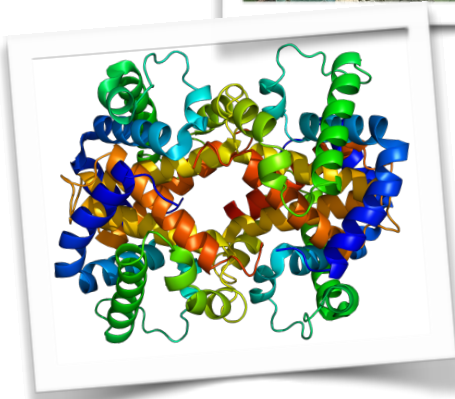


UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

PROTEINAS DE LA UVA Y EL VINO.
FUNCIONALIDAD TECNOLÓGICA Y
BIOLÓGICA



Alba García Martín

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA**



GRADO EN FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

“PROTEÍNAS DE LA UVA Y EL VINO. FUNCIONALIDAD TECNOLÓGICA Y BIOLÓGICA”

AUTORA: ALBA GARCÍA MARTÍN

TUTORA: M^a LUISA ESCUDERO GILETE

ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA.

**DPTO. NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA
LEGAL.**

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

SEVILLA, SEPTIEMBRE 2018

❖ RESUMEN:

El presente trabajo consiste en una revisión bibliográfica sobre la composición protéica de la uva y el vino, relacionándola a su vez con la funcionalidad tecnológica y biológica de éstas. Las proteínas que se identifican en la baya de uva son las llamadas Proteínas Relacionadas con la Patogénesis (PR), una familia de proteínas presentes en diversas frutas y vegetales. En la uva se ubican en el hollejo y en la pulpa, siendo mayoritario su contenido en la pulpa debido a la relación de peso. Dentro de esa familia se encuentran las quitinasas (familia PR-3) y proteínas similares a la taumatina (familia PR-5). Dichas proteínas protegen a la vid frente ataques fúngicos como el mildiu, por su capacidad de hidrólisis, sin embargo causan problemas en la industria enológica por su capacidad de fluocular dando lugar a grandes repercusiones económicas. En el vino hay péptidos procedentes tanto de la uva como de la lisis de las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) después de la fermentación, dichos péptidos parecen tener propiedades biológicas beneficiosas tales como: efecto hipotensor por la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina: IECA, y efecto antioxidante . De diferentes tipos de vino, el efecto IECA fue mayor en vinos tintos debido a los péptidos hidrófobos. Respecto al efecto antioxidante es mayor en vinos que se hayan sometido a fermentación maloláctica.

En cuanto a la funcionalidad tecnológica de las proteínas, determinados aminoácidos influyen positivamente en los vinos espumosos ya que contribuyen a la estabilidad de la espuma y aumentan su tiempo de desvanecimiento. Además, existen estudios más recientes en los que se está ensayando la utilización de extractos proteicos derivados de la semilla de uva en la clarificación de vinos para evitar problemas de alérgenos y conseguir mejorar la astringencia y el afinado del vino.

Palabras claves: Proteínas de la uva, GSE, IECA, péptidos del vino.

❖ ÍNDICE:

- Introducción
- Objetivos
- Metodología
- Resultados:
 - 1. La vid, la uva y el vino.
 - 2. Proteínas de la uva y del vino.
 - 3. Funcionalidad Biológica de las proteínas:
 - 3.1. Capacidad antifúngica de las proteínas PR
 - 3.2. Actividad antihipertensiva
 - 3.3. Actividad antioxidante y secuestradora de radicales libres
 - 4. Funcionalidad Tecnológica:
 - 4.1. Formación de espuma en el vino
 - 4.2. Turbidez en el vino
 - 4.3. Nuevo agente clarificante: GSE
 - 4.4. Papel adicional de GSE como reductor de la astringencia
- Conclusión
- Bibliografía

❖ INTRODUCCIÓN:

Hay una gran amplitud de artículos e información sobre la composición de la uva y la importancia de algunos de sus componentes como los fenoles. Sin embargo, este no es el caso de las proteínas de la uva, que dado su escaso porcentaje en la composición y su casi nula importancia nutricional no se han tenido en cuenta a lo largo de los años.

La extracción e identificación de las proteínas presentes en la uva es un proceso bastante laborioso y complejo, gracias a los grandes avances habidos en la ciencia y la tecnología, se ha podido conocer e identificar las proteínas a través de técnicas cromatográficas.

Empezó a conocerse la importancia de las proteínas de la uva debido a los problemas causados en la industria enológica por los precipitados aparecidos en el vino blanco almacenado que suponían una disminución de las ventas y la utilización, para evitarlo, de agentes clarificantes que o bien reducían las propiedades organolépticas del vino o introducían al vino potencial alergénico. Debido por tanto al incremento de las alergias e intolerancias que hay en los últimos tiempos se han intentado buscar alternativas para eliminar dichos precipitados y a la vez poder mejorar alguna característica del vino, este es el caso de la utilización de agentes clarificantes proteicos derivados de la propia uva (semilla).

Por otra parte en estudios del campo de la biología se descubrió que el vino disminuía la presión arterial en ratas con hipertensión. En un primer momento no se podía atribuir dicho efecto hipotensor con las proteínas del vino ya que se creía que era por el conjunto de componentes existente en el vino. Sin embargo, hoy día, a través de la separación de los elementos que constituyen el vino se han realizado estudios con fracciones proteicas específicas y se ha visto su efecto hipotensor además del efecto antioxidante que también posee.

❖ OBJETIVOS:

La composición de la uva y del vino es bastante compleja y variable, siendo poco conocido el contenido proteico y su papel biológico y funcional en la uva y en el proceso de vinificación, ya que se encuentra en cantidades minoritarias. Por ello el objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica y dar a conocer a través de las proteínas que se pueden encontrar en la baya de uva, su funcionalidad tecnológica y los problemas que presentan, así como su capacidad antihipertensiva, antioxidante y antifúngica de su funcionalidad biológica.

❖ METODOLOGÍA:

La estrategia de búsqueda para este trabajo ha consistido, tanto en la búsqueda de artículos y de revisiones bibliográficas en bases de datos fiables, como en la búsqueda de libros sobre conceptos básicos de enología.

En un primer momento para obtener una información general sobre el tema del que iba a tratar el trabajo busqué en bases de datos tales como Science Direct o Pubmed artículos sobre proteínas de la uva y el vino con palabras claves generales tales como “Grape peptides”, “Wine proteins”, “Biological properties grape” .

Para la información general sobre la composición de la uva y del vino busqué en las bibliotecas universitarias de Sevilla y Cádiz tratados de enología donde se recogen con detalles la composición de uva y el proceso de vinificación.

Una vez tenida ya una visión general del trabajo, para profundizar en ciertos aspectos como la funcionalidad biológica y tecnológica, utilicé las palabras claves: “IECA wine” , “GSE” , “PR-proteins”, además de buscar en las bases de datos artículos y estudios de autores concretos como Alcaide-Hidalgo, Gazzola o Vincenzi.

Principalmente se han utilizado fuentes como revisiones bibliográficas y libros, sobre todo para las partes más generales. Para temas más concretos he consultado trabajos científicos.

❖ RESULTADOS:

1. La vid, la uva y el vino:

La vid, desde el punto de vista de la botánica, pertenece a la familia de las *Vitáceas (Vitaceae)*, lianas o arbustos de tallo herbáceo, sarmentoso o tuberoso, con sarcillos opuestos a las hojas. Dentro de esta familia la vid pertenece al género *Vitis L.*, que comprende dos subgéneros: *euvitis* y *muscadina*, y más de 60 especies. De todos los grupos y especies, la especie *V. vinífera L.* se conoce como la vid europea y agrupa a la mayoría de variedades cultivadas, ya que presenta las mejores cualidades para la producción de vino (López, 2017).

La vid produce frutos de tipo baya organizados en racimos, a cada baya la denominamos **uva**. En la estructura de la uva se pueden diferenciar claramente dos partes las semillas y el pericarpo. En este último se pueden distinguir tres tipos de tejidos organizados al rededor de las semillas: el endocarpo que es el tejido más interno, el mesocarpo intermedio y que ocupa el mayor contenido de la baya, el exocarpo más externo que contiene la epidermis. Comúnmente al exocarpo se le conoce como hollejo y el mesocarpo junto con el endocarpo forman lo que se denomina pulpa de la baya (figura 1) .

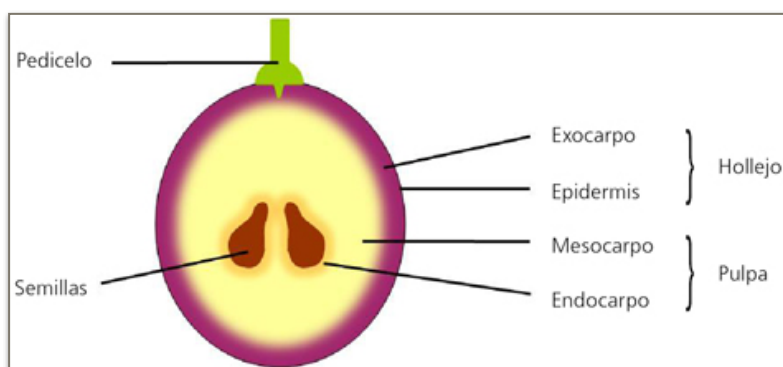


Figura 1: Partes de la baya de uva *V. vinifera L* (Carbonel, Martínez, 2013).

El grano de uva pesa entre 1 y 2 gramos, aunque varía mucho según la variedad y puede llegar hasta 4 gramos. Porcentualmente lo que más pesa es la pulpa (80-90%), el hollejo (6-10%) y por último las semillas (1-6%) (Hidalgo, 2003).

El hollejo se encuentra recubierto de una capa cerosa llamada pruina formada fundamentalmente por ácido oleanólico, alcoholes de cadena larga, ésteres, ácidos grasos y aldehídos, que le confieren a la uva un aspecto mate. En capas más internas destacan los compuestos fenólicos que se dividen en flavonoides y no flavonoides. Dentro de los compuestos fenólicos flavonoides encontramos: los antocianos, que son los pigmentos responsables del color de la uva tinta; los flavanoles o catequinas que confieren sabor amargo y astringencia; y también los taninos o protoantocianidinas con efectos sensoriales similares a las catequinas. Entre los compuestos fenólicos no flavonoides merece la pena citar los estilbenos como el resveratrol, gran antioxidante; y compuestos terpénicos responsables de los aromas característicos de cada variedad de uva (aromas varietales) (Carbonel, Martínez, 2013).

Tabla 1: Porcentaje composición de la pulpa de uva madura.

Componente Principal	H ₂ O	Azúcar	Ácidos Orgánicos	Sales Minerales	Compuestos Nitrogenados
	78-85%	12-25%	6-15%	2-4%	0,5-1%
Componente Secundario		Glucosa y Fructosa 50%	Tartárico 50-70% Málico 15- 50%	K ₂ O 500-700 mg/g	N Amonical (mín 0,3 g/L)
Componentes Residuales		Sacarosa Galactosa Arabinosa	Cítrico	CaO MgO SO ₃	N Amínico Péptidos y Proteínas

La pulpa está formada principalmente por agua y azúcares (tabla 1) y su contenido varía mucho según el grado de maduración en el que se encuentre la baya (Oreglia, 1978).

Los azúcares principales de la pulpa son glucosa y fructosa en un 50%, aunque también se encuentran en menor proporción otros como la sacarosa, galactosa o arabinosa pero en una menor proporción.

Los ácidos orgánicos mayoritarios en la pulpa de uva son el tartárico (50-70%) y el málico (15-50%), y en menor proporción el ácido cítrico. El ácido málico, responsable de la acidez, va disminuyendo durante la maduración de la uva, al contrario que pasa con el ácido tartárico que aumenta. De ahí el resultado de que en uva madura el porcentaje de ácido tartárico sea mayor que el porcentaje de ácido málico.

La pulpa contiene también ciertas cantidades de compuestos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos y sus derivados.

También se pueden encontrar en la pulpa vitaminas como vitamina C (ácido ascórbico) y algunas del grupo B (B1, B6, B12).

Las semillas o pepitas generalmente están en número par y compuestas por: 25-45% de agua, 30-40% glúcidos (almidón), 10-20% aceites (ácido palmítico, éster metílico del ácido linoleico, ácido linoleico, ácido oleico, éster etílico del ácido linoleico, ácido esteárico, etc.), 5-10% de taninos y polifenoles (principalmente catequinas), 4-7% sustancias nitrogenadas (proteínas), 2-4% sustancias minerales y otros compuestos en proporción menor de un 1 % como aldehídos y ácidos volátiles (Hidalgo, 2003) .

Los diferentes tejidos que conforman la baya de uva aportan distintos componentes al mosto y al vino dependiendo de factores como la variedad de la uva , el clima, o características del suelo.

Se considera mosto al zumo o jugo de la uva obtenido por presión que no ha iniciado el proceso de fermentación.

El **vino**, del latín *vinum*, es una bebida alcohólica obtenida a partir del mosto de uva por un proceso de fermentación llevada a cabo por las levaduras.

El proceso de vinificación es el paso de mosto a vino y consta de una serie de etapas: la primera etapa es la recepción de la uva a la bodega, despallado de los racimos para eliminar los raspones y, a continuación, la

prensa de la baya para la obtención del mosto. En la segunda etapa, el mosto obtenido con los hollejos y pepitas se encuba (en el caso de vinos tintos para la obtención del color) y se produce la fermentación alcohólica. En la fermentación alcohólica el azúcar del mosto se transforma en alcohol y gas carbónico mediante la acción de levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, poco abundante en la uva pero prácticamente la única especie fermentativa.

Una vez finalizada la fermentación alcohólica se produce el descube que es la separación del vino obtenido de los restos sólidos (hollejos, semillas, peciolas), y si se desea se procede a una tercera etapa, la fermentación maloláctica. En este caso, esta segunda fermentación no es llevada a cabo por levaduras, si no por bacterias malolácticas que transforman el ácido málico en ácido láctico, produciendo estabilización y reducción de la acidez , haciendo al vino más suave en boca. (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

Una vez terminadas las fermentaciones tiene lugar el trasiego del vino (traslado del vino de un recipiente a otro, separando el líquido de sus depósitos), y opcionalmente a la clarificación y/o filtración. Por último se embotella o pasa al sistema de crianza.

Respecto a la composición del vino podemos decir que es muy compleja y variable ya que influyen diversos parámetros como la variedad de uva utilizada, el estado de maduración de ésta en el momento de la vendimia, el proceso de vinificación, períodos de crianza, etc.

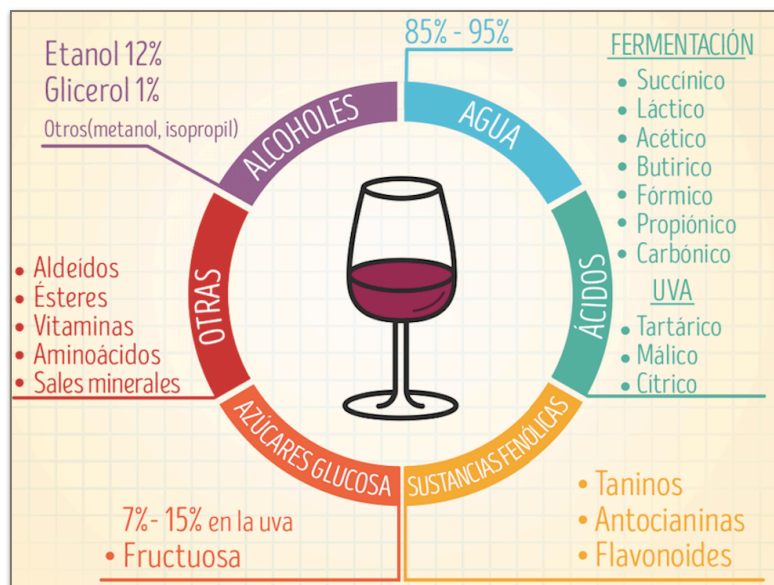


Figura 2: Composición química del vino (Blouin , Peynaud, 2003).

Tal como muestra la figura 2 los componentes mayoritarios del vino son el agua, el etanol producido por la fermentación de los azúcares de la uva, ácidos provenientes de la fermentación como el acético, succínico y láctico, y originarios de la uva como el málico que disminuye y el ácido tartárico que aumenta. Encontramos también compuestos fenólicos como taninos, antocianinas y flavonoides, grandes responsables de las características organolépticas, que provienen tanto de la uva como de las fermentaciones; al igual que otras sustancias tales como aldehídos, ésteres y aminoácidos.

2. Proteínas de la uva y del vino

Las proteínas son macromoléculas formadas por la unión de cadenas lineales de aminoácidos. La unión de varios aminoácidos dan lugar a péptidos y la unión de dichos péptidos en cadenas da lugar a proteínas .

En la uva como en el vino se pueden encontrar tanto aminoácidos libres como proteínas, ambos en baja concentración por lo que su extracción e identificación es un proceso laborioso y complicado. Sin embargo, gracias a los avances en las técnicas analíticas, y en especial a la utilización de la cromatografía líquida se han podido separar de otros componentes del vino e

identificar los aminoácidos y proteínas que se encuentran mayoritariamente (Vincenzi et al., 2005).

Los aminoácidos que se identifican en el vino tienen distintos orígenes, algunos están presentes en la uva y son metabolizados total o parcialmente por las levaduras durante la fermentación, otros son excretados por las levaduras en la fase final de la fermentación o liberados en la autólisis de estas, y los restantes son producidos por degradación enzimática de las proteínas presentes en la uva (Rapp y Versini; 1995).

La importancia de estos aminoácidos libres (arginina, prolina, alanina, ácido glutámico, treonina, serina y ácido gammaaminobutírico o GABA) que encontramos en la uva reside en que son la fuente de nitrógeno para las levaduras durante la fermentación y por consiguiente precursores de los compuestos aromáticos que se forman durante ésta (aldehídos, ésteres, etc.), teniendo un considerable impacto en las características organolépticas del vino (Callejón et al., 2010).

Respecto a las proteínas, tal como indican Ferreira et al. (2002) y otros autores, su mayor importancia reside en la inestabilidad que producen en el vino blanco, ya que la desnaturalización de estas proteínas (resultado de un almacenamiento desfavorable) da lugar a sedimentos amorfos o floculados disminuyendo así su valor comercial y haciendo a la botella inaceptable para su compra.

El perfil de proteínas solubles encontradas en el vino y zumo de la uva con frecuencia se presenta sorprendentemente simple, con predominancia de proteínas de bajo peso molecular. Un simple análisis electroforético sugiere que la totalidad de proteínas presentes en el vino está compuesta por solo unos pocos polipéptidos.

Los experimentos inmunológicos y las secuencias N-terminal del estudio realizado por Ferreira et al. (2002) revelan que esos polipéptidos están estructuralmente relacionados, derivan de unos pocos precursores sintéticos durante la formación de la uva. Dichos precursores han podido sufrir una

proteólisis durante la maduración del fruto y la vinificación, dando lugar a la variedad de péptidos presentes en el vino.

Las proteínas más abundantes que se extraen de la baya de uva son las Proteínas Relacionadas con la Patogénesis (PR), estas son Las proteínas similares a la taumatina (TLP) y las quitinasas. Sin embargo su distribución en diferentes tejidos de uva no estaba bien documentada, ya que hasta el estudio de Tian et al. (2015) solo se conocía que su síntesis ocurría principalmente en el hollejo y era regulada de forma específica en los tejidos en desarrollo (Hung, 2010).

En el estudio de Tian et al. (2015) las proteínas se extrajeron de la piel, pulpa y semillas de uvas Sauvignon Blanc, seguidamente se produjo la digestión con tripsina y por último el análisis por cromatografía líquida-ionización. Las proteínas identificadas incluyeron 75 proteínas de la piel, 63 de la pulpa y 35 de las semillas de la uva, clasificadas funcionalmente como asociadas con el metabolismo y la energía.

Algunas estaban presentes exclusivamente en tejidos específicos de las uvas, por ejemplo: las proteínas involucradas en la fotosíntesis solo se detectaron en la piel de la uva como la proteína de unión a la clorofila, y las proteínas encontradas en la fermentación alcohólica (alcohol deshidrogenasa y la piruvato descarboxilasa) solo se detectaron en la pulpa de la uva.

Las proteínas relacionadas con la patogénesis son típicamente ácidas, de bajo peso molecular, altamente resistentes a la degradación proteolítica y a bajos valores de pH, por ello son capaces de resistir a los procesos fermentativos y se encuentran también en el vino. Las dos proteínas solubles predominantes acumuladas en las uvas durante la maduración son las quitinasas (familia PR-3) y proteínas similares a la taumatina (familia PR-5) (Robinson et al., 2000). Gracias a los avances en la secuenciación del genoma de la vid se han logrado identificar otros miembros de la familia de las proteínas PR como osmotinas (familia PR-5), β -1,3-glucanasas (familia PR-2) y las proteínas PR-10 (Okuda et al., 2006).

Según los resultados obtenidos en el estudio de Tian et al. (2015), en *Vitis vinífera*, las proteínas similares a taumatina (TLP), y las quitinasas se identificaron tanto en la piel como en la pulpa de la uva, pero no en la semilla.

La cuantificación relativa de TLP y quitinasas se llevó a cabo comparando el área de los picos obtenidos en la cromatografía líquida iónica contra el área de un estándar de taumatina (tabla 2).

Tabla 2: Concentraciones de TLP y quitinasas en piel y pulpa de uva Sauvignon Blanc (Tian et al.,2015).

Tissue	TLPs (mg/L)*	Chitinases (mg/L)*
Skin	581.8 ± 17.2	442.4 ± 34.3
Pulp	275.1 ± 7.1	248.2 ± 14.1

* The concentration was determined using HPLC, and expressed as thaumatin equivalent.

La comparación de las concentraciones entre los dos tejidos de uva mostró que la pulpa de uva Sauvignon Blanc contenía una concentración similar de TLP y quitinasas (275.1mg/L y 248.2 mg/L, respectivamente). Las concentraciones de TLP y quitinasas determinadas en la piel de uva Sauvignon Blanc fueron 581.8 mg/L y 442.4 mg/L, respectivamente. Teniendo en consideración la relación de peso entre la piel y la pulpa en una sola baya (aproximadamente 1:8,8), la cantidad de estas proteínas PR en la piel de la uva en base a bayas es en realidad mucho menor que en la pulpa de la uva.

3. Funcionalidad Biológica de las proteínas

3.1. Capacidad antifúngica de las proteínas PR:

Las quitinasas y la β -1-3 glucanasa, ambas proteínas PR, son las que están implicadas en la capacidad de defensa de la baya ante agentes fúngicos patógenos, uno de los principales problemas que nos encontramos en el cultivo de la vid. Dicha propiedad emana de su habilidad catalítica para hidrolizar quitina y β -1-3 glucanos, compuestos que abundan en la estructura

de los componentes de la pared celular de las hifas fúngicas (Ferreira et al., 2004).

El agente causante del mildiu polvoroso de la vid, *Uncinula necator*, aumenta la actividad en quitinasas y β -1-3 glucanasa en las hojas de parra y el fruto en numerosos cultivos de vid susceptibles. El aumento en la actividad hidrolítica está directamente relacionado con la severidad de la infección fúngica en ambos órganos. La capacidad de resistencia a los hongos patógenos fue demostrada en el estudio de Ferreira et al. (2004) en las plantas transgénicas que sobreexpresaban quitinasa y β -1-3 glucanasa al ser infectadas con agentes fúngicos, demostrando un efecto sinérgico la expresión de ambos genes a la vez.

Respecto a las proteínas similares a la taumatina (TLP), su capacidad antifúngica puede deberse a la habilidad que tienen de permeabilizar la membrana celular, aunque su mecanismo de acción no está bien dilucidado todavía, ni su rol en la vid. Sin embargo sí se sabe que su acumulación está relacionada con la incapacidad de *U.necator* de iniciar nuevas infecciones en la uva (Ferreira et al., 2002).

3.2. Actividad antihipertensiva

El aumento de la presión sanguínea o hipertensión está considerada como una de las enfermedades crónicas más prevalentes en los países desarrollados, por ello cada vez existen más estudios sobre los péptidos antihipertensivos derivados de los productos alimentarios. El mecanismo de acción por el que actúan estos péptidos es el mismo que el de la mayoría de medicamentos que se utilizan para esta patología, la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Esta enzima es responsable del aumento de la presión sanguínea al convertir la angiotensina I en un fuerte vasoconstrictor, la angiotensina II; y la degradación de la bradiquinina, un vasodilatador. Por lo tanto, la inhibición de la ECA produce un efecto hipotensor (Gómez-Ruiz et al., 2004).

Los primeros estudios a mano de Takayanagi y Yokotsuka (1999) sobre la actividad antihipertensiva de los péptidos del vino demostraron que los vinos tintos tenían mayor actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) que los vinos blancos y que esta actividad disminuía durante la fermentación sin ningún motivo claro para esta disminución.

Posteriormente Perrot et al. (2003) comprobaron, en un estudio crónico en ratas normotensas e hipertensas, que el extracto de un vino de Champaña tenía una actividad antihipertensiva en ratas hipertensas pero no afectaba a las ratas normotensas. Sin embargo, esto no se podía atribuir solo a los péptidos ya que era un extracto bastante complejo y podían influir otros compuestos.

Pozo-Bayón et al.(2007) estudiaron la actividad antihipertensiva de 41 vinos, midiendo la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (IECA). Además determinaron los aminoácidos de los péptidos de 6 fracciones que presentaban actividad antihipertensiva. Los aminoácidos Asn, Gln y Val (Asparagina, Glutamina y Valina) formaban parte de 5 de las 6 fracciones estudiadas, y Thr y Ala (Treonina y Alanina) formaban parte de 4 de estas fracciones. La valina, que no es un aminoácido mayoritario en los péptidos del vino, está en la mayoría de las fracciones con actividad antihipertensiva estudiada. Los 41 vinos analizados y estudiados fueron: 9 vinos blancos de mesa, 5 vinos de Jerez, 15 vinos espumosos, 3 vinos rosados y 9 vinos tintos (figura 3). La actividad de los vinos tintos fue más alta y significativamente diferente de los rosados. El valor medio de la actividad de los vinos espumosos era igual al de los vinos blancos de mesa pero diferente del de los otros grupos de vinos y vinos de Jerez. El hecho de que los vinos tintos tuvieran mayor actividad IECA que los vinos blancos confirma los resultados obtenidos por Takayanagi y Yokotsuka (1999).

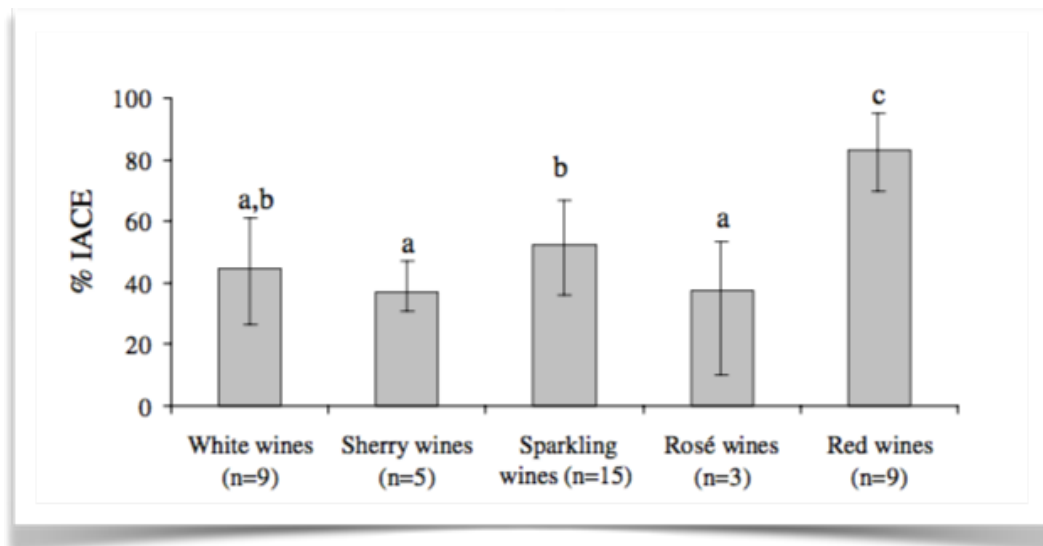


Figura 3: Porcentaje de actividad IECA de diferentes tipos de vinos: vino blanco de mesa (n=9), vino de Jerez (n=5), vino espumoso (n=15), vino rosado (n=3) y vino tinto (n=9) (Pozo-Bayón et al.,2007).

En otro estudio realizado se analizó la influencia de algunas variables en el proceso de obtención de vinos espumosos elaborados según el método tradicional (cepa de levadura y tiempo de crianza en lías) y en la producción de vinos tintos (fermentación maloláctica y envejecimiento en lías) respecto a la actividad IECA de la fracción peptídica de esos tipos de vinos (Alcahide-Hidalgo et al., 2008). El envejecimiento en lías influyó significativamente en la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina I en los vinos espumosos. Alcanzó los valores máximos a los 9 meses, disminuyendo después. En los vinos tintos, la actividad IECA también aumentó en los vinos criados en lías. En ambos vinos, los péptidos hidrofóbicos fueron responsables de la actividad de IECA, corroborando lo anteriormente demostrado por Alcahide-Hidalgo et al. (2007), que los péptidos liberados en el medio por *Saccharomyces cerevisiae*, como consecuencia de la autólisis, tienen actividad IECA y que dicha actividad es atribuible a los péptidos más hidrófobos. Sin embargo, dado que la autólisis es un proceso dinámico, los péptidos responsables de esta actividad pueden hidrolizarse en el tiempo por la acción de enzimas proteolíticas también en el medio, dando lugar a péptidos con actividad reducida, siendo una de las explicaciones de por qué los valores máximos se obtienen a los 9 meses y no a los 12.

En los vinos tintos, durante la fermentación maloláctica, las bacterias malolácticas consumen preferentemente péptidos hidrófilos y, por el contrario, también se produce una hidrólisis simultánea de proteínas en el medio que da lugar a la formación de péptidos más hidrófobos, similar a la que se produce durante la producción de vinos espumosos (Martínez-Rodríguez y Polo, 2000). Sin embargo, durante el envejecimiento, solo hubo degradación enzimática de péptidos hidrófobos para producir un aumento en los péptidos hidrófilos (Alcahíde-Hidalgo et al., 2008).

Años después se realizó otro estudio sobre el incremento de los péptidos antihipertensivos de vinos argentinos como consecuencia de la utilización de la bacteria *Oenococcus oeni* (bacteria utilizada habitualmente en la fermentación maloláctica). Se cultivó *Oenococcus oeni* en un medio sintético de vino que se complementó con una fracción de proteína y polipéptido de alto peso molecular obtenida de cuatro variedades de vinos argentinos. Después de 48 h de tiempo de incubación, además de mantener la viabilidad y aumentar la actividad proteolítica extracelular y la liberación de péptidos de bajo peso molecular, se detectó un aumento en las actividades antioxidantes y antihipertensivas en todos los medios estudiados (Apud et al., 2013).

Por tanto *Oenococcus oeni* proporciona beneficios adicionales para el vino, como un aumento en péptidos bioactivos con actividades beneficiosas multifuncionales, siendo más altas estas actividades cuando la fuente de nitrógeno peptídico se deriva de los vinos tintos corroborando así los resultados obtenidos en un estudio previo por Aredes Fernández et al. (2011) sobre la actividad proteolítica expresada por *O. oeni*.

3.3. Actividad antioxidante y secuestradora de radicales libres

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, de tal manera que un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres.

Los radicales libres son moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares. Este electrón desapareado confiere un grado considerable de reactividad al radical libre logrando además que pueda existir de forma independiente por cortos períodos de tiempo.

La dieta, el estilo de vida, la exposición a radiación, metales, pesticidas, tóxicos, y algunos medicamentos, son factores que están relacionados con la aparición y desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, desórdenes neurodegenerativos y el envejecimiento. Todas estas condiciones patológicas están asociadas a un estado conocido como “estrés oxidativo”, es decir, un aumento en las especies oxidantes y radicales libres, principalmente Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) y/o una disminución en los mecanismos de detoxificación de ellas (Londoño, 2012).

Es muy conocido y estudiado el efecto antioxidante del vino aportado por los fenoles, especialmente el resveratrol. Sin embargo, gracias a los estudios realizados para ver la actividad antihipertensiva de los péptidos bioactivos que posee el vino, se descubrió que éstos también presentaban actividad antioxidante.

En el estudio realizado por Apud et al. (2013) sobre el incremento en péptidos antioxidantes y antihipertensivos de vinos argentinos por *Oenococcus oeni*, se obtuvo la actividad antioxidante máxima por los péptidos liberados de la fracción del vino Cabernet Sauvignon. Los resultados fueron: 366,1 μmol de FeSO_4/L en el caso del poder antioxidante reductor férrico (la reducción de los iones férricos Fe^{3+} , a iones ferrosos Fe^{2+} , formándose el compuesto FeSO_4) y 8,9% en el barrido de radicales de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), es decir, la concentración de antioxidante necesaria para estabilizar un 50% del radical libre DPPH*. Por tanto *Oenococcus oeni* proporcionaría beneficios adicionales para el vino, como un aumento en péptidos bioactivos con actividades beneficiosas multifuncionales.

En los últimos ensayos se compara la actividad de los péptidos bioactivos liberados a través de la proteólisis llevada a cabo por *O. oeni* del mosto de uva no fermentado (MNF) y del mosto de uva fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* (MF). Los resultados se muestran en la figura 4, donde se puede observar un aumento de la actividad antioxidante de 305.07 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{L}$ después de la inoculación de *O. Oeni*, sobre todo a las 24 horas. Sin embargo, en los medios fermentados por *S. cerevisiae* no se evidencian cambios significativos.

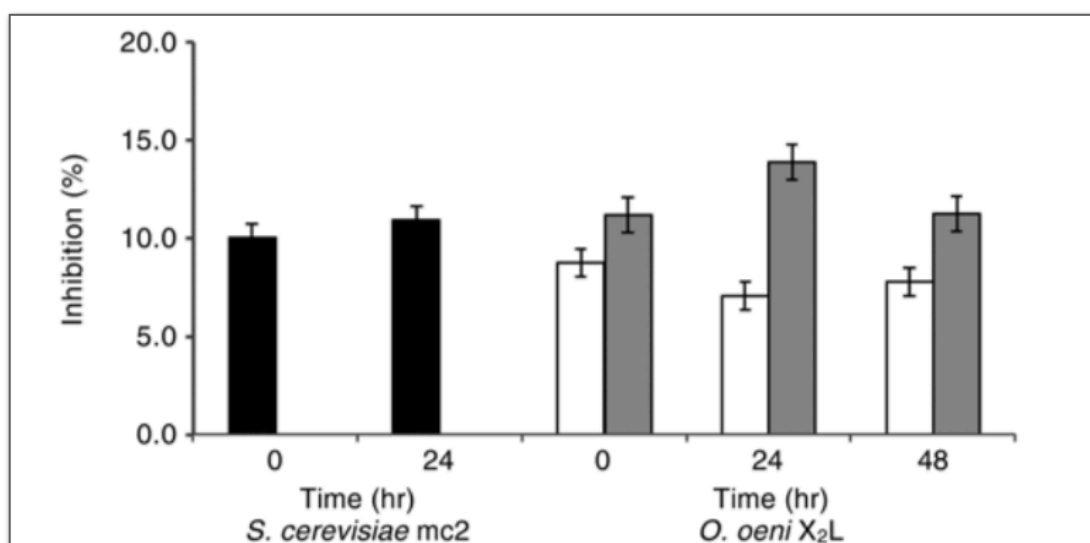
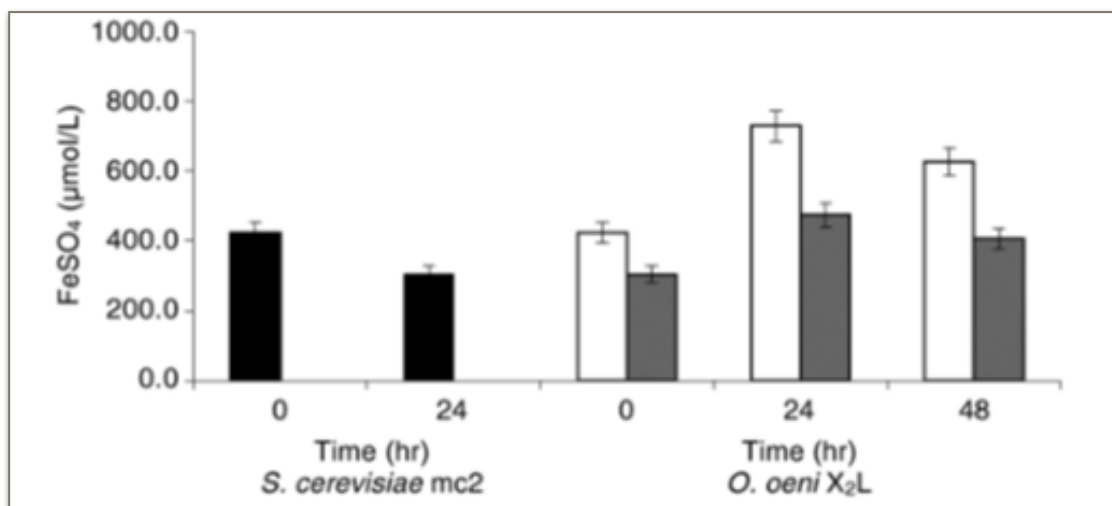


Figura 4. Actividad antioxidante determinada por la reducción del complejo Fe^{+3} en ozumo de uva durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (■) y *Oenococcus oeni* antes (□) y después (▒) de la fermentación con *S. cerevisiae* (Apud et al., 2013).

En la figura 5 se muestran los resultados relacionados con la actividad secuestradora de radicales o barrido de radicales. En este caso no se detectó diferencia significativa en la actividad de DPPH con la inoculación y crecimiento de *O. oeni*. Sí se puede observar la importancia de la fermentación alcohólica con *S. cerevisiae* en el porcentaje de inhibición de radicales libres DPPH* (Stivala et al., 2018).



radicales libres DPPH* en zumo de uva durante el crecimiento de *S. cerevisiae* (■) y *O. oeni* antes (□) y después (▒) de la fermentación con *S. cerevisiae* (Apud et al., 2013).

Estos estudios y resultados demuestran la funcionalidad biológica que presentan los péptidos de la uva y del vino.

4. Funcionalidad tecnológica de las proteínas

4.1. Formación de espuma en el vino

Una de las características más apreciadas de un vino espumoso es la calidad de su espuma, definida por los conceptos de espumabilidad o cantidad de espuma producida, y de persistencia de la espuma o tiempo de estabilidad.

Una espuma de calidad se define como aquella que causa una liberación lenta de CO₂ desde el fondo del líquido, con pequeñas burbujas que contribuyen a la formación de una corona en la superficie del vino, cubriéndola completamente con burbujas de dos o tres hileras de profundidad (Martinez-Rodríguez y Pueyo, 2009).

La presencia de una sobrepresión de CO₂ en el interior de la botella y de compuestos tensioactivos en el vino capaces de formar una interfase líquido-gas que dé a la burbuja su individualidad, son requerimientos indispensables para la formación y la estabilidad de la espuma (Buxaderas y

López-Tamames, 2010). La estabilidad de la espuma, es decir, la vida de las burbujas, depende de la formación de una flexible pero resistente película capaz de reducir la permeabilidad del gas e inhibir la coalescencia de la burbuja.

La formación de la espuma depende por tanto de la habilidad de las proteínas de absorber rápidamente y desplegar la interfase gas-líquido. Al pH del vino, los aminoácidos que componen las proteínas están protonados y actuarían como agentes tensoactivos catiónicos según la hidrofobicidad de sus cadenas laterales.

El carácter anfipático de los aminoácidos (es decir, tienen un extremo hidrofílico soluble en agua y otro hidrófobo que la repele) les permitiría concentrarse en la interfase líquido/aire y mejorar así la espumabilidad de los vinos.

La estabilidad de la espuma depende por tanto de la estructura de la proteína y composición, no significando siempre que la presencia de proteínas en los vinos espumosos conlleve una mayor formación y estabilidad de la espuma.

Según el estudio de Condé et al. (2017) realizado con 28 vinos blancos espumosos elaborados según distintos métodos, los aminoácidos arginina, asparagina, histidina y tirosina; influyen tanto positiva como negativamente, dependiendo del aminoácido, en las propiedades de la espuma y sus características tales como volumen, espumabilidad y estabilidad en las bebidas carbonatadas. Estando significativamente correlacionado el contenido en dichos aminoácidos con los parámetros representativos de la estabilidad de la espuma.

Respecto a los resultados obtenidos en el estudio, la presencia de asparagina contribuye negativamente, sobre todo en vinos sometidos a una segunda fermentación, la maloláctica. Sin embargo los resultados no son concluyentes ya que hay variabilidad según los estudios, debido a que la influencia de los aminoácidos en la estabilidad de la espuma parece ser el resultado de complejas interacciones entre los componentes del vino. Los

aminoácidos que sí demostraron contribuir positivamente en la estabilidad fueron la tirosina y la histidina. Con los resultados obtenidos se concluye que el contenido en proteínas está estadísticamente correlacionado con la disminución de la velocidad de desvanecimiento de la espuma y con el incremento de su vida media.

4.2. Turbidez en el vino

Aunque las proteínas en el vino se encuentren en pequeña concentración, suponen una gran importancia tecnológica y económica ya que son las responsables de la quebradura proteica o turbidez del vino blanco. Dicha turbidez confiere al vino un aspecto indeseable para su compra ya que, para los consumidores, el sentido de la vista es el primero por el que juzgan un vino (color, limpidez, brillo, etc.).

Las proteínas responsables de la nebulosidad son las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), más concretamente se conoce que la más implicada es la taumatina por su capacidad de resistir a la fermentación y a los bajos valores de pH.

Es necesario por tanto la estabilización del vino a través de la eliminación de dichas proteínas por clarificación. La estabilización de los vinos blancos se basa en la neutralización de las cargas entre el agente clarificante y las partículas en suspensión. El coloide se aglomera y flucula por gravedad. Otro método es que el agente clarificante absorba las partículas en suspensión (Pereira, 2014).

Una técnica universalmente empleada es la adición de bentonita, muy utilizada como agente clarificante en la industria del vino, para prevenir la turbidez. Dicho agente clarificante es un derivado de la arcilla montmorillonita (compuesto principalmente por silicato de aluminio) que posee una carga negativa neta, por su parte las proteínas del vino están cargadas positivamente dado el pH del vino, ambas cargas interactúan

electrostáticamente por su acción coloidal, dando como resultado su retirada (Vincenzi et al., 2015). Además de su efecto físico y mecánico ya que tiene una gran capacidad de absorción y floculación (cada gramo de bentonita acuosa supone una superficie de cinco metros cuadrados que al descender atrapa y arrastra).

La interacción bentonita-proteína es rápida, y la adsorción es independiente de la temperatura, pero varía levemente respecto a la cantidad de proteínas, la concentración de etanol y el pH del vino, y se ve muy afectada por el tipo de bentonita utilizada (Pereira, 2014).

El problema se presenta cuando se demuestra que la acción de la bentonita no es específica para las proteínas, sino que elimina otras especies cargadas o agregados, pudiendo afectar a los compuestos aromáticos del vino, y por tanto, disminuyendo las características organolépticas de éste. Vincenzi et al. (2015) demostraron la interacción directa entre la bentonita y los compuestos aromáticos a través de soluciones modelo que contenían una molécula aromática seleccionada, dando lugar a la disminución de la calidad sensorial que es a veces reclamada por los tratamientos con bentonita en vinos blancos.

Más específicamente, el tratamiento con bentonita elimina significativamente varios componentes, particularmente etil-ésteres y ácidos grasos. Una de las principales proteínas del vino, la proteína similar a la taumatina VVTL1, es capaz de unirse a ésteres etílicos de diferentes longitudes de cadena. Dichos ésteres etílicos son compuestos aromáticos producidos durante la fermentación, que son por tanto eliminados cuando la bentonita se une a la proteína similar a la taumatina VVTL1, unida ésta a su vez a los ésteres etílicos (Gaspero, 2016).

En el caso de los ácidos grasos, que son importantes precursores de los ésteres aromáticos, la bentonita elimina significativamente los ácidos decanoicos y dodecanoicos pero no los octanoicos. Esto es debido a la repulsión electrostática con la carga negativa de la bentonita, predominando en las interacciones debido a la hidrofobicidad. La bentonita puede interactuar con los ácidos grasos en el jugo de uva, lo que explica el aumento

del tiempo de fermentación cuando se usa antes de la inoculación con levadura (Vincenzi et al., 2015).

4.3 Nuevo agente clarificante: GSE

Una vez planteado el principal problema que presentan las proteínas en los vinos blancos, y cómo la clarificación con bentonita (tan utilizada) disminuye las características organolépticas, es necesario plantearse alguna solución. Dicha solución podría ser utilizar otro de los muchos agentes clarificantes que hay tales como la clara de huevo o la proteína de leche, pero aquí nos encontramos con los problemas de apariciones de alergias (cada vez más en auge) y la introducción de una nueva normativa. De ahí el aumento del interés en alternativas de agentes de clarificación en vinos para reemplazar las proteínas derivadas de plantas o animales que poseen potencial alergénico. En este contexto, la utilización de agentes clarificantes derivados de la uva, el vino o levaduras, ya que no necesitarían nivel de declaración al no añadirse sustancias exógenas en el vino podría resultar ser beneficioso.

Más recientemente, el material endógeno de la uva en estudio es el extracto proteico de la semilla de uva (GSE), que además muestra resultados prometedores en la reducción de la astringencia en vinos tintos como se explicará más adelante (Gazzola et al; 2017).

La clarificación tiene un papel muy importante en la industria del vino, siendo aplicada en el zumo de la uva o vino antes, durante y/o después de la fermentación alcohólica.

Dicha clarificación tiene varios objetivos: eliminar las partículas insolubles no deseadas, aumentar la claridad y filtrabilidad, modular la composición fenólica del vino, obtener la estabilidad del color gracias a la reducción de la oxidación fenólica, y aumentar los atributos sensoriales del vino por la reducción de la astringencia y sabores desagradables.

Los agentes clarificantes derivados de animal más populares son la gelatina de cerdo (la gelatina bovina se abandonó por precaución en la propagación de la encefalopatía bovina esponjiforme), la albúmina de huevo

(derivado de las claras de huevo) y la caseína (proteína de la leche) (Tschiersch et al., 2010). El huevo y las proteínas de la leche son conocidos como alérgenos alimentarios, suponiendo por tanto un riesgo alérgico a los consumidores si quedan residuos en el vino después del tratamiento de clarificación. Los potenciales agentes clarificantes alérgicos en el vino han de declararse si son encontrados a una concentración superior a 0,25 mg/L según la nueva normativa ya vigente (Resolución OIV-OENO-SECSAN 520-2014).

Como alternativa a los recursos animales fueron autorizadas las proteínas derivadas de plantas como el trigo o los guisantes, no estando comercializado ningún producto con proteínas del trigo debido a su alto riesgo de reacciones adversas al gluten; mientras una gran cantidad de productos comercializados si contienen proteínas de guisante. Más recientemente, la proteína de la patata (patatin) fue propuesta como agente clarificante del zumo de uva/vino debido a su bajo riesgo alérgico (aunque se han reportado algunos casos) (Gambutí et al., 2016).

Gazzola et al. (2017) evaluaron el potencial del extracto proteico de semilla de uva (GSE) para comprobar si podía ser una buena alternativa a los agentes de clarificación comúnmente utilizados en la industria enológica. Estudiando, por tanto, el efecto del GSE en la turbidez, características cromáticas, sensibilidad oxidativa, reducción de la concentración de sustancias fenólicas y las propiedades sensoriales; en vinos blancos (Chardonnay), rosados (Raboso Piave) y tintos (Raboso Piave); y compararlos con agentes clarificantes sintéticos (PVPP: polivinilpolipirrolidona), derivados de animales (gelatina, ovoalbúmina y caseinato de potasio) y derivados de plantas (proteína patatín y proteínas de guisante).

El GSE se obtiene con dificultad, a partir del residuo seco remanente después de la extracción del aceite de semilla de uva. La dificultad en la extracción de proteínas derivadas de la semilla de uva es debida a su gran contenido en fibra y compuestos fenólicos, siendo una tarea complicada y requiriendo un largo número de pasos. Se extrae con buffers a pH de valores severos, el primer paso es la solubilización de las proteínas en condiciones de pH alcalinas y el segundo es su precipitación a pH bajo (Vincenzi et al., 2013).

En los resultados obtenidos en el estudio de Gazzola et al (2017) el extracto proteico de semilla de uva en el vino Chardonnay fue uno de los agentes clarificantes más efectivos. La mayor dosis de GSE (20g/hL) redujo la turbidez del vino en un 67%. Respecto al vino rosado Raboso, este presentaba la mayor turbidez de todos los vinos testados, se redujo la turbidez en un 50% (con una concentración de GSE de 20g/hL).

Sin embargo, comparado con los otros agentes clarificantes, la albúmina de huevo mostró mejores resultados en la reducción de turbidez con menor dosis de agente. Después de la albúmina, los mejores resultados lo mostraron la proteína patatín, que a dosis media mostró la mejor acción clarificante.

Por tanto, en los vinos blancos estudiados, GSE fue efectivo como clarificante del vino, sugiriendo así la posibilidad de usarse como alternativa a K-caseinato. De esta forma, debido a los problemas de alergias en los que está envuelto el K-caseinato como agente clarificante y la polivinilpirrolidona (PPVP), que es un aditivo sintético y no está autorizado en la industria del vino orgánico; el extracto proteico de semilla de uva podría reemplazar a dichos clarificantes para eliminar de manera eficiente las sustancias fenólicas oxidadas y aquellas susceptibles de oxidación; sin afectar negativamente a las características sensoriales del vino.

Respecto al vino rosado, los otros agentes de clarificación probados resultaron ser más eficientes en la reducción de la turbidez que el GSE. Sin embargo, GSE mantiene el color del vino inalterado, a diferencia de los otros clarificantes. Esto puede ser particularmente significativo en los vinos rosados, donde el color debe ser preservado ya que es un importante factor de calidad. Además, el tratamiento con GSE mejora las propiedades sensoriales, reduciendo drásticamente las notas vegetales y mejorando su palatabilidad.

En el vino tinto, el extracto de semilla de uva no fue particularmente efectivo en la disminución de la turbidez, sin embargo en el vino que mayor concentración de sustancias fenólicas tenía consiguió reducir significativamente su contenido, especialmente las proantocianidinas, al menos de manera similar a la albúmina de huevo y a la gelatina.

4.4. Papel adicional de GSE como reductor de la astringencia

Otro añadido que presenta la utilización del GSE como agente clarificante es la reducción de la astringencia en vinos tintos. Este efecto se puede explicar ya que todas las proteínas que se usan en la clarificación de los vinos tienen generalmente afinidad por los taninos e interaccionan con ellos mediante puentes de hidrógeno, formados entre los grupos fenólicos e hidroxílicos y las cadenas peptídicas de los componentes proteicos (Bourvellec y Renard, 2012). Como consecuencia de estas interacciones, las proteínas clarificantes crean partículas insolubles que son eliminadas, dando lugar a la clarificación del vino, su estabilización y reducción de la astringencia debido a la eliminación de los taninos con proteínas reactivas, afectando así a las propiedades sensoriales del vino.

Según el estudio de Vincenzi et al. (2013), el extracto proteico de semilla de uva mostró, en los vinos ensayados (Cabernet Sauvignon), una intensa disminución de la astringencia comparado con el agente clarificante de referencia, la gelatina. Esto es debido al efecto de la interacción de las proteínas presentes en el extracto proteico de semilla de uva (GSE) con los taninos. Los polisacáridos también pueden influir en la percepción de la astringencia del vino ya sea por el aumento de la amplitud de sensaciones o el bloqueo de la interacción polifenol/proteína.

Respecto a las propiedades sensoriales, el efecto que se ha comprobado con la utilización de GSE como clarificante en los vinos tintos es la mejora de la integración de las texturas en boca como resultado de la disminución de la astringencia y la acidez (Vincenzi et al; 2013) y en vinos rosados (Raboso Piave) la reducción de las notas vegetales (Gazzola et al., 2017).

❖ CONCLUSIONES:

Las proteínas más abundantes en la uva son las Proteínas Relacionadas con la Patogénesis (PR) siendo las más importantes en este grupo las quitinasas y las proteínas similares a la taumatina. Dichas proteínas le confieren a la baya de uva una cierta capacidad antifúngica frente a agentes patógenos, siendo esta capacidad una de las funcionalidades biológicas.

Sin embargo, dichas proteínas también presentan grandes problemas de turbidez en el vino blanco, por ello en los últimos años se han realizados estudios sobre la utilización de extractos proteicos de semilla de uva como agente clarificante (funcionalidad tecnológica), dando buenos resultados, además de mejorar las propiedades sensoriales del vino disminuyendo la astringencia y dando lugar a un afinamiento del vino .

En vinos espumosos se ha comprobado que los aminoácidos histidina y tirosina contribuyen a la estabilidad de la espuma, disminuyendo la velocidad de desvanecimiento de ésta e incrementando su vida media.

Por otra parte, en el vino, sobre todo en el tinto, se encuentran péptidos con funcionalidades biológicas como antihipertensivas e inhibidora de radicales libres que podría resultar de interés en un futuro si se pudiera aumentar la cantidad de dichos péptidos.

❖ BIBLIOGRAFÍA:

Alcaide-Hidalgo JM, Pueyo E , Polo MC , Martínez-Rodríguez AJ. Bioactive peptides released from *Saccharomyces cerevisiae* under accelerated autolysis in a wine model system. *Journal of Food Science*. 2007; 72: 276-279.

Alcaide-Hidalgo JM, Martínez-Rodríguez AJ, Martín-Álvarez Pedro J, Pueyo E. Influence of the elaboration process on the peptide fraction with angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity in sparkling wines and red wines aged on lees. *Food Chem*. 2008; 111: 965-969.

Apud GR, Rodríguez-Vaquero MJ, Rollan G, Stivala MG, Aredes P. Increase in antioxidant and antihypertensive peptides from Argentinean wines by *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*. 2013; 163: 166-170.

Aredes Fernández PA, Stivala MG, Rodríguez Vaquero MJ. Increase in antioxidant and antihypertensive activity by *Oenococcus oeni* in a yeast autolysis wine model. *Biotechnology Letters*. 2011; 33: 359-364.

Blouin J, Peynaud E. *Enología práctica: conocimiento y elaboración del vino*. 4ª ed. París: Dunod ;2003

Bourvellec C, Renard GC. Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012; 52: 213-248.

Buxaderas S, López-Tamames E. Managing the quality of sparkling wines. En: A. G. Reynolds (Ed.). *Managing wine quality: oenology and wine quality*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2010.

Callejón RM, Troncoso A.M, Morales M.L. Determination of amino acids in grape-derivate products: A review. *Talanta*. 2010; 81 (2010):1143-1152

Carbonel Bejerano P, Martínez Zapater JM. Estructura y composición de la uva y su contribución al vino. En*: Pujol Gebellí X/ Ferrer S/ Ángel de la Rosa M. SEBBM Bioquímica del vino. 176. Madrid: Rubes; 2013: 5-8.

Condé BC, Bouchard E, Culbert JA, Wilkinson KL, Fuentes S, Howell KS. Soluble protein and amino acid content affects the foam quality of Sparkling Wine. *L Agric Food Chem*. 2017; 65: 9110-9119.

Ferreira RB, Picarra-Pereira MA, Monteiro S, Loureiro VB, Teixeira AR. The wine proteins. *Trends Food Sci Technol*. 2002; 12: 230-239.

Ferreira RB, Monteiro S, Picarra-Pereira MA, Teixeira AR. Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *Trends in Biotechnology*. 2004; 22 (4): 168-173.

Gambutì A, Rinaldi A, Romano R, Manzo N, Moio L. Performance of a protein extracted from potatoes for fining of white musts. *Food Chem*. 2016; 190: 237-243.

Gasparo M, Ruzza P, Hussain R, Vincenzi S, Biondi B, Gazzola D et al. Spectroscopy reveals that ethyl esters interact with proteins in wine. *Food Chem*. 2016; 217: 373-378.

Gazzola D, Vincenzi S, Marangon M, Pasini G, Curioni A. Grape seed extract: the first protein-based fining agent endogenous to grapes. *Aust J Grape Wine R*. 2017; 23: 215-225.

Gómez-Ruiz JA, Ramos M, Recio I. Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2004; 1054: 269-277.

Hidalgo Togores J. Tratado de Enología. 1ª ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 2003.

Hung W. Protein stabilization of New Zealand Sauvignon blanc. Tesis Doctoral en la Universidad de Lincoln, Nueva Zelanda. 2010; 153.

Londoño J. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Desarrollo y Transversalidad. 5 ed. Medellín, Colombia: Corporación Universitaria Lasallista; 2012 :129-62.

López Alejandro M. Manual de viticultura, enología y cata. 3ª ed. Madrid: Almuzara; 2007.

Martínez-Rodríguez AJ, Pueyo E. Sparkling wines and yeast autolysis. En: Moreno- Arribas MV, Polo MC (eds). Wine Chemistry and Biochemistry. New York. Springer Science and Business Media; 2009: 61-80.

Okuda T, Fukui M, Takayanagi T, Yokotsuka K. Characterization of major stable proteins in Chardonnay wine. Food Science and Technology Research. 2006; 12: 131-136.

Oreglia F. Enología Teórico-Práctica. 3ª ed. Buenos Aires: Instituto Salesiano de Artes Gráficas; 1978.

Pereira C. Estabilización proteica en vinos blancos: Estudio y comparación de distintas alternativas para Sauvignon Blanc. Tesis doctoral universidad de Cuyo, Argentina. 2014; 16-22.

Perrot L , Dukic S , Charpentier M , Duteurtre B, Duchiron F , Kaltenbach ML. Antihypertensive effect of a low molecular weight fraction (1 kDa) of champagne wine in spontaneously hypertensive rats. En: A. Lonvaud-Funel, G. Revel, & P. Darriet (Eds.). Oenologie. Paris: Editions TEC and DOC ; 2003: 688-691.

Pozo-Bayón MA , Alcaíde JM , Polo MC , Pueyo E . Angiotensin I- converting enzyme inhibitory compounds in white and red wines. Food Chem. 2007; 100: 43-47.

Rapp A, Versini G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. Developments in Food Science. 1995; 37 :1659-1694.

Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2nd edn. Chichester, England: Handbook of Enology;2006.

Robinson SP, Davies C. Molecular biology of grape berry ripening. Aust J Grape Wine R. 2000; 6: 175-188.

Stivala MG, Apud GR, Aredes-Fernández P. Release of Biologically Active Peptides from Grape Juice by *Oenococcus oeni* Isolated from Argentine Wine. Am. J. Enol. Vitic. 2018; 69: 89-93.

Takayanagi T , Yokotsuka K. Angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptides from wine. Am J Enol Viticult. 1999; 50: 65-68.

Tian B, Harrison R, Morton J, Deb-Choudhury S. Proteomic Analysis of Sauvignon Blanc Grape Skin, Pulp and Seed and Relative Quantification of Pathogenesis-Related Proteins. PLoS ONE. 2015; 10(6): e0130132. doi:10.1371/journal.pone.0130132.

Tschiersch C, Nikfardjam MP, Schmidt O, Schwack W. Degree of hydrolysis of some vegetable proteins used as fining agents and influence on polyphenol removal from red wine. European Food Research and Technology. 2010; 231: 65-74.

Vincenzi S, Mosconi S, Zoccatelli G, Pellegrina CD, Veneri G, Chingnola R, Peruffo A, Curioni A, Rizzi C. Development of a new procedure for protein recovery and quantification in wine. *Am J Enol Viticult.* 2005; 56: 182-187.

Vincenzi S, Dinnella C, Recchia A, Monteleone E, Gazzola D, Pasini G et al. Grape seed proteins: a new fining agent for astringency reduction in red wine. *Aust J Grape Wine R.* 2013; 19: 153-160.

Vincenzi S, Panighel A, Gazzola D, Flamini R, Curioni A. Study of combined effect of proteins and bentonite fining on the wine aroma loss. *J Agric Food Chem.* 2015; 63: 2314-2320.