de 1,5 a 2 ml, amb una gran similitut entre els dos anys. Ala vegada en aquesta varietat es conserven també els pics de 2 a 2,5 ml en els dos anys. Cal assenyalar també que el Pinot Noir, l'única varietat negra d'aquest estudi, no presenta el primer pic del cromatograma, mentres que la altres quatre varietats blanques si que ho presenten.

Es molt interessant el fet de discriminar per les fraccions de menys càrrega elèctrica, doncs com s'ha vist en el capítol 2, aquestes fraccions es conserven fins i tot en vins estabilitzats, pel que aquest mètode es podria aplicar a tota mena de vins i mostos en qualsevol estadi de l'elaboració.

Caldria un treball més profund per confirmar aquestes hipòtesis i poder arribar a tenir les dades de l'origen varietal en funció del contingut en proteïnes d'un vi. L'aplicació d'aquest mètode de separació podria aplicar-se a la classificació de les varietats a més gran escala i es podria establir una arbre de varietats amb característiques comuns.

Figura 65: perfils de cada varietat en els dos anys estudiats.





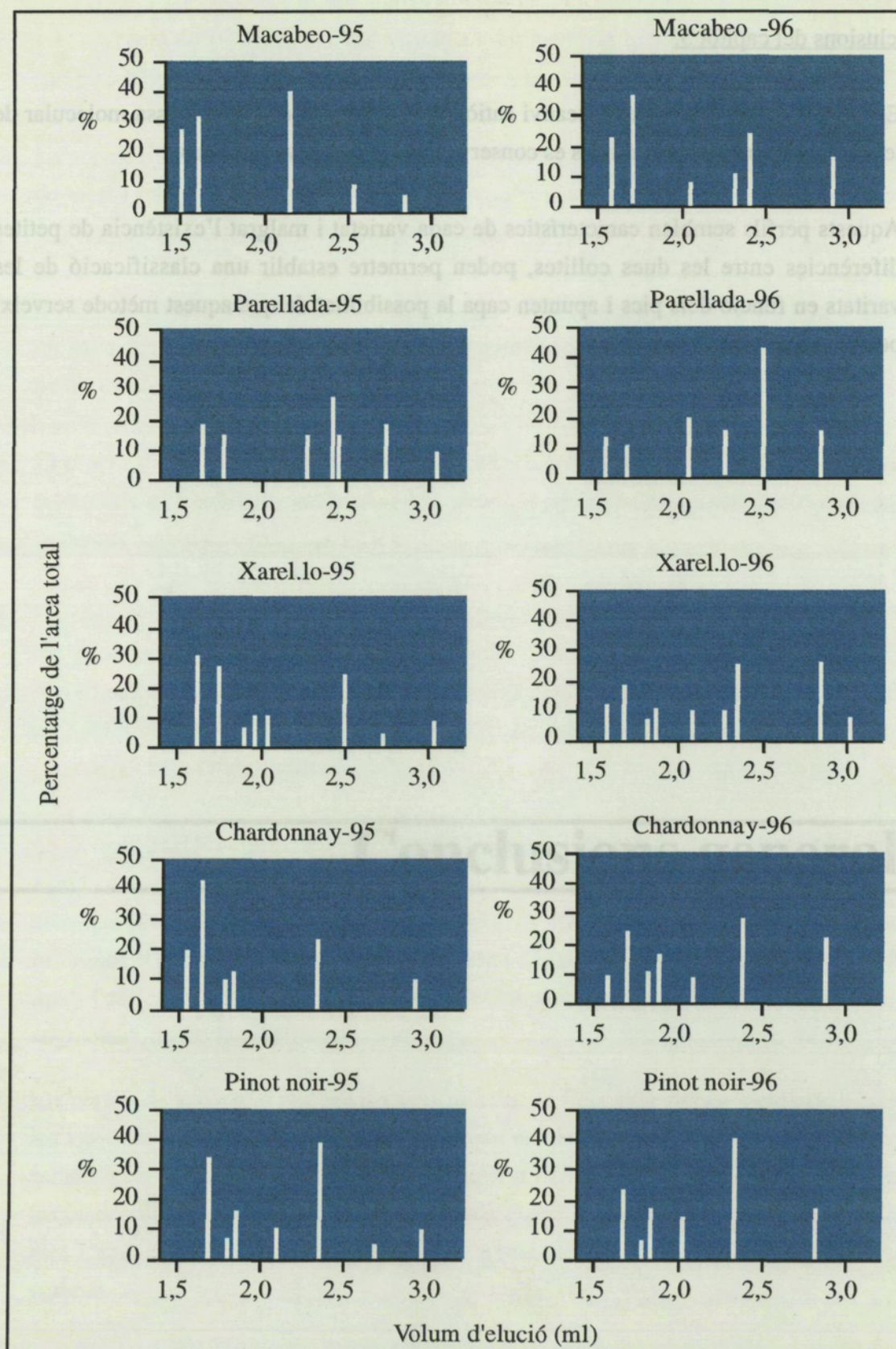


Figura 66: Representació de barres proporcionals al percentatge d'àrea per les cinc varietats pels anys 95 i 96. Les dades corresponen a la mitjana de 3 cromatogrames.

### Conclusions del capítol 5.

1. Els perfils de separació per bescanvi catiònic de la fracció de baixa massa molecular de les varietats viníferes estudiades es conserven en els dos anys estudiats.
2. Aquests perfils semblen característics de cada varietat i malgrat l'existència de petites diferències entre les dues collites, poden permetre establir una classificació de les varietats en funció dels pics i apunten cap a la possibilitat de que aquest mètode serveixi per a la identificació varietal.

---

## **Conclusions generals.**

---



1. La separació de les proteïnes del vi mitjançant exclusió molecular dona lloc a dos pics (de 60 i 30 kDa) que corresponen exactament a les bandes obtingudes per PAGE-SDS.
2. La separació per bescanvi catiònic demostra que el pic 2 és una sola proteïna de 60 kDa de massa molecular, mentre que el pic 3 és un conjunt heterogeni de proteïnes de massa molecular semblant i diferent càrrega elèctrica.
3. Aquest mètode presenta l'avantatge respecte les tècniques electroforètiques d'una més elevada precisió i repetibilitat. A més, permet recuperar la mostra fraccionada per posteriors anàlisis.
4. El procés de vinificació implica la disminució de la proteïna total i de les dues fraccions separades per exclusió molecular observant-se que disminueixen preferentment les fraccions amb més càrrega elèctrica.
5. La conservació del vi després de la fermentació alcohòlica comporta l'augment de totes les proteïnes almenys durant els cinquanta dies següents, essent més baix aquest increment en el cas dels vins conservats en barrica. La permanència del vi en contacte amb les lies (llevats) no comporta l'aparició de cap proteïna de massa molecular més gran de 15 kDa i més petita de 70 kDa.
6. La concentració de proteïna augmenta al llarg de la maduració en totes les varietats estudiades. Aquest augment es degut majoritàriament a les proteïnes de massa molecular al voltant de 30 kDa, mentre que la de 60 kDa es manté a nivells similars. El conjunt de proteïnes d'entre 20 i 30 kDa no augmenten d'una manera uniforme sino que les de menys càrrega elèctrica augmenten significativament mentre que les de més càrrega, tot i augmentar, no ho fan de manera clara
7. Els perfils de separació per bescanvi catiònic de la fracció de baixa massa molecular de les varietats viníferes estudiades es conserven en els dos anys estudiats. Aquests perfils semblen característics de cada varietat i malgrat l'existència de petites diferències entre les dues collites, poden permetre establir una classificació de les varietats en funció dels pics i apunten cap a la possibilitat de que aquest mètode serveixi per a la identificació varietal.





---

---

## **Bibliografia.**

---

---



**Acedo, M.I., Pueyo, E., Polo, M.C.** (1994). Preliminary Studies on Peptides in Wine by HPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 2, 167-172.

**Aleixandre, J.L., Velez, S.** (1992). Fenómenos Coloidales en los Vinos Blancos. *Viticultura/Enología Profesional*, 18, 1, 38-45.

**Amerine, M. A., Ough, C.S.** (1974). *Vine and must analysis*. John Wiley and Sons, Inc., New York.

**Anderson, I.W.** (1990). The effect of  $\beta$ -glucan molecular weight on the sensitivity of dye binding assay procedures for  $\beta$ -glucan estimation. *Journal of Institute of Brewing*, 96, 5, 323-326.

**Andrés-Lacueva, C., Gallart, M., Lopez-Tamames, E., Lamuela-Raventós, R.M.** (1996). Influence of variety and Aging on foaming properties of sparkling wine (Cava). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44, 12, 3826-3829.

**Anelli, G.** (1977). The proteins of musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 4, 200-203.

**Ari'izumi, K., Suzuki, Y., Kato, I., Yagi, Y., Otsuka, K., Sato, M.** (1994). Winemaking from Kosshu Variety by the sur lie Method: Change in the Content of Nitrogen Compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 3, 312-318.

**Ayestaran, B.M., Ancín, M.C., Garcia, A.M., González, A., Garrido, J.J.** (1995). Influence of pre fermentation clarification on nitrogenous contents of musts and wines, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43, 476-482.

**Bachmann, O., Blaich, R.** (1988). Isoelectric focusing of grapevine peroxidases as a tool for ampelography. *Vitis*, 27, 147-155.

**Bagot, D., Meyer, J.P., Schaeffer, A.** (1989). Relation entre le métabolisme de souches de levures et la formation de mousse. *Revue Française d'Enologie*, 117, 5-13.

**Baily, F.C., Berg, H. W.** (1967). Grape and wine proteins of white wine varieties. *Am. J. Enol. Vitic.*, 18, 18-32

**Ballou, C.E.** (1982). *The molecular Biology of the yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbour, NY, 335.

**Bamforth, C.W.** (1985). The foaming properties of beer. *Journal of Institute of Brewing*, 91, 370-383.

**Bamforth, C.W.** (1993). Recent progress in our understanding of beer foam. *Malting and Brewing Technology*, 3, 49-53.

**Barbaric, S., Mrsa, V., Ries, B., Mildner, P.** (1987). The function of carbohydrate moiety of glycoenzymes. *Period Biol.*, 89, 185-196.

**Beckman Instruments** (1991). Introduction to capillary electrophoresis. Beckman Instruments Inc, Fullerton, Califòrnia.

**Belleville, M.P., William, P., Brillouet, J.M.** (1993). A linear arabinan from a red wine. *Phytochemistry*, 33, 1, 227-229.

**Benin, M., Gasquez, J., Mahfoudi, A., Bessis, R.** (1988). Caracterisation biochimique des cepages de *Vitis vinifera* L. par electrophorese d'isoenzymes foliaires: Essai de classification des varietes. *Vitis*, 27, 157-172.

**Berthier, L., Marchal, R., Maujean, A.** (1996). Comparaison des activités pectolytiques et protéolytiques de six préparations commerciales clarifiantes. Incidence des activités enzymatiques secondaires sur les protéines de moûts champenois. *Journal International Science Vigne et vin*, 30, 2, 103-111.

**Beutler, H.-O.** (1984). *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed. Bergmeyer. 3rd ed., vol IV, 639-645.

**Bikerman, J.J.** (1938). The unit of foaminess. *Trans. Faraday Soc.*, 34, 634-638.

**Bio-Rad** (1994). *Bio-Rad Protein Assay*. Bio-Rad, Munich.

**Blade, W.H., Boulton, R.** (1988). Adsorption of Protein by bentonite in a model wine solution. *American journal of enology and viticulture*, 39, 3, 193-199.

**Bosch, M.P., Comelles, F., Castro, J.** (1989). Influència de les propietats superficials dels tensioactius d'origen natural a l'elaboració d'un vi de cava. *A.C.E. Revista d'enologia*, 4, 10-14.

**Boulton, R.** (1974). The nature of wine proteins. Proc. of the 6th Wine Ind. Tech. Seminar. Wine Institute, San Francisco, CA, 46-58.

**Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., Kunkee, R.** (1996). Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, New York.

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

**Brefort, H., Guinard, J.X., Buhlert, J.E., Lewis, M.J.** (1989). The contribution of dextrans to beer sensory properties. Part I: aftertaste. Journal of Institute of Brewing, 95, 6, 431-435.

**Brenna, O., De, Vecchi, S.** (1990). Evaluation of protein and phenolic content in must and wine. I. Assay of soluble proteins. Italian Journal of Food Science, 4, 269-273.

**Brillouet, J.M., Bosso, C., Moutounet, M.** (1990). Isolation, Purification, and Characterization of an Arabinogalactan from a Red wine. American Journal of Enology and Viticulture, 41, 1, 29-36.

**Brillouet, J.M., Saulnier, L., Moutounet, M.** (1989). Structure des Polysaccharides du Raisin et de la Levure et leur devenir dans le Procédé de Microfiltration Tangentielle du Vin. BULLETIN OIV, 699-700, 339-361.

**Brissonnet, F., Maujean, A.** (1991). Identification of Some Foam-Active Compounds in Champagne Base Wines. American Journal of Enology and Viticulture, 42, 2, 97-102.

**Brissonnet, F., Maujean, A.** (1993). Characterization of foaming proteins in a champagne base wine. American Journal of Enology and Viticulture, 44, 3, 297-301.

**Cameron, D.R., Cooper, D.G., Neufeld, R.J.** (1988). The Mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* Is an Effective Bioemulsifier. Applied and Environmental Microbiology, 54, 6, 1420-1425.

**Carey, R.** (1993). Of hooves, blood and milk in winemaking, Vineyard & Winery Management, 6, 58-59.

**Casp, A.** (1991). Utilización de productos enológicos en las operaciones prefermentarias y en la fermentación. Vitivinicultura, 2, 27-43.

**Cere, L., Percivale, F., Torazzo, A.** (1983). Determinazione di basi puriniche e pirimidiniche in fecce di vino e contenuto proteico di queste. *Rassegna Chimica*, **35**, 3, 121-125.

**Clark, D.C., Wilde, P.J.** (1994). The protection of beer foam against lipid-induced destabilization. *Journal of Institute of Brewing*, **100**, 1, 23-25.

**Clark, D.C., Wilde, P.J., Wilson, D.R.** (1991). The effect of pre-isomerised hop extract on the properties of model protein stabilized foams. *Journal of Institute of Brewing*, **97**, 3, 169-172.

**Coghlan, D.St.J., Woodrow, J., Bamforth, C.W., Hinchliffe, E.** (1992). Polypeptides with enhanced foam potential. *Journal of Institute of Brewing*, **98**, 3, 207-213.

**Cole, K.D., Cousin Jr., S.L.** (1994). Size Exclusion Chromatography of Soybean Proteins and Isoflavones. *Journal Agriculture of Food Chemistry*, **42**, 2713-2720.

**Comelles, F., Bosch, M.P., Castro, J.J.** (1991). Aspectes físico-químics relacionats amb la capacitat escumant de diferents varietats de raïm. *A.C.E. Revista d'enologia*, **4**, 7-16.

**Conterno, L., Delfini, C.** (1994). Activité proteasique et habilité des levures du vin a utiliser les proteines du mout de raisin comme seule source azotée, *Revue des Œnologues*, **73**, S, 53-54.

**Correa, I., Polo, M.C.** (1991). Las proteínas de los mostos y los vinos: Importancia tecnológica y técnicas analíticas para su estudio, *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, **31**, 3, 319-329.

**Correa, I., Polo, M.C., Amigo, L., Ramos, M.** (1988). Séparation des protéines des moûts de raisin au moyen de techniques électrophorétiques, *Conn. Vigne Vin*, **22**, 1, 1-9.

**Correa-Gorospe, I., Polo, M.C., Hernandez, T.** (1991). Characterization of the Proteic and the Phenolic Fraction in Tartaric Sediments from Wines. *Food Chemistry*, **41**, 135-146.

**Cvetkovic, A., Blagojevic, S., Hranisavljevic, J.** (1997). Effects of pathogen-related proteins from barley grain on brewers yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, **103**, 3, 183-186.



**Chaler, G.** (1991). Nuevos dispositivos de vendimia mecánica. *Viticultura/Enologia Profesional*, 13, 38-45.

**Charpentier, C., Freyssinet, M.** (1989). The mechanism of yeast autolysis in wine. *Yeast*, 5, abril, 181-186.

**Cheyrier, V., Masson, G., Rigaud, J., Moutounet, M.** (1993). Estimation of Must Oxidation During Pressing in Champagne. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 4, 393-399.

**Dale, C.J.** (1991). Applications of column chromatography to the analysis of brewing raw materials, wort and beer, *Journal of Institute of Brewing*, 97, 3, 187-195.

**Dale, C.J., Walker, S.G., Lyddiatt, A.** (1993). Dynamic changes in the composition and physical behaviour of dispensed beer foam. *Journal of Institute of Brewing*, 99, 461-466.

**Dale, C.J., Young, T.W.** (1989). Fractionation of small peptides from beer *Journal of Institute of Brewing*, 95, 1, 35-41.

**Dale, C.J., Young, T.W.** (1992a). Applications of fast protein liquid chromatography (FPLC) to the analysis of the nitrogenous constituents of beer. *Journal of Institute of Brewing*, 98, 2, 117-121.

**Dale, C.J., Young, T.W.** (1992b). Low molecular weight nitrogenous components and their influence on the stability of beer foam. *Journal of Institute of Brewing*, 98, 2, 123-127.

**Dale, C.J., Young, T.W., Brewer, S.** (1989). Amino acid analysis of beer polypeptides. *Journal of institute of Beer*, 95, 2, 89-97.

**Dawes, H., Boyes, S., Keene, J., Heatherbell, D.** (1994). Protein Instability of Wines: Influence of Protein Isoelectric Point. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 3, 319-326.

**De La, Torre, M.C., Martí, M., Gomez, J.M.** (1987). Aspectes relacionats amb els canvis de color en els caves. *A.C.E. Revista d'enologia*, 4, 30-32.

**Delcour, J.A., Verdeyen, J.P., Dondeyne, P.** (1981). The tanning of beer proteins by polyphenols. *Journal of Institute of Brewing*, 87, 391.



**Dickinson, E.** (1994). Colloidal aspects of beverages. *Food Chemistry*, 51, 343-347.

**Dizy, Soto, M.** (1993). Estudio Comparativo de vinos obtenidos por fermentación espontánea e inducida, en presencia y ausencia de anhídrido sulfuroso. Capítulo 6, Evolución de la fracción protéica. Tesis Doctoral, 171-198.

**Dorrestein, E., Ferreira, R.B., Laureano, O., Teixeira, A.R.** (1995). Electrophoretic and FPLC Analysis of Soluble Proteins in Four Portuguese Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 2, 235-242.

**Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 3, 350-356.

**Dubourdieu, D.** (1986). Les substances colloïdales dans les boissons fermentées et les jus de fruits. Les Polyaccharides Secretes par Botrytis Cinerea dans la baie de raisin. Council of Europe, 192-208.

**Dubourdieu, D., Hadjinicolaou, D., Ribereau-Gayon, P.** (1981). Les polysaccharides solubles du mout: methode simple d'appréciation, evolution au cours de la maturation, incidence sur les operations prefermentaires. *Connaissance Vigne Vin*, 15, 1, 29-40.

**Dubourdieu, D., Llauberes, R.M., Ollivier, C.** (1986). Estimation rapide des constituants macromoléculaires des mouts et des vins par chromatographie liquide haute pression (CLHP) de tamisage moléculaire. *Conn. Vigne Vin*, 20, 2, 119-123.

**Dubourdieu, D., Ribereau-Gayon, P.** (1980). Fractinnement sur échangeur anionique des colloïdes glucidiques solubles (gommes et pectines) du jus de raisin sain. *Conn. Vigne Vin*, 14, 1, 29-36.

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

**Dulau, L., Gerland, C.** (1994). La microbiologie des vins mousseux. *Revue des Œnologues*, 73, S, 55-57.

**Dumolin, E.D., Azais, B.P., Guerain, J.T.** (1987). Determination of sugar and ethanol content in aqueous products of molasses distilleries by near infrared spectrophotometry. *J. Food Science*, 52, 626-630.

**Dussaud, A., Robillard, B., Carles, B., Duteurtre, B., Vignes-Adler, M. (1994).** Exogenous Lipids and Ethanol Influences on the Foam Behavior of Sparkling Base Wines. *Journal of Food Science*, 59, 1, 148-167.

**Edens, L., Heslinga, L., klok, R., Ledebøer, A.M., Maat, J., Toonen, M.Y., Visser, C., Verrips, C.T. (1982).** Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 18, 1-12.

**Edward, M., Eschenbruch, R., Molan, P.C. (1982).** Foaming in Winemaking. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 105-109.

**Escribano-Bailón, M.T.; Gutiérrez, Y.; Rivas, J.C.; Santos-Buelga, C. (1992).** Analysis of Flavan-3-ol from *Vitis Vinifera* Variety Tempranillo Grape Seeds. *Bull. Liaison Groupe Polyphénols*, 16(II), 129-132.

**European Community (1990).** Council Regulation N°2676/90 determining the community analysis methods applicable in the wine sector. *Off. J. Eur. Comm.* L272, 1-192, October 3.

**Ferrari, G., Feuillat, M. (1988).** L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. I. Etude des composés azotés, des acides gras et analyse sensorielle des vins. *Vitis*, 27, 183-197.

**Feuillat, M. (1987).** Mise au point de la préparation d'un autolysat de levures a usage œnologique en vue d'accélérer la maturation des vins effervescents et des vins tranquilles conservés sur lies. *Office International de la vigne et du vin*, 1425/87, 1-16.

**Feuillat, M. (1994).** Origine et rôles œnologiques des colloïdes de levures, *Revue des Œnologues*, 73, S, 15-19.

**Feuillat, M., Charpentier, C. (1982).** Autolysis of yeast in Champagne. *American Journal of Enology and Viticulture*, 33, 1, 6-13.

**Feuillat, M., Charpentier, C., Picca, G., Bernard, P. (1988).** Production de Colloïdes par les Levures dans les vins mousseux élaborés selon la méthode champenoise. *Cah. scient. Rev. Fran. d'Enol.*, 36-45.

**Feuillat, M., Charpentier, C., Von, Bonn, E. (1995).** Caractérisation des protéines dans les vins blancs. Applications au cépage chardonnay. *Revue des Œnologues et des techniques vitivinicoles et œnologiques*, 78, 9-14.

- Feuillat, M., Freyssinet, M., Charpentier, C.** (1989). L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. II. Evolution des macromolécules: polysaccharides et protéines. *Vitis*, 28, 161-176.
- Fevert, J., Ballou, C.E.** (1985). *Saccharomyces cerevisiae* structural cell wall mannoprotein. *Biochemistry*, 24, 753-759.
- Fleet, G.H.** (1994). *Wine microbiology and biotechnology*. Segona Edició. Chur, Switzerland Harwood Academic.
- Galet, P.** (1985). *Precis d'Ampelographie Pratique*. 5e Ed., Pierre Galet, Montpellier.
- Garcia Barceló, J.** (1990). *Técnicas analíticas para vinos*. GAB, Moja.
- Garcia-Viguera, C., Bridle, P.** (1995). Analysis of non-coloured phenolic compounds in red wines. A comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 54, 4, 349-352.
- Gerbaud, V., Gabas, N., Laguerie, C., Blouin, J., Vidal, S., Moutounet, M., Pellerin, P.** (1996). Effect of wine polysaccharides on the nucleation of potassium hydrogen tartrate in model solutions. *Trans. I. Chem. E.*, 74, A, 782-789.
- Gerbi, V., Zeppa, G., Milanaccio, G.E., Rissone, M.** (1990). Verifica mediante analisi sensoriale dell'effetto di lieviti e chiarificanti diversi nella produzione di uno spumante classico. *Industrie delle Bevande*, 19, 12, 488-491.
- Gil, M.I., Garcia-Viguera, C., Bridle, P., Tomas-Barberan, F.A.** (1995). Analysis of phenolic compounds in Spanish red wines by capillary zone electrophoresis. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 200, 4, 278-281.
- Glories, Y.** (1976). Recherches sur la structure et les propriétés des composés phénoliques polymérisés des vins rouges. III. Fractionnement avec p.v.p. *Connaissance Vigne Vin*, 10, 1, 51-71.
- Glories, Y.** (1978). *Recherches sur la matière colorante des vins rouges*. These Doctorelle. Université de Bordeaux II.

**González-Lara, R., Polo, M.C., Correa, I., Ramos, M. (1989).** Características de las proteínas de mostos de uvas de variedades cultivadas en España. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 29, 3, 332-339.

**Gössinger, M., Schödl, H., Steidl, R., Meier, W. (1997).** Vergleich handelsüblicher Most- und weinbentonite. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 47, 1-7.

**Guilloux-Benatier, M., Feuillat, M. (1993).** Incidence de la clarification des moûts de raisin sur les fermentescibilités alcoolique et malolactique. *Journal International Sciences Vigne et Vin*, 27, 4, 299-311.

**Guilloux-Benatier, M., Guerreau, J., Feuillat, M. (1995).** Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 4, 486-492.

**Guilloux-Benatier, M., Son, H.S., Bouhier, S., Feuillat, M. (1993).** Activités enzymatiques: glycosidases et peptidases chez *Leuconostoc oenos* au cours de la croissance bactérienne. Influence des macromolécules de levures. *Vitis*, 32, 1, 51-57.

**Hagerman, A.E., Klucher, K.M. (1986).** Tannin-protein interactions. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*. pp 66-76. Alan R. liss, Inc.

**Hames, B.D., Rickwood, D. (1990).** *Gel Electrophoresis of Proteins. A practical approach.* Oxford University Press, Oxford, U.K.

**Heatherbell, D.A., Flores, J.H. (1988).** Unstable proteins in grape juice and wine and their removal by ultrafiltration. *International Cool climate Viticulture and Oenology Symposium*, Auckland, New Zealand.

**Hebert, J.P., Strobbel, B. (1972).** L'Electrofocalisation et la recherche en brasserie, 9, 351-366.

**Hey, M.J., Hilton, A.M., Bee, R.D. (1994).** The formation and growth of carbon dioxide gas bubbles from supersaturated aqueous solutions. *Food Chemistry*, 51, 349-357.

**Hsu, J.C., Heatherbell, D.A. (1987a).** Isolation and Characterization of Soluble Proteins in Grapes, Grape Juice, and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 1, 6-10.

- Hsu, J.C., Heatherbell, D.A.** (1987b). Heat-Unstable Proteins in Wine. I. Characterization and Removal by Bentonite Fining and Heat Treatment. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 1, 11-16.
- Hsu, J.C., Heatherbell, D.A., Flores, J.H., Watson, B.T.** (1987). Heat-Unstable Proteins in Grape Juice and Wine. II. Characterization and Removal by Ultrafiltration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 1, 17-22.
- Interesse, F.S., Alloggio, V., Lamparelli, F., D'Avella, G.** (1987). Protein in must estimated by size-exclusion HPLC. *Food Chem.*, 23, 65-78.
- Jackson, R.S.** (1994). *Wine science principles and applications*. Academic Press corp., San Diego, CA, USA.
- Janes, P.W., Skerritt, J.H.** (1993). High performance liquid chromatography of barley proteins: relative quantities of hordein fractions correlate with malt extract. *Journal of Institute of Brewing*, 99, 1, 77-84.
- Jespersen, L.** (1994). Use of flow cytometry for rapid estimation of intracellular events in brewing yeasts, *Journal of Institute of Brewing*, 100, 399-403.
- Kenney, B.F.** (1991). Determination of organic acids in food samples by capillary electrophoresis. *European Food & Drink Review*, summer, 21-22, 25.
- Klockow, A., Paulus, A.** (1996). Sugar analysis in fruit juices by capillary electrophoresis. *American Laboratory*, 28, 14, 28C-28D, 28F, 28H, 28I.
- Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C., Ribéreau-Gayon, P.** (1984). Inhibition of Alcoholic Fermentation of Grape Must by Fatty Acids produced by Yeasts and their Elimination by Yeast Ghosts. *Applied Environmental Microbiology*, 47, 1246-1249.
- Lagune, L., Glories, Y.** (1992). *Caracterisation des gelatines Œnologiques*, *Institute d'Œnologie Bordeaux II*, 166-169.
- Lamadon, F.** (1989). *Les substances azotees dans les vins rouges. Rapport de Diplome d'Etudes Approfondies*.
- Lamikanra, O.** (1987). The proteins of muscadine grapes. *J. Food Sci.*, 57, 483-484.



**Lamikanra, O., Inyang, I.D.** (1988). Temperature Influence on Muscadine Wine Protein Characteristics. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 2, 113-116.

**Larue, F., Geneix, C., Park, M.K., Murakami, Y., Lafon-Lafourcade, S., Riberau-Gayon, P.** (1985). Incidence de certains polysaccharides insolubles sur la fermentation alcoolique. *Conn. Vigne Vin*, 19, 1, 41-52.

**Lazzarelli, S., Bazzarini, R., Trifiro, A., Saccani, G., Gherardi, S.** (1996). Use of capillary electrophoresis for the determination of organic and inorganic anions in fruit juices. *Industrie delle Bevande*, 25, 143, 209-216.

**Ledoux, V., Dubourdiou, D.** (1992). Dosage des proteines des vins blancs par electrophorese capillaire. Etude de leur stabilite thermique et de leur comportement vis a vis la bentonite. *Institute d'œnologie Bordeaux II*, 136-139.

**Ledoux, V., Dubourdiou, D.** (1994). Stabilisation proteique des vins blancs. *Revue des Œnologues*, 73, S, 41-42.

**Ledoux, V., Dulau, L., Dubourdiou, D.** (1992a). Interpretation de l'amelioration de la stabilite proteique des vins au cours de l'elevage sur lies. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 26, 4, 239-251.

**Ledoux, V., Dulau, L., Dubourdiou, D.** (1992b). Recherche sur l'evolution de la stabilite proteique des vins blancs au cours de leur elevage sur lies. *Institute d'œnologie Bordeaux II*, 133-135.

**Leroy, M.J., Charpentier, M., Duteurtre, B., Feuillat, M., Charpentier, C.** (1990). Yeast Autolysis During Champagne Aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 1, 21-28.

**Loomis, W.D.** (1974). Overcoming Problems of Phenolics and Quinones in the Isolation of Plant Enzymes and Organelles. *Methods in enzymology.*, 528-544.

**Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Rondall, R. J.** (1951). Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

**Lubbers, S., Guerreau, J., Feuillat, M.** (1995). Étude de l'efficacité déprotéinisante de bentonites commerciales sur un moût et des vins des cépages Chardonnay et Sauvignon. *Bulletin de l'OIV*, 769-770, 224-244.

- Lubbers, S., Voilley, A., Charpentier, C., Feuillat, M.** (1993). Mise en evidence d'interactions entre les macromolecules et les aromes du vin. Influence des traitements de clarification sur la qualité aromatique du vin. *Revue Francaise d'Œnologie. Cahier Scientifique*, 144, 6, 12-18.
- Luguera, C., Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Polo, M.C.** (1997). Capillary electrophoretic analysis of wine proteins. Modifications during the Manufacture of Sparkling Wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, en premsa.
- Lurton, L.** (1988). Etude de la proteolyse des levures de vinification lors de l'elevage d'un vin sur ses lies. *Revue Française d'Œnologie*, 113ch, 35-41.
- Llauberes, R.M., Dubourdiu, D., Villettaz, J.C.** (1987). Exocellular Polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. *J. Sci. Food Agric.*, 41, 277-286.
- Main, G.L., Morris, J.R.** (1994). Color of Seyval blanc juice and wine as affected by juice fining and bentonite fining during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 4, 417-422.
- Malvy, J., Robillard, B., Duteurtre, B.** (1994). Influence des proteines sur le comportement de la mousse des vins de Champagne. *Science des Aliments*, 14, 1, 87-98.
- Marchaud, R., Bouquelet, S., Maujean, A.** (1996). Purification and partial biochemical characterization of glycoproteins in a champenois chardonnay wine. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44, 1716-1722.
- Marti, M., De La, Torre, M.C.** (1989). Determination of Molecular Weight of Polysaccharides in musts and wines by HPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 3, 221-223.
- Maujean, A.** (1989). Historie de bulles. *Revue Francaise d'Œnologie*, 120, 11-17.
- Maujean, A.** (1993). Propriétés physico-chimiques des bentonites: applications œnologiques. *Revue Francaise d'Œnologie*, 143, 43-53.
- Maujean, A., Gomerieux, T., Garnier, J.M.** (1988). Etude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents. I. Mise au point d'une technique de mesure des effervescences spontanée et provoquée des boissons mousseuses. *Bulletin de l'O.I.V.*, 61, 25-35.

**Maujean, A., Poinaut, P., Dantan, H., Brissonnet, F., Cossiez, E. (1990).** Etude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents. *Bulletin OIV*, 1990, 711-712, 405-427.

**Miller, G.C., Amon, J.M., Gibson, R.L., Simpson, R.F. (1985).** Loss of wine aroma attributable to protein stabilization with bentonite and ultrafiltration. *Australian Grapegrower & Winemaker*, 256, 46-50.

**Millies, K. (1975).** Protein stabilization wine using silica fining. *Mitteilungsblatt der Gach-Fachgruppe. Lebens Chemic.*, 29, 50-53.

**Mohan, S.B., Perry, L., Malhotra, J.M., Lyddiatt, A. (1993).** Assessment of beer foam stability by high performance liquid immunoaffinity chromatography (HPLIAC). *Journal of Institute of Brewing*, 99, 3, 231-236.

**Mohan, S.B., Smith, L., Kemp, W., Lyddiatt, A. (1992).** An immunochemical analysis of beer foam. *Journal of Institute of Brewing*, 98, 3, 187-192.

**Moine-Ledoux, V., Perrin, A., Paladin, I., Dubourdieu, D. (1997).** Premiers résultats de stabilisation tartrique des vins par addition de mannoprotéines purifiées. *Journal International Science Vigne et vin*, 31, 1, 23-31.

**Moio, L., Addeo, F. (1989).** Focalizzazione isoelettrica delle proteine dei mosti e dei vini. *Vignevini*, 26, 4, 53-57.

**Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Polo, M.C. (1996).** Peptides in Must and Wines. Changes during the Manufacture of Cavas (Sparkling Wines). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44, 12, 3783-3788.

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

**Murphey, J.M., Powers, J.R., Spayd, S.E. (1989a).** Estimation of Soluble Protein Concentration of White wines Using Coomassie Brilliant Blue G-250. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 3, 189-193.

**Murphey, J.M., Spayd, S.E., Powers, J.R.** (1989b). Effect of Grape Maturation on soluble Protein Characteristics of Gewürztraminer and White Riesling Juice and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 3, 199-207.

**Nadal, M.** (1993). Study of the ecological factors and ripening conditions of the Cabernet Sauvignon to obtain premium wines in the Priorato region (Catalonia, Spain). Doctoral thesis. Facultat de Biologia, U. Barcelona.

**Navarro, G., Zuñel, C., Méndez, C., Navarro, S.** (1988). Vinificaciones comparadas en tinto tradicional y por maceración carbónica, de vitis vinifera, variedad monastrell. IV. Pectinas. *Analytical Bromatology*, 40, 2, 369-373.

**Ollivier, Ch., Stonestreet, Th., Larue, F., Dubourdiu, D.** (1987). Incidence de la composition colloïdale des mouts blancs sur leur fermentescibilité. *Conn. Vigne Vin*, 21, 1, 59-70.

**Paetzold, M., Dulau, L., Dubourdiu, D.** (1990). Fractionnement et caractérisation des glycoprotéines dans les mûts de raisins blancs. *Conn. Vigne Vin*, 24, 1, 13-28.

**Paetzold, M., Glories, Y.** (1990). Étude de gélatines utilisées en œnologie par mesure de leur charge macromoléculaire. *Conn. Vigne Vin*, 24, 2, 79-86.

**Pellerin, P., Brillouet, J-M.** (1992). Study of red wine polysaccharides fractionated by ion exchange chromatography. *Wein-Wissenschaft*, 47, 5, 153-157.

**Pellerin, P., Waters, E.J., Brillouet, J-M., Moutounet, M.** (1994). Effet de polysaccharides sur la formation de trouble protéique dans un vin blanc. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 28, 3, 213-225.

**Peynaud, E.** (1987). *El Gusto del Vino*. Mundi-Prensa, Madrid.

**Peyron, D., Boukharta, A., Cuby, A., Feuillat, M.** (1993). Dosage des polysaccharides dans les vins rouges. Interactions avec les composés phénoliques. *Science des aliments*, 13, 761-767.

**Poinsaut, P., Hardy, G.** (1995a). Les bentonites. Caractérisation des bentonites. *Revue des Œnologues*, 75, 25-30.

**Poinsaut, P., Hardy, G. (1995b).** Les bentonites. Analyses et comportements des bentonites. *Revue des Œnologues*, 76, 17-21.

**Poinsaut, P., Hardy, G. (1995c).** Utilisation des bentonites en Œnologie. *Revue des Œnologues*, 77, 29-34.

**Polo, M.C. (1996).** Relación entre la composición química y las características de la espuma en vinos de Cava. *Curs de Tècniques Vitivinícoles, Universitat d'Estiu de la U.R.V.*

**Potty, V. H. (1969).** Determination of protein in presence of phenols. *Anal. Biochem.*, 29, 535

**Powers, J.C., Nagel, C.W., Weller, K. (1988).** Protein Removal from a Wine by Immobilized Grape Proanthocyanidins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 2, 117-120.

**Pressi, G., Curioni, A., Peruffo, A.D.B., Zamorani, A. (1993).** Effectiveness of the electroendosmotic preparative electrophoresis for the purification of all proteins and polypeptides from beer. *Journal of Institute of Brewing*, 99, 1, 63-65.

**Pueyo, E., Dizey, M., Polo, M.C. (1993).** Varietal differentiation of must and wines by means of protein fraction. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 3, 255-260.

**Pueyo, E., Martin-Alvarez, P., Polo, M.C. (1995).** Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cava (sparkling wines). *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 4, 518-524.

**Radola, B.J., Richter, O.H.K. (1972).** Physico-chemical studies on soluble grape proteins. I. Charge properties. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 2, 41-50.

**Read, S.M., Northcote, D.H. (1981).** Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.*, 116, 53-64.

**Renger, R.S., Van, Hateren, S.H., Luiben, K.Ch.A.M. (1992).** The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation, the effect of carbon dioxide pressure. *Journal of Institute of Brewing*, 98, 6, 509-513.

**Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P., Ribéreau-Gayon, P.** (1976). Sciences et techniques du vin. *Traité d'œnologie*. Tome 1- Analyse et contrôle des vins. Tome 2- Caractères des vins. Maturation du raisin. 3- Vinifications. Transformations du vin. Tome 4- Clarification et stabilisation. Matériels et Installations. Bordas, Paris.

**Ricardo-da-Silva, J.M., Cheynier, V., Souquet, J.M., Moutounet, M., Cabanis, J.C., Bourzeix, M.** (1991). Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *Journal of Science Food Agricultural*, 57, 111-125.

**Robillard, B.** (1995). Compostos implicats en l'estabilització i la desestabilització de l'escuma dels vins escumosos. *Revista de la ACE*, 4trim, 3-9.

**Robillard, B., Delpuech, E., Viaux, L., Malvy, J., Vignes-Adler, M., Duteurtre, B.** (1993). Improvements of Methods for Sparkling Base Wine Foam Measurements and Effect of Wine Filtration on Foam Behavior. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 4, 387-392.

**Rudin, A.D.** (1983). Measurement of the foam stability of beers. *Journal of Institute of Brewing*, 63, 506-509.

**Santoro, M.** (1995). Fractionation and Characterization of Must and Wine Proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 2, 250-254.

**Sato, M., Suzuki, Y., Hanamura, K., Katoh, I., Yagi, Y., Otsuka, K.** (1997). Winemaking from Koshu variety by the sur lie Method: Behavior of free amino acids and proteolytic activities in the wine. *American Journal of Enology and viticulture*, 48, 1, 1-6.

**Segarra, I., Lao, C., Lopez-Tamames, E., De la Torre, Boronat, M.C.** (1995). Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 4, 564-570.

**Semino, G.A., Restani, P., Cerletti, P.** (1985). Effect of bound carbohydrate on the action of trypsin on lupin seed glycoproteins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 33, 196-199.

**Serrano, M., Vannier, A.C., Ribereau-Gayon, P.** (1988). Clarification des vins par filtration en flux tangentiel (ultrafiltration). Incidence sur la composition chimique et les qualites organoleptiques. Evolution des produits au cours du vieillissement. *Connaissance Vigne Vin*, 22, 1, 49-71.



**SERVEI D'EXTENSIÓ AGRARIA.** (1990). El Conreu de la vinya a Catalunya. Caixa d'Estalvis de Catalunya. Servei Agrari 1, Barcelona.

**Siebert, K.J., Lynn, P.Y.** (1997). Haze-Active Protein and polyphenols in apple juice assessed by turbidimetry. *Journal of Food Science*, 62, 1, 79-84.

**Siebert, K.J., Troukhanova, N.V., Lynn, P.Y.** (1996). Nature of Polyphenol-Protein Interactions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 80-85.

**Silva, A., Fumi, M.D., Trioli, G., Petegolli, D., Ragg, E.** (1990). Evoluzione delle frazioni glicoproteiche e dei composti fosforilati del lievito durante la maturazione dello spumante in bottiglia. *Industrie delle Bevande*, 2, 10, 380-387.

**Sitters, J.H.** (1988). The use of electrophoresis in grape and wine research. *Australian Grapegrower & Winemaking*, 3, 13-14.

**Slaughter, J.C., Nomura, T.** (1992). Activity of the vacuolar proteases of yeast and the significance of the cytosolic protease inhibitors during the post-fermentation decline phase. *Journal of Institute of Brewing*, 98, 4, 335-338.

**Somers, T.C., Ziemelis, G.** (1972). Interpretations of Ultraviolet Absorption in White Wines. *Journal Science Food Agricole*, 23, 441-453.

**Somers, T.C., Ziemelis, G.** (1973). Direct Determination of Wine Proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 24, 2, 47-50.

**Somers, T.C., Ziemelis, G.** (1985). Spectral Evaluation of Total Phenolic Components in *Vitis vinifera*: Grapes and Wines. *J. Science Food Agricole*, 36, 1275-1284.

**Suami, T., Hough, L., Machinami, T., Watanabe, N., Nakamura, R.** (1997). Molecular mechanisms of sweet taste 7: The sweet protein, Thaumatin I. *Food Chemistry*, 60, 3, 277-285.

**Tedesco, G., Villa, P., Valenti, L., Sala, E., Scienza, A.** (1997). A chemotaxonomic investigation on *Vitis vinifera* L. III: Characterization of *Vitis* biotypes via root apex proteins. *Vitis*, 36, 2, 85-90.

**Tesniere, C.M., Romieu, C., Robin, J-P.** (1994). Grape in vivo Protein Synthesis: Changes in Response to Anaerobiosis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 3, 267-272.

**Toland, T.M., Fugelsang, K.C., Muller, C.J.** (1996). Method for Estimating Protein Instability in White Wines: A comparison. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47**, 1, 111-112.

**Trenerry, G.** (1995). Some applications of capillary electrophoresis to the analysis of wine. *Australian grapegrower & winemaker*, **378a**, 126-128.

**Tyson, P.J., Luis, E.S., Day, W.R., Walker, B., Lee, T.H.** (1981). Estimation of soluble protein by high performance liquid chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture*, **32**, 241-243.

**Usseglio-Tomasset, L., Di Stefano, R.** (1977). Osservazioni sui costituenti azotati dei colloidi dei mosti, dei vini e dei colloidi ceduti dal lievito al substrato fermentativo. *Riv. Vitic. Enol.*, **11**, 3-20.

**Viaux, L., Morard, C., Robillard, B., Duteurtre, B.** (1994). The impact of base Wine filtration on Champagne foam behavior, *American Journal of Enology and Viticulture*, **45**, 4, 407-409.

**Vilter, H.** (1990). Aqueous two-phase extraction of plant enzymes from sources containing large amounts of tannins and anionic mucilages. *Bioseparation*, **1**, 283-292.

**Villettaz, J.C., Weber, J., Wurtz, R., Cayrel, G.** (1987). Dégradation enzymatique du glucane de Botrytis. Incidence technologique et économique au niveau des filtrations sur terre et sur plaques. *Revue des Œnologues*, **45**, 25-30.

**Voilley, A., Lamer, C., Dubois, P., Feuillat, M.** (1990). Influence of macromolecules and treatments on the behaviour of aroma compounds in a model wine. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **38**, 248-251.

**Waters, E.J., Pellerin, P., Brillouet, J-M.** (1994a). A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydrate polymers*, **23**, 185-191.

**Waters, E.J., Pellerin, P., Brillouet, J-M.** (1994c). A wine arabinogalactan-protein that reduces heat-induced wine protein haze. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **58**, 1, 43-48.

- Waters, E.J., Peng, Z., Pocock, K.F., Jones, G.P., Clarke, P., Williams, P.J. (1994b).** Solid state  $^{13}\text{C}$  NMR investigation into insoluble deposits adhering to the inner glass surface of bottled red wine, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **42**, 1761-1766.
- Waters, E.J., Peng, Z., Pocock, K.F., Williams, P.J. (1995a).** Proteins in white wine, I: Procyanidin occurrence in soluble proteins and insoluble protein hazes and its relationship to protein instability. *Australian Journal of Grape and wine Research*, **1**, 86-93.
- Waters, E.J., Peng, Z., Pocock, K.F., Williams, P.J. (1995b).** Proteins in white wine, II: Their resistance to proteolysis is not due to their phenolic association or glycosylation. *Australian Journal of Grape and wine Research*, **1**, 94-99.
- Waters, E.J., Shirley, N.J., Williams, P.J. (1996).** Nuisance Proteins of wine Are Grape Pathogenesis-Related Proteins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **44**, 1, 3-5.
- Waters, E.J., Wallace, W., Tate, M.E., Williams, P.J. (1993).** Isolation and partial Characterisation of a Natural Haze Protective Factor from Wine. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **41**, 724-730.
- Waters, E.J., Wallace, W., Williams, P.J. (1990).** Peptidases in Winemaking. *Proceedings of the seventh Australian wine industry technical conference*, 186-191.
- Waters, E.J., Wallace, W., Williams, P.J. (1991).** Heat Haze Characteristics of Fractionated Wine Proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, **42**, 2, 123-127.
- Waters, E.J., Wallace, W., Williams, P.J. (1992).** Identification of Heat-Unstable Wine Proteins and Their Resistance Peptidases, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **40**, 1514-1519.
- Watts, D.A., Ought, C.S., Brown, W.D. (1981).** Residual amounts of proteinaceous additives in table wine. *Journal of Food Science*, **46**, 681-687.
- Weaire, D.L. (1995).** De la Burbuja a la Espuma, *Mundo Científico*, **15**, 157, 408-414.
- Weetall, H.H., Zelko, J.T., Bailey, L.F. (1984).** A new method for the stabilization of white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **35**, 4, 212-215.
- Winkler, A.J., Cook, J.A., Kliewer, W.M., Lider, L.A. (1974).** *General Viticulture*. 2nd Ed. Berkeley, CA, University of California Press.

**Yokotsuka, K., Kato, K., Kushida, T.** (1978). Microdetermination of proteins in juices and wines by trichloroacetic acid (perchloric acid)-dye method. (Chemical studies on coloring and flavoring substances in japanese grapes and wines. VIII). *J. Ferment. Technol.*, 56, 606-610.

**Yokotsuka, K., Nozuki, K., Kushida, T.** (1983). Turbidity formation caused by interaction of must proteins with wine tannins. *J. Ferment. Technol.*, 61, 413-416.

**Yokotsuka, K., Nozuki, K., Takayanagi, T.** (1994). Characterization of soluble glycoproteins in red wine, *American Journal of Enology and viticulture.*, 45, 4, 410-416.

**Yokotsuka, K., Yoshii, M., Aihara, T., Kushida, T.** (1977). Isolation and characterization of proteins from juices, must and wines from japanese grapes. (Chemical studies on coloring and flavoring substances in japanese grapes and wines. VI). *J. Ferment. Technol.*, 55, 510-515.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

aplicació de tècniques de cromatografia líquida de proteïnes (FPLC) a l'estudi de vins blancs

trànsferència de calor

transferència de calor

transferència de calor

transferència de calor

transferència de calor

transferència de calor

transferència de calor

transferència de calor

transferència de calor

transferència de calor

transferència de calor

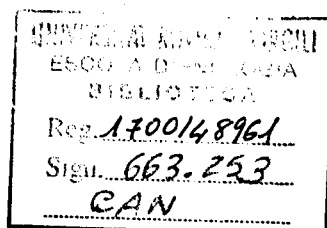
transferència de calor

transferència de calor

transferència de calor

transferència de calor

transferència de calor







UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
APLICACIÓ DE TÈCNIQUES DE CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA DE PROTEÏNES (FPLC) A L'ESTUDI DE VINS BLANCS  
Joan Miquel Canals Bosch  
DL:T-1570-2009/ISBN: 978-84-692-4529-3

