



**CARACTERITZACIÓ QUÍMICA DE L'ENTERBOLIMENT PROTEIC  
ESPONTANI DEL VI BLANC**  
**Mireia Esteruelas Coma**

**ISBN: 978-84-693-5414-8**  
**Dipòsit Legal: T-1402-2010**

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



TESI DOCTORAL

**CARACTERITZACIÓ QUÍMICA DE  
L'ENTERBOLIMENT PROTEIC ESPONTANI  
DEL VI BLANC**



Mireia Esteruelas Coma

Tarragona, 2 de juliol del 2010

Mireia Esteruelas Coma

CARACTERITZACIÓ QUÍMICA DE L'ENTERBOLIMENT  
PROTEIC ESPONTANI DEL VI BLANC

TESI DOCTORAL

dirigida pels Doctors  
Fernando Zamora Marín i Joan Miquel Canals Bosch

Departament de Bioquímica i Biotecnologia  
Grup de Recerca Tecnologia Enològica



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona  
4 de maig de 2010



Fernando Zamora Marín i Joan Miquel Canals Bosch, professors titulars del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili,

### CERTIFIQUEN:

Que aquest treball, aquí presentat i que duu per títol “CARACTERITZACIÓ QUÍMICA DE L'ENTERBOLIMENT PROTEIC ESPONTANI DEL VI BLANC”, que presenta MIREIA ESTERUELAS COMA per a l'obtenció del títol de Doctora, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Bioquímica i Biotecnologia d'aquesta Universitat.

Tarragona, 4 de maig de 2010

Dr. Fernando Zamora Marín

Dr. Joan Miquel Canals Bosch

Aquesta tesi ha estat finançada per:

- Empresa **SOFRALAB** (*Société Française de Laboratoires d'Oenologie*);
- **CiCYT** (*Centro de Investigación Científica y Tecnológica*), projecte **AGL2004-02309** i projecte **AGL2007-66338**;
- **CDTI** (*Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial*), projecte **CENIT-Deméter** (*Consortios Estratégicos Nacionales de Investigación Tecnológica -Desarrollo de Estrategias y Métodos vitícolas y Enológicos frente al cambio climático. Aplicación de nuevas Tecnologías que mejoren la Eficiencia de los procesos Resultantes*).

Voldria donar les gràcies a tots els doctors, doctorands, estudiants de màster, tècnics i personal d'administració i serveis amb els que he compartit el dia a dia i amb els que he treballat colze a colze, per la seva ajuda, els seus consells, la seva dedicació, comprensió, els seus ànims, la seva confiança, i la seva amistat ...

**Moltes gràcies a tots!!**

## A la meva família i amics

No te rindas, aún estás a tiempo  
De alcanzar y comenzar de nuevo,  
Acepta tus sombras,  
Enterrar tus miedos,  
Liberar el lastre,  
Retomar el vuelo.  
No te rindas que la vida es eso,  
Continuar el viaje,  
Perseguir tus sueños,  
Destruir el tiempo,  
Correr los escombros,  
Y destapar el cielo.  
No te rindas, por favor no cedas,  
Aunque el frío queme,  
Aunque el miedo muerda,  
Aunque el sol se esconda,  
Y se calle el viento,  
Aún hay fuego en tu alma  
Aún hay vida en tus sueños.  
Porque la vida es tuya y tuyo también el deseo  
Porque lo has querido y porque te quiero  
Porque existe el vino y el amor, es cierto.  
Porque no hay heridas que no cure el tiempo.  
Abrir las puertas,  
Quitar los cerrojos,  
Abandonar las murallas que te protegieron,  
Vivir la vida y aceptar el reto,  
Recuperar la risa,  
Ensayar un canto,  
Bajar la guardia y extender las manos  
Desplegar las alas  
E intentar de nuevo,  
Celebrar la vida y retomar los cielos.  
No te rindas, por favor no cedas,  
Aunque el frío queme,  
Aunque el miedo muerda,  
Aunque el sol se ponga y se calle el viento,  
Aún hay fuego en tu alma,  
Aún hay vida en tus sueños  
Porque cada día es un comienzo nuevo,  
Porque esta es la hora y el mejor momento.  
Porque no estás solo, porque yo te quiero.

Mario Benedetti, *No te rindas*.

## ÍNDEX

<b>Introducció.</b>	<b>1</b>
1. Les proteïnes del vi blanc.	2
2. Influència de les proteïnes en les propietats organolèptiques del vi.	17
3. Les proteïnes inestables.	18
4. Els tests d'estabilitat.	22
5. Mètodes d'estabilització del vi vers les proteïnes.	26
6. Influència dels components del vi d'origen no proteic en la inestabilitat proteica.	33
<b>Justificació i Objectius.</b>	<b>45</b>
<b>Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.</b>	<b>48</b>
1.1. Caracterització de l'enterboliment proteic espontani en vi blanc de la varietat <i>Sauvignon Blanc</i> .	51
1.2. Identificació de les proteïnes inestables mitjançant la tècnica MALDI-TOF/TOF.	70
1.3. Identificació de les proteïnes de les fraccions obtingudes per FPLC-IC.	89
1.4. Electroforesis en gel del vi abans i després de la precipitació natural.	94
<b>Capítol 2. Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.</b>	<b>99</b>
2.1. Comparació de l'eficàcia dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.	102
2.2. Contingut en proteïna i compostos fenòlics del vi abans i després d'aplicar els diferents tests d'estabilitat.	121
<b>Capítol 3. Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.</b>	<b>128</b>
3.1. Compostos fenòlics presents en l'enterboliment proteic espontani en vi blanc de la varietat <i>Sauvignon Blanc</i> .	131
3.2. Espectres TOF dels compostos fenòlics identificats en el vi blanc.	146
<b>Conclusions.</b>	<b>159</b>
<b>Annex 1: Materials i Mètodes.</b>	<b>162</b>
<b>Bibliografia.</b>	<b>183</b>



# Introducció



Vincent van Gogh, *The Red Vineyard*.

## Introducció

<b>1. Les proteïnes del vi blanc.</b>	<b>2</b>
1.1. Origen de les proteïnes del vi blanc.	2
1.1.1. Proteïnes procedents de raïm.	2
1.1.2. Proteïnes procedents del llevat.	3
1.1.3. Proteïnes d'origen bacterià o procedents dels fongs patògens de la vinya.	4
1.2. Contingut proteic del vi blanc.	4
1.3. Les proteïnes majoritàries en el vi blanc: les proteïnes-PR.	6
1.3.1. Proteïnes-PR <sub>2</sub> .	8
1.3.2. Proteïnes-PR <sub>3</sub> : les quitinases.	9
1.3.3. Proteïnes-PR <sub>4</sub> .	10
1.3.4. Proteïnes-PR <sub>5</sub> : la taumatina.	10
1.4. Glicosilació de les proteïnes del vi blanc.	12
1.5. Composició aminoacídica de les proteïnes del vi blanc.	13
1.6. Factors que influencien en el contingut proteic del vi blanc.	13
1.6.1. Factors que influencien quantitativament en el contingut proteic del vi blanc.	14
1.6.2. Factors que influencien qualitativament en el contingut proteic del vi blanc.	15
<b>2. Influència de les proteïnes en les propietats organolèptiques del vi.</b>	<b>17</b>
<b>3. Les proteïnes inestables.</b>	<b>18</b>
<b>4. Els tests d'estabilitat.</b>	<b>22</b>
4.1. El test del calor o test tèrmic.	23
4.2. El Bentotest i el test del TCA (àcid tricloroacètic).	24
4.3. El test de l'etanol i test del taní.	24
4.4. El test del sulfat d'amoni.	25
4.5. El Prostab.	25
4.6. L'Immunotest.	25
<b>5. Mètodes d'estabilització del vi vers les proteïnes.</b>	<b>26</b>
5.1. La bentonita.	26
5.1.1. Procés d'estabilització en continu del vi mitjançant bentonita.	28
5.2. Tècniques alternatives a la bentonita.	29
5.2.1. La ultrafiltració.	29
5.2.2. La digestió enzimàtica.	30
5.2.3. La pasteurització.	30
5.2.4. Els compostos fenòlics immobilitzats.	31
5.2.5. La criança amb lles.	31
5.2.6. El diòxid de zirconi.	32
5.2.7. La quitina.	33
5.2.8. Els anticossos.	33
<b>6. Influència dels components del vi d'origen no proteic en la inestabilitat proteica.</b>	<b>33</b>
6.1. Els polisacàrids: les mannoproteïnes.	34
6.2. Els compostos fenòlics.	36
6.2.1. El pH i l'etanol.	40
6.2.2. La temperatura.	41
6.2.3. L'oxigen.	41
6.2.4. Els metalls.	42
6.3. El sulfat.	44

## Introducció

### 1.1 Les proteïnes del vi blanc.

Les proteïnes del vi blanc, han estat, són i seran un dels temes d'estudi preferit per molts investigadors en l'àmbit de l'enologia, degut a la seva importància tan a nivell qualitatiu, com tecnològic i econòmic. D'on procedeixen les proteïnes del vi blanc?, El seu origen és només vegetal?, Quines proteïnes hi ha en el vi?, Quines són les seves propietats físico-químiques?, Quins factors influencien quantitativa i qualitativament en el contingut proteic del vi?, ... aquests seran els temes que estudiarem en aquest primer apartat de la introducció.

#### 1.1. Origen de les proteïnes del vi blanc.

Les proteïnes del vi poden ser d'origen vegetal, procedir del raïm (*Vitis vinifera*); poden ser aportades pels llevats, encarregats de la fermentació alcohòlica (*Saccharomyces cerevisiae*); poden provindre dels fongs patògens de la vinya (*Uncinula necator*, *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*, ...), o bé poden ser d'origen bacterià (*Oenococcus oeni*, ...).

##### 1.1.1. Proteïnes procedents del raïm.

Estudis recents en els que s'ha utilitzat tècniques immunològiques han demostrat que les proteïnes presents en el vi procedeixen majoritàriament del raïm (Dambrouck i col., 2003). El raïm es pot dividir en tres parts, la pell, la polpa i la llavor; les proteïnes hi estan distribuïdes heterogèniament tan a nivell qualitatiu com quantitatiu. Tal i com s'observa a la Taula 1A, la llavor és la part del raïm més rica en proteïna, conté principalment un polipèptid de 24 KDa de massa molecular; la fulla és més rica en contingut proteic que la polpa; i la pell només conté traces de proteïna.

**Taula 1A.** Contingut en proteïna soluble total del material biològic que contribueix potencialment a les proteïnes del vi. (Ferreira i col., 2000)

Component	Total soluble protein ( $\mu\text{g/g}$ fresh wt)
Grape skin	1.6
Pulp	95.6
Grape seed	290.0
Stem	71.0
Leaf	192.0
Yeast	780.0

En estudis realitzats mitjançant anticossos policlonals altament específics de les proteïnes del vi, s'ha observat que les proteïnes que hi ha al vi blanc procedeixen principalment de la polpa del raïm. La polpa conté un nombre limitat de polipèptids amb masses moleculars majoritàriament entre 20 i 36 KDa. (Ferreira i col., 2000). Es a partir del premsat del raïm que s'obté el most, i aquest contindrà principalment la proteïna procedent de la polpa com ja era d'esperar, malgrat no ser aquesta la part més rica en proteïna.

## Introducció

### 1.1.2. Proteïnes procedents del llevat.

El llevat *Saccharomyces cerevisiae* és l'encarregat de realitzar la fermentació alcohòlica del most. Al llarg de la fase estacionària de creixement de la població de llevats, la proporció de llevats viables va disminuint; després de la mort del llevat, aquest allibera uns enzims proteolítics que s'encarreguen de degradar les estructures cel·lulars pròpies, aquestes es desestabilitzen, tal com s'observa a la Figura 1A, i acaben trencant-se. D'aquesta manera el llevat allibera al vi molècules de l'interior de la cèl·lula i de la paret cel·lular (Bayly i Berg, 1967; Feuillat i col., 1980). Aquest és el procés mitjançant el qual el llevat aporta les proteïnes i altres components al vi, és coneix com autòlisis del llevat.

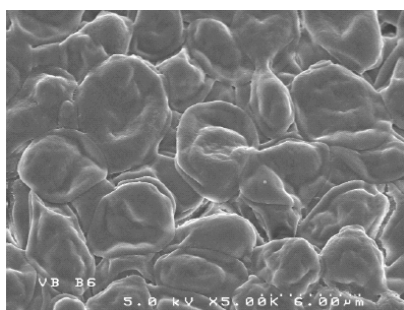


Figura 1A. Llevats durant la autòlisis.

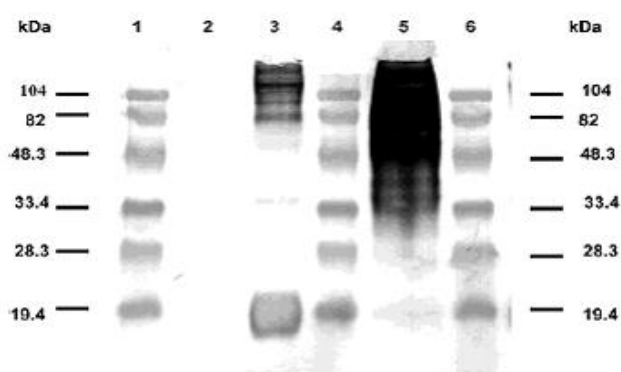


Figura 1B. SDS-PAGE i Immunoblotting de les fraccions polipeptídiques en el vi blanc procedents del llevat. (1,4 i 6) estàndards; (2) most; (3) vi blanc; (5) proteïnes secretades pel llevat. (Dambrouck i col., 2003)

La utilització d'anticossos policlonals específics de les proteïnes que secreta el llevat, ha permès identificar tres fraccions polipeptídiques en el vi blanc procedents del llevat (Figura 1B, carrera 3), aquestes tenen una massa molecular de 20 KDa, 38 KDa i entre 80 i 100 KDa respectivament (Dambrouck i col., 2003). Les fraccions de baixa massa molecular, segons estudis realitzats *in vitro*, tendeixen a degradar-se al llarg del temps (Taula 1B), tot generant pèptids de massa molecular inferior a 700 Da, i aquests pèptids continuen degradant-se fins a aminoàcids (Martínez-Rodríguez i Polo, 2000).

Taula 1B. Bandes electroforètiques detectades a diferents temps d'autòlisis. (Martínez-Rodríguez i Polo, 2000)

relative molecular mass	autolysis time (h)					
	4	24	48	72	168	360
16900	+++	++	+	-	-	-
11400	+	++	+++	+	-	-
9900	+	+	+	+	-	-
6800	+	+++	++	++	-	-
4800	+	+++	++	++	-	-
4400	-	+++	++	++	-	-

Aquesta degradació no s'ha descrit per a la fracció proteica d'alta massa molecular (80-100 KDa) formada principalment per les mannoproteïnes del llevat, ara bé, aquestes

## Introducció

habitualment no es consideren proteïnes sinó polisacàrids, ja que la part proteica representa un percentatge molt baix en la seva estructura (Saulnier i col., 1991; Dambrouck i col., 2003).

La degradació al llarg del temps de les proteïnes de baixa massa molecular fins a aminoàcids i el baix percentatge de proteïna que hi ha en les mannoproteïnes ha permès concloure que la contribució en el contingut proteic del vi per part del llevat és menyspreable (Dambrouck i col., 2003).

### 1.1.3. Proteïnes d'origen bacterià o procedents dels fongs patògens de la vinya.

En un vi també podem trobar proteïnes d'origen bacterià com per exemple procedents de *Oenococcus oeni*, bacteris responsables de la fermentació malolàctica; o proteïnes procedents dels fongs patògens de la vinya, els més comuns són *Uncinula necator*, *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*. Recentment Cilindre i col. (2008), han caracteritzat mitjançant nanocromatografia líquida acoblada a un detector de masses dues proteïnes secretades per *Botrytis cinerea* en un vi botrititzat, aquestes són dos enzims pectinolítics la *endopoligalacturonasa 4* (EC 3.2.1.15) i la *pectinmetilesterasa* (EC 3.1.1.11).

En general però, en un vi no hi ha proteïnes procedents dels fongs patògens ja que la presència d'aquestes es deguda a infeccions, o bé a la manipulació inadequada del raïm durant la collita (Kwon, 2004; Cilindre i col., 2008), processos que l'enòleg evita per poder aconseguir un raïm de màxima qualitat.

## 1.2. Contingut proteic del vi blanc.

S'han utilitzat un ampli i variat rang de tècniques per tal de conèixer la composició proteica del vi blanc (Moreno-Arribas i col., 2002): cromatografia de bescanvi iònic (Waters i col., 1992; Waters i col., 1993; Dorrestein i col., 1995); FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography* (Dawes i col., 1994; Canals i col., 1998); HPLC, *High Performance Liquid Chromatography* (Tyson i col., 1981; Acedo i col., 1994; Santoro, 1995; Yokotsuka i Singleton, 1997; Sarmiento i col., 2001; Kwon, 2004); cromatografia d'exclusió molecular (Somers i Ziemelis, 1973; Pellerin i col., 1993); cromatografia d'afinitat (Pellerin i col., 1993; Berthier i col., 1999); electroforesis bidimensional (Lamikanra i Inyang, 1988); electroforesis capil·lar (Moine-Ledoux i col., 1992; Dizy i Bisson, 1999; Rodríguez-Delgado i col., 2002) isoelectroenfoque (Anelli, 1977; Hsu i Heatherbell, 1987a i 1987b; Hsu i col., 1987c; Moio i Addeo, 1989; Pueyo i col., 1993; Dawes i col., 1994; Santoro, 1995), *western blotting* (Hsu i Heatherbell, 1987a i 1987b; Hsu i col., 1987c); tècniques immunològiques (Monteiro i col., 1999; Ferreira i col., 2000; Dambrouck i col., 2003) espectrometria de masses (Kwon, 2004)

## Introducció

i seqüenciació de l'extrem aminoterminal (Waters i col., 1996). Tot i l'elevat i variat nombre de tècniques utilitzades per poder conèixer les proteïnes del vi blanc, la separació i caracterització d'aquestes és una tasca força complicada degut a la baixa concentració en que es troben al vi, i a les fortes interaccions amb els polifenols o amb altres compostos d'origen no proteic presents en el vi (Rodríguez-Delgado i col., 2002; Ferreira i col., 2002). A més, els processos d'extracció de proteïnes que s'utilitzen habitualment són llargs i tediosos i impliquen, o bé la precipitació d'algunes proteïnes o bé la degradació i modificació d'altres (Ferreira i col., 2002).

Els primers investigadors interessats en conèixer el contingut proteic del vi van ser Kock i Sajak (1959), mitjançant la tècnica d'electroforesis en paper que separa en funció del tamany i de la càrrega, van observar que en el vi hi ha entre dos i cinc fraccions proteiques. Moretti i Berg (1965) van corroborar aquest resultat emprant la tècnica d'electroforesis en disc, en aquest estudi s'observa que el vi conté quatre fraccions proteiques, encara que ocasionalment pot haver-n'hi cinc. Posteriorment, Bayly i Berg (1967) mitjançant la tècnica d'electroforesis en disc observen entre 6 i 10 fraccions i mitjançant cromatografia d'intercanvi aniònic obtenen quatre fraccions. No va ser fins el 1973 que es va determinar la massa molecular d'aquestes fraccions quan Somers i Ziemelis mitjançant la tècnica de filtració en gel suggereixen, a partir de les especificacions de la columna que utilitzen en la separació, que la massa molecular d'aquestes fraccions varia entre 10 i 50 KDa.

Hsu i Heatherbell (1987) foren els pioners en la separació i caracterització de les proteïnes del vi, van utilitzar l'electroforesis bidimensional, tècnica que els va permetre conèixer la massa molecular i el pI (punt isoelectric) de les fraccions proteiques del vi (Figura 1C). La massa molecular dels polipèptids presents en el vi està compresa entre 9 i 69 KDa i els seu punt isoelectric oscil·la entre 3 i 9. La fracció polipeptídica més abundant té una massa molecular entre 20 i 30 KDa i un punt isoelectric entre 4.1 i 5.8. Estudis més recents en els que s'utilitzen tècniques de separació electroforètiques ja sigui amb o sense fraccionament previ del vi, han corroborat aquests resultats (Lamikanra i Inyang, 1988;

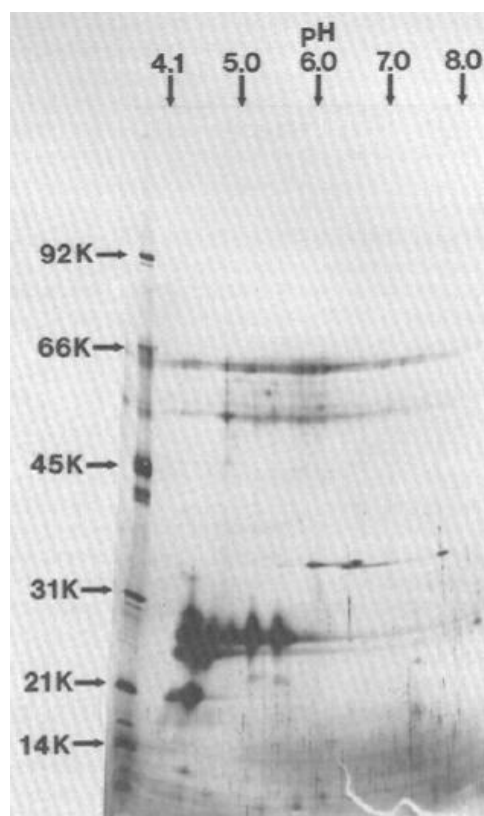


Figura 1C. Electroforesis bidimensional de les proteïnes del vi blanc. (Hsu i Heatherbell, 1987a).

## Introducció

Waters i col., 1992; Brissonnet i Maujean, 1993; Dorrestein i col., 1995; Santoro, 1995). L'anàlisi mitjançant MALDI-TOF ha permès conèixer amb major precisió la massa molecular d'aquests polipèptids; els polipèptids més abundants tenen una massa molecular de 21.3 KDa i la resta 7.2, 9.1, 13.1, 16.6-16.8 i 22.2 KDa respectivament (Weiss i col., 1998).

La utilització de tècniques immunològiques i l'anàlisi de la seqüència de l'extrem aminoterminal, han revelat que els polipèptids majoritaris difereixen poc en la seva massa molecular i tenen estructures molt semblants. Aquest elevat grau de semblança entre ells és degut possiblement a que procedeixen d'un o de pocs precursors comuns sintetitzats durant la maduració del raïm (Monteiro i col., 2001). Molts estudis els han identificat com a proteïnes-PR, proteïnes relacionades amb la patogenicitat, en el vi es troben principalment proteïnes-PR de la família de les quitinases (PR3) i de la taumatina (PR5) (Waters i col., 1996; Peng i col., 1997; Tattersall i col., 1997; Pocock i col., 2000).

Segons aquests estudis podem concloure que el contingut proteic del vi blanc, estarà constituït per una fracció majoritària de polipèptids amb massa molecular entre 20 i 30 KDa, aquests s'han identificat com quitinases (proteïnes-PR3) i proteïnes amb estructura semblant a la taumatina (*thaumatin like proteins*, proteïnes-PR5); la resta correspondrà a proteïnes amb una massa molecular superior, entre 60 i 115 KDa, la contribució de les quals en el contingut proteic serà menys important com més elevat sigui la seva massa molecular.

### 1.3. Les proteïnes majoritàries en el vi blanc: les proteïnes-PR.

Les proteïnes-PR, proteïnes relacionades amb la patogenicitat, es troben àmpliament distribuïdes en la naturalesa. Les plantes activen diferents mecanismes de defensa contra l'estrès biòtic o abiòtic, a causa d'això es sintetitza la proteïna adequada que acaba sent essencial per sobreviure. Aquestes s'expressen a baixos nivells en les cèl·lules, però s'acumulen com a resposta a l'atac dels fongs o d'altres inductors (Van Loon, 1985; Uknes i col., 1992; Monteiro i col., 2003b).

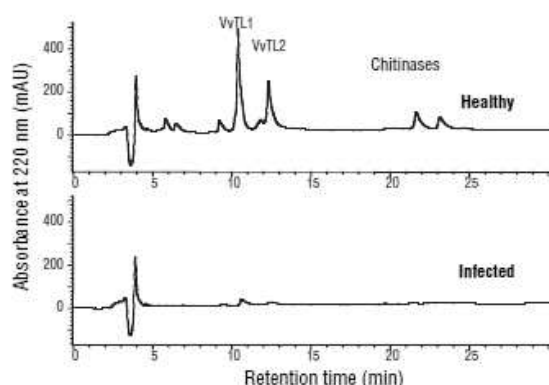
Les proteïnes-PR del raïm presenten activitat antifúngica *in vitro* vers fongs patògens comuns del raïm com són *Uncinula necator*, *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola* (Salzman i col., 1998; Tattersall i col., 2001; Jayasankar i col., 2003; Monteiro i col., 2003b). En molts estudis s'ha descrit que la infecció del raïm per *Uncinula necator* i per *Botrytis cinerea*, implica un augment en la expressió dels gens que codifiquen les proteïnes-PR i en la concentració d'algunes proteïnes-PR en fulles i raïm (Renault i col., 1996; Derckel i col., 1998; Jacobs i col., 1999; Bézier i col., 2002; Robert i col., 2002; Monteiro i col., 2003b; Girbau i col., 2004).

## Introducció

Girbau i col., (2004) han estudiat la concentració de proteïnes-PR en vins obtinguts a partir de raïm amb diferents percentatges d'infecció per *Botrytis cinerea*. Si el percentatge d'infecció és superior al 30%, es dona un augment en la concentració de totes les proteïnes-PR del vi (Taula 1C), contràriament, a nivells d'infecció més elevats, la concentració de proteïnes-PR en el raïm disminueix (Figura 1D), ja que hi té lloc una degradació d'aquestes per acció dels enzims proteolítics fúngics (Marchal i col., 1998; Girbau i col., 2004; Cilindre i col., 2008). Així doncs la infecció, per *Botrytis cinerea* pot donar lloc a un augment o bé a una disminució en la concentració final de proteïnes del raïm en funció del grau d'infecció d'aquest.

**Taula 1C.** Concentració de proteïnes-PR en vins obtinguts a partir de raïm amb diferent percentatge d'infecció per *Botrytis cinerea*. (Girbau i col., 2004)

Variety	Level of infection	Wine haze potential (A 540 nm) <sup>c</sup>	Protein concentration (mg/L) <sup>b</sup> in wine					
			Unknown protein <sup>d</sup>	VvTL1	VvTL2	Total TL <sup>e</sup> proteins	Chitinases	Total PR <sup>f</sup> proteins
Chardonnay	non-infected	0.084 <sup>A</sup>	17 <sup>A</sup>	29 <sup>A</sup>	11 <sup>A</sup>	50 <sup>A</sup>	nd <sup>A,h</sup>	67 <sup>A</sup>
Chardonnay	1-5%	0.098 <sup>A</sup>	26 <sup>B</sup>	30 <sup>A</sup>	14 <sup>A</sup>	54 <sup>A</sup>	nd <sup>A</sup>	80 <sup>AB</sup>
Chardonnay	10-30%	0.138 <sup>A</sup>	16 <sup>A</sup>	32 <sup>A</sup>	27 <sup>A</sup>	71 <sup>A</sup>	18 <sup>B</sup>	105 <sup>B</sup>
Chardonnay	>30%	0.281 <sup>B</sup>	23 <sup>B</sup>	42 <sup>B</sup>	68 <sup>B</sup>	127 <sup>B</sup>	34 <sup>C</sup>	184 <sup>C</sup>
	F <sup>g</sup> =	< 0.0001	0.002	0.0007	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Cabernet	non-infected	ne <sup>i</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cabernet	1-20%	ne	nd	< 5	nd	< 5	nd	< 5



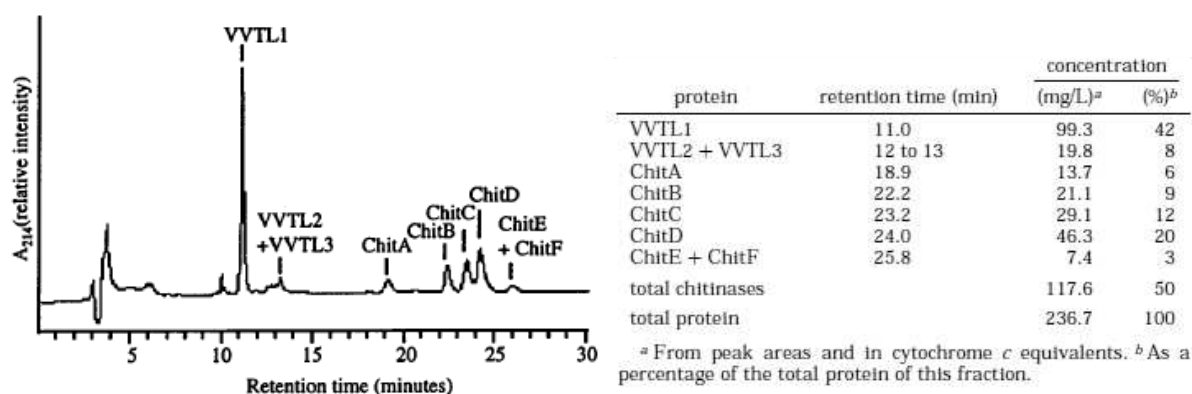
**Figura 1D.** Anàlisi per HPLC de la composició proteica del most procedent de raïm sà i de raïm amb *Botrytis cinerea*. (Girbau i col., 2004)

Encara que la major part de les proteïnes del raïm es sintetitzen durant el verolat (Monteiro i col., 2006), l'expressió dels gens que codifiquen les proteïnes-PR augmenta significativament durant el procés de maduració (Tattersall i col., 1997; Derckel i col., 1996 i 1998; Robinson i col., 1997; Salzman i col., 1998), i la seva síntesis té lloc principalment en la pell del raïm (Pocock i col., 1998a).

Waters i col., (1998) han estudiat el contingut proteic del raïm mitjançant HPLC (Figura 1E), i han observat que les quitinases representen aproximadament el 50% del total de proteïna i el 50% restant està format per proteïnes de la família de la taumatina (Waters i col., 1998; Pocock i col., 2000).



## Introducció



**Figura 1E.** Separació mitjançant HPLC de les proteïnes del vi blanc (esquerra) i concentració de les diferents fraccions obtingudes (dreta). (Chit) Quitinases; (VVTL) proteïnes de la família de la taumatina. (Waters i col., 1998)

Aquesta caracterització de les proteïnes del vi però no sembla ser aprovada per tots els investigadors, Monteiro i col. (2003a), després d'analitzar mitjançant tècniques immunològiques i intercanvi catiònic el perfil proteic del Moscatell de Alexandria de dues anyades consecutives, identifica quatre polipèptids, dos d'aquests amb estructura semblant a la osmotina i els altres dos amb estructura semblant a la taumatina, tots ells formen part de la família de proteïnes-PR5; en aquest estudi no s'identifica cap proteïna-PR3 (família de les quitinases).

Molts autors han intentat caracteritzar les diferents varietats de raïm en funció del perfil de proteïnes-PR dels diferents vins, però els resultats obtinguts encara són una mica confusos (González-Lara i col., 1989; Pueyo i col., 1993; Moreno-Arribas i col., 1999; Hayasaka i col., 2001 i 2003).

Tot seguit es descriuran les proteïnes-PR identificades en el vi, aquestes formen part principalment de les famílies PR2, PR3, PR4 i PR5.

### 1.3.1. Proteïnes-PR2.

La família de les proteïnes-PR2 té activitat  $\beta$ -1,3-glucanasa, són proteïnes que s'encarreguen de la hidròlisi dels  $\beta$ -1,3-glucans, polisacàrids presents en la paret cel·lular de molts fongs, són proteïnes minoritàries i han estat identificades en pocs estudis (Kraeva i col., 1998; Ferreira i col., 2002; Sarry i col., 2004; Cilindre i col., 2008). En la Figura 1F podem observar l'estructura quaternària de la  $\beta$ -1,3-Glucanasa de *Vitis vinifera*.



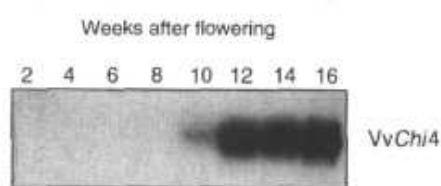
**Figura 1F.** Estructura quaternària de la  $\beta$ -1,3-Glucanase de *Vitis vinifera*.

## Introducció

### 1.3.2. Proteïnes-PR3: les quitinases.

Les quitinases [poli(1,4-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina) glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.14] degraden la quitina. La quitina és un polímer de N-acetil-D-glucosamina, amb unions  $\beta$ -1-4, sovint situat a la paret cel·lular dels fongs patògens i als exosquelets dels artròpodes (Mauch i col., 1988a i 1988b). Aquest enzim normalment és multifuncional, i a més pot tenir activitat quitosanasa o liozima. Les quitosanases hidrolitzen el quitosan (quitina desacetilada), component de la paret cel·lular dels fongs; la liozima hidrolitza mureïna (un peptidoglicà), és un component de la paret cel·lular dels bacteris. La purificació de la liozima i de les quitinases, ha permès observar *in vitro* que inhibeixen el creixement d'alguns fongs i d'alguns bacteris patògens (Mauch i col., 1988a i 1988b; Stintzi i col., 1993).

L'activitat quitinasa augmenta al principi de la etapa de maduració del raïm, i continua augmentant mentre s'acumula sucre durant l'etapa de creixement del raïm (Robinson i col., 1997; Derckel i col., 1996 i 1998); podem observar a la Figura 1G, l'augment en la concentració de quitinases a partir de la desena setmana després de la floració. Com ja hem descrit anteriorment aquesta característica és comú en totes les proteïnes-PR del raïm.



**Figura 1G.** Expressió del gen *VvChi4* al llarg de l'etapa de maduració del raïm. (Robinson i col., 1997)

**Taula 1D.** Massa molecular de les proteïnes-PR del vi. (Pocock i col., 2000)

protein	$M_r$ by	
	SDS PAGE <sup>a</sup>	ESI-MS <sup>b</sup>
VVTL1	24 000	21 272 <sup>c</sup>
minor TL	25 000	21 260
ChitA	32 000	25 942
ChitB	33 000	25 588
ChitC	32 000	25 410
ChitD	34 000	25 457

<sup>a</sup> Estimated from comparison to standards,  $\pm 2000$  Da. <sup>b</sup>  $\pm 5$  Da. <sup>c</sup> Ion at 21 250 also detected in all samples of VVTL1 and under all conditions of mass spectrometry.

En l'anàlisi electroforètic dels teixits del raïm s'ha observat fins a 13 isoformes diferents de quitinasa, 4 d'elles amb propietats bàsiques i 9 amb propietats àcides (Derckel i col., 1996).

El percentatge de participació de les diferents quitinases en el contingut proteic total del vi es força heterogeni tal i com es pot observar en la Figura 1E. En aquest estudi però s'han detectat només sis quitinases, les tres més abundants són la ChitB (9%), la ChitC (12%) i la ChitD (20%). La ChitA és minoritària (6%), també trobem la ChitE i la ChitF, entre les dues representen el 3% del contingut proteic (Waters i col., 1998; Pocock i col., 2000). La massa molecular d'aquestes es pot observar a la Taula 1D. Estudis realitzats mitjançant la tècnica d'espectrometria de masses, han permès identificar fins a 9 quitinases diferents presents en el vi, aquestes tenen una massa molecular entre 25.329 i 25.958 Da (Waters i col., 1998; Pocock i col., 2000; Hayasaka i col., 2001).

## Introducció

El grup de les proteïnes-PR3 està format principalment per les quitinases, però les quitinases també es troben distribuïdes per altres famílies de proteïnes-PR (PR4, PR8 i PR11) (van Loon i col., 2006). En la Figura 1H podem observar l'estructura quaternària de les quitinasa 3 de *Vitis vinifera*.



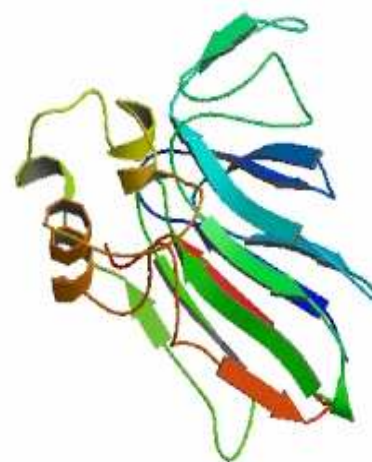
**Figura 1H.** Estructura quaternària de la quitinasa de *Vitis vinifera* (CHIT3\_VITVI).

### 1.3.3. Proteïnes-PR4.

L'anàlisi per HPLC acoblat a masses ha permès identificar tres proteïnes-PR4 en el raïm amb una massa molecular de 12.905, 12.995 i 13.020 Da respectivament (Hayasaka i col., 2001). La proteïna amb massa molecular 13.020 Da s'ha caracteritzat com a *VvPR-4a* per anàlisi de la seqüència del cDNA, les altres dues proteïnes no han estat identificades; es coneix que el gen *VvPR-4a* forma part d'una família multigènica altament relacionada en la que hi ha entre dos i cinc gens (Tattersall, 1999). Quitinases de la classe 1 i 2 estan incloses en aquest grup de proteïnes (Ferreira i col., 2002).

### 1.3.4. Proteïnes-PR5: la taumatina.

En el grup de les proteïnes-PR5, es troben la taumatina, la osmotina i les proteïnes amb estructura semblant a la taumatina i a la osmotina; totes elles estan presents en el vi. Són proteïnes amb estructura compacta i globular, amb pocs llocs disponibles per l'acció de les proteases (Tattersall i col., 2001). Aquest grup de proteïnes s'han conservat al llarg de l'evolució i normalment tenen propietats àcides. No tenen una funció massa coneguda, però alguns experiments *in vitro* han demostrat activitat antifúngica (Hejgaard i col., 1991; Vigers i col., 1991; Woloshuk i col., 1991; Abad i col., 1996).



**Figura 1I.** Estructura quaternària de les proteïnes-PR5. (*Nicotiana Tabacum*)

La taumatina va ser identificada per primer cop en els fruits de la planta monocotiledònia de l'oest d'Àfrica *Thaumatococcus daniellii* (Van der Wel i Loeve, 1972). La taumatina és un potent edulcorant utilitzat habitualment en la indústria alimentària. Aquesta propietat però sembla no estar present en les proteïnes amb estructura semblant a la taumatina presents en el vi, ja que no s'ha observat diferències significatives entre l'aigua i l'aigua amb diferents dosis de la fracció vínica que conté les proteïnes amb estructura semblant a la taumatina, per tan l'efecte edulcorant d'aquestes proteïnes no és present als nivells de fracció vínica utilitzats en el tast (Peng i col., 1997). S'ha postulat que la presència

## Introducció

i la posició espacial dels residus de leucina de la taumatina, és una característica important respecte a les propietats edulcorants d'aquesta (Ogata i col., 1992; Van der Wel i Bel, 1976). La baixa concentració d'aquests residus bàsics en les proteïnes àcides amb estructura semblant a la taumatina presents al vi, és una possible explicació de la pèrdua de la propietat edulcorant d'aquestes. Per mètodes immunològics s'han identificat dues regions en la seqüència aminoacídica de la taumatina relacionades amb la propietat edulcorant i potenciadora de gust d'aquesta proteïna (Slootstra i col., 1995); en aquestes regions les proteïnes amb estructura semblant a la taumatina que conté el vi només presenten un 37% d'homologia. La pèrdua d'homologia en aquestes regions relacionades directament amb la propietat edulcorant i potenciadora del gust de la taumatina, ja s'han descrit en altres plantes, com per exemple la planta del tabac (Singh i col., 1987) i el cirerer (Fils-Lycaon i col., 1996), i com en el cas de les proteïnes amb estructura semblant a la taumatina del vi, aquestes proteïnes no són edulcorants. Es considera que la presència d'aquestes regions en la seqüència aminoacídica, és el tret diferenciador entre la taumatina i les proteïnes amb estructura semblant a la taumatina (Peng i col., 1997). Sembla ser però que les proteïnes amb estructura semblant a la taumatina presents en el vi actuen com a potenciadors del gust, incideixen en la percepció dels gustos metàl·lics i amargs, i actuen sinèrgicament amb altres potenciadors del gust com és el glutamat monosòdic.

S'han identificat tres proteïnes amb estructura semblant a la taumatina en el vi (Figura 1E); la VVTL1, la VVTL2 i la VVTL3, *Vitis vinifera thaumatin-like protein* 1, 2 i 3 respectivament (Tattersall i col., 1997; Peng i col., 1997; Waters i col., 1998). Tal i com s'observa en la Figura 1E, la VVTL1 és la proteïna-PR5 més abundant en el vi, representa el 42% del contingut proteic (Waters i col., 1998), mentre que les altres dues són minoritàries i ambdues representen el 8% de la proteïna total (Peng i col., 1997; Waters i col., 1998). Aquestes proteïnes tenen una massa molecular entre 21.272 i 21.239 Da (Pocock i col., 2000; Hayasaka i col., 2001); segons els resultats que es mostren en la Taula 1D a la VVTL1 li correspon una massa molecular de 21.272 Da (Pocock i col., 2000).

La VVTL1 està codificada per un gen que forma part d'una família multigènica, en el raïm s'expressa per combinació de la concentració de sucre acumulat i la tovor del gra (Tattersall i col., 1997). La funció exacta de la VVTL1 és desconeguda, però la seva acumulació en el raïm està correlacionada amb la capacitat de *Uncinula necator* a iniciar noves infeccions en aquest (Tattersall i col., 1997). Podem observar en la Figura 1J que la VVTL1 apareix en el raïm 11 setmanes després de la floració i es a partir de llavors que es comença a acumular

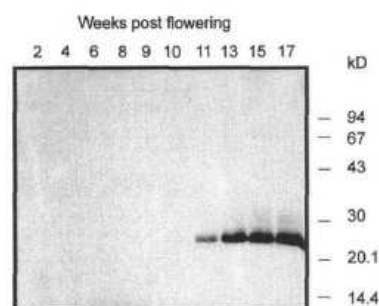


Figura 1J. Acumulació de la VvTL1.  
(Tattersall i col., 1997)

## Introducció

en el raïm, ja que cada cop la banda electroforètica és més intensa degut a una major concentració d'aquesta, característica que també hem descrit en les quitinases.

Les proteïnes amb estructura semblant a la osmotina presents en el vi, a diferència de les que tenen estructura semblant a la taumatina, s'han caracteritzat com a proteïnes amb propietats bàsiques (Monteiro i col, 2001; Capelli i col., 1997; Takeda i col., 1991; Singh i col., 1987).

### 1.4. Glicosilació de les proteïnes del vi blanc.

La glicosilació proteica té lloc normalment en el reticle endoplasmàtic rugós de les cèl·lules eucariotes del raïm i del llevat. Aquest procés àmpliament distribuït per tota la naturalesa, consisteix en la modificació de l'estructura de la proteïna per l'addició de carbohidrats; quan el monosacàrid que s'uneix és la glucosa s'anomenarà glucoproteïna i quan és la mannososa, mannoproteïna. Aquest procés normalment marca el destí de la proteïna i també ajuda en el plegament espacial de l'estructura quaternària d'aquesta.

Tres fraccions glicoproteiques es van identificar en el vi en els primers estudis realitzats, aquestes fraccions tenen una massa molecular de 12.6, 25 i 28 KDa, respectivament (Hsu i Heatherbell, 1987a). Estudis més recents en els que s'ha combinat la electroforesis desnaturant amb la tinció de l'àcid periòdic (PAS), tinció específica de glicoproteïnes, han permès identificar quatre fraccions polipeptídiques de massa molecular 20, 25, 30 i 65 KDa respectivament, aquestes fraccions ja estan presents en el most. La utilització de Concanavalina A (ConA) ha permès aïllar aquestes fraccions proteiques glicosilades. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 1K i corroboren els ja descrits anteriorment (Waters i col., 1993; Marchal i col., 1996 i 1998; Weiss i col., 1998; Dambrouck i col., 2003;).

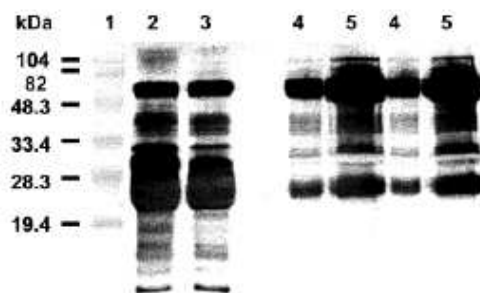


Figura 1K. Glicoproteïnes del vi blanc. (1) estàndards; (2) most; (3) vi blanc; (4 i 5) anàlisi amb ConA. (Dambrouck i col., 2003)

Hi ha estudis que evidencien la glicosilació de la major part de les proteïnes del vi, el percentatge de glicosilació pot variar entre el 0.3 i el 33,3% (Dambrouck i col., 2003). La fracció de glicoproteïnes més important quantitativament en el vi conté menys d'un 10% de glicosilació, té una massa molecular entre 12.1 i 30.8 KDa i el punt isoelèctric oscil·la entre 3.7 i 4.9, els monosacàrids implicats són l'arabinosa, la ramnosa, la galactosa i la glucosa (Yokotsuka i Singleton, 1997).

## Introducció

En el vi també trobem molècules amb un baix contingut proteic però que estan altament glicosilades; en aquest cas el percentatge de la part proteica pot ser inferior al 10% i per això molts autors les consideren polisacàrids i no proteïnes. Mitjançant estudis electroforètics en condicions desnaturalitzants i utilitzant la tinció de l'àcid periòdic (PAS), s'ha observat que principalment aquestes molècules tenen un elevada massa molecular de  $\approx 100$  KDa. Es tracta d'arabinogalactans, procedents del raïm (Saulnier i col., 1992; Waters i col., 1994a) i mannopteïnes procedents del llevat (Waters i col., 1993; Marchal i col., 1996; Dupin i col., 2000a; Dambrouck i col., 2003). Aquestes macromolècules a diferència de les proteïnes o de les glicoproteïnes no es tenyeixen amb Coomassie Blue ni amb tinció de plata (Waters i col., 1993; Frevert i Ballou, 1985).

S'ha descrit un perfil glicoproteic diferent al llarg de les diferents etapes de vinificació, i s'ha observat una marcada disminució en la concentració de les glicoproteïnes durant el procés de la fermentació alcohòlica. Llavors la glicosilació de les proteïnes no implica una estabilització d'aquestes davant de la desnaturalització i posterior precipitació per augment de la concentració d'etanol o per la disminució del pH, i tampoc no està relacionada amb la resistència a la proteòlisis (Yokotsuka i Singleton, 1997).

### 1.5. Composició aminoacídica de les proteïnes del vi blanc.

A partir d'estudis realitzats mitjançant HPLC s'ha observat que entre el 65 i el 80% dels aminoàcids que formen part de la seqüència aminoacídica de les proteïnes del vi són aminoàcids hidrofílics, entre els quals la serina, l'aspàrtic i el glutàmic són els aminoàcids polars majoritaris i la glicina i la alanina són els aminoàcids no polars més abundants. El percentatge aminoacídic restant està constituït principalment per aminoàcids hidrofòbics entre els quals els majoritaris són la leucina, la valina i en alguns casos la prolina (Santoro, 1995). La composició aminoacídica és tan semblant entre les proteïnes del vi que aquest autor suggereix que o totes les fraccions proteiques del vi formen part d'un grup similar de proteïnes o totes han estat originades per hidròlisis del mateix complex proteic.

### 1.6. Factors que influeixen en el contingut proteic del vi blanc.

Els factors que influeixen en el contingut proteic del vi blanc són diversos, i a més, estan presents tant en el procés de formació del raïm com al llarg de l'etapa de recol·lecció i vinificació d'aquest. Ara bé, és durant la fermentació alcohòlica que hi té lloc la principal disminució del contingut proteic del vi.

## Introducció

### 1.6.1. Factors que influencien quantitativament en el contingut proteic del vi blanc.

Existeix un ampli i variat ventall de factors que poden influenciar en la concentració final de proteïna en el vi, a continuació es descriuen els més importants:

La varietat de *Vitis vinifera* marca significativament la concentració de proteïna, no totes les varietats donaran lloc a vins amb igual concentració proteica (Lamikanra i Inyang, 1988). Per exemple, la concentració de proteïna en vins obtinguts a partir de la varietat *Sauvignon Blanc* serà major que la dels vins obtinguts a partir de la varietat *Macabeu*.

Els factors mediambientals com el clima i el tipus de sòl de la regió on s'ha cultivat el raïm, així com l'estat sanitari del raïm també influencien en la concentració proteica. Raïms de la mateixa varietat de *Vitis vinifera*, però d'anyades diferents, o de regions diferents, poden tenir diferent concentració proteica (Dizy i Bisson, 1999; Sarmiento i col., 2001). En la Taula 1C i Figura 1D es pot observar com influencia l'estat sanitari del raïm en el contingut proteic del vi final (Girbau i col., 2004).

L'estat de maduresa en el que es cull el raïm està relacionat directament amb la concentració de proteïnes solubles en el vi; a més maduresa del raïm més concentració proteica en el vi, ja que la concentració de proteïna en el raïm augmenta al llarg del procés de maduració (Murphey i col., 1989). Aquest punt s'ha ampliat en l'apartat en el que s'estudia les proteïnes-PR del vi (Figura 1G i 1J).

Estudis recents però indiquen que els factors mediambientals i l'estat sanitari del raïm, són més decisius que el grau de maduresa del raïm en l'expressió i acumulació de les proteïnes del raïm (Monteiro i col., 2003a).

El tipus de verema condiona la concentració de proteïnes al most; la verema mecànica augmenta la concentració de proteïna degut a una menor integritat del gra de raïm en comparació a la verema tradicional a mà (Paetzold i col., 1990; Derckel i col., 1996 i 1998). La verema mecànica permet el contacte del suc del raïm amb la pell o altres parts del raïm, tot afavorint l'extracció proteica i així augmentant la concentració de proteïna en el most. La verema mecànica seguida d'un llarg transport, implica un vi més inestable degut a l'augment de la concentració proteica en aquest (Pocock i Waters, 1998b).

L'augment de la pressió de premsat incrementa la concentració de proteïnes en el most obtingut, ja que hi té lloc un augment en l'extracció proteica.

La maceració pel·licular abans de la fermentació, incrementarà la concentració de proteïna final degut al contacte del suc del raïm amb les pells, s'afavoreix l'extracció de proteïnes procedents de la pell del raïm (Paetzold i col., 1990); aquesta aportació no serà molt important perquè ja hem vist anteriorment que la pell conté poca proteïna (Taula 1A).

En el desfangat s'observa activitat proteolítica degut a les proteases del raïm que degraden parcialment les proteïnes del most, les proteases del raïm es troben en les parts

## Introducció

sòlides i en la polpa. La sedimentació d'aquestes parts sòlides juntament amb els enzims proteolítics que contenen, afavoreix la disminució de l'activitat proteolítica sobre les proteïnes del most.

La fermentació alcohòlica és la principal causa de la disminució en el contingut proteic del vi respecte al most; l'augment de la concentració d'etanol que té lloc al llarg de la fermentació alcohòlica afavoreix la desnaturalització proteica i posterior precipitació per insolubilització de les proteïnes del most. La concentració de proteïnes en el most oscil·la entre 180 i 790 mg/l, mentre que en el vi està entre 15 i 230 mg/l (Bayly i Berg, 1967); en el vi hi ha entre el 25-50% menys de proteïna que en el most (Kock i Sajak, 1959; Murphey i col., 1989; Santoro, 1995). Canals i col., (1998) en l'estudi de les proteïnes del most i del vi mitjançant cromatografia d'exclusió molecular i d'intercanvi catiònic mostren aquesta disminució en la concentració de proteïnes del vi respecte al most (Figura 1L).

Els tractaments postfermentatius que s'utilitzen per estabilitzar el vi acabat abans d'embotellar-lo també impliquen una disminució del contingut proteic, es pot observar a la Figura 1L. El tractament amb bentonita (es descriu més àmpliament en apartats posteriors), que es realitza en el procés de clarificació del vi blanc implica una disminució important de la concentració proteica del vi. El tractament criogènic per eliminar els sòlids en suspensió i en dissolució, així com l'excés de bitartrat de potassi i de tartrat neutre de calci, també té influència en la concentració final de proteïna en el vi.

Hem pogut comprovar que existeixen nombrosos factors que influeixen en la concentració final de proteïna del vi blanc; aquests estan distribuïts al llarg de les diferents etapes de creixement i desenvolupament del raïm (en el cep), i al llarg del procés d'elaboració del vi. Es necessari doncs, un bon control de tots aquests factors per poder obtenir un vi amb una concentració proteica adequada.

### 1.6.2. Factors que influeixen qualitativament en el contingut proteic del vi blanc.

Molts autors han estudiat la influència en el contingut proteic del vi, de la varietat del raïm, la tècnica de vinificació utilitzada, l'anyada, la regió en la que s'ha cultivat el raïm,... La

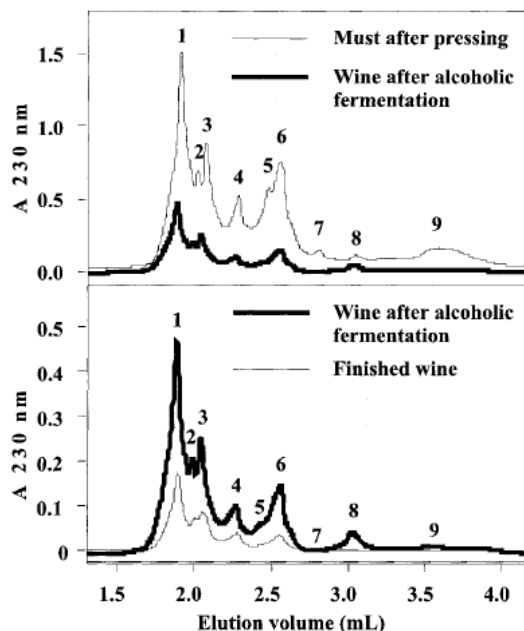


Figura 1L. Separació mitjançant intercanvi catiònic de les proteïnes del most, del vi després de la fermentació i del vi acabat. (Canals i col., 1998)



## Introducció

utilització de tècniques immunològiques ha permès conèixer que vins obtinguts a partir de varietats diferents, ja sigui de raïm blanc o negre, o elaborats per diferents tècniques de vinificació, d'anyades diferents i procedents de regions diferents, estan formats per fraccions polipeptídiques de massa molecular similar; si la regió de la que procedeixen i l'anyada és la mateixa llavors aquestes fraccions són idèntiques (Ferreira i col., 2000). L'anàlisi mitjançant MALDI-TOF de les proteïnes del vi de varietats i anyades diferents, així com de regions diferents i utilitzant tècniques de vinificació diferent, corrobora que les fraccions polipeptídiques tenen masses moleculars similars i que per tan no hi ha diferències entre els perfils polipeptídics d'aquests vins (Weiss i col., 1998). Així doncs aquests factors (la varietat de *Vitis vinifera*, l'anyada, la regió, el clima, el sòl, la tècnica de vinificació utilitzada), condicionaran la concentració final de proteïna en el vi, com ja s'ha vist anteriorment, però sembla que no estan tan relacionats amb el contingut proteic, o sigui són factors importants a nivell quantitatiu però no tan a nivell qualitatiu.

La majoria dels estudis realitzats per tal de conèixer quins factors influeixen qualitativament en el contingut proteic del vi, han demostrat que la fermentació alcohòlica és el principal i més important procés implicat en la variació de la composició proteica final del vi (Figura 1L).

A més a més però, les proteïnes sofreixen proteòlisis, hidròlisis en la seqüència aminoacídica que implica pèrdues aminoacídiques més o menys importants i per tant canvis a nivell d'estructura i principalment de càrrega elèctrica. En el vi hi ha proteïnes que poden tornar-se insolubles degut a la proteòlisis però també hi ha fraccions proteiques que en són resistents. La proteòlisis d'aquestes fraccions proteiques resistents genera una amplí i variat rang de polipèptids que difereixen només per alguns aminoàcids en funció del grau de proteòlisis sofert (Monteiro i col., 2001). La proteòlisis enzimàtica pot donar-se per acció d'enzims procedents de llevat (Feuillat i col. 1980), d'origen bacterià (Farías i Manca de Nadra, 2000) o bé procedents de fongs patògens (Marchal i col., 1998; Girbau i col., 2004). La proteòlisis enzimàtica d'origen fúngic genera canvis en el perfil proteic del vi i aquests seran més importants com més infectat estigui el raïm tal i com s'observa en la figura 1D (Girbau i col., 2004); així doncs l'estat sanitari en el que es troba el raïm influeix tan quantitativa com qualitativament en el contingut proteic del vi. Hi ha estudis que suggereixen que les proteïnes resistents a la proteòlisis no posseeixen intrínsecament la propietat de ser resistents (Dizy i Bisson., 1999), sinó que l'adquireixen per associació amb els compostos fenòlics (Heatherbell i col., 1984), o degut a la seva glicosilació (Waters i col., 1995b); en altres estudis s'ha demostrat que aquesta propietat no està relacionada ni amb la presència d'inhibidors, ni dels polisacàrids que actuen com a col·loides protectors (Waters i col., 1992).

## Introducció

Llavors, tan la fermentació alcohòlica com la proteòlisis són els factors responsables del procés selectiu d'extracció de proteïnes del most, en el vi trobarem principalment les proteïnes resistents a aquestes condicions (Ferreira i col., 2002). Aquestes proteïnes ja han estat descrites per molts autors i són les proteïnes-PR, com ja hem descrit en apartats anteriors són aquestes les proteïnes majoritàries en el vi (Waters i col., 1992 i 1996; Monteiro i col., 2006). El mecanisme pel qual aquestes proteïnes són resistents a l'etanol o a la proteòlisis no està del tot clar, però aquestes propietats són típiques de les proteïnes-PR en general.

## 2. Influència de les proteïnes en les propietats organolèptiques del vi.

Les proteïnes del vi poden unir-se a compostos volàtils tot estabilitzant l'aroma del vi (Lubbers i col., 1994); protegeixen el vi de la precipitació tartàrica (Lubbers i col., 1993; Gerbaud i col., 1997; Moine-Ledoux i col., 1997); són en part responsables de la sensació de untuositat i cos en els vins (Kwon, 2004); estan relacionades directament en la estabilitat de l'escuma del cava o del *champagne* (Brissonnet i Maujean, 1991; Malvy i col., 1994; Pueyo i col., 1995; Andrés-Lacueva i col., 1996); i les mannoproteïnes estan implicades en la reducció de la terbolesa dels vins inestables (Waters i col., 1993, 1994a i 1994b).

Fins ara només hem enumerat les propietats organolèptiques del vi en les que les proteïnes influencien positivament, però les proteïnes també estan implicades en la inestabilitat del vi blanc, un dels problemes d'origen no microbiològic més important del vi blanc embotellat (Bayly i Berg, 1967; Waters i col. 1992). Un vi blanc embotellat que no sigui estable, d'aspecte tèrbol, no s'accepta per ser venut i llavors no es pot comercialitzar. Aquesta terbolesa, es pot observar en la Figura 2A, apareix quan les proteïnes deixen de ser estables i precipiten, per això aquest problema es coneix com inestabilitat proteica. En la indústria enològica existeixen moltes tècniques per tal d'eliminar aquestes proteïnes inestables i així evitar aquesta precipitació en botella (s'estudia més àmpliament en apartats posteriors), però la seva eliminació està directament relacionada amb la disminució de les propietats organolèptiques en les que hi són beneficioses.

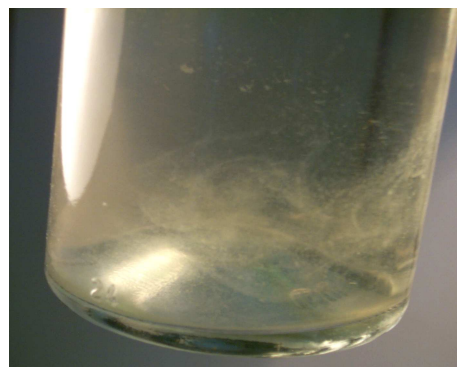


Figura 2A. Enterboliment que apareix en el vi blanc embotellat .

### 3. Les proteïnes inestables.

Durant els darrers 50 anys molts investigadors han intentat identificar i caracteritzar les proteïnes inestables del vi ja que aconseguir-ho implicaria conèixer les seves propietats físico-químiques i així trobar un mètode òptim per a la seva eliminació. Quines són les proteïnes inestables del vi?, Quina és la seva massa molecular?, Quin és el seu pI?, Quin és el mecanisme de precipitació d'aquestes?, són els temes que es tractaran en aquest apartat.

Inicialment es creia que la precipitació proteica estava relacionada amb totes les proteïnes del vi, llavors era evident pensar que un vi amb més concentració proteica seria més inestable que un vi amb una concentració proteica inferior. Però tal i com s'observa a la Figura 3A, no hi ha una correlació directa entre la concentració total de proteïna en el vi i la inestabilitat d'aquest (vers la temperatura), ja que el vi B conté aproximadament la meitat de proteïna que el vi A i en canvi és lleugerament més inestable que aquest (Hsu i Heatherbell, 1987a), aquests resultats han estat corroborats per altres autors (Moretti i Berg, 1965; Bayly i Berg, 1967; Waters i col. 1991; Dizy i Bisson, 1999; Mesquita i col., 2001). Així doncs, serà l'estudi de les fraccions proteiques del vi i no la concentració total de proteïnes que aquest conté, que ens permetrà conèixer les proteïnes inestables del vi.

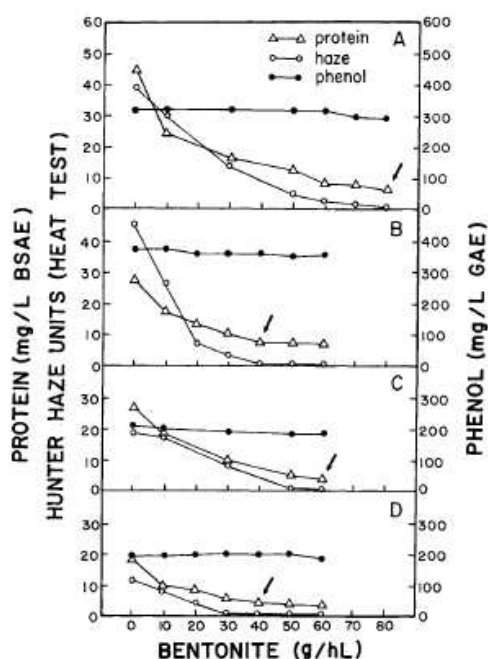


Figura 3A. Variació en la concentració de proteïna i de compostos fenòlics, així com de la inestabilitat del vi amb el tractament amb bentonita. (Hsu i Heatherbell, 1987b)

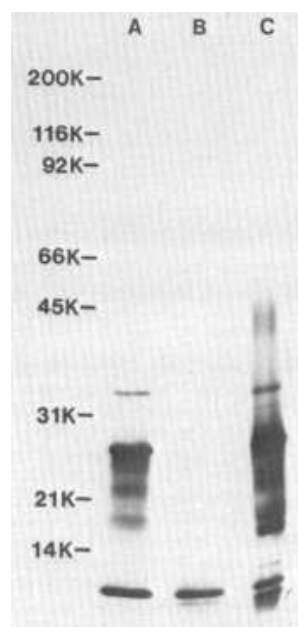


Figura 3B. Separació electroforètica de les proteïnes termoestables del vi blanc. (A i B) vi abans i després d'aplicar calor; (C) precipitat. (Hsu i Heatherbell, 1987b)

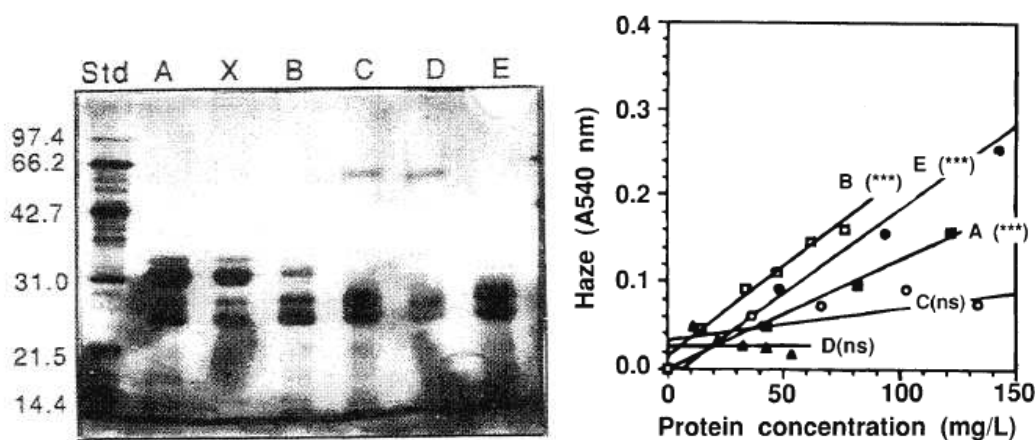
Els estudis basats en la identificació de les proteïnes inestables del vi segueixen dues estratègies experimentals diferents: la primera consisteix en l'estudi del precipitat que

## Introducció

apareix en els vins inestables després d'aplicar el test del calor (Hsu i Heatherbell, 1987b); i la segona consisteix en l'obtenció de les diferents fraccions proteiques del vi per precipitació d'aquestes amb percentatges creixents de sulfat d'amoni saturat, aquestes fraccions s'addicionen de nou al vi i s'aplica calor (80 °C, 6h) al vi enriquit amb cada fracció, les fraccions estables seran aquelles que després d'addicionar-les al vi no augmenten la terbolesa d'aquest respecte el vi inicial (Waters i col., 1991). En cap dels dos casos es treballa amb una precipitació natural de les proteïnes del vi.

En la Figura 3B es mostra la separació mitjançant LDS-PAGE de les proteïnes del precipitat obtingut després d'aplicar al vi inestable el test del calor; es pot deduir que són pràcticament totes les fraccions proteiques inicialment presents en el vi (carrera A), les que precipiten quan s'aplica calor al vi (carrera C). Són però, les proteïnes de baixa massa molecular (12.6, entre 20 i 30 KDa) les que estan directament implicades en la inestabilitat proteica (Hsu i Heatherbell, 1987b).

Cinc fraccions proteiques majoritàries hi ha en el vi blanc segons Waters i col. (1991) quan es realitza un fraccionament de les proteïnes del vi amb dosis creixents de sulfat d'amoni, aquestes fraccions estan formades principalment per proteïnes amb massa molecular 24, 32 i 63 KDa respectivament (Figura 3C esquerra); totes les fraccions contribueixen en la formació de terbolesa ja que en tots els casos al augmentar la dosis addicionada al vi inicial s'observa un augment en la formació de terbolesa (Figura 3C dreta). La fracció E genera un 50% més de terbolesa que la fracció B. La fracció E conté principalment les proteïnes de massa molecular 24 KDa, mentre que la fracció B conté a més de les proteïnes de massa molecular 24 KDa les de massa molecular 32 KDa. Les fraccions C i D no generen un augment de la terbolesa proporcional a l'augment en la concentració d'aquestes fraccions en el vi. Aquestes fraccions contenen una proteïna de



**Figura 3C.** Separació electroforètica de les diferents fraccions proteiques del vi obtingudes per precipitació mitjançant percentatges creixents de sulfat d'amoni (esquerra); influència de les diferents fraccions proteiques en la inestabilitat del vi quan s'aplica calor (dreta). (A) 60%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; (B) entre 65-70%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; (C) fraccions que no precipiten amb un 70% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Waters i col., 1991)

## Introducció

massa molecular 63 KDa, alguns estudis suggereixen que aquesta proteïna actua com a factor protector de la terbolesa, és termostable i està glicosilada (Bayly i Berg, 1967; Hsu i Heatherbell, 1987b; Waters i col., 1991; Waters i col., 1993).

Ambdues estratègies descrites en aquest apartat sobre l'estudi de les proteïnes inestables mostren resultats semblants, les proteïnes inestables del vi tenen una massa molecular entre 20 i 32 KDa. La seqüenciació de les fraccions de 24 i 32 KDa ha permès identificar aquestes proteïnes; són proteïnes-PR i principalment s'han trobat quitinases i proteïnes amb estructura semblant a la taumatina (Waters i col., 1992), aquestes seran doncs les proteïnes responsables de la terbolesa dels vins blancs embotellats (Waters i col., 1998). Són proteïnes amb propietats àcides (pI entre 4.1 i 5.8) i estan glicosilades (Hsu i Heatherbell, 1987b).

**Taula 3A.** Separació de les proteïnes del vi segons el seu pI (dalt); tipus de sediment generat pels diferents grups de proteïnes obtinguts per separació en funció del pI (baix). (Dawes i col., 1994)

Sample	Fraction no.	pI range	No. of proteins in each group	Protein* (µg)
Group I	1 - 2	> 7.00	16	1520
Group II	3 - 6	≥ 7.00	10	8650
Group III	7 - 9	7.00 - 5.94	0	trace
	10 - 12	5.94 - 5.36	8	1780
Group IV	13 - 16	5.36 - 4.65	7	3790
Group V	17 - 31	4.65 - 3.80 (frac. 31 < 3.80)	12	3720

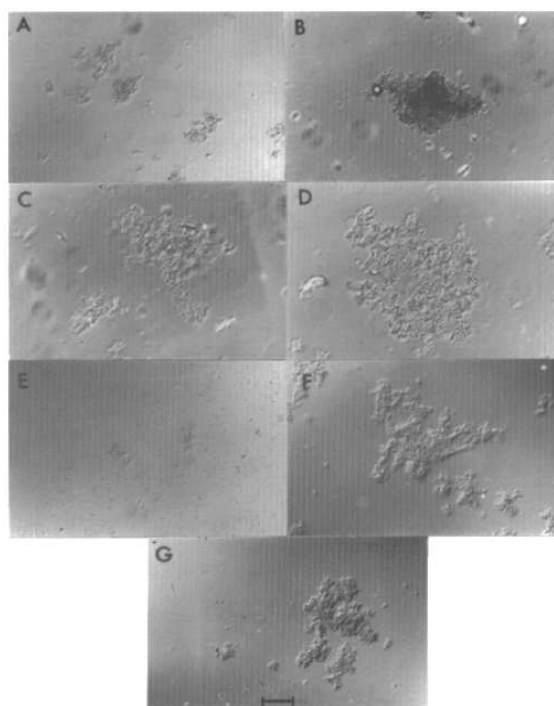
Protein fractions added to protein-free wine	Concentration of protein <sup>b</sup> in sample (mg/L)	Haze after heat/cold test <sup>a</sup>		Protein <sup>b</sup> in supernatant after heat/cold test (mg/L)
		visual clarity <sup>c</sup>	A <sub>650 nm</sub>	
Group I	65.30	++ 1 mm compact sediment	0.057	17.93
Group II	77.54	++ 1 mm compact sediment	0.082	19.18
Group III	69.51	+ 5.5 mm floccular sediment	0.042	7.02
Group IV	75.42	+ 4.5 mm floccular sediment	0.111	10.59
Group V	75.42	+ suspended haze	0.041	29.10
<b>Controls</b>				
Groups I - V (in protein-free wine)	82.22	++ 1 mm compact sediment	0.053	18.55
Groups I - V (in tartrate buffer)	77.12	++ 1 mm compact sediment	0.049	22.11
Tartrate buffer (in protein-free wine)	9.33	-	0.019	5.55

Dawes i col. (1994), han estudiat la influència del pI de les diferents fraccions proteiques del vi en la inestabilitat d'aquest, també han utilitzat el test del calor com a criteri d'estabilitat de les diferents fraccions obtingudes. Segons aquest estudi totes les proteïnes del vi són termolàbils, són inestables amb la temperatura, resultats que corroboren els mostrats anteriorment, ara bé no totes les fraccions flocculen o precipiten de la mateix manera. Són cinc les fraccions proteiques obtingudes després de separar les proteïnes del vi en funció del seu pI; la fracció majoritària té un pI ≥ 7 (Grup II Taula 3A dalt) seguit per les fraccions amb pI entre 5.36 i 3.80 (Grup IV i V Taula 3A dalt). La concentració proteica d'aquestes fraccions disminueix en tots els casos quan al vi s'aplica el test del calor, ara bé,

## Introducció

la disminució és més o menys accentuada en cadascuna d'elles (Taula 3A baix). La fracció amb pI entre 5.94 i 5.36 és la que presenta una major disminució en la seva concentració respecte el vi inicial ja que després d'aplicar el test del calor, només hi roman el 10% de la concentració inicial; el 14% de les proteïnes del grup IV només resta en el vi després d'aplicar el test del calor; el grup de proteïnes més termostables correspon al format per les proteïnes més àcides (Grup V), en aquest cas després d'aplicar el test del calor el 38% d'aquestes romanen en el vi .

Ja hem vist que els diferents grups de fraccions obtingudes en funció del pI es comporten de manera diferent davant del test del calor, però a més, aquestes fraccions també donen lloc a diferents tipus de precipitat tal i com s'observa en la Taula 3A (baix) i en les imatges de la Figura 3D. El precipitat generat per les proteïnes amb elevat pI ( $\geq 7.0$ ) és el més compacte; el precipitat de les proteïnes amb pI intermedi (5.94-5.36 i 5.36-4.65) és entre 4 i 5 cops superior al obtingut per les proteïnes amb elevat pI i és un precipitat molt menys compacte; el precipitat de les proteïnes amb pI baix ( $\leq 4.65$ ) és una suspensió. Segons aquests resultats, totes les proteïnes del vi són termoinestables però són les que tenen un pI entre 6 i 4.5 les més inestables. A més, també podem concloure que els precipitats obtinguts són més compactes com més alt és el seu pI.



**Figura 3D.** Aparença dels precipitats generats al aplicar el test del calor en el vi enriquit amb els diferents grups de proteïnes obtinguts per separació en funció del seu pI. (Dawes i col., 1994)

En tots aquests estudis s'utilitza el test del calor per valorar l'estabilitat de les diferents fraccions proteiques del vi, no existeixen estudis en els que es demostrí que el test del calor reproduïx exactament la precipitació natural de les proteïnes inestables del vi blanc, de fet

## Introducció

aquest mecanisme encara és força desconegut, encara que es creu que n'és una aproximació, llavors els resultats obtinguts estan relacionats principalment amb les proteïnes termolàbils del vi.

El mecanisme de precipitació d'aquestes proteïnes inestables del vi encara és incert, sembla que les proteïnes del vi sofreixen una lenta desnaturalització, s'agreguen entre elles i amb altres compostos presents en el vi, el tamany de l'agregat va augmentant progressivament fins que es dona la floculació, i tot seguit la sedimentació i aparició del precipitat (Bayly i Berg, 1967; Hsu i Heatherbell 1987a; Waters i col., 1991 i 1992). Podem observar en la Figura 3F el model descrit en la precipitació proteica segons Ribéreau-Gayon i col., (1976), els dos factors relacionats amb la desestabilització de les proteïnes del vi que implica la desnaturalització d'aquestes estan relacionats amb la hidratació i la càrrega de les proteïnes en solució.

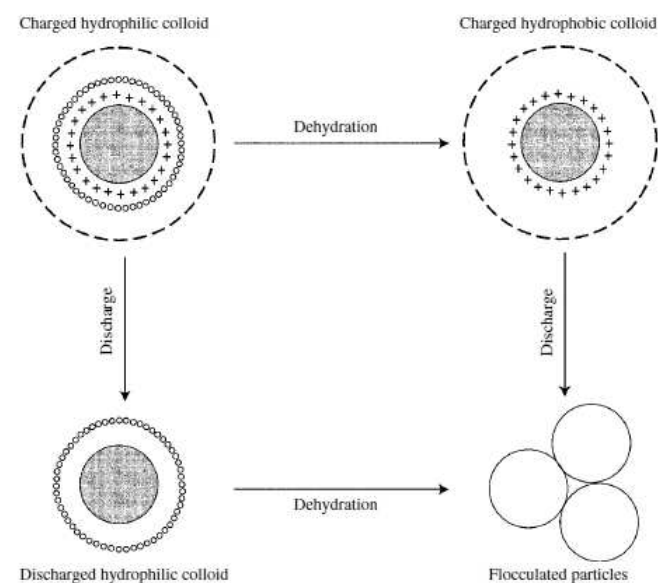


Figura 3F. Model de precipitació de les proteïnes inestables del vi.  
(Ribéreau-Gayon i col., 1976)

## 4. Els tests d'estabilitat.

Després de la fermentació alcohòlica el vi blanc s'estabilitza front possibles precipitacions en botella, com és la precipitació proteica. Un vi blanc embotellat que no sigui estable, d'aspecte tèrbol, no s'accepta per ser venut i llavors no es pot comercialitzar, aquest fenomen es coneix com inestabilitat proteica i tal com ja hem comentat en l'apartat anterior és un dels problemes d'origen no microbiològic més important del vi blanc embotellat.

La estabilització del vi blanc vers la precipitació proteica es dona per addició de determinades substàncies que es coneixen com a clarificants (se'n parla més àmpliament en l'apartat següent), amb capacitat per flocular i sedimentar tot emportant-se les proteïnes presents en el vi. Cada vi inestable però necessita una dosi de clarificant diferent, habitualment s'utilitzen els tests d'estabilitat proteica per tal de conèixer quina és la dosi necessària de clarificant que hem d'addicionar al vi per tal d'estabilitzar-lo.

## Introducció

Els tests d'estabilitat provoquen la precipitació de les proteïnes presents en el vi, i assumeixen que la terbolesa que apareix a posteriori reflexa el potencial d'inestabilitat d'aquest. Si després del tractament amb una dosi determinada de clarificant, apliquem el tests d'estabilitat i ens dóna que el vi és inestable, això ens indica que la dosi no ha estat la adequada i que cal augmentar-la; però si pel contrari el resultat és un vi estable, això no ens assegura que el contingut proteic del vi no acabi precipitant a la botella, només ens indica que en aquests moments el vi és estable. Cada test precipita les proteïnes basant-se en criteris diferents i llavors els resultats entre tests no tenen perquè ser comparatius, de fet normalment tests diferents ens donen resultats diferents. Ja hi ha nombrosos estudis que classifiquen aquests tests en funció de la seva sensibilitat, i així doncs, del grau de credibilitat dels resultats finals (Dubourdieu i col., 1988; Toland i col., 1996).

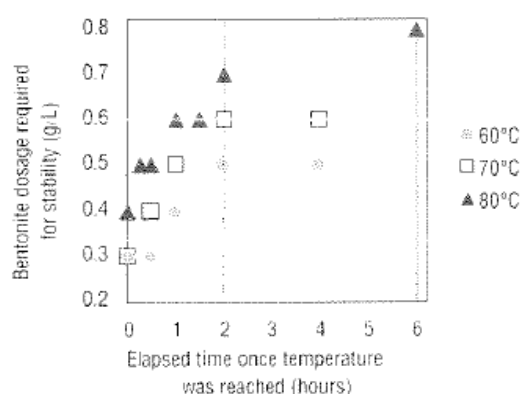
Es considera que un vi és estable, quan l'increment de NTU (unitats de mesura de la terbolesa) entre el vi inicial i el vi després d'aplicar el test d'estabilitat, és inferior a 2 (Moine-Ledoux i Dubourdieu 1999).

De quins tests d'estabilitat disposem per tal de predir la inestabilitat proteica del vi blanc? Com actua cada test? Tot seguit donarem resposta a aquestes preguntes.

### 4.1. El test del calor o test tèrmic.

Aquest test va ser descrit per primer cop per Pocock i Rankine l'any 1973. El test del calor o test tèrmic es considerat per la majoria d'autors test estàndard d'estabilitat proteica. No existeix una temperatura de treball i un temps d'aplicació d'aquesta definit, ara bé en general podem parlar de test del calor o test tèrmic ràpid i lent (Sarmiento i col., 2000a).

Existeixen nombrosos estudis en els que s'intenta optimitzar la temperatura i el temps d'aplicació d'aquesta, ja que el test del calor està àmpliament distribuït però les condicions en les que s'aplica no segueixen una distribució homogènia. En tot cas el que s'ha observat és que l'augment en la temperatura de treball i en el temps d'aplicació d'aquesta, implica un augment en la terbolesa formada i per tan en la dosi final de bentonita a utilitzar per estabilitzar el vi (Pocock i Waters, 2006), aquesta tendència es pot veure representada a la Figura 4A.



**Figura 4A.** Influència de la temperatura i del temps d'aplicació d'aquesta en la dosi de bentonita a utilitzar segons el test del calor. (Pocock i Waters, 2006)



## Introducció

El calor aplicat al vi genera una desnaturalització de les proteïnes termolàbils, i accelera l'oxidació i la condensació dels compostos fenòlics amb les proteïnes. Podem observar a la Taula 4A la disminució en el contingut proteic i polifenòlic de dos vins de la varietat Riesling i Gewürztraminer respectivament; després d'aplicar el test del calor (6h a 80°C, 12h 4°C), hi ha una disminució de aproximadament el 51% en proteïna i del ≈7% en polifenols.

**Taula 4A.** Variació en la concentració de proteïnes i de compostos fenòlics de dos vins blancs després d'aplicar el test del calor. (Hsu i Heatherbell, 1987b)

Sample	Protein (mg/L) <sup>a</sup>	Phenol (mg/L) <sup>a</sup>
Gewürztraminer		
Before treatment	59.2 ± 0.2	302.1 ± 7.7
After treatment	28.6 ± 1.5	282.9 ± 5.4
% Removal	51.7	6.4
White Riesling		
Before treatment	36.1 ± 0.7	371.3 ± 3.1
After treatment	17.8 ± 0.8	342.3 ± 1.3
% Removal	50.7	7.8

<sup>a</sup> Heat test for determining protein stability (6 h, 80 °C; 12 h, 4 °C).

<sup>b</sup> Mean of triplicate determinations ± standard deviation.

Sarmento i col. (2000a) postulen que aquest test només està influenciat pel contingut en proteïna i compostos fenòlics del vi; els compostos fenòlics interferiran en la mesura de terbolesa final tot augmentant-la.

Normalment les dosis de clarificant que s'apliquen en funció dels resultats obtinguts a partir d'aquest test són excessives, malgrat ser molt més grans en la resta de tests. El test del calor és el que dona dosis de bentonita menys elevades (Pocock i Waters, 2006).

### 4.2.El Bentotest i el test del TCA (àcid tricloroacètic).

El Bentotest i el test del TCA precipiten les proteïnes del vi mitjançant la desnaturalització química d'aquestes. Aquests tests no prediuen exactament la inestabilitat proteica sinó que són més aviat una estimació de la proteïna total, ja que desnaturalitzen la totalitat de les proteïnes del vi donant lloc a lectures de terbolesa molt altes (Berg i Akiyoshi., 1961; Somers i Ziemelis, 1973; Dawes i col., 1994; Toland i col., 1996).

El Bentotest és el segon test d'estabilitat més utilitzat en la indústria enològica. Bentotest és el nom comercial que rep la solució formada per àcid fosfomolibdic (5%), sulfat de sodi (5%), glucosa (0.25g) i àcid sulfúric(15%); és una solució ja preparada per ser aplicada directament en el vi i poder predir l'estabilitat d'aquest. Aquest test és molt ràpid i senzill.

### 4.3. El test de l'etanol i test del taní.

El test de l'etanol i test del taní es basen en la disminució de la solubilitat de les proteïnes en solució per augment en la concentració d'etanol (Boulton, 1980) i de taní (Mesrob i col., 1983) respectivament.

## Introducció

L'addició d'etanol disminueix la constant dielèctrica de la mostra i així disminueix la solubilitat de la proteïna (Lehninger, 1981) que acaba precipitant, aquest test precipita fins i tot les fraccions proteïques més estables al pH del vi. En el test de l'etanol interfereix la concentració de proteïna total, el calci i el pH; la dosi de clarificant necessària per establir el vi prenent com a criteri el test de l'etanol serà superior degut a la precipitació induïda pel calci que farà augmentar la terbolesa (Sarmiento i col., 2000a).

L'addició de taní afavoreix l'augment d'interaccions entre les proteïnes i els tanins, el compost que es forma va augmentant de tamany fins que deixa de ser estable en suspensió i tendeix a precipitar. En el test del taní influeixen el pH, el contingut en proteïna total i la concentració de ferro, potassi i coure. Aquest test està influenciat per molts factors intrínsecs del vi i llavors és molt poc recomanable utilitzar-lo com a indicador de la dosi de clarificant a utilitzar (Sarmiento i col., 2000a).

### 4.4. El test del sulfat d'amoni.

Aquest test presenta resultats similars al test del calor, això es degut a que el test del sulfat d'amoni produeix més aviat un "salting out" que aglomera i precipita les proteïnes i no pas una desnaturalització massiva de les proteïnes del vi (Toland i col., 1996). Tot i així no és un test àmpliament utilitzat en la indústria enològica.

### 4.5. El Prostab.

Borrot i Gresser (2000) han posat a punt un kit per tal de predir la inestabilitat proteica del vi blanc. Aquest kit conté dos reactius (la composició dels quals no es pot consultar), que s'addicionen al vi inestable. És un kit poc estudiat i el mecanisme d'acció per tal de predir la inestabilitat proteica no ha estat publicat.

### 4.6. L'Immunotest.

Recentment, Manteau i Poinssaut (2010) han desenvolupat un test basat en la detecció de les proteïnes inestables, quitinases i *Thaumatin-like proteins*, mitjançant anticossos anti-quitinases i anti-thaumatin like proteins. El vi s'afegeix a unes tires de nitrocel·lulosa, es realitza la fixació dels anticossos, i el revelat; es treballa amb un vi inestable i un d'estable com a controls positiu i negatiu respectivament. Si el vi mostra presenta una coloració púrpura negra serà indicatiu d'un vi inestable.

## 5. Mètodes d'estabilització del vi vers les proteïnes inestables.

En l'etapa de la clarificació del vi, s'addiciona a aquest un compost adsorbent amb la capacitat de precipitar i emportar-se així les proteïnes inestables del vi. L'addició de bentonita en el vi inestable, és la tècnica més utilitzada en la indústria enològica per tal de preveure l'aparició de terbolesa en el vi blanc embotellat (Blade i Boulton 1988; Ferreira i col., 2002).

Què és i com actua la bentonita en el procés d'estabilització del vi vers la precipitació proteica? Quins inconvenients i avantatges proporciona aquest tractament? Quines tècniques alternatives a l'ús de la bentonita es poden utilitzar? En què consisteixen? Aquests temes es descriuran en aquest apartat.

### 5.1. La bentonita.

La bentonita és una argila col·loïdal que fou descoberta l'any 1888 a Fort Benton (Wyoming, Estats Units). Es pot veure una representació tridimensional de la bentonita en la Figura 5A. Segons el Còdex enològic internacional, la bentonita és un silicat d'alumini hidratat, la forma mineral del qual és, principalment, la montmorillonita. La seva estructura és laminar i està formada per capes de tetràedres en les que s'hi troba intercalada una capa d'octàedres (cada làmina té l'estructura Te-Oc-Te). Al centre dels tetràedres hi trobem els ions  $\text{Si}^{4+}$ , de vegades també ions  $\text{Al}^{3+}$ , mentre que en el centre dels octàedres hi ha els ions  $\text{Al}^{3+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ . A més, en un de cada tres octàedres aquests dos ions estan absents. Globalment hi ha, doncs, un dèficit de càrrega positiva el qual és compensat pel conjunt de cations intercanviables ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  principalment) situats als espais interfoliars, en aquests espais és on es troben també les molècules d'aigua. Existeixen nombrosos estudis en els que es compara la capacitat de desproteïnització dels diferents tipus de bentonites que existeixen en el mercat; les que contenen sodi normalment són més efectives que les que tenen calci, tot i que les més eficients són les bentonites càlciques activades (Dawes i col., 1994; Lubbers i col., 1995; Poinssaut i Hardy, 1995; Leske i col., 1995; Blade i Boulton, 1988; Sarmento i col., 2000b).

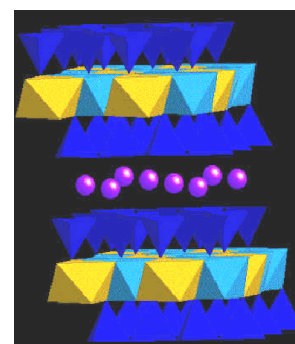
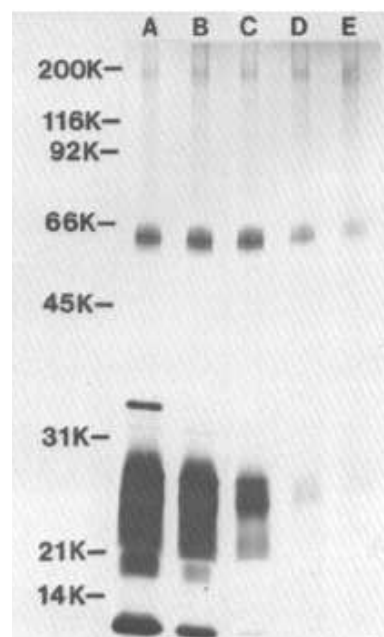


Figura 5A. Estructura 3D de la bentonita.

El dèficit en càrrega positiva que presenta la bentonita en la seva estructura és el que li permet actuar com a intercanviador catiònic, quan s'afegeix al vi, adsorbeix a la seva superfície les proteïnes amb càrrega positiva al pH d'aquest (Blade i Boulton, 1988; Ferreira i col., 2002). En la Figura 5B es mostra la evolució de les diferents fraccions proteïques del vi al adicionar dosis creixents de bentonita en aquest. Es pot observar que el tractament

## Introducció

amb dosis baixes de bentonita (20 g/hl, carrera B) s'emporta les proteïnes més carregades positivament, fracció de proteïnes amb elevat pI (5.8-8.0) i amb massa molecular entre 32 i 45 KDa, aquesta fracció proteica representa només una petita part de les proteïnes solubles del vi blanc. Proteïnes amb massa molecular entre 60 i 65 KDa i amb pI entre 4.1 i 8.0 són molt resistents a aquest tractament i necessiten dosis de bentonita molt elevades per ser eliminades (80 g/hl, carrera E), per això normalment romanen en el vi estabilitzat. La fracció de les proteïnes inestables que és la que ens interessa eliminar, amb una massa molecular entre 20 i 30 KDa i un pI entre 4.1 i 5.8 que està formada per glicoproteïnes, necessita dosis de bentonita elevades (70 g/hl, carrera D) i normalment després del tractament roman en el vi (Hsu i Heatherbell, 1987b).



**Figura 5B.** Disminució del contingut proteic del vi per addició de dosis creixents de bentonita. (0, 20, 50, 70 i 80 g/hl). (Hsu i Heatherbell, 1987b)

Moine-Ledoux i col. (1992) conclouen en el seu estudi que les proteïnes inestables són molt difícils d'eliminar, ja que són proteïnes molt àcides, amb pI molt baix; algunes d'elles amb pI inferior al pH del vi i llavors amb càrrega neta neutra o negativa en el vi, no estarà afavorida la interacció amb la bentonita que actua com a bescanviador catiònic i no aniònic.

Dawes i col., 1994, estudien la influència del pI dels 5 grups de proteïnes presents en el vi per ser adsorbits per la bentonita (Taula 5A). La bentonita adsorbeix proteïnes de tots cinc grups, però és el grup I, format per les proteïnes amb pI més alt el que presenta una davallada més accentuada. Amb una dosi de 400 mg/l de bentonita en el vi hi roman el 72% de proteïna, i amb 1000 mg/l només hi queda el 22% . Aquests resultats confirmen els obtinguts anteriorment per Hsu i Heatherbell; la utilització de bentonita implica una disminució en el contingut proteic total del vi i no només de les proteïnes inestables.

**Taula 5A.** Variació en la concentració de proteïna quan s'aplica el tractament amb bentonita. (Dawes i col., 1994)

Sample	Unfined wine	Bentonite fined wine (400 mg/L)		Bentonite fined wine (1000 mg/L)	
	Total protein* (µg)	Total protein* (µg)	% protein remaining	Total protein* (µg)	% protein remaining
Groups I -V	1215.40	880.00	72.4	269.50	22.2
Group I	130.70	74.60	57.1	12.10	9.3
Group II	442.60	303.00	68.5	95.20	21.5
Group III	230.90	197.00	85.3	72.70	31.5
Group IV	188.50	149.10	79.1	31.60	16.7
Group V	222.70	156.20	70.1	60.10	27.0

\*Protein determined by Coomassie blue assay.

## Introducció

La capacitat d'absorció de la bentonita és independent de la temperatura en la que s'aplica (Blade i Boulton, 1988), però varia en funció del contingut proteic, del pH, de la concentració d'etanol i del mètode en el que s'addiciona al vi (Achaerandio i col., 2001; Weiss i col., 2001).

La bentonita necessita una etapa prèvia d'hidratació, després s'afegeix al vi, flocula, i tot seguit sedimenta de forma natural. Quan es recupera el vi clarificat s'observen pèrdues de entre el 5 i el 10% del volum inicial, aquestes pèrdues de vi representen pèrdues econòmiques importants (Lagace i Bisson, 1990; Tattersall i col., 2001). Aquest procés d'estabilització en discontinuo implica temps llargs de sedimentació, grans quantitats de bentonita a utilitzar, i un difícil control de la qualitat del producte final (Pashova i col., 2004a).

La bentonita també absorbeix altres compostos relacionats amb l'aroma i el sabor del vi, si hi sumem la forta desproteïnitació que hi té lloc, podem dir que el tractament amb bentonita implica una alteració negativa de les propietats sensorials d'aquest (Miller i col., 1985; Voilley i col., 1990; Lubbers i col., 1996; Guillou i col., 1998; Martínez-Rodríguez i col., 2003; Vanrell i col., 2007).

### 5.1.1. Procés d'estabilització en continuo del vi mitjançant bentonita.

Degut als nombrosos inconvenients relacionats amb el procés d'estabilització en discontinuo del vi mitjançant bentonita, molts estudis s'han centrat en l'optimització d'aquest procés mantenint la bentonita com a estabilitzant però realitzant el procés d'estabilització en continuo.

Blade i Boulton (1988) van observar que el màxim d'adsorció de les proteïnes a la bentonita s'assoleix força ràpid, en 30 segons; si el procés d'estabilització del vi amb bentonita es realitza en continuo, ja es pot reduir un dels inconvenients del procés en discontinuo que és el temps de sedimentació de la bentonita (aproximadament dues setmanes).

Recentment, Muhlack i col., (2006) han proposat un procés d'estabilització del vi en continuo, en aquest procés la bentonita prèviament afegida al vi s'elimina d'aquest mitjançant centrifugació. El vi roman estable si s'utilitza el test del calor com a indicador de la inestabilitat entre 30 segons i 2 minuts després de la injecció de bentonita. En aquest procés es redueix el volum que es perd quan s'aplica el tractament en discontinuo de la bentonita, ja que s'aplica la centrifugació com a tècnica per separar la bentonita del vi, aquesta tècnica permet recuperar més volum de vi que la sedimentació natural. El principal inconvenient d'aquesta tècnica és que un 30% de la bentonita afegida resta en el vi després de la centrifugació.

## Introducció

El petit tamany de partícula i la capacitat d'hidratació de les bentonites comercials són dues de les limitacions del procés en continu, així com també ho és la regeneració de la bentonita (Pocock i Waters, 2006). Per tan aquest procés d'estabilització en continu del vi encara necessita millores abans de poder ser àmpliament acceptat en la indústria enològica.

### 5.2. Tècniques alternatives a la bentonita.

En l'apartat anterior ja s'ha estudiat els inconvenients i avantatges que presenta l'ús de la bentonita en el procés d'estabilització del vi, de fet és la tècnica més àmpliament utilitzada en la indústria enològica. La ultrafiltració, l'addició d'enzims proteolítics, la pasteurització, la criança amb lies, la utilització d'altres adsorbents com són les procianidines immobilitzades, el diòxid de zirconi o la quitina, la utilització d'anticossos específics de les proteïnes-PR, són tècniques alternatives a l'ús de la bentonita per tal d'estabilitzar el vi front la precipitació de les proteïnes inestables.

#### 5.2.1. La ultrafiltració.

La ultrafiltració és una tècnica que s'està estudiant des de ja fa molts anys com a substitut al tractament amb bentonita en la estabilització proteica del vi blanc (Hsu i col., 1987c; Flores i col., 1990).

Aquest procés consisteix en fer passar el vi a través d'una membrana amb un determinat tamany de porus; les molècules amb una massa molecular superior al tamany del porus, hi queden retingudes mentre que les partícules de massa molecular inferior, passaran a través del porus; en funció de la membrana que utilitzem podem conèixer quina massa molecular tenen les partícules que no queden retingudes en el filtre. Quan s'utilitza aquesta tècnica per estabilitzar el vi blanc, s'observa una disminució en el contingut proteic del vi ultrafiltrat proporcional a la disminució de la massa molecular de tall de la membrana utilitzada en la ultrafiltració, o sigui, a menys tamany de porus de la membrana més partícules retingudes i per tan menys contingut proteic en el vi. Si es treballa amb membranes que retenen compostos amb massa molecular superior a 10 KDa, s'observa que més del 99% de les proteïnes solubles del vi queden retingudes. Tot i així, entre 3 i 20 mg/l de proteïna roman al vi ultrafiltrat. Aquestes proteïnes que encara estan presents en el vi estabilitzat són proteïnes inestables, ja que quan s'utilitza el test del calor com a criteri per determinar la estabilitat del vi ultrafiltrat aquest continua sent inestable (Hsu i col., 1987c); serà necessari afegir sobre els 5 g/hl de bentonita per poder estabilitzar el vi ultrafiltrat. Així, la ultrafiltració ens permet reduir entre el 80 i el 95% la dosis de bentonita que necessita un vi per ser estable.

## Introducció

La presència de les proteïnes inestables en el vi ultrafiltrat i la possible pèrdua de compostos amb elevada massa molecular relacionats amb altres propietats organolèptiques del vi (polisacàrids), fa que la ultrafiltració no sigui una bona alternativa a la bentonita i per això el seu ús en la indústria enològica no està extensament difós (Miller i col., 1985).

### 5.2.2. La digestió enzimàtica.

L'addició d'enzims proteolítics d'origen endogen o exogen al vi per degradar les proteïnes en general, és una tècnica força estudiada com a alternativa al tractament amb bentonita (Feuillat i Ferrari, 1982; Heatherbell i col., 1984; Waters i col., 1992).

Manca de Nadra i col. (1997 i 1999) han estudiat l'efecte dels enzims proteolítics de *Leuconostoc oenos* i *Oenococcus oeni* en el perfil proteic del vi blanc i han confirmat la degradació d'algunes fraccions proteiques. Lagace i Bisson (1990) estudiaren l'efecte de les proteases de vuit llevats diferents i els seus resultats confirmen l'activitat proteolítica d'aquestes sobre les proteïnes del vi. Girbau i col. (2004), han observat ens els seus experiments que els raïms molt infectats amb *Botrytis cinerea* redueixen la seva concentració proteica degut a la degradació de les proteïnes pels enzims proteolítics que secreta el fong; aquests enzims tenen doncs el potencial per reemplaçar el tractament amb bentonita i així estabilitzar el vi.

Però la digestió enzimàtica de les proteïnes del vi, és una tècnica poc efectiva a la temperatura normal de vinificació (Heatherbell i col., 1984; Waters i col., 1992; Waters i col., 1995b) ja que les proteïnes-PR són resistents a l'atac proteolític en aquesta temperatura. Per això s'ha intentat combinar aquest procés de digestió enzimàtica amb altres processos que prèviament desnaturalitzin la proteïna i facilitin així l'atac dels enzims (Pocock i Waters, 2006). Per tal d'afavorir la digestió enzimàtica de les proteïnes del vi es necessari treballar a una temperatura >35 °C, a un pH elevat o bé precipitar les proteïnes del vi amb etanol al 50% (v/v); tots aquests factors impliquen la prèvia desnaturalització de les proteïnes per poder ser atacades pels enzims proteolítics (Ferreira i col., 2004).

La digestió enzimàtica implica tractaments previs que influencien negativament en les propietats organolèptiques del vi, i per això és una tècnica que s'ha d'optimitzar per tal de ser aplicada en la indústria enològica.

### 5.2.3. La pasteurització.

Ferenczy (1966) va ser el primer investigador interessat en la tècnica de la pasteurització ràpida com alternativa al tractament amb bentonita. S'ha observat que si el vi es posa a 90 °C durant un curt període de temps, es redueix entre el 50 i el 70% la dosi de bentonita necessària per estabilitzar el vi i no hi ha efectes adversos en les propietats

## Introducció

sensorials d'aquest (Francis i col., 1994; Pocock i col., 2003), aquests resultats però s'han dut a terme només a nivell experimental. Caldrà observar si realment el tractament del vi a una temperatura tan elevada modifica o no les propietats sensorials d'aquest.

### 5.2.4. Els compostos fenòlics immobilitzats.

L'ús de compostos fenòlics immobilitzats també ens permet l'estabilització del vi en front la precipitació proteica (Weetall i col., 1984). Hi ha compostos fenòlics com les procianidines (tanins condensats) que interaccionen amb les proteïnes en un ampli rang de temperatura i pH; les proteïnes s'uneixen a les procianidines i com a resultat obtenim un vi estable, utilitzant com a criteri d'estabilitat el test de l'àcid tricloroacètic (Powers i col., 1988). El principal inconvenient d'aquesta tècnica és la reutilització de les procianidines, ja que perden la seva capacitat d'unió a les proteïnes i llavors s'ha d'optimitzar el procés de regeneració d'aquestes (Powers i col., 1988).

### 5.2.5. La criança amb lies.

Les mannoproteïnes del llevat exerceixen un efecte protector davant de la precipitació de les proteïnes inestables (es descriu àmpliament en l'apartat 6), per això, l'enriquiment del vi amb mannoproteïnes de la paret cel·lular del llevat, o bé la prolongació del contacte entre el vi i els llevats morts (lies), són tècniques utilitzades pels enòlegs per tal de millora l'estabilitat proteica del vi blanc i reduir així la dosi de bentonita a utilitzar. El tractament del vi inestable amb lies, disminueix la inestabilitat d'aquest sempre i quan s'utilitzi el test del calor com a criteri d'estabilitat proteica, ja que els resultats amb el Bentotest són contradictoris (Zamora, 2005).

La criança amb lies, és una tècnica molt utilitzada en vins blancs, ja que, a més d'estabilitzar el vi vers la precipitació proteica, les lies consumeixen oxigen tot evitant així processos indesitjats d'oxidació del vi (Fournarion i col., 1999 i 2002; Zamora, 2002). A més a més les mannoproteïnes del llevat, exerceixen altres efectes positius sobre el vi: milloren l'estabilitat tartàrica (Moine-Ledoux i col., 1997; Moine-Ledoux i Dubourdieu, 2000, 2002a i 2002b), milloren l'estabilitat de la matèria colorant (Feuillat i col., 2001; Fuster i Escot, 2002), disminueixen l'astringència dels vins negres (Fuster i Escot, 2002), milloren la persistència aromàtica, milloren les característiques escumants dels caves (Vanrell i col., 2005) i augmenten la untuositat del vi (Zamora, 2002; Vidal i col., 2004).

Aquesta tècnica però també pot exercir efectes negatius com és el risc de reducció del vi (Chattonnet, 2000; Feuillat i col., 2001), o l'aparició de desviacions de caràcter microbiològic (Chattonnet, 2000; Zamora, 2002). A més, la criança amb lies és una pràctica



## Introducció

complicada ja que implica la immobilització dels estocs i una important dedicació dels recursos del celler (Zamora, 2005).

Sembla ser doncs que aquest tractament és una alternativa força interessant per tal d'estabilitzar el vi front la precipitació proteica, tot i així seria interessant obtindre un producte que s'addicioni al vi i confereixi totes les millores que s'adquireixen després de la criaça sobre lies, aquest producte estabilitzarà el vi front la precipitació proteica però no presentarà els inconvenients que té la criaça amb lies esmentats anteriorment (Zamora, 2005). Existeixen molts estudis en els que s'intenta optimitzar el procés d'extracció de les mannoproteïnes de la paret cel·lular del llevat (Dupin i col., 2000b), o bé conèixer quins gens estan implicats en la producció de mannoproteïnes per tal d'augmentar-ne l'expressió i així la concentració d'aquestes en el vi (González-Ramos i col., 2006; Brown i col., 2007).

### 5.2.6. El diòxid de zirconi.

El diòxid de zirconi té una elevada estabilitat tèrmica i és químicament inert, s'utilitza com a catalitzador i en molts processos de separació com és la cromatografia líquida i la filtració amb membrana. La seva superfície presenta propietats àcides i bàsiques, característica que el fa idoni per ser utilitzat com adsorbent, a més les proteïnes es poden adsorbir a la superfície dels òxids metàl·lics com ja han demostrat molts estudis (Fukuzaki i col., 1996; Hughes-Wassell i Embery, 1996; Giacomelli i col., 1997; Pashova i col., 2002).

Estudis realitzats per Pashova i col. (2004a i 2004b), en els que utilitzen el diòxid de zirconi empaquetat en una columna com a estabilitzant del vi en un procés en continu, conclouen que la proteïna total disminueix el 50 o el 70% en funció del tipus de diòxid de zirconi que utilitzen (n'estudien dos de diferents). Inicialment s'observa la disminució de les fraccions de massa molecular entre 20 i 50 KDa i entre 50 i 70 KDa, mentre que la fracció de 15 KDa i la de massa molecular >70 KDa s'eliminen després. La fracció proteica amb massa molecular 15 KDa no afecta a la inestabilitat proteica, mentre que la de 70 KDa sembla que hi estigui relacionada. Aquesta tècnica és selectiva amb la fracció proteica de massa molecular entre 20 i 30 KDa, fracció en la que es troben les proteïnes inestables.

Salazar i col., 2006, comparen els efectes sobre l'estabilitat proteica i les propietats sensorials del vi quan aquest es tracta amb diòxid de zirconi i amb bentonita, conclouen que el tractament amb diòxid de zirconi del vi és comparable amb el tractament amb la bentonita, o sigui, les propietats físico-químiques i sensorials del vi tractat amb diòxid de zirconi són similars a les del vi tractat amb bentonita. Aquesta tècnica però només s'ha estudiat a nivell experimental.

## Introducció

### 5.2.7. La Quitina.

La Quitina [poli(N-acetil-1,4- $\beta$ -D-glucopiranosamina)], és un polímer natural i insoluble present en l'exosquelet de molts crustacis i invertebrats.

Vincenzi i col. (2005), són els primers en proposar aquest polímer com alternativa a la bentonita en el procés d'estabilització del vi blanc front la precipitació proteica. Quan s'afegeix 1.0 g/l de quitina al vi, la terbolesa d'aquest després d'aplicar el test tèrmic s'ha reduït a la meitat respecte el vi inicial i la proteïna total ha disminuït només un 14%. Aquests resultats indiquen que la quitina és més específica que la bentonita en la eliminació de les proteïnes inestables, ja que redueix molt poc el contingut proteic i en canvi redueix molt la terbolesa. La quitina elimina principalment la fracció proteica amb massa molecular 9 KDa quan s'utilitzen dosis molt baixes; amb dosis més elevades, s'observa una progressiva reducció de la fracció proteica de 31 KDa, aquesta fracció s'elimina totalment amb una dosis de 20g/l de quitina. La quitina també redueix el contingut en polifenols entre 0.2 i 0.15 g/l; un 25% del contingut total en polifenols es redueix amb una dosis de 20g/l de quitina.

Dosis elevades de quitina (20g/l) redueixen entre el 70-80% la terbolesa que genera el vi quan s'aplica el test tèrmic com a criteri de mesura de l'estabilitat proteica del vi, es necessita 0.5 g/l de bentonita per eliminar la mateixa quantitat de proteïna; la quantitat de quitina necessària per eliminar la mateixa quantitat de proteïna que la bentonita és molt més elevada, aquest és un dels principals inconvenients en l'ús de la quitina com a substitut de la bentonita, però és un problema moderat tenint en compte que la quitina es pot regenerar simplement netejant-la amb solució salina i metanol, a més és barata d'obtenir.

### 5.2.8. Els anticossos.

L'eliminació de les proteïnes inestables mitjançant anticossos immobilitzats també s'està estudiant com a possible procés per eliminar les proteïnes inestables del vi. El principal inconvenient però d'aquesta tècnica és el baix pH del vi que desfavoreix les interaccions antigen-anticòs, ja que la conformació de les immunoglobulines s'altera de forma reversible a pH 2.5-3.0 i llavors a aquest pH no poden interaccionar amb els antígens (Ferreira i col., 2004).

## 6. Influència dels components del vi d'origen no proteic en la inestabilitat proteica.

La composició del vi influeix en la inestabilitat proteica d'aquest com ja s'ha demostrat en apartats anteriors, existeixen components que exerceixen un efecte protector tot

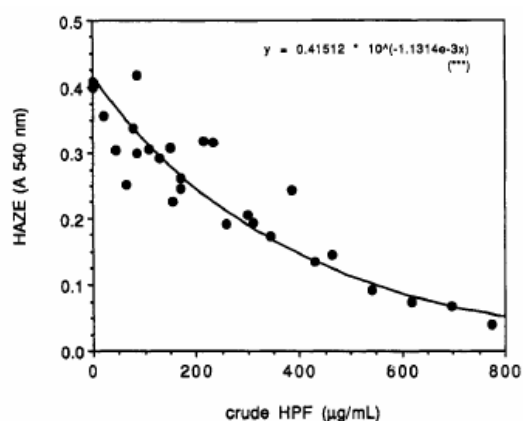
## Introducció

disminuint la inestabilitat proteica del vi i d'altres que pel contrari afavoreixen l'aparició de precipitat. Els principals components del vi implicats en la precipitació de les proteïnes inestables són les mannoproteïnes i els polifenols. Ara bé, hi ha altres components com l'etanol, els metalls, l'oxigen, o factors intrínsecs o extrínsecs, com el pH i la temperatura que poden influenciar en la interacció d'aquests components amb les proteïnes, tot augmentant o disminuint la seva capacitat protectora o potenciadora de la inestabilitat proteica. En aquest apartat es descriurà la participació d'aquests components d'origen no proteic en la precipitació proteica.

### 6.1. Els polisacàrids: les mannoproteïnes.

Ja s'ha descrit en l'apartat de la glicosilació de les proteïnes del vi, la presència en aquest de molècules majoritàriament d'elevada massa molecular amb un elevat contingut de monosacàrids i un baix contingut en aminoàcids, aquests col·loides es coneixen com arabinogalactans (procedents del raïm) i mannoproteïnes (procedents del llevat). Existeixen nombrosos estudis que demostren la capacitat que tenen alguns d'aquests polisacàrids per actuar com a col·loides protectors de les proteïnes inestables vers la formació de precipitat. En la Figura 6A s'observa la progressiva estabilització d'un vi inestable per addició de dosis creixents d'una mannoproteïna termostable que es coneix com HPF (*Haze Protector Factor*) (Waters i col., 1993). Tot seguit descriurem els principals estudis sobre col·loides protectors de la inestabilitat proteica.

Moine-Ledoux i Dubourdieu (1999), identifiquen una mannoproteïna aminoglicosilada de 31.8 KDa que es coneix com a MP32 que actua com a col·loide protector; correspon a un fragment de la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*, aquesta mannoproteïna s'allibera al vi per combinació de les  $\beta$ -glucanases de la paret cel·lular i la proteasa A vacuolar del llevat (enzims proteolítics presents en l'autòlisis del llevat). En aquest estudi s'ha caracteritzat les diferents mannoproteïnes del llevat; per una banda les obtingudes a partir de la hidròlisis de la paret cel·lular del llevat, i per altra les obtingudes a partir del vi en el que s'ha aplicat calor durant 30 min a 80 °C. Ambdues fraccions de mannoproteïnes obtingudes són diferents. La fracció obtinguda a partir de la digestió enzimàtica conté mannoproteïnes amb un 27% de



**Figura 6A.** Disminució de la terbolesa per addició de dosis creixents de mannoproteïna termostable (HPF) en un vi inestable. (Waters i col., 1993)

## Introducció

proteïna i la part polisacàridica només està formada per mannosa; aquesta fracció té més poder estabilitzant que la fracció obtinguda després d'aplicar calor al vi. Això es degut a que la fracció obtinguda a partir de la digestió enzimàtica conté una concentració més elevada de MP32, així a més concentració de col·loide protector en el vi, més estabilitat vers la precipitació proteica.

Waters i col. (1993) analitzen les mannoproteïnes presents en el vi després d'aplicar-li calor per així poder estudiar les mannoproteïnes termostables. En aquest estudi es realitza una electroforesis desnaturalitzant i s'aplica la tinció de l'àcid periòdic (PAS). Apareix una ampla banda al principi del gel, aquesta banda es difusa cosa que marca una heterogeneïtat de masses moleculars, no es tenyeix ni amb Coomassie Brillant Blue ni amb la tinció de nitrat de plata. Correspon a una mannoproteïna que conté un 96% de monosacàrids i un 4% de aminoàcids; la composició química d'aquesta es mostra en la Taula 6A. La proporció dels dos aminoàcids majoritaris i el fet de que principalment contingui mannosa, indica que és una mannoproteïnes de la paret cel·lular del llevat (Frevert i Ballou, 1985). Aquest polisacàrid es troba en tots els vins.

**Taula 6A.** Composició química de la mannoproteïna HPF (*Haze Protector Factor*). (Waters i col., 1993)

		rel %	
carbohydrate		96	
protein		4	
Neutral Sugar Composition <sup>a</sup>			
sugar	% molar ratio	sugar	% molar ratio
mannose <sup>b</sup>	78	galactose <sup>c</sup>	3
glucose <sup>b</sup>	13	arabinose <sup>c</sup>	2
apiose <sup>c</sup>	3	hexosamine <sup>c</sup>	1
Amino Acid Composition <sup>d</sup>			
amino acid	% molar ratio	amino acid	% molar ratio
Ser	31	Ile	5
Thr	13	Tyr	5
Asx	9	Leu	4
Glx	9	Phe	2
Gly	9	Lys	1
Val	6	Pro	nd <sup>e</sup>
Ala	5		

Waters i col. (1994b) identifiquen una mannoproteïna en vi negre present a una concentració molt baixa (traces), també amb la propietat d'estabilitzar les proteïnes inestables del vi. Aquesta mannoproteïna té una massa molecular de 420 KDa, el 70% són carbohidrats i el 30% restant correspon a aminoàcids. El 98% dels monosacàrids són mannosa i el 2% restant glucosa; la part proteica està formada principalment per serina, glicina, treonina i alanina.

Pellerin i col., (1994), en l'estudi dels arabinogalactans han conclòs que aquests col·loides també exerceixen un efecte protector en l'estabilitat proteica, però menys efectiu que el de les mannoproteïnes. Altres autors també han estat estudiant l'efecte protector dels arabinogalactans (Waters i col., 1994a).

Les mannoproteïnes, descrites com a col·loides protectors del vi davant de la inestabilitat proteica, tenen la capacitat de reduir el tamany de partícula de l'agregat que es forma abans de precipitar. Hi ha una relació exponencial entre l'augment en la concentració d'aquest col·loide protector i la disminució del tamany de l'agregat que precipita, tal i com s'observa en la Figura 6B (Waters i col., 1993). A menys tamany d'agregat menys

## Introducció

precipitació i així menys terbolesa. Quan s'addiciona dosis elevades d'aquest polisacàrid, hi ha una disminució per sota de 5µm del tamany de partícula que precipita; partícules amb un tamany inferior a 5µm es considera comercialment insignificants per ser detectades pels consumidors.

El mecanisme pel qual les mannoproteïnes actuen com a col·loides protectors de la inestabilitat proteica no està del tot clar, sembla ser que les mannoproteïnes i les proteïnes inestables del

vi competeixen per unir-se al mateix o mateixos components del vi, llavors les mannoproteïnes entren en competència amb les proteïnes inestables del vi i així disminueix el tamany de l'agregat format amb les proteïnes del vi, llavors aquest és més estable en solució i no acabarà precipitant. Pocock i Waters (2006) suggereixen que les mannoproteïnes competeixen amb altres proteïnes del vi per unir-se a un component d'origen no proteic present en el vi de forma natural que anomenen "Factor X", necessari per a que es formin els grans agregats insolubles de proteïna que donen lloc a la terbolesa. Més endavant parlarem d'aquest "factor X".

### 6.2. Els compostos fenòlics.

Ja hem anat introduint en alguns dels apartats anteriors la presència dels compostos fenòlics en la precipitació proteica; l'aparició de terbolesa en el vi blanc embotellat està relacionada tan amb les proteïnes inestables com amb la interacció proteïna-polifenol (Heatherbell, 1976; Goertges, 1982).

Les proantocianidines, tot i estar presents en baixes concentracions, són els compostos fenòlics majoritaris del vi blanc, seguides del tirosol, la (-)-epicatequina i (+)-catequina, l'àcid cafeic i el p-cumàric en la forma esterificada majoritàriament, i de forma molt menys representativa l'àcid gàl·lic i la quercitina, les concentracions d'aquests i el percentatge en el que participen en el contingut

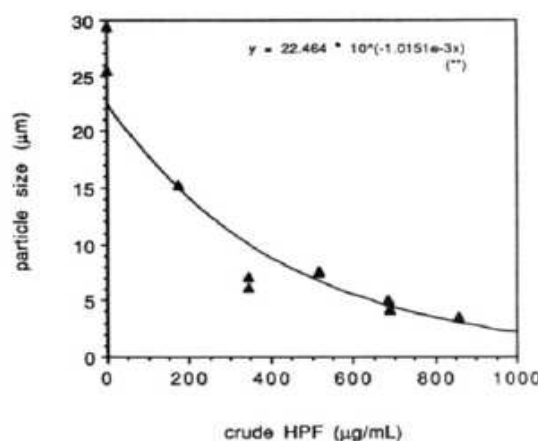


Figura 6B. Disminució del tamany de partícula de l'agregat format per addició de dosis creixents de mannoproteïna termostable (HPF) en un vi inestable. (Waters i col., 1993)

Taula 6B. Compostos fenòlics del vi blanc. (Ribéreau-Gayon i col., 2006)

	Dry white wine		Sweet white wine (botrytized)	
	Content	%	Content	%
Tyrosol	25	22.2	29	40.5
Gallic acid	1.4	1.2	1.0	1.4
Caffeic acid				
Total	13.5	12	0.2	0.3
Free	3.5		ε	
Paracoumaric acid				
Total	2.6	2.3	ε	
Free	1.0		ε	
Quercetin	0.2	0.2	ε	
Catechins	10	8.9	12.3	17.2
(+)-catechin	3.4		10.1	
(-)-epicatechin	6.6		2.2	
Tannins (procyanidins)	60	53.2	29	40.5
Total phenols	112.7	100	71.5	100

## Introducció

polifenòlic total d'un vi blanc es mostra en la Taula 6B. La concentració de polifenols en vins blancs és molt inferior a la dels vins negres, en vins blancs els compostos fenòlics no es troben molt polimeritzats, principalment es troben formant dímers i trímers.

Van ser Koch i Sajak (1959) els primers investigadors en descriure l'associació de les proteïnes del vi amb els polifenols. Més tard, Somers i Ziemelis (1973) van observar que el 50% de les proteïnes estan associades a flavonoids. Els flavonoids en el vi blanc estan representats principalment per la catequina i la epicatequina, tots els respectius derivats glicosilats i les proantocianidines amb baix grau de polimerització. Waters i col., (1995a) han descrit la presència de proantocianidines en precipitats naturals i en precipitats obtinguts després d'aplicar el test del calor en el vi; aquesta determinació es va realitzar per anàlisi química i per piròlisi DI-EI MS/MS. La degradació per oxidació en medi àcid de les proantocianidines trobades en el precipitat, ha permès conèixer la presència de la cianidina en aquests, tot confirmant la presència de les procianidines en el precipitat. Aquestes procianidines normalment es troben entre <0.02 i 4.9% (p/p) en el precipitat obtingut després d'aplicar calor al vi.

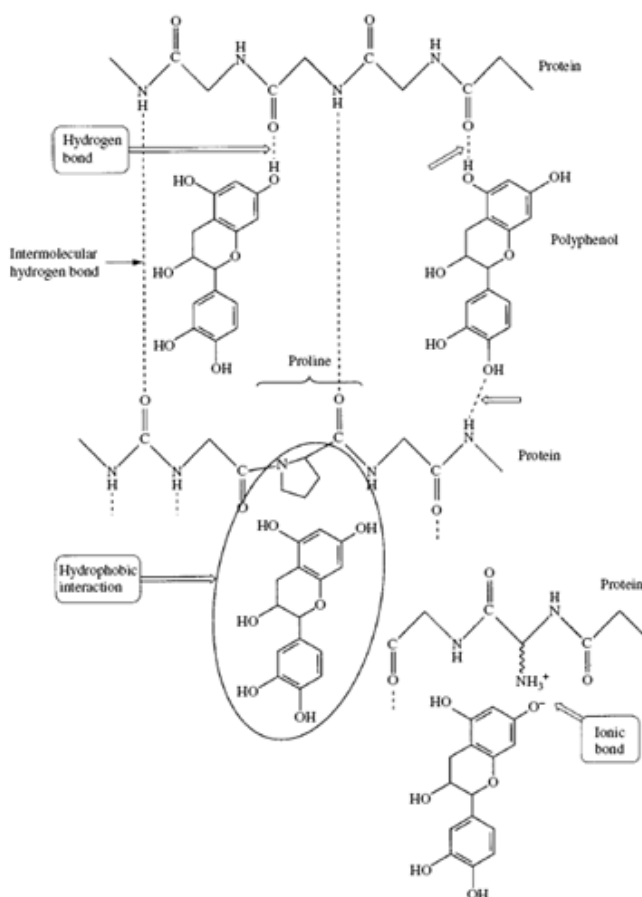
En estudis recents de Pocock i col., (2007) s'ha afegit àcid caftàric, àcid cafeic, epicatequina, epigal·locatequina, àcid gàl·lic, una barreja de tots cinc, àcid ferúlic, i tanins de la llavor del raïm, a una solució sintètica amb 500 mg/l de taumatina i s'ha aplicat el calor per poder estudiar la inestabilitat de les diferents solucions. En cap cas s'ha observat una augment en la terbolesa formada si es compara amb el control (sense addició de cap compost fenòlic). Amb aquests resultats conclouen que aquests compostos fenòlics no són els desencadenants de la precipitació proteica, almenys a les dosis de treball (dosis en les que els trobem al vi). No es descarta que altres compostos fenòlics diferents als utilitzats en aquest estudi presents en el vi puguin estar implicats directament en la precipitació proteica. De fet, en el mateix estudi es demostra la influència dels compostos fenòlics en la precipitació proteica; a vuit vins diferents se'ls aplica el tractament del PVPP (polivinil pirrolidona) per tal d'eliminar els compostos fenòlics i després en aquests mateixos vins ja tractats s'aplica calor, s'observa que els vins en els que s'ha eliminat part del seu contingut fenòlic es forma menys terbolesa després d'aplicar calor, o sigui, són vins més estables que els vins control (sense tractament amb PVPP). Per tan és evident que els compostos fenòlics estan implicats directament amb la precipitació proteica malgrat no ser aquests els iniciadors o segons aquest estudi, el "factor X".

Molts investigadors han intentat estudiar el mecanisme d'interacció entre les proteïnes i els polifenols així com la naturalesa dels polifenols que interaccionen amb les proteïnes, s'ha treballat majoritàriament amb solucions sintètiques i els resultats s'han extrapolat al vi. Les interaccions entre la proteïna i el polifenols tenen lloc quan la proteïna està

## Introducció

desnaturalitzada ja que és en aquest estat en el que les proteïnes tenen més accessibles els llocs d'unió amb els polifenols (Pocock i Waters, 2006). Així doncs és necessari una prèvia desnaturalització en la que es desestabilitza l'estructura espacial de la proteïna, tot afavorint l'exposició als polifenols de les parts reactives d'aquesta.

Els polifenols del vi blanc no presenten càrrega al pH del vi, llavors la seva reactivitat amb altres molècules del vi no estarà determinada per forces de caràcter iònic o electrostàtic (Ferreira i col., 2002). Per a que es formi un enllaç de caràcter iònic entre la proteïna i el polifenol, l'oxigen hidroxílic de l'anell aromàtic del polifenol, ha tenir càrrega negativa o bé densitat de càrrega negativa per poder interaccionar amb el nitrogen que forma l'enllaç aminoacídic, que ha tenir càrrega positiva; és molt difícil que al pH del vi es trobin ambdues molècules amb aquesta càrrega, aquest tipus interacció està representada en la Figura 6C que es mostra tot seguit. Els polifenols normalment adquireixen càrrega negativa per pèrdua de l'hidrogen hidroxílic a pH més elevats al pH del vi, aquests protons són lleugerament àcids.



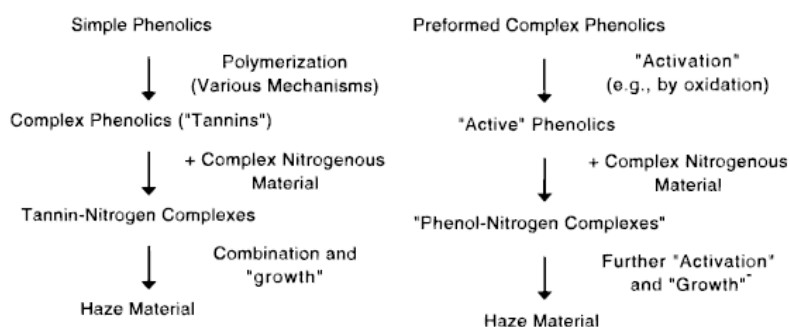
**Figura 6C.** Possibles d'interaccions entre compostos fenòlics i proteïnes.  
(Asano i col., 1982).

La interacció entre les proteïnes i els polifenols del vi blanc es creu que té lloc principalment mitjançant la formació d'enllaços d'hidrogen i per interaccions hidrofòbiques

## Introducció

(Oh i col., 1980; Hagerman i Butler, 1981; Asano i col., 1982), es mostra a la Figura 6C. Els enllaços d'hidrogen poden ser intermoleculars (entre proteïnes) o bé intramoleculars (entre proteïna i polifenol). L'enllaç d'hidrogen intermolecular es dona entre l'hidrogen del grup amino i l'oxigen carboxílic. Els enllaços d'hidrogen intramoleculars poden ser de dos tipus; entre els hidrògens dels hidroxils dels anells aromàtics del polifenol i els oxígens carboxílics dels aminoàcids; o bé entre els oxígens hidroxílics dels compostos fenòlics i l'hidrogen del grup amino de l'enllaç aminoacídic. La interacció proteïna-polifenol serà més forta com més hidroxils tingui el polifenol, ja que podrà formar-se més enllaços d'hidrogen. Les interaccions hidrofòbiques entre les proteïnes i els polifenols, tenen lloc mitjançant la formació d'enllaços  $\pi$  entre els anells aromàtics dels aminoàcids aromàtics que formen la seqüència aminoacídica de la proteïna i els del polifenols (Baxter i col., 1997; Bianco i col., 1997).

Gardner i McGuinness (1977) van proposar dos possibles mecanismes de formació de complexos proteïna-polifenol, tots dos impliquen la formació de grans agregats que finalment donaran lloc a la formació de precipitat. En la Figura 6D es poden veure tots dos mecanismes; el mecanisme de l'esquerra es basa en la polimerització dels compostos fenòlics simples per donar lloc als tanins, aquests polímers es complexaran amb les proteïnes i formaran agregats, aquests es combinaran entre ells i el seu tamany creixerà fins que acabarà precipitant; el mecanisme de la dreta s'inicia per activació dels compostos fenòlics, per exemple mitjançant oxidació, aquests compostos fenòlics actius es complexaran amb les proteïnes i mitjançant consecutives activacions aniran formant complexos cada cop més grans fins que també acabaran precipitant. Tots dos mecanismes estan influenciats per factors intrínsecs com és el pH, l'etanol, els metalls, l'oxigen o bé per factors extrínsecs com és la temperatura.



**Figura 6D.** Dos possibles mecanismes de formació de complexos proteïna-polifenol. (Gardner i McGuinness, 1977).

Segons estudis realitzats per Siebert i col., (1996a i 1996b), existeix una relació entre la concentració de proteïna i de polifenols en la formació d'agregats més o menys grans, i per tan, amb més o menys tendència a precipitar. S'ha descrit que quan la concentració de proteïna (possibles llocs d'unió d'aquesta amb els polifenols), és igual a la concentració de



## Introducció

polifenols (possibles llocs d'unió d'aquestos a la proteïna), es formen grans col·loides i es dona la màxima formació de precipitat (Figura 6E dalt); si la concentració de polifenols o de proteïna és superior respectivament, els agregats que es formen tenen un tamany més petit i per tan hi ha menys precipitació. En els vins blancs trobem concentració semblants de proteïna i de polifenols, ambdues però força baixes (Siebert i col., 1996c).

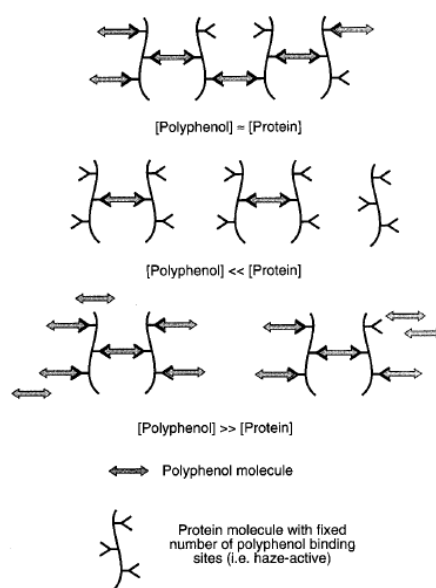
Mesquita i col., (2001) han observat que malgrat ser imprescindible la presència de proteïnes en el vi per tal de desencadenar-se la formació de precipitat, el patró de formació de terbolesa del vi no està relacionat amb la proteïna sinó amb altres compostos d'origen no proteic presents en el vi. La desproteïnitació d'un vi 1 i posterior addició de l'extracte proteic a un vi 2, no implica variacions en el patró de terbolesa generat pel vi 1, tenint en compte que el vi 2 genera un patró de terbolesa diferent a la del vi 1; és en la formació d'aquest patró de terbolesa típic de cada vi en el que estan directament implicats els compostos fenòlics.

La possibilitat de que un polifenol interaccioni amb una proteïna està relacionat amb la disposició espacial d'aquest i amb el nombre i posició dels grups hidroxil en l'anell aromàtic (McManus i col., 1985). Si els grups hidroxil els trobem en posició orto, l'energia necessària per trencar l'enllaç que es forma entre el polifenol i la proteïna és molt més gran que la que es necessita quan els grups hidroxil del polifenols estan en posició meta, l'enllaç entre el polifenol amb els grups hidroxil en orto és molt més estable. Si el polifenol té tres hidroxils en posicions veïnes, forma un enllaç més estable que el polifenol amb dos grups hidroxil en orto.

La interacció de les proteïnes amb els polifenols està influenciada per factors intrínsecs i extrínsecs que tot seguit descriurem.

### 6.2.1. El pH i l'etanol.

Alguns estudis demostren que en la formació dels complexos proteïna-polifenol, hi ha una marcada influència del pH de la solució i de la concentració en etanol d'aquesta (Siebert i col., 1996b). Amb una concentració d'etanol al 12% (v/v), s'assoleix el màxim de precipitació quan el pH està entre 4.0-4.2 tal i com es pot observar a la Figura 6F, a pH inferiors o superiors a aquest hi ha una disminució en la terbolesa generada després



**Figura 6E.** Mecanisme conceptual de la interacció proteïna-polifenol. (Siebert i col., 1996a)

## Introducció

d'aplicar el test del calor. Aquest efecte s'associa amb l'augment de la càrrega de la proteïna a aquest pH, encara que la interacció proteïna-polifenol no és de caràcter iònic, quan augmenta la càrrega de les proteïnes hi ha un augment en la repulsió entre elles i per tan estan més accessibles per poder interaccionar amb els compostos fenòlics. Tot i així, al pH del vi, la concentració d'etanol no influencia en la formació dels complexos proteïna-polifenol.

### 6.2.2. La temperatura

Els estudis realitzats per Mesquita i col., (2001) confirmen la influència de la temperatura en l'augment de terbolesa formada en el vi blanc, aquest estudi s'ha realitzat amb sis varietats de raïm diferents i el rang de temperatura aplicat és de 30 a 80 °C. Tal i com s'observa a la Figura 6G, amb l'augment de la temperatura a la que s'incuba el vi, augmenta la quantitat de terbolesa formada en aquest. Aquest augment en la formació de terbolesa podria estar relacionat amb el fet de que al augmentar la temperatura les proteïnes tenen més predisposició a desnaturalitzar-se, llavors hi haurà més llocs disponibles d'unió amb els polifenols i per tan es formaran ràpidament agregats més grans i més precipitació. A més, la temperatura també pot influir en la composició en polifenols inicial del vi, de fet amb la temperatura s'observa un canvi de coloració del vi, de groguenc a marronós, donant lloc doncs a una modificació dels compostos fenòlics presents en aquest. També és pot observar a la Figura 6G que l'augment de terbolesa al augmentar la temperatura es dona en tots els vins utilitzats en l'estudi, però no tots els vins segueixen el mateix patró en la formació de terbolesa.

### 6.2.3. L'oxigen

L'oxigen molecular és necessari per a que es doni les reaccions d'oxidació en el vi,

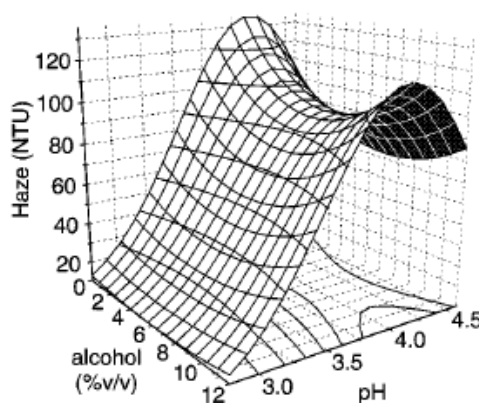


Figura 6F. Influència del pH i de la concentració d'etanol en la formació de precipitat. (Siebert i col., 1996b).

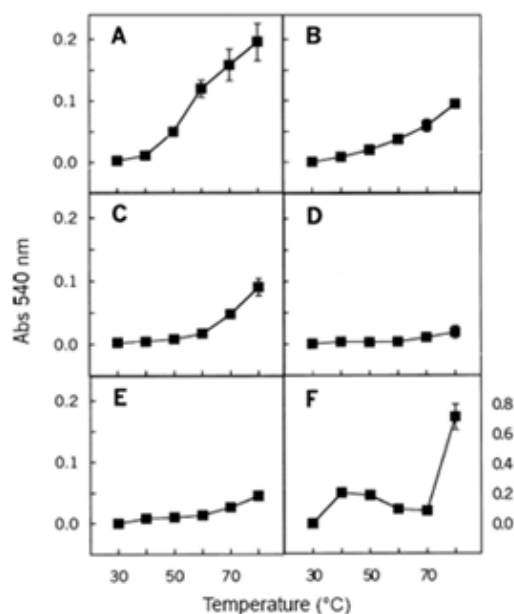


Figura 6G. Influència de la temperatura en l'augment de terbolesa generada en sis vins blancs. (Mesquita i col., 2001)

## Introducció

aquest però, no actua directament sobre els substrats sinó que forma radicals amb un elevat potencial d'oxidació i són aquests radicals els que estaran implicats en les reaccions d'oxidació dels components del vi. En un vi principalment hi té lloc l'oxidació del etanol a acetaldehid i l'oxidació dels compostos fenòlics per donar lloc a quinones, espècies molt reactives que tendiran a polimeritzar per tal d'aconseguir estructures més estables. Ambdues oxidacions estan implicades en el mecanisme de precipitació dels complexos proteïna-polifenol. L'airejació dels vins blancs potencia la precipitació proteica i l'enfosquiment del vi blanc. (Waterhouse i Laurie, 2006).

### 6.2.4. Els metalls.

Els metalls presents en el vi procedeixen directament del raïm, per tan, la seva composició estarà marcada per la regió en la que ha crescut el cep; així doncs el tipus de sòl, les condicions climàtiques de l'anyada, la varietat i la maduresa del raïm en el moment de la collita, seran els factors que determinaran la concentració dels diferents metalls en el vi (González i col., 1996; Kment i col., 2005).

Els metalls majoritaris són el Ca, K, Na i Mg, la seva concentració en el vi pot oscil·lar entre  $10\text{-}10^3$  µg/mL. El K és el metall que normalment presenta una concentració superior en el vi; les concentracions de Ca i Mg són comparables però inferiors en un ordre de magnitud a la del K; el Na es troba en concentració igual o inferior a les del Ca i Mg. L'Al, Cu, Fe, Mn, Rb, Sr i Zn es troben en una concentració entre 0.1-10 µg/mL. En el vi es troben traces de Ba, Cd, Co, Cr, Li, Ni, Pb i V, la seva concentració oscil·la entre 0.1-100 ng/mL o inferior (Pohl, 2007).

La concentració dels diferents metalls en el vi respecte el most, decreix al llarg de la fermentació degut a la precipitació dels tartrats de K i Ca (González i col., 1996; Rodríguez i col., 1999; Sauvage i col., 2002;) o d'altres precipitats insolubles de Al, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb i Zn (Rodríguez i col., 1999; Galani-Nikolakaki i col., 2002). Aquesta precipitació s'accelera amb l'augment del pH i del percentatge d'alcohol (Rodríguez i col., 1999). A més, el llevat capta Ca, Cu, Fe, K, Mg i Zn al llarg de la fermentació alcohòlica i per tan ajuda en la disminució de la concentració d'aquests metalls (Rodríguez i col., 1999). Així doncs els metalls, malgrat estar presents en el vi a baixes concentracions, estan implicats en molts dels processos de precipitació que es donen al llarg del procés d'elaboració, a més, es troben units tan a proteïnes com a polisacàrids i compostos fenòlics, tots ells compostos del vi importants en el desenvolupament de la precipitació proteica.

La precipitació dels tartrats de K i Ca canvia el pH del vi, tot afavorint l'oxidació del Cu i el Fe i conseqüentment l'aparició de terbolesa que afecta a la conservació del vi (McKinnon i Scollary, 1997; Rodríguez i col., 1999).

## Introducció

El Cu, el Fe i el Mn són els metalls responsables de la estabilitat del vins blancs embotellats (Palacios i col., 2001). Aquest fenomen que es coneix com a enfosquiment del vi, consisteix en un cadena de reaccions d'oxidació dels components orgànics del vi que implica la pèrdua de frescor i d'aroma i l'aparició de tanins condensats que acaben precipitant (Palacios i col., 2001; Benítez i col., 2002). El mecanisme és força complex;  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  i  $\text{Mn}^{+2}$  activen l'oxigen molecular i tot seguit es dona l'oxidació dels compostos orgànics a aldehids i cetones per formació d'espècies reactives d'oxigen (radicals hidroxil) (Benítez i col., 2002; Lara i col., 2005; Danilewicz, 2003 i 2007). A més a més el Fe actua com a catalitzador en les reaccions d'oxidació dels polifenols, i el Mn està implicat en la formació d'acetaldehid; l'acetaldehid reacciona amb els polifenols amb l'ajuda del Fe com a catalitzador i es formen grans polímers que acaben precipitant (Benítez i col., 2002).

El  $\text{Cu}^{+2}$  i  $\text{Fe}^{+3}$  també estan implicats en la precipitació cúprica i fèrrica (Kment i col., 2005). L'associació d'aquests metalls amb quelants orgànics és un dels més importants mecanismes antioxidants que té lloc en el vi per tal de reduir la formació d'espècies reactives (Cacho i col., 1995; Waterhouse i Laurie, 2006).

Així doncs el Fe, el Cu i el Mn, estan implicats en la polimerització i en l'activació mitjançant oxidació dels compostos fenòlics, tots dos processos implicats en la formació de grans complexos per unió a les proteïnes del vi, donant lloc finalment a la formació de precipitat. Aquests dos mecanismes s'han descrit en l'apartat dels compostos fenòlics i es mostren a la Figura 6D.

Estudis realitzats per Besse i col. (2000), mostren la precipitació del coure juntament amb les proteïnes i els polifenols quan s'aplica el test del calor al vi. Els nivells de coure en el vi després d'aplicar el test del calor disminueixen en tots els vins estudiats, a més la disminució es quasi proporcional a la disminució en proteïna, a més proteïna precipitada més coure precipitat. Suggereixen que el coure es combina amb la proteïna per donar lloc a la formació de productes implicats en l'enfosquiment del vi, i així és com acaba apareixen la terbolesa.

Pocock i col., (2007) en la cerca del "factor X" han estudiat la influència del  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{+}$  i  $\text{Cu}^{+2}$  en la formació de precipitat després d'aplicar el calor a una solució sintètica que conté 500 mg/l de taumatina. Tan l'addició de  $\text{Fe}^{+2}$  com de  $\text{Fe}^{+3}$  implica un augment en la terbolesa formada si es compara amb el control (sense l'addició de cap metall); en el cas de  $\text{Cu}^{+}$  i  $\text{Cu}^{+2}$  no s'han observat diferències. Malgrat tenir lloc un augment en la terbolesa en el cas de  $\text{Fe}^{+2}$  i  $\text{Fe}^{+3}$ , aquest metall no es troba en estat lliure en el vi i a més, les dosis utilitzades en les que hi ha augment en l'aparició de terbolesa són més elevades que la concentració en la que normalment es troba en el vi, per tan aquest autor suggereix que  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{+}$  i  $\text{Cu}^{+2}$  no són els factor que desencadena la formació del precipitat proteic.

### 6.3. El sulfat.

Els primers estudis en els que s'atribueix la influència de l'anió sulfat en la precipitació proteica han estat publicats recentment per Pocock i col., (2007). Dosis creixents d'aquest anió (entre 0.5-2.0 g/l), s'han afegit a una solució sintètica en la que hi ha 500 mg/l de taumatina, s'ha aplicat calor i s'ha comprovat si hi ha diferències en la terbolesa generada comparant-ho amb el control (0 g/l sulfat). S'ha observat que al augmentar la dosi de sulfat afegida hi ha un augment en la terbolesa que es forma, per tan hi ha un augment en la precipitació proteica. Aquest estudi proposa que el sulfat és el "factor X" o sigui l'iniciador de la precipitació proteica tenint en compte l'efecte modulador per part dels compostos fenòlics en aquesta. El sulfat està present en el vi en les dosis que s'ha estudiat en aquest treball.

Les proteïnes estan carregades al pH del vi, i la solubilitat d'aquestes depèn de la concentració de sals dissoltes en el vi, de la polaritat de la solució, del pH i de la temperatura. La solubilitat de les proteïnes es pot veure modificada si en el vi hi tenen lloc variacions en els factors que hem citat anteriorment; aquestes variacions poden afavorir la solubilitat de la proteïna o pel contrari disminuir-la. L'addició de sulfat implica un augment en la concentració de sals dissoltes, que a la vegada implica una disminució en la solubilitat de la proteïna, el que es coneix com precipitació salina o "salting-out". De fet el sulfat d'amoni és la sal més utilitzada en els processos de purificació de proteïnes per precipitació salina. Per aquest motiu al afegir dosis creixents de sulfat a la solució sintètica que conté 500 mg/l de taumatina hi ha un augment en la precipitació proteica i així en la terbolesa.

Aquests resultats s'han obtingut per addició de sulfat en una solució sintètica que conté 500 mg/l de taumatina, la concentració proteica en la que s'ha treballat és molt elevada en comparació a la concentració que sol haver-hi en un vi blanc, a més en el vi no s'ha descrit la presència de taumatina, sinó de proteïnes amb estructura semblant a la taumatina i per tan s'hauria de treballar directament amb el vi per tal de verificar l'efecte del sulfat.

# Justificació i Objectius



Rossy Gómez, *Ribeira Sacra*.

## Justificació i Objectius

Malgrat que evitar l'aparició d'enterboliments proteics en el vi blanc és relativament senzill, tots els processos destinats a l'estabilització del vi comporten un minvament de la seva qualitat. Els tractaments amb bentonita, àmpliament utilitzats per la indústria del vi, no són prou específics i eliminen també altres molècules. És per això, que la filial vitivinícola ha cercat i encara cerca tractaments alternatius més específics que puguin selectivament eliminar aquelles proteïnes responsables de l'enterboliment sense afectar la resta de la matriu. No obstant, el possible disseny de nous tractaments d'estabilització més respectuosos amb la qualitat implica un millor coneixement de la realitat química de l'enterboliment i dels mecanismes que provoquen la seva aparició. La bibliografia existent sobre el tema és àmplia però encara manté molts punts foscos. De fet les proteïnes identificades com responsables de la precipitació proteïca, les *Thaumatin like proteins* i les quitinases, han estat identificades en precipitats forçats pel calor o en extractes prèviament precipitats amb sulfat amònic, i no en precipitats espontanis que són els que veritablement provoquen l'enterboliment. D'altra banda, molts autors han suggerit que a més de les proteïnes, altres molècules, entre les que destaquen els compostos fenòlics per la seva afinitat per les proteïnes, poden estar presents en el precipitat i fins i tot ésser els desencadenants del procés. És per aquest motiu que en aquest treball ens plantegem els següents objectius concrets:

1. Caracteritzar químicament l'enterboliment proteic espontani del vi blanc.
2. Identificar les proteïnes presents a l'enterboliment proteic espontani del vi blanc.
3. Comparar la composició química dels precipitats generats pels tests d'estabilitat proteica més usuals amb la del precipitat natural. Determinar la fiabilitat real de cadascun dels tests.
4. Identificar els compostos fenòlics presents a l'enterboliment proteic espontani del vi blanc.

## **Justificació i Objectius**



## Capítol 1:

# Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.



Janis Miglavs, Vineyard in Carnaros area of Napa Valley.

- 1.1. Caracterització de l'enterboliment proteic espontani en vi blanc de la varietat *Sauvignon Blanc*.
- 1.2. Identificació de les proteïnes inestables mitjançant la tècnica MALDI-TOF/TOF.
- 1.3. Identificació de les proteïnes de les fraccions obtingudes per FPLC-IC.
- 1.4. Electroforesis en gel del vi abans i després de la precipitació natural.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

En aquest primer capítol, *Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc*, s'engloben tots els resultats obtinguts en l'estudi de les proteïnes inestables presents en l'enterboliment proteic espontani del vi blanc de la varietat *Sauvignon Blanc*. Aquest primer estudi ha permès la publicació científica d'alguns dels resultats obtinguts; apartat 1.1 d'aquest capítol, *Characterization on natural haze protein in Sauvignon white wine*. No obstant, la limitació d'espai a la que obliguen les revistes científiques, ha deixat en el tinter molta informació que només es descrita de forma molt breu. Es per aquesta raó que s'ha cregut convenient incloure nous subcapítols en que es descriuen totes les experiències realitzades i es mostren tots els resultats obtinguts.

## **Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables.**

## Capítol 1.1:

# Caracterització de l'enterboliment proteic espontani en vi blanc de la varietat *Sauvignon Blanc*.



***“Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine.”***

Article publicat a la revista

*Food Chemistry*, 2009, 113, 28-35.

## **Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine**

**M. Esteruelas<sup>a</sup>, P. Poinaut<sup>b</sup>, N. Sieczkowski<sup>b</sup>, S. Manteau<sup>b</sup>, M.F. Fort<sup>a</sup>,  
J.M. Canals<sup>a</sup> and F. Zamora<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona (CeRTA),  
Universitat Rovira i Virgili, C/Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain.

<sup>b</sup>Martin Vialatte Œnologie. 79, Avenue A.A. Thévenet, BP 1031 Magenta, 51319 Epernay  
Cedex, France.

**Food Chemistry 113 (2009) 28-35**

Received 12 March 2008; revised 6 May 2008; accepted 2 July 2008

### **Abstract**

The natural precipitate of a white Sauvignon wine was dissolved, lyophilized and analyzed by molecular exclusion FPLC and/or electrophoresis (SDS–PAGE, native and isoelectrofocusing) using three types of stains (Coomassie Blue, silver stain and PAS stain). The protein spots were digested and analyzed by MALDI-TOF/TOF MS. Direct analysis of the precipitates by SDS–PAGE gave no bands with Coomassie Blue stain and five bands with silver stain. It was not possible to identify these bands by MALDI-TOF/TOF MS. However, applying molecular exclusion FPLC prior to SDS-PAGE improved sensitivity and enabled three bands to be identified. These were the previously described thaumatin-like protein (VVTL1) and two proteins that to our knowledge have never been described as components of protein haze:  $\beta$ -(1-3)-glucanase and ripening-related protein grip22 precursor.

**Keywords:** Haze proteins; White wine; Electrophoresis; FPLC; MALDI-TOF/TOF.

### **Introduction**

One of the main factors affecting the stability of white wine during storage is the instability of proteins (Bayly & Berg, 1967; Hsu & Heatherbell, 1987a). Though wine proteins are usually found at very low concentrations, some of them may precipitate due to lack of stability (Bayly & Berg, 1967; Waters et al., 1991). The appearance of haze in a bottle of wine can seriously harm the image of the wine and affect its acceptance by the consumer.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

The wine industry systematically tries to stabilize white wines and prevent protein precipitation. Currently the best way to eliminate the risk of protein precipitation is bentonite fining (Hsu & Heatherbell, 1987b; Pocock & Waters, 2006). Alternative methods such as ultrafiltration (Hsu, Heatherbell, Flores, & Watson, 1987) and zirconium oxide treatment (Salazar, Achaerandio, Labbe, Guell, & López, 2006) can also be effective but their use is still experimental.

Bentonite interacts electrostatically with proteins and this produces flocculation (Hsu & Heatherbell, 1987b; Hsu et al., 1987). However, protein instability does not correlate well with total protein concentration because individual proteins behave differently (Bayly & Berg, 1967; Hsu & Heatherbell, 1987a). Other factors may also have a role in protein precipitation (Siebert, 1999; Waters et al., 1995). It has recently been suggested, for example, that sulfate may be a key factor (Pocock, Alexander, Hayasaka, Jones, & Waters, 2007).

The literature contains several tests for determining the stability of wine proteins and there are even some commercial tests on the market. However, these tests sometimes provide different results, which create uncertainty for the winemaker (Dubourdieu et al., 1988; Sarmiento et al., 2000; Toland et al., 1996). As there is no clear criterion for selecting the correct dose of bentonite to stabilize a wine, winemakers usually treat wine with high doses.

However, an excess of bentonite can have negative effects on wine aroma (Lubbers, Charpentier, & Feuillat, 1996) and mouthfeel (Guillou, Aleixandre, García, & Lizama, 1998). Bentonite also affects the foaming properties of sparkling wines (Martinez-Rodriguez & Polo, 2003; Vanrell et al., 2007). For these reasons, the chemical nature of protein precipitates is still a subject of great interest in oenology.

Several techniques have been used to study the protein fraction of white wines: gel electrophoresis, isoelectric focusing (Dawes, Boyes, Keene, & Heatherbell, 1994), capillary electrophoresis (Dizy & Bisson, 1999), HPLC (Kwon, 2004), affinity chromatography, FPLC (Canals, Arola, & Zamora, 1998) and chromatofocusing on FPLC (Dawes et al., 1994). More recently, N-terminal sequencing (Ferreira et al., 2000, Waters et al., 1998; Waters et al., 1996) and mass spectrometry (Hayasaka et al., 2001) methods have been used.

Few of these techniques have been used to study unstable proteins, however. Bayly and Berg (1967) reported that the proteins with the lowest pI were the most unstable against the heat test. These data were confirmed by Hsu and Heatherbell (1987b), who reported that unstable proteins have a low isoelectric point (4.1-5.8) and a low relative molecular mass (13-30 kDa). More recently Waters et al. used the back-addition technique (Waters et al., 1991, Waters et al., 1996; Waters et al., 1998) to identify pathogenesis-related proteins (thaumatin-like proteins and chitinases) as causes of haze.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

All the above studies were conducted using heat forced precipitates (Hsu & Heatherbell, 1987b) or back-addition techniques (Waters et al., 1991). To our knowledge only Koch and Sajak (1959) and Sarmiento et al. (2000) have analyzed the naturally occurring precipitate. The aim of the present study was to characterize the proteins in a natural precipitation of a white Sauvignon wine.

### Materials and methods

**Chemicals.** All products were of high purity and suitable for fast protein liquid chromatography (FPLC) and electrophoresis. All solutions were previously filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  acetate cellulose filters (Millipore GSE) and degassed using an ultrasonic water bath.

**Sample preparation.** Unfined Sauvignon white wine, produced in 2006 at the experimental cellar of the Tarragona Enology Faculty (Rovira i Virgili University) in Constantí (A.O.C. Tarragona), was centrifuged (10 min at 12.000 g), filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ), bottled (375 mL) and stored at room temperature until natural precipitation appeared.

**Wine before and after natural precipitation.** For wine analysis, aliquots of 30 mL of wine before and after precipitation were centrifuged (10 min at 12.000 g) and dialyzed in tubes of a molecular weight cut-off of 3500 Da (Membrane Filtration Products Inc., San Antonio, TX, USA). The dialyzed samples were lyophilized and preserved at -20  $^{\circ}\text{C}$  until the time of analysis.

**Natural precipitate.** For analysis of the precipitate, the bottles were vigorously stirred and all their contents homogeneously distributed in eight centrifuge tubes. The tubes were then centrifuged (10 min at 12.000 g) and the eight pellets were directly dissolved with a total volume of 2 mL of 50 mM disodium phosphate solution (pH 9.23). These precipitates were not dialyzed in order to prevent some of their components (e.g. phenolic compounds) from being lost. Aliquots of this sample were used for protein estimation. The rest of the sample was lyophilized and stored at -20  $^{\circ}\text{C}$ .

**Determination of protein concentration.** The protein concentrations of the various samples were determined by the Bradford dye-binding microassay method (Bradford, 1976). These analyses were carried out after dialysis, lyophilization and dissolution in 0.3 M

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

ammonium acetate solution (pH 6.80) in the case of the wines and after resuspension in 50 mM disodium phosphate solution (pH 9.23) in the case of the precipitate. These data were used to select the correct dilution factor for electrophoresis of the different samples.

**Chemical analysis of the natural precipitate.** Aliquots of the lyophilized precipitate were weighed and used for protein determination by the Bradford dye-binding microassay method (Bradford, 1976), for polysaccharide determination by the phenol-sulphuric acid assay method (Segarra, Lao, López-Tamames, & De la Torre-Boronat, 1995), for phenolic compound determination by the Folin-Ciocalteau microassay method (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999) and for organic elemental analysis. All results are expressed in percentages of the various substances with respect to the original dry weight of the precipitate.

**Organic elemental analysis.** Samples of the natural precipitate were analyzed with an organic elemental analyzer equipped with a gas chromatograph and a thermal conductivity detector (Thermo Quest 1108, Carlo Erba, Milan, Italy). Samples were combusted at 1020 °C in a tin capsule with oxygen injection. Helium was then used to carry the generated gases through specific reactants and convert them into N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O and SO<sub>2</sub>, which were immediately measured.

**Gel filtration chromatography on FPLC.** The wine lyophilized samples (before and after natural precipitation) were resuspended in 1.2 mL of 0.3 M ammonium acetate solution (pH 6.80). The lyophilized precipitate was dissolved in an appropriate suitable volume of 0.3 M ammonium acetate solution (pH 6.80) to obtain a protein concentration of 0.25 µg/µL. The samples were centrifuged (5 min at 12.000 g, 4 °C) and the supernatant was used directly for FPLC analysis (Canals et al., 1998). Analyses were carried out with a Superdex 75 PC 3.2/30 column on a fast protein liquid chromatography system (Smart System, Pharmacia, Uppsala, Sweden). The samples (50 µL) were injected and eluted with a 0.3 M ammonium acetate solution (pH 6.80) with a flow rate of 40 µL/min. The column eluents were continuously monitored at 280 nm using a µPeak Monitor (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The various fractions (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> and F<sub>4</sub>) were collected and lyophilized for later protein determination and electrophoresis.

**Cation exchange chromatography on FPLC.** The wine lyophilized samples (before and after precipitation) were resuspended in 1.2 mL of 0.05 M acetic acid-HCl buffer (pH 2.0). The previously lyophilized samples were dissolved in a suitable volume of 0.05 M



## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

acetic acid-HCl buffer (pH 2.0) to obtain a protein concentration of 0.5 µg/l. The samples were centrifuged (5 min at 12.000 g, 4 °C) and the supernatant was used directly for FPLC analysis (Canals et al., 1998). Analyses were carried out with an ion exchange column Mono S PC 1.6/5 on a fast protein liquid chromatography system (Smart System, Pharmacia, Uppsala, Sweden). The initial buffer was 0.05 M acetic acid-HCl (pH 2.0). The elution buffer was the initial buffer with sodium chloride 1 M. The column was equilibrated with the initial buffer at a flow rate of 100 µl/min. Fifty microlitres of the samples were loaded into the column. The bound proteins were eluted with a gradient of elution buffer and continuously monitored at 280 nm.

**SDS-PAGE.** Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis was performed using a precast discontinuous gel buffer system (Laemmli, 1970). PhastGel Homogeneous 20 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) was used to adequately separate the proteins.

Samples of the wines (before and after natural precipitation) previously dialysed, lyophilized and dissolved in 0.3 M ammonium acetate solution (pH 6.80). These samples, the dissolved precipitate and their corresponding fractions obtained from FPLC ( $F_1+F_2$ ,  $F_3$  and  $F_4$ ) were lyophilized and resuspended in a buffer containing 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 10% glycerol, and 0.002% bromophenol blue, thus assuring an SDS/protein ratio greater than three. The buffer volume was selected so as to obtain a protein concentration of 100 ng/µl for silver staining and 500 ng/µl for Coomassie Blue and PAS stain. The samples were boiled for 5 min and subjected to electrophoresis.

Two molecular weight standards calibration kits for SDS-PAGE were used to determine the molecular weights (ref. 161-0304 and ref. 161-0326, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The low range molecular weight standards calibration kit was made up of phosphorylase b (97.400 Da), serum albumin (66.200 Da), ovalbumin (45.000 Da), carbonic anhydrase (31.000 Da), trypsin inhibitor (21.500 Da) and lysozyme (14.400 Da). The polypeptide molecular weight standards calibration kit was made up of triosephosphate isomerase (26.625 Da), myoglobin (16.950 Da), α-lactalbumin (14.437 Da), aprotinin (6.512 Da), insulin b chain oxidized (3.496 Da) and bacitracin (1.423 Da). Electrophoresis was performed using a PhastSystem apparatus (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) and PhastSystem Separation Technique File No. 111 (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990).

**Native-PAGE.** PhastGel Homogeneous 20 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) was used to adequately separate the proteins. The gels were run with PhastGel Native Buffer Strips (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden). Samples of the wines (before and after natural precipitation) previously dialysed, lyophilized and dissolved in 0.3 M ammonium acetate

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

solution (pH 6.80). These samples, the dissolved precipitate and their corresponding fractions obtained from FPLC ( $F_1+F_2$ ,  $F_3$  and  $F_4$ ) were lyophilized and resuspended in an appropriate volume of MilliQ to obtain a protein concentration of 100 ng/ $\mu$ l for silver staining and 500 ng/ $\mu$ l for Coomassie Blue and PAS staining. Electrophoresis was performed using a PhastSystem apparatus (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) and PhastSystem Separation Technique No. 121 (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990).

**Isoelectrofocusing.** PhastGel IEF 3-9 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) was used to adequately separate the proteins. Samples of the wines (before and after natural precipitation) previously dialysed, lyophilized and dissolved in 0.3 M ammonium acetate solution (pH 6.80). These samples, the dissolved precipitate and their corresponding fractions obtained from FPLC ( $F_1+F_2$ ,  $F_3$  and  $F_4$ ) were lyophilized and resuspended in a suitable volume of MilliQ to obtain a protein concentration of 100 ng/ $\mu$ l for silver staining and 500 ng/ $\mu$ l for Coomassie Blue and PAS staining. A broad range pI (pH 3-10) calibration kit for pI determinations (ref. 17-0471-01, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) was used to determine the pI of the proteins. This kit was made up of amyloglucosidase (pI 3.50), methyl red (pI 3.75), soybean trypsin inhibitor (pI 4.55),  $\beta$ -lactoglobulin A (pI 5.20), carbonic anhydrase B bovine (pI 5.85), carbonic anhydrase B human (pI 6.55), myoglobin horse acidic (pI 6.85), myoglobin horse basic (pI 7.35), lentil lectin acidic (pI 8.15), lentil lectin middle (pI 8.45), lentil lectin basic (pI 8.65) and trypsinogen (pI 9.30). Electrophoresis was performed using a PhastSystem apparatus (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) and PhastSystem Separation Technique No. 100 (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990).

**Stains.** The protocols for silver and Coomassie Blue R-250 stains are described in Amersham Biosciences automated staining of polyacrylamide gels with Processor Plus (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990). The reagents used for silver staining were prepared according to Plus One Silver Stain Kit protein instructions (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990). The reagents used for Coomassie Blue R-250 stain were prepared according to Fast Coomassie Staining Development Technique File No. 200 (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990). A modified silver staining protocol (Yan et al., 2000) was used in the gels, by which their spots were removed for analysis by MALDI-TOF/TOF MS. Periodic acid Schiff (PAS) stain was carried out using the Sigma Glycoprotein Detection Kit (SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA).

**MALDI-TOF/TOF MS.** Protein identification by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry was carried out according to Fernández-Acero et al. (2006). Protein spots were excised manually

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

and then digested automatically using a Proteineer DP protein digestion station (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany). Digestion was carried out with modified porcine trypsin (Sequencing Grade, Promega, Madison, USA) at 37 °C for 6 h (Shevchenko, Wilm, Vorm, & Mann, 1996). The digestion solutions were collected, vacuum-dried and kept frozen for later MS analysis.

Peptide mass fingerprint spectra were measured on a Bruker Ultraflex TOF/TOF MALDI mass spectrometer (Bruker-Daltonics) in a positive ion reflector mode (Suckau et al., 2003). Internal calibration was done with mass signals of trypsin autolysis ions to reach a typical mass measurement accuracy of 625 ppm. For fragment ion analysis in the TOF/TOF mode, precursor ions were selected according to their intensity and resolution using a timed ion gate. The measured tryptic peptide masses together with the corresponding MS/MS spectra were transferred through the MS BioTools program (Bruker-Daltonics) as inputs to protein identification in the NCBI nr database using MASCOT software (Matrix Science, London, UK) (Perkins, Pappin, Creasy, & Cottrell, 1999).

**Statistical analysis.** All numerical data are expressed as the arithmetic average  $\pm$  standard deviation from three replicates. Statistical comparisons between means were established with Student's t-test using Statview (software for Macintosh).

### Results and discussion

Table 1 shows the proteins, phenolic compounds and polysaccharides in the natural precipitate's composition. Direct protein analysis of the natural precipitate by the Bradford dye-binding assay indicated that the proportion of protein was only 10.3%. On the other hand, direct determination of phenolic compounds and polysaccharides presented quantitatively comparable levels (7.2% and 4.4%, respectively). However, we should point out that as the spectrophotometric methods are not very specific, these results should be interpreted with caution.

**Table 1**  
Chemical composition of natural precipitate

Substance	%
Protein	10.3 $\pm$ 1.4
Phenolic compounds	7.2 $\pm$ 0.4
Polysaccharides	4.4 $\pm$ 0.2

All data are expressed as the average of three replicates  $\pm$  standard deviation.

Surprisingly, the addition of percentages of proteins, polysaccharides and phenolic compounds barely exceeds 20% of the dry weight of the natural precipitate. The reasons for

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

this low proportion are the limitations of spectrophotometric methods mentioned above and the presence of other compounds in the natural precipitate such as metals and tartaric acid salts. Since the wine was not stabilized and the precipitate was not dialyzed, it is quite probable that significant amounts of tartaric acid salts were present. In fact, Correa-Gorospé, Polo & Hernandez (1991) found proteins and phenolic compounds present in tartaric sediments from wines.

Even so, the low proportion of proteins in the natural precipitate was also confirmed by organic elemental analysis (Table 2), which indicated that the proportion of nitrogen was extremely low (2.24%). When a standard factor of 6.25 was applied, the percentage of protein ( $14.02 \pm 0.45\%$ ) was similar to that obtained by the Bradford method.

**Table 2**  
Organic elemental composition of natural precipitate

Element	%
Nitrogen	$2.24 \pm 0.07$
Carbon	$35.44 \pm 0.36$
Hydrogen	$6.73 \pm 0.9$
Sulfur	$0.03 \pm 0.01$

All data are expressed as the average of three replicates  $\pm$  standard deviation.

However, according to these data, the natural precipitate in wines seems to be made up not only of proteins but also of polysaccharides and especially of phenolic compounds. Dadić and Belleau (1980) obtained similar results in precipitates of beer. They found significant amounts of polysaccharides (15-40%) and phenolic compounds (25-30%), and deduced that proteins and metals are only the remaining proportion (30-60%). These results are higher than our results in wine, but they are proportionally similar.

Sarmiento et al. (2000) found that the percentage of initial wine protein that precipitated was higher than 50%, which suggests that there is a greater proportion of protein in the precipitate. However, they obtained this data by calculating the difference between the protein concentration of wine before and after precipitation instead of directly measuring it from the natural precipitate.

Koch and Sajak (1959) found a higher proportion of proteins in natural precipitates. However, they used the Biuret method which is more affected by interferences than the Bradford dye-binding assay (Williams, Fox, & Marshall, 1995).

In a previous study (Canals et al., 1998) we proposed a method that used FPLC to separate white wine proteins into several fractions. In all the wines studied, three or four fractions were obtained by molecular exclusion chromatography ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$  and  $F_4$ ). Depending on the protein wine concentration,  $F_1$  and  $F_2$  were either one or two single peaks. In the present study, these fractions were subsequently analyzed by SDS-PAGE and

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

cationic exchange chromatography. The results indicated that the high molecular weight fraction ( $F_1$ ) had a molecular weight of over 100 kDa. The intermediate molecular weight fraction ( $F_2$ ) was a single protein with a molecular weight of around 60 kDa, which according to the literature is probably invertase. The low molecular weight fraction ( $F_3$ ) consisted of several different proteins with molecular weights of between 20 and 30 kDa. Finally, the very low molecular weight fraction ( $F_4$ ) included polypeptides with molecular weights of less than 20 kDa and phenolic compounds.

Fig. 1 shows the molecular exclusion chromatograms of the white Sauvignon wine before and after natural protein precipitation and of the precipitate using the above method. No great differences were found between the chromatograms of the wine before and after natural precipitation, which indicates that only a small proportion of protein was precipitated.

Fig. 2 shows the protein concentration of the wine measured by the Bradford dye-binding assay and their different molecular exclusion fractions before and after natural precipitation. A significant decrease in total protein concentration was detected after natural precipitation. This decrease was almost completely due to the low molecular weight fraction ( $F_3$ ). These data are in agreement with results previously published by Hsu and Heatherbell (1987b), who reported that unstable proteins were those with a molecular weight of between 13 and 30 kDa.

The fact that there were no differences in the exclusion molecular chromatograms of wines before and after natural precipitation but a significant decrease with the Bradford dye-binding assay may be related to the greater specificity of the latter method. Absorbance at 280 nm, used for detecting peaks in molecular exclusion chromatography, detects many other substances such as phenolic compounds.

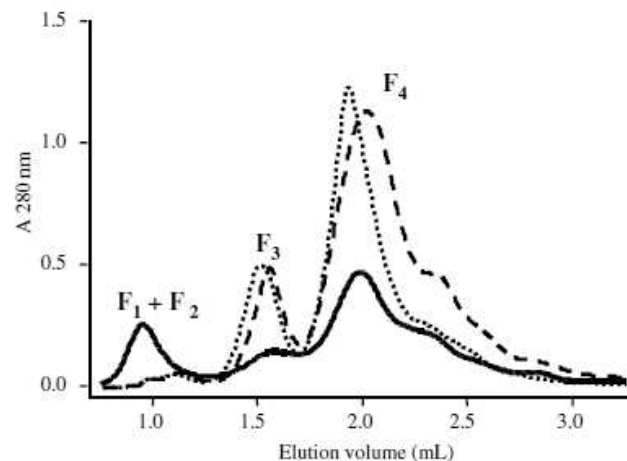


Fig. 1. Molecular exclusion chromatograms. (---) Wine before natural precipitation; (—) wine after natural precipitation; (· · ·) natural precipitate.

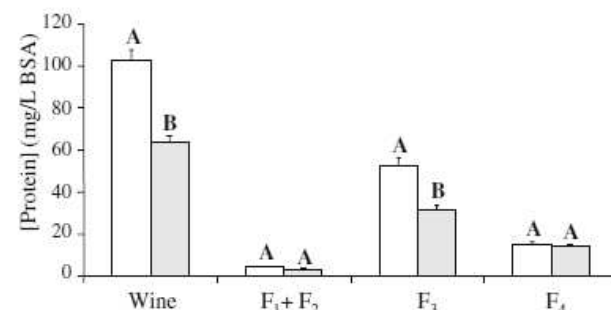


Fig. 2. Protein concentration of the wine and their different molecular exclusion fractions before (□) and after (■) the natural precipitation. Equal letters AB indicate the absence of statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) among the samples.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

Fig. 1 also shows the molecular exclusion chromatogram of the natural precipitate. There are three clear peaks corresponding to the high and intermediate molecular weight fractions ( $F_1+F_2$ ), the low molecular weight fraction ( $F_3$ ), and the very low molecular weight fraction ( $F_4$ ). However, there is no clear quantitative relationship between the changes in the profile of the natural precipitate and the small differences in wine after natural precipitation. It should be noted that the concentration factor applied in the natural precipitate was 7.5 folds higher than in wines. Therefore, it is not possible to quantitatively compare the chromatograms of natural precipitates and those of wines.

Fig. 3 shows the cationic exchange chromatograms of the white Sauvignon wine before and after natural protein precipitation and of the precipitate. Twelve peaks were detected in the wine before natural precipitation and two of these (peaks 6 and 9) clearly decreased after precipitation. Five peaks were detected in the natural precipitate. It is difficult to determine the exact correspondence between the peaks of the precipitate and those of the original wine because their retention times do not coincide exactly. One possible explanation for this phenomenon may be that the association of phenolic compounds in the protein binding sites may lead to changes in the protein charge. However, it appears that the first three peaks of the precipitate correspond to peaks 1, 2 and 3 of the original wine. The fourth and fifth peaks of the precipitate should correspond to peaks 6 and 9 of the wine since they decline more sharply.

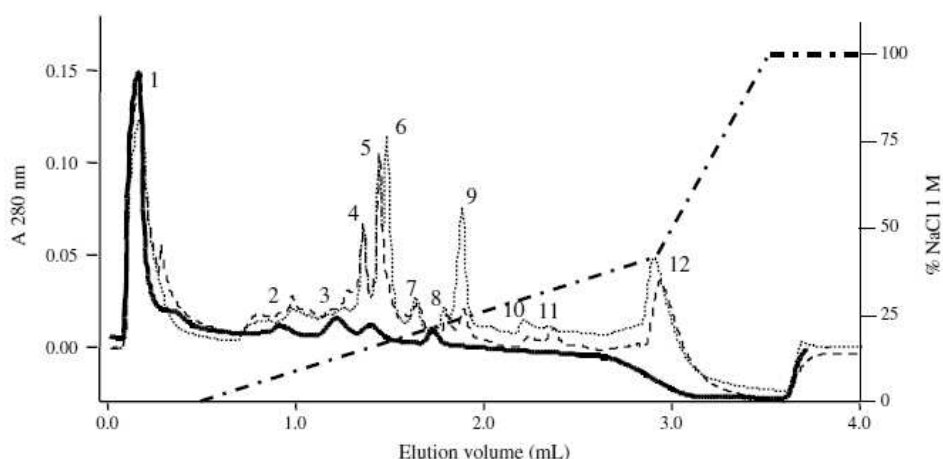


Fig. 3. Cationic exchange chromatograms. (· · ·) wine before natural precipitation; (— —) wine after natural precipitation; (—) Natural precipitate; (— —) NaCl gradient.

We should point out that the first peak was eluted before the saline gradient started. It therefore corresponds to substances that were not retained by the cationic exchange column. This peak, which is present in both the wines and the precipitate, did not originate a band when SDS-PAGE and silver stain were applied (data not shown). Therefore, peak 1 is probably made up of polysaccharides and/or phenolic compounds but not of proteins. This peak is much higher than the other four peaks detected in the natural precipitate, which

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

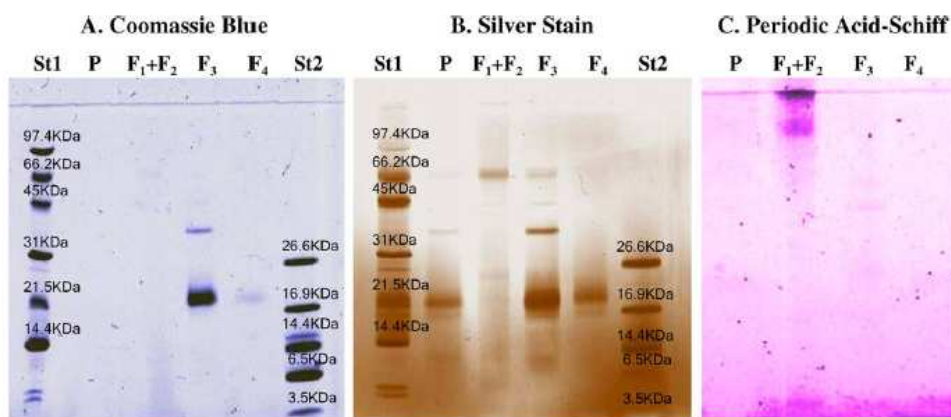
suggests, as we observed in our previous analysis (Table 1 and Table 2), that the proportion of protein in the precipitate is relatively low.

Fig. 4 shows the SDS-PAGE analysis of the natural precipitate and its molecular exclusion fractions using three different stains. The precipitate did not give any band when Coomassie Blue R-250 and Periodic Acid-Schiff were used as stains. However, when silver stain was used, four bands were detected at 69, 41, 20 and 18 kDa, which coincided with the number of peaks retained by cation exchange chromatography.

The high and intermediate molecular weight fractions ( $F_1+F_2$ ) only gave a band at 69 kDa with silver stain but not with Coomassie Blue R-250. This fraction also gave a narrow band at the beginning of the gel when periodic acid-Schiff was applied. These data again confirm the presence of polysaccharides in the natural precipitate.

The low molecular weight fraction ( $F_3$ ) originated five bands at 69, 53, 41, 26-18 and 14 kDa when silver stain was applied. However, only the two major bands (41 and 26-18 kDa) were clearly detected when Coomassie Blue R-250 was used. Although no clear bands were detected with periodic acid-Schiff stain, a diffuse band could be seen between 26 and 18 kDa, which indicates the presence of glycoproteins.

The very low molecular weight ( $F_4$ ) only originated a band at 22-20 kDa with both protein stain methods. However, this band is probably the tail of  $F_3$  as the peak has the same molecular weight as its major band.



**Fig. 4.** SDS-PAGE of precipitate and their molecular exclusion fractions. St1: low molecular weight standards; P: natural precipitate;  $F_1 + F_2$ : high and intermediate molecular weight fractions;  $F_3$ : low molecular weight fraction;  $F_4$ : very low molecular weight fraction; St2: polypeptide molecular weight standards.

The separation of the precipitate by FPLC improved the resolution of the gel spots obtained by SDS-PAGE. It has been reported that the elimination of phenolic compounds with PVPP (polyvinyl pyrrolidone) improved the resolution of bands in gel electrophoresis (Charmont, Jamet, Pont-Lezica, & Canut, 2005). FPLC separation of the fractions may have eliminated some of these compounds, thus enhancing the resolution of the various bands.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

Fig. 5 shows the Native-PAGE analysis of the natural precipitate and its molecular exclusion fractions when the three different stains were used. No bands were detected when the natural precipitate was directly analyzed with any of the stains.

However,  $F_1+F_2$  originated a narrow band at the beginning of the electrophoregram but only when periodic acid-Schiff stain was used. These data again confirm the presence of polysaccharides in the natural precipitate.

Moreover,  $F_3$  originated seven well-defined bands in the gel ( $R_f$ : 0.28, 0.40, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 1.00) with both protein stain methods, though in this case the resolution was better with Coomassie Blue R-250. The bands with  $R_f$  0.40, 0.55, 0.65 and 1.00 were also detected in  $F_4$  but only when Coomassie Blue R-250 was used. On the other hand, the periodic acid-Schiff stain generated a diffuse smear along the gel for both fractions ( $F_3$  and  $F_4$ ).

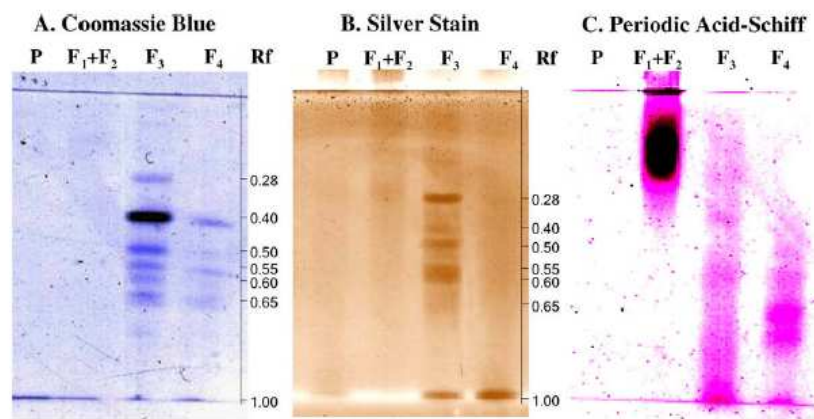


Fig. 5. Native-PAGE of precipitate and their molecular exclusion fractions. P: natural precipitate;  $F_1 + F_2$ : high and intermediate molecular weight fractions;  $F_3$ : low molecular weight fraction;  $F_4$ : very low molecular weight fraction.

Fig. 6 shows the electrofocusing analysis of the natural precipitate and its molecular exclusion fractions when the three different stains were used. As with the other electrophoretic techniques, none of the staining methods revealed any band when the natural precipitate was directly applied to the electrofocusing gel. Neither  $F_1+F_2$  nor  $F_4$  originated any band when silver or Coomassie Blue R-250 stains were used. In  $F_1+F_2$ , however, a smear towards the acid area of the gel was detected when periodic acid-Schiff stain was used, which again confirms the presence of polysaccharides in the high molecular weight fraction of the natural precipitate.

Again it was the low molecular weight fraction where most of the proteins were detected. Both protein stain methods originated seven bands with fraction  $F_3$ . In this case, periodic acid-Schiff stain did not reveal any bands. All protein bands were detected in the acid area and their isoelectric points corresponded to 5.0, 4.8, 4.6, 4.5, 4.4, 4.3 and 4.2. These data are also in agreement with Hsu and Heatherbell (1987b), who reported that unstable proteins have a low isoelectric point (4.1-5.8).



## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

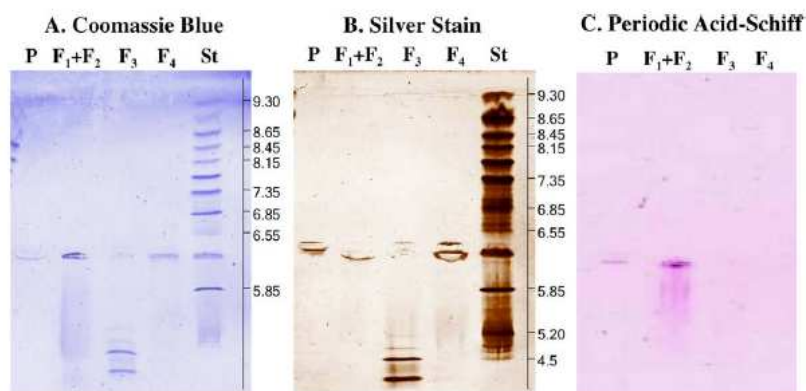


Fig. 6. IEF of precipitate and their molecular exclusion fractions. St: isoelectric point standards; P: natural precipitate;  $F_1 + F_2$ : high and intermediate molecular weight fractions;  $F_3$ : low molecular weight fraction;  $F_4$ : very low molecular weight fraction.

Table 3 summarizes the overall results for protein band identification by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. None of the protein bands from natural precipitate or from  $F_1 + F_2$  fraction were identified by this technique. However, three proteins were identified in  $F_3$ . Specifically, the *Vitis vinifera thaumatin-like protein 1* (VVTL1) was identified in the main band (26-18 kDa) of the SDS-PAGE, in three bands of the Native-PAGE (Rf: 0.40, 0.50 and 1.00) and in four bands of the Isoelectrofocusing (pI: 4.8, 4.5, 4.4 and 4.3). Two other proteins were recognized in this fraction: a band at 41 kDa of SDS-PAGE was identified as  $\beta$ -1,3-glucanase and a band at Rf 0.28 of Native-PAGE was identified as ripening-related protein Grip22 precursor. VVTL1 was also identified in the Rf 0.40 of Native-PAGE of the fraction  $F_4$ .

Table 3  
 Summarized results corresponding to the protein band identification by means of by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry

Electrophoretical analysis		P		$F_1 + F_2$		$F_3$		$F_4$	
		Bands	MS	Bands	MS	Bands	MS	Bands	MS
SDS-PAGE (kDa)	69	+	ni	++	ni	+	ni	nd	*
	53	nd		nd	*	+	ni	nd	*
	41	+	ni	nd	*	++	$\beta$ -1,3-glucanase	nd	*
	26-18	++	pi	nd	*	+++	WTL1	+	pi
	14	nd		nd	*	+	ni	nd	
Native-PAGE (Rf)	0.28	nd	*	nd	*	++	Grip 22	nd	*
	0.40	nd	*	nd	*	+++	WTL1	+	VVTL1
	0.50	nd	*	nd	*	++	WTL1	nd	
	0.55	nd	*	nd	*	++	ni	+	ni
	0.60	nd	*	nd	*	++	ni	nd	*
	0.65	nd	*	nd	*	++	ni	+	ni
	1.00	nd	*	nd	*	+	WTL1	+	ni
IEF (pI)	5.0	nd	*	nd	*	+	ni	nd	*
	4.8	nd	*	nd	*	+	WTL1	nd	*
	4.6	nd	*	nd	*	++	ni	nd	*
	4.5	nd	*	nd	*	+	WTL1	nd	*
	4.4	nd	*	nd	*	+	WTL1	nd	*
	4.3	nd	*	nd	*	+	WTL1	nd	*
	4.2	nd	*	nd	*	++	ni	nd	*

P: natural precipitate;  $F_1 + F_2$ : high and intermediate molecular weight fractions;  $F_3$ : low molecular weight fraction;  $F_4$ : very low molecular weight fraction; MS: mass spectrometry; nd: not detectable; (+): low intensity band; (++): intermediate intensity band; (+++): high intensity band; ni: not identified.

Finally, Fig. 7 shows the electrophoregram of wine before and after natural precipitation took place using Coomassie Blue R-250 for SDS-PAGE and native electrophoresis and silver stain for isoelectrofocusing.

These results confirm all the data discussed above. Fig. 7A shows that the 41 kDa band nearly disappeared and the 28-18 kDa clearly decreased in the wine after natural

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

precipitation. These bands were the major bands detected in the natural precipitate (Fig. 4A) and correspond to  $\beta$ -1,3-glucanase (MW: 37.5 kDa) and VVTL1 (MW: 24.9 kDa).

On the other hand, native electrophoresis (Fig. 7B) indicated that the band with Rf 0.40 disappeared completely after natural precipitation. This band is precisely the major band obtained in the natural precipitate (Fig. 5A) and has been identified as VVTL1. Moreover, three other bands (Rf: 0.50, 0.55 and 0.60) clearly decreased in the wine after natural precipitation and they are present in the natural precipitate (Fig. 5A).

The results obtained by isoelectrofocusing (Fig. 7C) are not so clear. However, it seems that all bands present in the natural precipitate (Fig. 6B) decreased in the wine after precipitation. Nevertheless, a band with a pI of 8.1, which was present in the original wine but not in the wine before natural precipitation, is not detected in the natural precipitate.

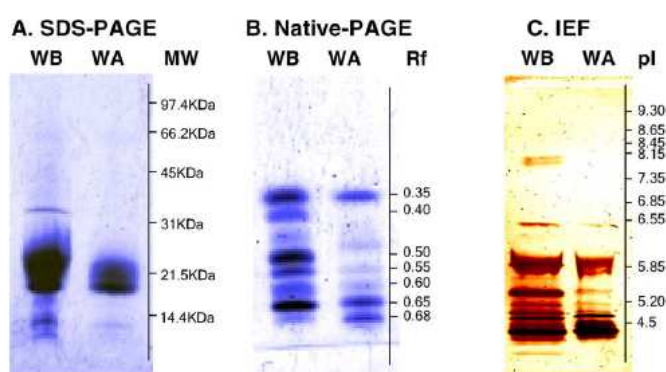


Fig. 7. Electrophoregrams of wine before (WB) and after (WA) natural precipitation. (A) SDS-PAGE with Coomassie Blue R-250; (B) Native-PAGE with Coomassie Blue R-250; (C) Isoelectrofocusing with silver stain.

## Conclusions

We can conclude that protein represents only a relatively small proportion of natural protein precipitate, which is also made up of phenolic compounds and polysaccharides. Proteins with a molecular weight of between 18 and 26 kDa make up most of the natural protein precipitate but some proteins of 14, 41, 53 and 69 kDa are also present. All unstable proteins have an isoelectric point between 4.2 and 5.0. The application of MALDI-TOF/TOF MS has identified some of these proteins. As reported previously with other techniques (Waters et al., 1998 and Waters et al., 1996), the presence of VVTL1 in several bands confirms their participation in natural haze. Note that chitinases were not identified in any of the bands despite the fact that some authors have described their participation in protein precipitation (Waters et al., 1998 and Waters et al., 1996). However, the fact that several bands could not be identified does not mean they are not present. To our knowledge, however, this is the first time that  $\beta$ -1,3-glucanase and ripening-related protein Grip22 precursor have been reported to participate in the natural protein haze of white wines.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

### Acknowledgment

We would like to thank CICYT (AGL2007-66338 and AGL2004-02309) for financial support.

### References

- Bayly, F. C., & Berg, H. W. (1967). Grape and wine proteins of white wine varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 24, 18-32.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54.
- Canals, J.M., Arola, Ll., & Zamora, F. (1998). Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 383-388.
- Correa-Gorrospe, 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.
- Charmont, S., Jamet, E., Pont-Lezica, R., & Canut, H. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochemistry*, 66, 453-461.
- Dadic, M., & Belleau, G. (1980). Beer hazes. I. Isolation and preliminary analysis of phenolic and carbohydrate components. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 38, 154-158.
- 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, 319-326.
- Dizy, M., & Bisson, L. F. (1999). White wine protein analysis by capillary zone electrophoresis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 120-127.
- Dubourdieu, D., Serrano, M., Vannier, A.C., & Ribéreau-Gayon, P. (1988). Étude comparée des tests de stabilité protéique. *Connaissance de la Vigne et du Vin.*, 22, 261-273.
- Fernández-Acero, F. J., Jorge, I., Calvo, E., Vallejo, I., Carbú, M., Camafeita, L. E., López, J. A., Cantoral, J. M., & Jorrián, J. (2006). Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics*, 6, S88-S96.
- Ferreira, R. B., Monteiro, S., Piçarra-Pereira, M. A., Tanganho, M. C., Loureiro, V. B., & Teixeira, A. R. (2000). Characterization of the proteins from grapes and wines by immunological methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 22-28.
- Guillou, C., Aleixandre, J. L., García, M. J., & Lizama, V. (1998). Clarification influence upon sensorial and analytical characteristics of Muscat dry wine. *Journal International des Science du la Vigne et du Vin*, 32, 111-119.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

- Hayasaka, Y., Adams, K. S., Pocock, K. F., Baldock, G. A., Waters, E. J., & Hoj, P.B. (2001). Use of electrospray mass spectrometry for mass determination of grape (*Vitis vinifera*) juice pathogenesis-related proteins: a potential tool for varietal differentiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1830-1839.
- 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, 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, 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, 17-22.
- Koch, J., & Sajak, E. (1959) A Review and Some Studies on Grape Protein. *American Journal of Enology and Viticulture*, 10, 114-123.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lubbers, S., Charpentier, C., & Feuillat, M. (1996). Study of the binding of aroma compounds by bentonites in must, wine and model systems. *Vitis*, 59-62.
- Martinez-Rodriguez, A. J., & Polo, M. C. (2003). Effect of the addition of bentonite to the tirage solution on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chemistry*, 81, 383-388.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., & Cottrell J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20, 3551-3567.
- Pharmacia LKB Biotechnology. PhastSystem Users Manual. Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden. 1990.
- Pocock, K. F., Alexander, G. M., Hayasaka, Y., Jones, P. R., & Waters, E. J. (2007). Sulfate- a candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1799-1807.
- Pocock, K. F., & Waters, E. J. (2006). Protein haze in bottled white wines: how well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 212-220.
- Salazar, F. N., Achaerandio, I., Labbe, M. A., Guell, C., & López, F. (2006). Comparative study of protein stabilization in white wine using zirconia and bentonite: physicochemical and wine sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9955-9958.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

- Sarmiento M. R., Oliveira J. C., Slatner M., Boulton R. B. (2000). Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability tests. *Food Control*, 11, 423-432.
- Segarra, I., Lao, E., López-Tamames, E., & De la Torre-Boronat, M.C. (1995). Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharides levels in winemaking products. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 564-570.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrilamide gels. *Analytical Chemistry*, 68, 850-858.
- Siebert, K. J. (1999). Protein-polyphenol haze in beverages. *Food Technology*, 53, 54-57.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., & Holle, A. (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, 952-965.
- Kwon S. W. (2004). Profiling of soluble proteins in wine by nano-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7258-7263.
- Toland, T. M., Fugelsang, K. C., & Muller, C. J. (1996). Methods for estimating protein instability in white wines: a comparison. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 111-112.
- Vanrell, G., Canals, R., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2007). Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chemistry*, 104, 148-155.
- Waters, E. J., Wallace, W., & Williams, P. J. (1991). Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 123-127.
- Waters, E. J., Peng, Z., Pocock, K. F., & Williams, P. J. (1995). 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., Shirley, N. J., & Williams, P. J. (1996). Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3-5.
- Waters, E. J., Hayasaka, Y., Tattersall, D. B., Adams, K. S., & Williams, P. J. (1998). Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4950-4957.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

- Williams, K. M., Fox, P., & Marshall, T. (1995) A comparison of protein assays for the determination of the protein concentration of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 101, 365-369.
- Yan, J. X., Wait, R., Berkelman, T., Harry, R.A., Westbrook, J. A., Wheeler, C. H., & Dunn, M. J. (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 21, 3666-3672.

## Capítol 1.2:

# Identificació de les proteïnes inestables mitjançant la tècnica MALDI-TOF/TOF.



1. Anàlisi de les bandes electroforètiques del precipitat total.
2. Anàlisi de les bandes electroforètiques de la fracció  $F_1+F_2$  del precipitat natural.
3. Anàlisi de les bandes electroforètiques de la fracció  $F_3$  del precipitat natural:  
identificació de les proteïnes inestables.
  - 3.1. Electroforesis en gel en condicions desnaturalitzants: SDS-PAGE.
  - 3.2. Electroforesis en gel en condicions no desnaturalitzants: Native-PAGE.
  - 3.3. Isoelectroenfoc: IEF-PAGE.
4. Anàlisi de les bandes electroforètiques de la fracció  $F_4$  del precipitat natural.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

En l'apartat 1.1 d'aquest capítol, "Caracterització de l'enterboliment proteic espontani en vi blanc de la varietat *Sauvignon Blanc*", s'han mostrat els resultats obtinguts en la identificació d'algunes de les proteïnes presents en el precipitat natural mitjançant la tècnica de MALDI-TOF/TOF. Aquest apartat 1.2 pretén ésser un complement del 1.1; inclou els espectres de masses, així com els alineaments obtinguts en la identificació de les proteïnes inestables, dades que per motius d'espai no s'han pogut incloure en la publicació científica.

Abans de començar a mostrar els resultats, es descriurà breument el procediment experimental que s'ha realitzat per tal d'obtenir les bandes electroforètiques, que s'han identificat mitjançant la tècnica de MALDI-TOF/TOF. El precipitat es dissol amb fosfat disòdic 50 mM, i tot seguit s'analitza mitjançant cromatografia líquida d'exclusió molecular tal i com s'indica en l'Annex 1 Materials i Mètodes. Aquesta tècnica ens permet separar el precipitat en tres fraccions  $F_1+F_2$ ,  $F_3$  i  $F_4$ . Aquest mateix precipitat i les diferents fraccions obtingudes mitjançant cromatografia líquida d'exclusió molecular ( $F_1+F_2$ ,  $F_3$  i  $F_4$ ), es processen i s'analitzen mitjançant electroforesis en gel en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE), no desnaturalitzants (Nativa) i per isoelectroenfoc (IEF), utilitzant la tinció amb plata, la tinció de Coomassie Blue i la tinció de l'Àcid Periòdic, tal i com s'ha descrit en l'annex 1 Materials i Mètodes. Així doncs, tenim 4 mostres, de les quals en deriven 9 carrils electroforètics diferents per mostra, ja que s'aplica tres tècniques electroforètiques amb tres tincions.

En el cas de que per a una mateixa mostra, s'obtingui perfils electroforètics semblants, amb tinció de Coomassie Blue i amb la tinció de plata, s'ha optat per identificar la banda tenyida amb la tinció de Coomassie, ja que presenta menys interferències per part dels solvents utilitzats en la tinció i a més conté més concentració de proteïna que la banda tenyida amb la tinció de plata. La tinció de l'Àcid Periòdic no és compatible amb la tècnica de MALDI-TOF/TOF, i per això aquestes bandes no es poden analitzar per aquesta tècnica. Les bandes escollides es processen i s'analitzen mitjançant MALDI-TOF/TOF, seguint el procediment descrit en l'Annex 1 Materials i Mètodes.

Els pics que s'observen amb una relació càrrega/massa 845 i 2211 corresponen a fragments procedents de la hidròlisi de la tripsina, són dues senyals de referència que apareixen en casi tots els espectres de masses que es mostraran a continuació.

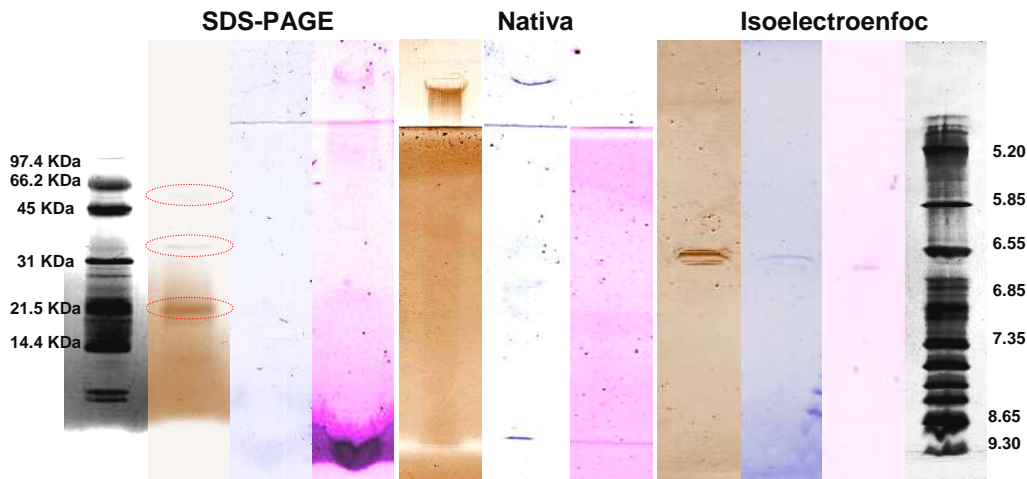
### 1. Anàlisi de les bandes electroforètiques del precipitat total.

En la Figura 1 es mostren els 9 carrils electroforètics obtinguts en l'anàlisi del precipitat total. Només s'observen tres bandes en el carril electroforètic corresponent a la separació en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) i amb la tinció de plata. Aquestes

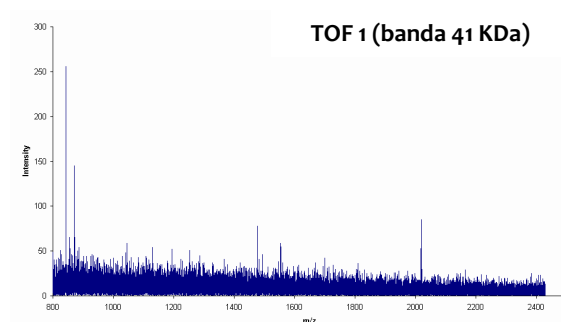
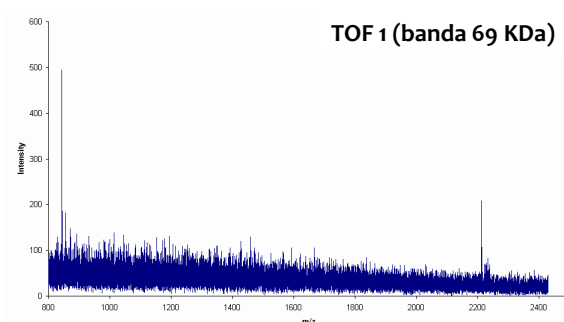


## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

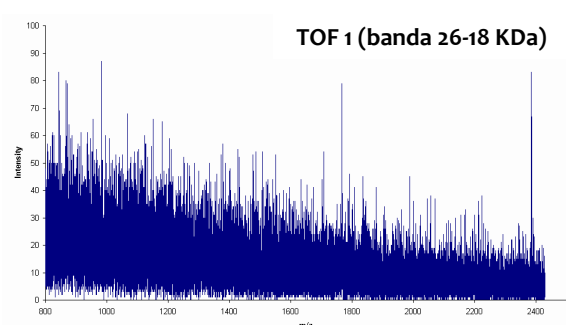
bandes tenen una massa molecular de 69, 41 i 26-18 KDa respectivament. Són aquestes bandes les que s'han analitzant mitjançant MALDI-TOF/TOF. A continuació es mostren els espectres de masses corresponents a la banda de 69, 41 i 26-18 KDa respectivament.



**Figura 1:** Anàlisi del precipitat total mitjançant les tres tècniques electroforètiques, SDS-PAGE, Nativa i Isoelectroenfoc, emprant la tinció amb plata (marró), la de Coomassie Blue (blau) i la de l'Àcid Periòdic (rosa).



Pràcticament no s'observen pics en cap dels espectres de masses que es mostren, a banda dels dos corresponents a la hidròlisi de la tripsina. Els pics tenen una intensitat molt baixa i de fet es confonen pràcticament amb el soroll de fons de la línia base. Això pot ser degut a que la mostra no s'ha digerit bé, i

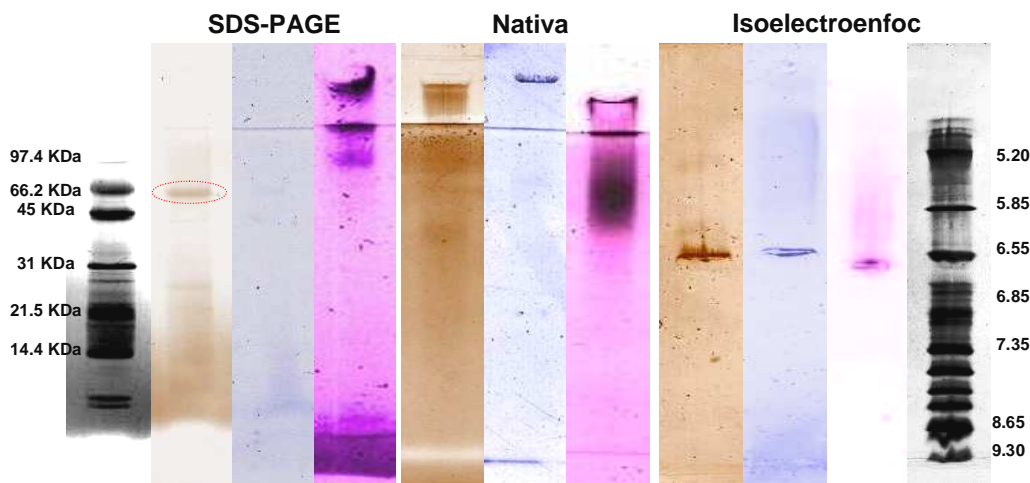


per tan no tenim possibles fragments per analitzar; o bé a que la concentració en proteïna de la mostra és molt baixa, i després de la digestió no hi ha prou senyal en el pic corresponent per ser detectat; o bé la fragmentació en el TOF1 ha donat lloc a pics amb una relació càrrega/massa que no està inclosa en el rang de treball. Així doncs, en el precipitat total no hem pogut identificar cap de les bandes obtingudes.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

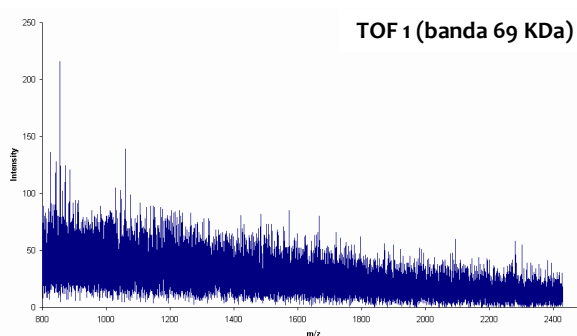
### 2. Anàlisi de les bandes electroforètiques de la fracció $F_1+F_2$ del precipitat natural.

En la Figura 2 es mostren els 9 carrils electroforètics obtinguts en l'anàlisi de la fracció  $F_1+F_2$  del precipitat, només s'obté una banda en el carril electroforètic corresponent a la separació en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) i amb la tinció de plata. Aquesta banda té un massa molecular de 69 KDa .



**Figura 2:** Anàlisi de la fracció  $F_1+F_2$  del precipitat mitjançant les tres tècniques electroforètiques, SDS-PAGE, Nativa i Isoelectrofoc, emprant la tinció amb plata (marró), la de Coomassie Blue (blau) i la de l'Àcid Periòdic (rosa).

Tot seguit es mostra l'espectre de masses corresponent a la banda de 69 KDa. Podem observar que igual com passava en els espectres corresponents al precipitat total (apartat anterior), els pics obtinguts tenen una intensitat molt baixa i a més les masses dels fragments obtinguts són molt petites i no ens permeten la identificació de cap proteïna. Aquesta banda de 69 KDa també es detecta en el precipitat total i no es pot identificar en cap de les dues mostres. Així doncs, en el cas de la fracció  $F_1+F_2$  del precipitat no s'ha pogut identificar cap proteïna.



### 3. Anàlisi de les bandes electroforètiques de la fracció $F_3$ del precipitat natural: identificació de les proteïnes inestables.

Tal i com es descriu en la publicació científica, les proteïnes inestables estan presents en aquesta fracció. Com que es detecten varies bandes en les respectives tècniques

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

electroforètiques utilitzades, es mostren els resultats obtinguts per a cada tècnica per separat per tal de facilitar la descripció dels resultats.

### 3.1. Electroforesis en gel en condicions desnaturalitzants: SDS-PAGE.

Els resultats obtinguts mitjançant electroforesis en gel en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) es mostren en la Figura 3. Amb la tinció de plata s'observen cinc bandes amb un massa molecular de 69, 53, 41, 26-18 i 14 KDa respectivament. Amb la tinció de Coomassie Blue només s'observen dues de les bandes, la de 41 i 26-18 KDa. Aquestes cinc bandes són les que s'han analitzat mitjançant MALDI-TOF/TOF.

Tot seguit es mostren els espectres de masses corresponents a les bandes amb una massa molecular de 69, 53 i 14 KDa.

La banda de 69 KDa, present en el precipitat total i en la fracció  $F_1+F_2$  del precipitat, també està present en aquesta fracció. En aquest cas tampoc no s'ha pogut realitzar la identificació, ja que els pics obtinguts tenen una massa molecular molt petita i no ens permeten identificar cap proteïna.

Les bandes de 53 i 14 KDa, presenten un perfil de pics amb una intensitat i una massa molecular molt baixa. No hem pogut identificar cap proteïna en cap de les dues bandes.

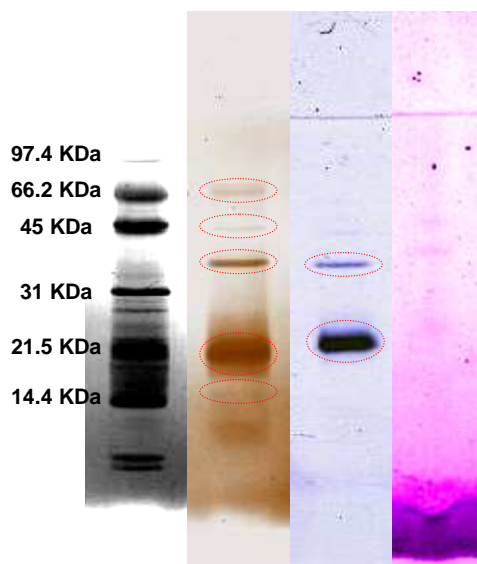
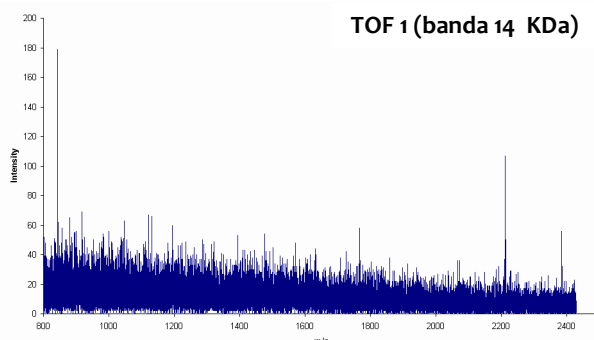
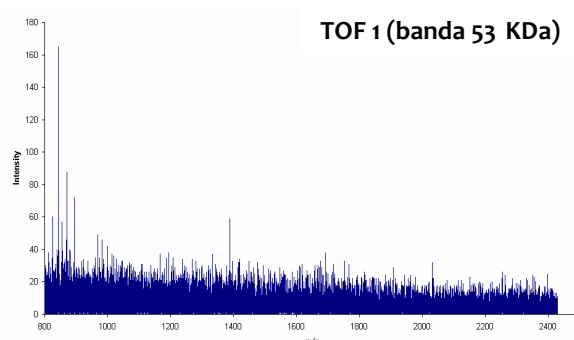
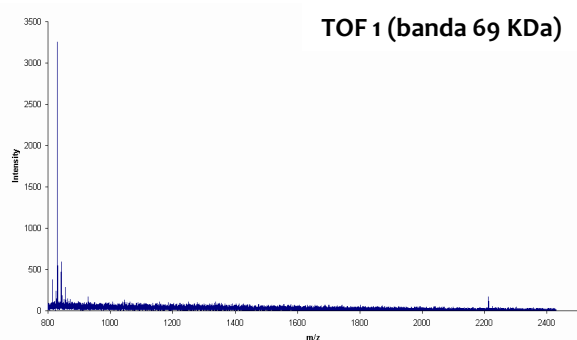
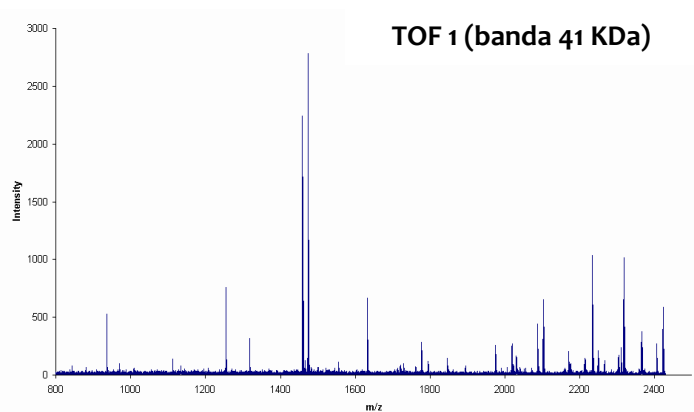


Figura 3. Anàlisi de la fracció  $F_3$  del precipitat mitjançant SDS-PAGE emprant la tinció amb plata (marró), la de Coomassie Blue (blau) i la de l'Àcid Periòdic (rosa).



## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

La banda de 41 KDa presenta l'espectre de masses que es mostra a continuació. En aquest espectre podem observar que els pics dels fragments obtinguts tenen una intensitat i una massa molecular que ens permeten la identificació de proteïna. Mitjançant la base de dades *Mascot Search Results*



podem assignar aquest espectre de masses a la  $\beta$ -1,3-Glucanase de *Vitis Vinifera*. La seqüència aminoacídica que es mostra a continuació correspon a la  $\beta$ -1,3-Glucanase de *Vitis Vinifera* i els aminoàcids en negreta corresponen als dels pèptids alineats de la proteïna present en la banda de 41 KDa. En la identificació d'aquesta proteïna ja ha estat suficient l'empremta peptídica que ens dona el TOF1 i no ha estat necessari analitzar-la pel TOF2.

Number of mass values searched: 15  
 Number of mass values matched: 10  
 Sequence Coverage: 36%

Matched peptides shown in **Bold Red**

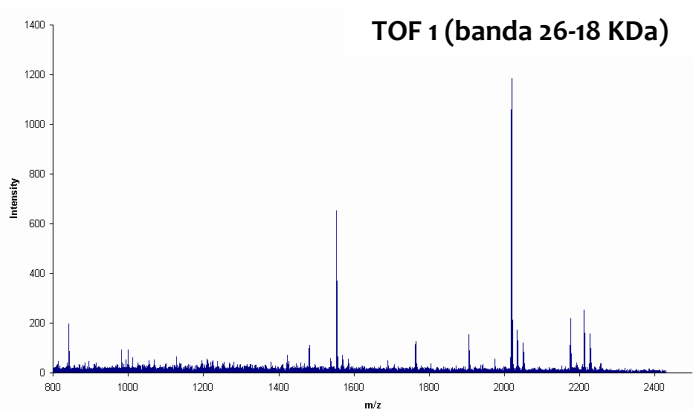
```

1 MAMFDSTVKS SSRMAILLLV FGLLMASLHL TVAQTGVCYG MEGDNLPPPG
51 QVVGLYNQYS IRRMRLYDPN QAALQALRGS NIELMIGVPN DALQNIASIQ
101 GNANSWVQNN IKNYGNVRFY YVAVGNEVSP TGPTAQFVLP AMRNIFNAIS
151 AAGLGNQIKV STAITDGVLG TSYPSPKGF KPEVTSFLNP IISFLVKNRA
201 PLLVNLYPYF SYIGNTRDIR LDYALFKAPG VVVQDGLGY KNLFDAILDA
251 VYSALERVGG GSLQVVISG GWPSAGGTAT TVGNAKTYS NLIQHVKGGT
301 PKKPGGPIET YVFAMFNENR KSPEYEKHWG LFLPNKQAKY PINFN
    
```

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 7801384</a>	37489	150	beta 1-3 glucanase [Vitis vinifera]

Podem observar que l'espectre de masses d'aquesta banda no té res a veure amb el descrits fins ara, per això fins ara no s'havia pogut arribar a identificar cap proteïna i en aquest cas sí que ha estat possible.

La banda de 26-18 KDa presenta els següent espectres de masses. Aquesta banda també estava present en el precipitat total, però l'espectre corresponent no ens ha permès identificar-la. En aquest cas, l'espectre de masses presenta pics amb una intensitat i una massa molecular que ens permeten la

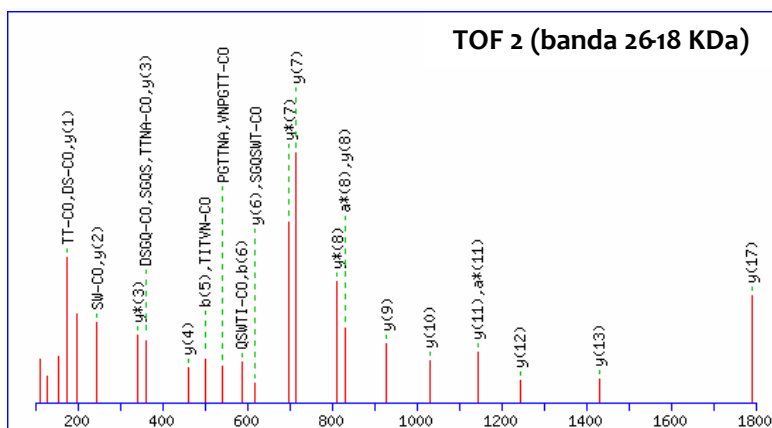


identificació de proteïna; tot i així ha estat necessari analitzar els fragments obtinguts en el

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

TOF1 pel TOF2 per tal de poder descartar ambigüitats en l'assignació. En l'espectre de masses del TOF2, obtenim informació sobre la seqüència del pic base obtingut en el TOF1.

Aquest ió és molt estable i no ens permet obtenir fragments de massa molecular inferior, per això cal procedir a una segona fragmentació. Segons la base de dades *Mascot Search Results* aquest espectre de masses correspon a la VVTL1 de *Vitis Vinifera*.



Sequence Coverage: **42%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MRFTTTLPII IPLLSSLFT STHAATFDIL NKCTYTVWAA ASPGGRRLD
51 SGQSWTITVN PGTNARIWG RTSCTFDANG RGK CETGDCN GLEECQGYGS
101 PPNTLAEFAL NQPNNLDYID ISLVDGFNIP MDFSGCRGIQ CSVDINGQCP
151 SELKAPGGCN NPCTVEKTNE YCCTDGGPGSC GPTTYSKFFK DRCPDAYSYP
201 QDDKTSLFTC PSGTNYKVTF CP
    
```

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="#">gi 2213852</a>	24866	288	VVTL1 [Vitis vinifera]

Mitjançant la tècnica de MALDI/TOF-TOF hem pogut identificar les dues bandes majoritàries que hem obtingut mitjançant electroforesis en gel en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE), emprant la tinció amb plata i la de Coomassie Blue de la fracció F<sub>3</sub> del precipitat, aquestes bandes corresponen a la β-1,3-Glucanase i a la VVTL1 de *Vitis vinifera*. La β-1,3-glucanase té una massa molecular de 37.489 Da i la VVTL1 de 24.886 Da, dades comparables a les obtingudes en la separació electroforètica realitzada.

La tinció amb plata, és una tinció amb una sensibilitat molt més baixa que la tinció amb Coomassie Blue, de fet la concentració de proteïna no és la mateixa en ambdues tincions, 100 i 500 ng/μl de proteïna total respectivament. A més, la tinció amb plata no només detecta proteïnes mentre que la de Coomassie Blue és més específica de proteïnes. Les dues bandes identificades es tenyeixen en ambdues tincions, mentre que les bandes no identificades es tenyeixen principalment amb la tinció de plata, la qual cosa ens suggereix, bé que són proteïnes que es troben a molt baixa concentració, o bé la possible presència d'altres compostos que poden ser d'origen no proteic.

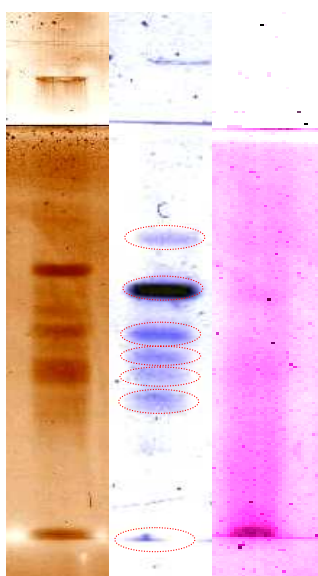
Amb la tinció de l'àcid periòdic s'observa una lleugera coloració de les bandes identificades, la qual cosa ens suggereix pensar la possible glicosilació d'aquestes proteïnes.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

### 3.2. Electroforesis en gel en condicions no desnaturalitzants: Native-PAGE

Els resultats obtinguts mitjançant electroforesis en gel en condicions no desnaturalitzants es mostren a la Figura 4. En aquestes condicions s'han obtingut les mateixes bandes tan amb la tinció de plata com amb la tinció de Coomassie Blue, s'observen set bandes amb un recorregut electroforètic de 0.28, 0.40, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65 i 1.00 respectivament.

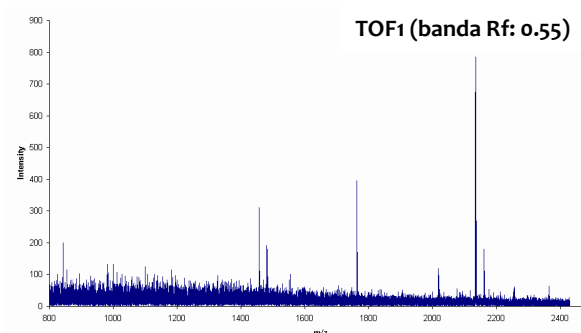
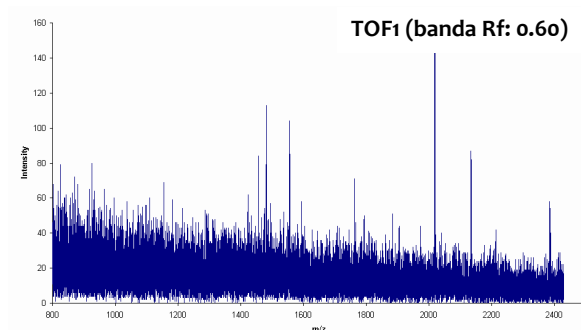
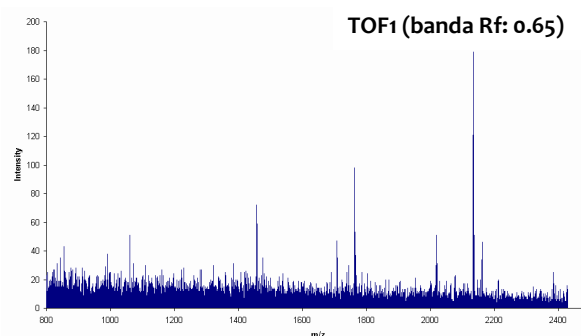
La resolució de les bandes amb la tinció de Coomassie Blue és molt millor que amb la tinció de plata, a més la tinció amb Coomassie Blue presenta menys interferència que la tinció de plata en l'anàlisi per espectrometria de masses, per això la identificació es realitza de les bandes tenyides amb Coomassie Blue. Tot seguit es mostren els espectres de masses corresponents a les bandes amb recorregut electroforètic 0.55, 0.60 i 0.65.



**Figura 4:** Anàlisi de la fracció  $F_3$  del precipitat mitjançant electroforesis en condicions no desnaturalitzants (Nativa) emprant la tinció amb plata (marró), la de Coomassie Blue (blau) i la de l'Àcid Periòdic (rosa).

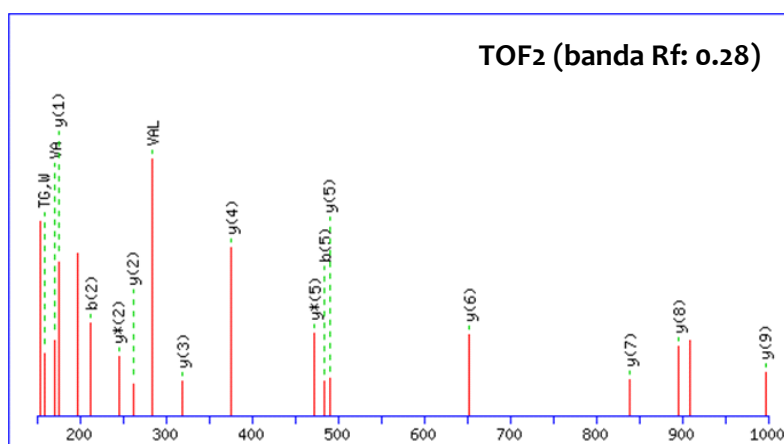
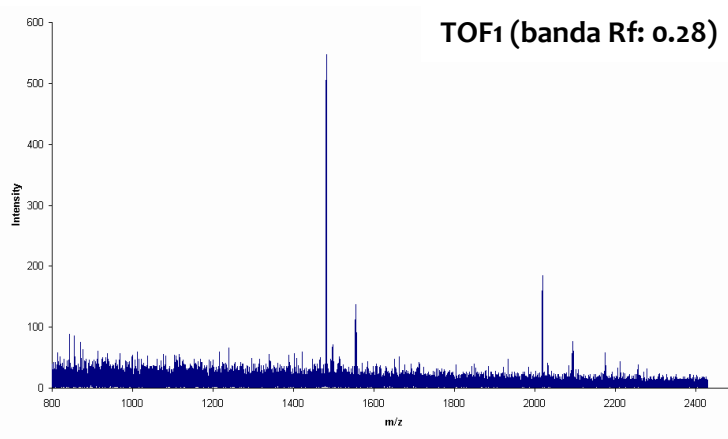
Els pics corresponents als fragments obtinguts en tots tres casos tenen una intensitat molt baixa o bé les seves masses són molt petites i no ens permeten la identificació de cap proteïna.

La banda amb recorregut electroforètic 0.28 presenta els següent espectres de masses, per poder realitzar-ne la identificació ha estat necessari generar l'espectre de masses mitjançant el TOF2 que també es mostra a continuació. La base de dades *Mascot*



## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

*Search Results* ens indica que aquest espectre de masses correspon a Ripening-related protein grip22 precursor de *Vitis Vinifera*. Aquesta proteïna no s'havia identificat en cap banda de les obtingudes per electroforesis en gel en condicions desnaturalitzants.



Sequence Coverage: **15%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

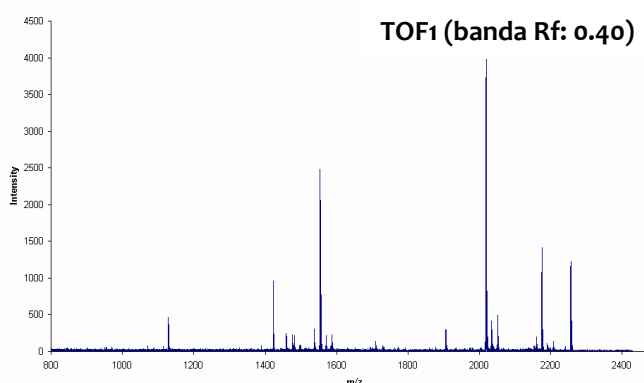
```

1 MAKSALVWLA SVCLVFNILS LPFLALGLSS CGGSCQTLND YEQQLICING
51 ECNDDEVTG HICGGNSSTP SPPPPSTCQP SGTLACKGGK PKNTYTCSPP
101 ITSSTPAVLT NNNFEKGGDG GGPSACDNKY HDNSERIVAL STGWYNGGSR
151 CGKMIRITAQ NGRSVLAKVV DECDSMHGCD KEHAGQPPCD NNIVDGSNAV
201 WNALGLDINI GEVDVTWSMA
    
```

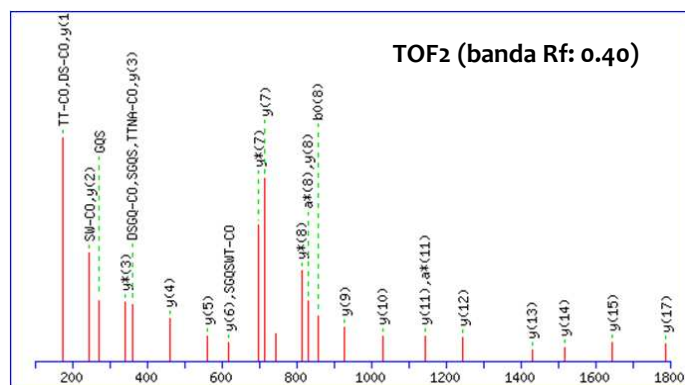
**Accession Mass Score Description**

1. [gi|75184387](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Tran/TranQuery.fcgi?db=protein&term=gi%7C75184387) 23669 122 Ripening-related protein grip22 precursor

La banda amb recorregut electroforètic 0.40 presenta el següent espectre de masses, per poder realitzar-ne la identificació ha estat necessari generar l'espectre de masses mitjançant el TOF2 que també es mostra a continuació. La base de dades *Mascot Search Results* ens indica que aquest espectre de masses correspon a la VVTL1 de *Vitis Vinifera*.



## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.



Sequence Coverage: **54%**

Matched peptides shown in **Red**

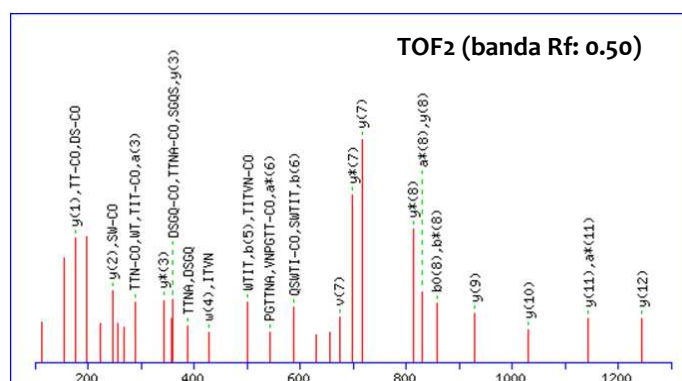
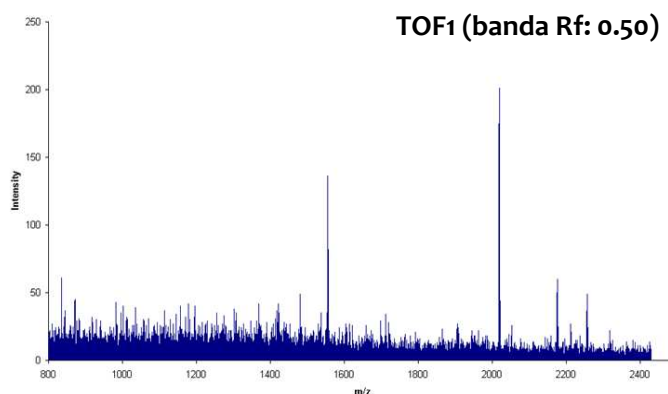
1 MRFTTLPIL IPLLSSLLFT STHAATFDIL NK**CTYTVWAA ASPGGRRILD**  
 51 **SGQSWTITVN PGTNARIWG RTSCTFDANG** RGKCETGDCN GLLECQGYGS  
 101 PPNTLAEFAL NQPNNLDYID ISLVDGFNIP MDFSGCRGIQ **CSVDINGQCP**  
 151 **SELKAPGGCN NPCTVFKTNE YCCTDGPSC** **GPTYSKFFK DRCPDAYSYP**  
 201 **QDDKTSLFTC** **PSGTNYK**VTF CP

Accession Mass Score Description

1. [gi|2213852](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/2213852) 24866 407 VVTL1 [Vitis vinifera]

Aquesta proteïna ja ha estat identificada en la banda majoritària obtinguda per electroforesis en condicions desnaturalitzants tan amb la tinció de plata com amb la de Coomassie Blue, en aquest cas també és la banda majoritària. Així doncs, la identificació d'aquesta proteïna en condicions no desnaturalitzants ens corrobora la seva presència en aquesta fracció i en el precipitat natural.

La banda amb recorregut electroforètic 0.50 presenta els següent espectre de masses, per poder realitzar-ne la identificació ha estat necessari generar l'espectre de masses mitjançant el TOF2 que també es mostra a continuació. La base de dades *Mascot Search Results* ens indica que aquest espectre de masses també correspon a la VVTL1 de *Vitis Vinifera*. Aquesta proteïna també s'ha identificat a la banda amb Rf 0.40.





## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

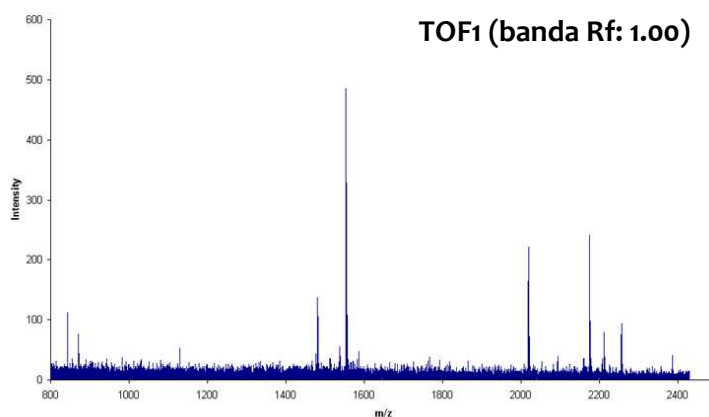
Sequence Coverage: 15%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MRFTTLPIL IPLLSSLLFT STHAATFDIL NKCTYTVWAA ASPGGRRLD
51 SGQSWTITVN PGTNARIWG RTSCFDANG RGKCEGDCN GLECCQYGS
101 PPNTLAEFAL NQPNNLDYID ISLVDGFNIP MDFSGCRGIQ CSVDINGQCP
151 SELKAPGGCN NPCTVFKTNE YCCTDGP GSC GPTTYSKFFK DRCPDAYSYP
201 QDDKTSLFTC PSGTNYKVTF CP
```

	Accession	Mass	Score	Description
1.	<a href="#">gi 2213852</a>	24866	129	VVTL1 [Vitis vinifera]

La banda amb recorregut electroforètic 1.00 presenta els següent espectre de masses, en aquest cas no ha estat necessari generar l'espectre de masses mitjançant el TOF2 per tal de poder-la identificar. La base de dades *Mascot Search Results* ens indica que aquest espectre de masses també corresponen a la VVTL1 de *Vitis Vinifera*.



Sequence Coverage: 40%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MRFTTLPIL IPLLSSLLFT STHAATFDIL NKCTYTVWAA ASPGGRRLD
51 SGQSWTITVN PGTNARIWG RTSCFDANG RGKCEGDCN GLECCQYGS
101 PPNTLAEFAL NQPNNLDYID ISLVDGFNIP MDFSGCRGIQ CSVDINGQCP
151 SELKAPGGCN NPCTVFKTNE YCCTDGP GSC GPTTYSKFFK DRCPDAYSYP
201 QDDKTSLFTC PSGTNYKVTF CP
```

	Accession	Mass	Score	Description
1.	<a href="#">gi 2213852</a>	24866	130	VVTL1 [Vitis vinifera]

La VVTL1 l'hem pogut identificar en tres bandes, el recorregut electroforètic de les quals és força diferent (0.40, 0.50 i 1.00), tenint en compte que la separació es realitza en condicions no desnaturalitzants, aquests resultats ens indiquen que aquesta proteïna presenta mobilitat diferent al llarg del gel ja sigui per la seva càrrega, el seu tamany o la seva estructura quaternària. En condicions desnaturalitzants només la trobem a la banda de 26-18 KDa, però en aquest cas, la separació es dóna en funció de la seva massa molecular i no depèn de la seva càrrega ni de la seva estructura tridimensional. Aquesta variació en la mobilitat pot estar relacionada amb la interacció amb altres compostos d'origen no proteic.

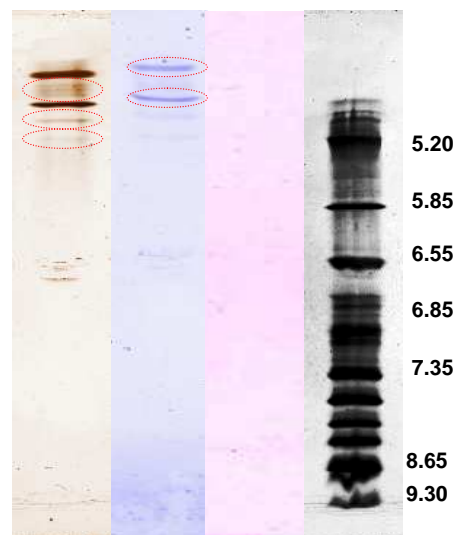
## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

La banda amb recorregut electroforètic 1.00 mostra una banda intensa quan s'utilitza la tinció de l'àcid periòdic, la qual cosa ens suggereix una elevada glicosilació d'aquesta proteïna, aquesta banda rosada no s'observa en les altres dues bandes que també corresponen a la VVTL1; la diferent mobilitat també podria estar relacionada amb el grau de glicosilació d'aquest proteïna.

Mitjançant la tècnica de MALDI-TOF/TOF hem pogut identificar la VVTL1 i el Ripening-related protein Grip22 precursor en les bandes obtingudes per electroforesis en condicions no desnaturalitzants. La  $\beta$ -1,3-Glucanase no ha estat identificada en aquest cas. El Ripening-related protein Grip22 precursor no s'havia trobat en la identificació de les bandes obtingudes per SDS-PAGE, aquesta proteïna té una massa molecular de 23.669 Da, llavors el trobarem a la banda de 26-18 KDa en la que hem identificat la VVTL1.

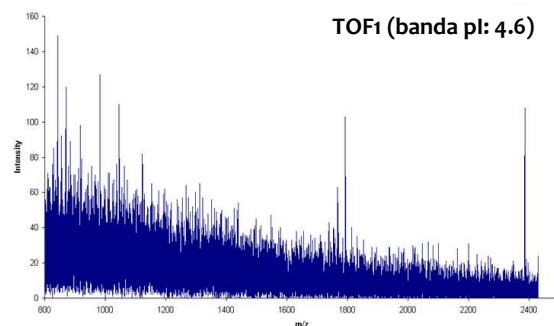
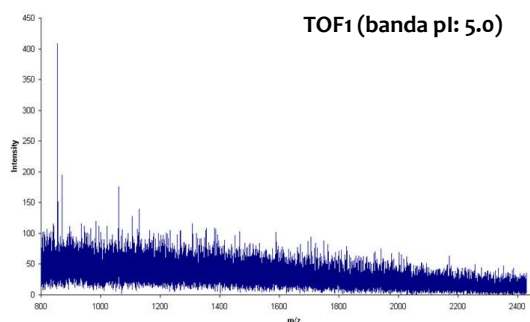
### 3.3. Isoelectroenfoc: IEF-PAGE.

Els resultats obtinguts mitjançant isoelectroenfoc es mostren a la Figura 5. En aquestes condicions s'han obtingut les mateixes bandes tan amb la tinció de plata com amb la tinció de Coomassie, s'observen set bandes amb punt isoelèctric (pI) 5.0, 4.8, 4.6, 4.5, 4.4, 4.3 i 4.2 respectivament. Malgrat que la resolució de les bandes amb la tinció de plata és molt millor que amb la tinció de Coomassie Blue, el protocol utilitzat per a la tinció de plata no és compatible amb MALDI-TOF/TOF i per això la identificació es va realitzar de les bandes tenyides amb Coomassie Blue.

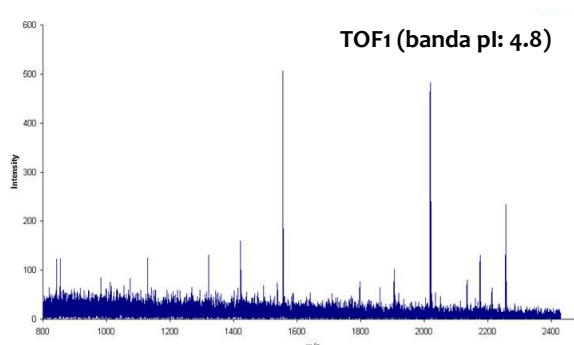
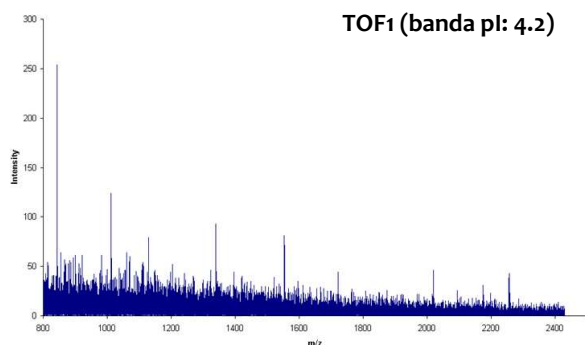


**Figura 5.** Anàlisi de la fracció F<sub>3</sub> del precipitat mitjançant Isoelectroenfoc emprant la tinció amb plata (marró), la de Coomassie Blue (blau) i la de l'Àcid Periòdic (rosa).

Tot seguit es mostren els espectres de masses corresponents a la banda amb pI 5.0, 4.6 i 4.2. Les masses dels fragments obtinguts en tots tres casos són molt petites i no ens permeten la identificació de cap proteïna.



## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.



La banda amb pI 4.8 presenta l'espectre de masses que es mostra a la imatge, per poder realitzar-ne la identificació no ha estat necessari generar l'espectre de masses mitjançant el TOF2. La base de dades *Mascot Search Results* ens indica que aquest espectre de masses corresponen a la VVTL1 de *Vitis Vinifera*. Finalment, aquesta proteïna també la identifiquem els gels d'isoelectroenfoc, així doncs podem confirmar la seva presència en el precipitat i en aquesta fracció mitjançant les tres tècniques electroforètiques utilitzades en l'estudi.

Number of mass values searched: 7  
 Number of mass values matched: 6  
 Sequence Coverage: 35%

Matched peptides shown in **Bold Red**

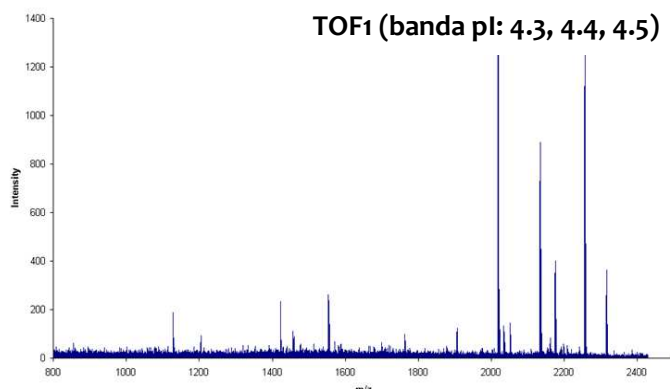
```

1 MRFTTLPIL IPLLSSLLFT STHAATFDIL NKCTYTVWAA ASPGGRRLD
51 SGQSWTIIVN PGTNARIWG RTSCTFDANG RGKCETGDCN GLLECQGYGS
101 PPNTLAEFAL NQPNNLDYID ISLVDGFNIP MDFSGCRGIQ CSVDINGQCP
151 SELKAPGGCN NPCTVEKTNE YCCTDGPGSC GPTYSKFFK DRCPDAYSYP
201 QDDKTSLFTC PSGTNYKVTF CP
    
```

**Accession Mass Score Description**

1. [gi|2213852](#) 24866 157 VVTL1 [Vitis vinifera]

Les bandes amb pI 4.5, 4.4 i 4.3 es van processar juntes en la identificació per MALDI-TOF/TOF ja que com es pot observar en el gel són molt fines i estan molt juntes, era molt difícil de tallar-les per separat. Es mostra l'espectre de masses del TOF1 d'aquestes bandes, no fou necessari aplicar el TOF2. La base de



dades *Mascot Search Results* ens indica que aquest espectre de masses correspon a la VVTL1 de *Vitis Vinifera*. Tot hi haver-hi tres bandes, l'espectre de masses només ens va identificar una sola proteïna.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

Number of mass values searched: 9  
 Number of mass values matched: 8  
 Sequence Coverage: 45%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MRFTTLPIL IPLLLSLFT STHAATFDIL NKCTYTVWAA ASPGGRRLD
51 SGQSWTITVN PGTNARIWG RTSCTFDANG RGKCETGDCN GLLECQGYGS
101 PPNTLAEFAL NQPNNLDYID ISLVDGFNIP MDFSGCRGIQ CSVDINGQCP
151 SELKAPGGCN NPCTVFKTNE YCCTDGPGSC GPTTYSKFFK DRCPDAYSYP
201 QDDKTSLFTC PSGTNYKVTF CP
    
```

Accession	Mass	Score	Description
1. <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi 2213852">gi 2213852</a>	24866	126	VVTL1 [Vitis vinifera]

La VVTL1 s'ha identificat en quatre bandes diferents, totes elles amb un pI entre 4.8 i 4.3, llavors tot i ser la mateixa proteïna presenta càrrega diferent ja que en el gel s'observa una mobilitat diferent. Aquesta heterogeneïtat en el gel també s'observava en condicions no desnaturalitzants. Aquesta proteïna té un pI de 5.09.

La tècnica de MALDI-TOF/TOF ens ha permès identificar la VVTL1 en les bandes obtingudes mitjançant isoelectroenfoc. En aquest cas, però no s'ha pogut identificar ni la  $\beta$ -1,3-Glucanase ni tampoc el Ripening-related Grip22 protein precursor, aquestes proteïnes tenen un pI de 9.45 i 4.83 respectivament.

### 4. Anàlisi de les bandes electroforètiques de la fracció F<sub>4</sub> del precipitat natural.

En la Figura 6 es mostren els 9 carrils electroforètics obtinguts en l'anàlisi de la fracció F<sub>4</sub> del precipitat. En condicions desnaturalitzants s'observa majoritàriament una banda a 26-18 KDa en ambdues tincions, amb plata i Coomassie Blue. En condicions no desnaturalitzants s'observa tres bandes amb recorregut electroforètic (Rf) 0.40, 0.55 i 1.00.

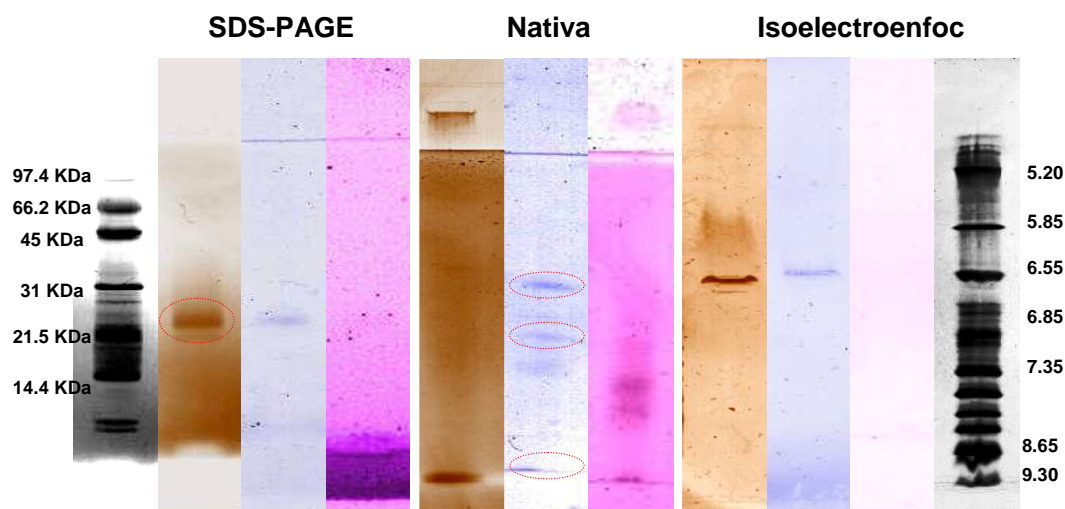
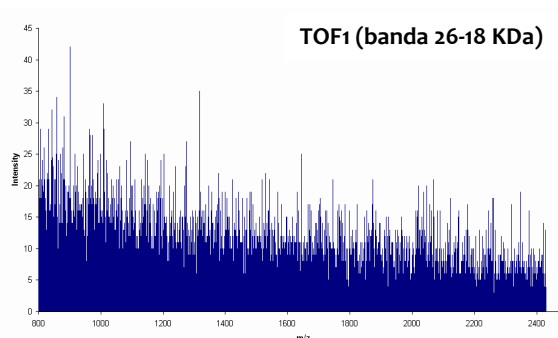


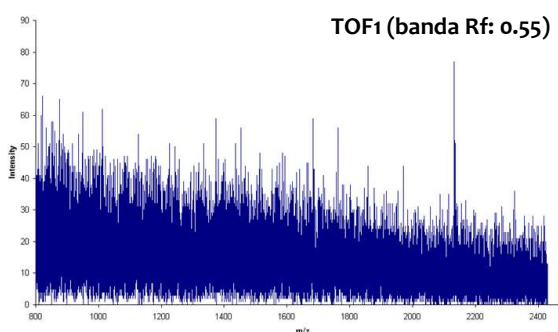
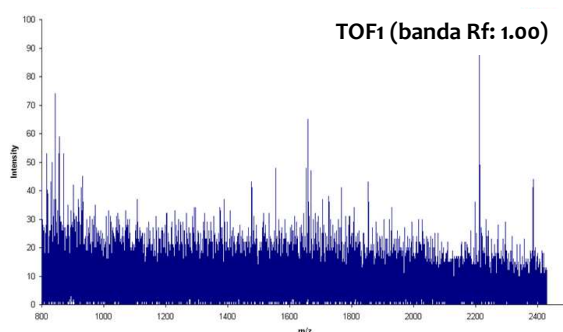
Figura 6. Anàlisi de la fracció F<sub>4</sub> del precipitat mitjançant les tres tècniques electroforètiques, SDS-PAGE, Nativa i Isoelectroenfoc, emprant la tinció amb plata (marró), la de Coomassie Blue (blau) i la de l'Àcid Periòdic (rosa).

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

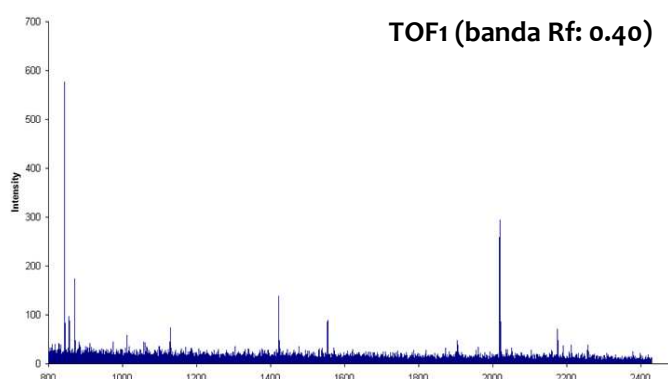
Tot seguit es mostra l'espectre de masses corresponent a aquesta banda entre 26-18 KDa. Les masses dels fragments obtinguts són molt petites i no ens permeten la identificació de cap proteïna. Sembla ser però que aquesta banda en la fracció F<sub>4</sub> del precipitat correspondria a la cua de la fracció F<sub>3</sub> del precipitat, llavors tot sembla indicar que malgrat no poder-ne realitzar la identificació correspondria a la VVTL1.



Les masses dels fragments obtinguts en els espectres de masses corresponents a la banda amb recorregut electroforètic 0.55 i 1.00 són molt petites i no ens permeten la identificació de cap proteïna. Aquestes dues bandes també estan presents en la fracció F<sub>3</sub> del precipitat quan s'analitza per electroforesis en condicions no desnaturitzats; la banda de Rf 0.55 tampoc no s'ha pogut identificar però la banda amb recorregut electroforètic 1.00 si, correspon a la VVTL1, llavors no seria d'estranyar que en el cas de la banda amb Rf 1.00 de la fracció F<sub>4</sub> del precipitat també hi estigués present la VVTL1.



La banda amb recorregut electroforètic 0.40 presenta el següent espectre de masses. No ha estat necessari realitzar un TOF2 per poder identificar-la. La base de dades *Mascot Search Results* ens indica que aquest espectre de masses corresponen a la VVTL1 de *Vitis*



*Vinifera*. Aquesta proteïna també s'ha identificat en la fracció F<sub>3</sub> del precipitat i presenta el mateix recorregut electroforètic. La identificació de la VVTL1 en aquesta banda ens indica

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

la possible presència en la banda de 26-18 KDa obtinguda en condicions desnaturalitzants, tal i com ja havíem suggerit.

Number of mass values searched: 6  
Number of mass values matched: 6  
Sequence Coverage: 35%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MRFTTLPIL IPLLLSLLFT STHAATFDIL NKCTYVWAA ASPGGRRLD
51 SGQSWTITVN PGTNARIWG RTSCTFDANG RGKCEGDCN GLEECQGYGS
101 PPNTLAEFAL NQPNNLDYID ISLVDGFNIP MDFSGCRGIQ CSVDINGQCP
151 SELKAPGGCN NPCTVEKTNE YCCTDGGPSC GPTTYSKFFK DRCPDAYSYP
201 QDDKTSLFTC PSGTNYKVTF CP
```

Accession	Mass	Score	Description
-----------	------	-------	-------------

1. <a href="#">gi 2213852</a>	24866	134	VVTL1 [Vitis vinifera]
-------------------------------	-------	-----	------------------------

Mitjançant la tècnica de MALDI-TOF/TOF, no hem pogut identificar totes les bandes electroforètiques que s'obtenen per a les diferents fraccions del precipitat després de separar-lo per exclusió molecular, ni del precipitat total. Gràcies a la separació del precipitat total per exclusió molecular hem pogut identificar algunes de les proteïnes presents en la Fracció F<sub>3</sub> i F<sub>4</sub>, identificació que no s'hagués pogut dur a terme sense aquest tractament previ de la mostra. Podem observar que en el precipitat total no es detecta cap banda quan s'analitza en condicions no desnaturalitzants, i només s'observen bandes quan s'utilitza la tinció amb plata en condicions desnaturalitzants. La separació per exclusió molecular ens permet separar els diferents compostos que formen part del precipitat en funció de la seva massa molecular, així les diferents fraccions contenen menys interferències quan s'analitzen per electroforesis i obtenim una separació molt més completa i sense smears. La VVTL1 és la proteïna majoritària present en el precipitat natural de la varietat *Sauvignon blanc*, és una *Thaumatococcus*-like protein. A més també hi trobem la  $\beta$ -1,3-Glucanase i el Ripening-related Grip22 precursor, aquest últim més minoritari. En la publicació científica, apartat 1.1 es mostra el quadre resum de les bandes identificades (Table 3).

Tot seguit es mostra la Informació que ens dona la base de dades NCBI (National Centre for Biotechnology Information) de les proteïnes identificades.

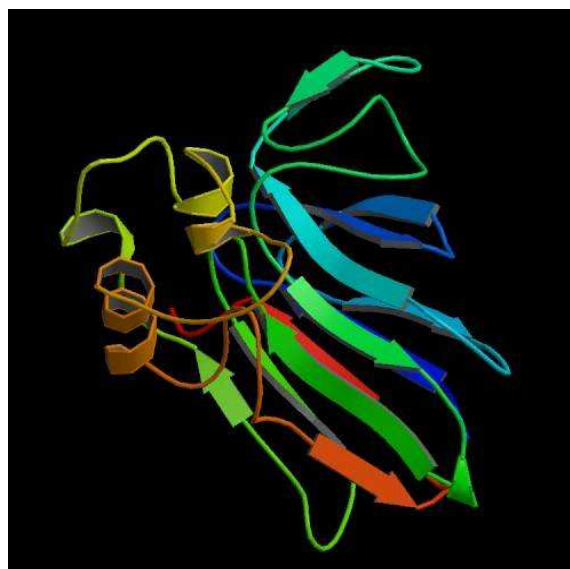
## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

LOCUS CAB91554 345 aa linear PLN 15-APR-2005  
DEFINITION beta 1-3 glucanase [Vitis vinifera].  
ACCESSION CAB91554  
VERSION CAB91554.1 GI:7801384  
DBSOURCE embl accession [AJ277900.1](#)  
KEYWORDS .  
SOURCE Vitis vinifera  
ORGANISM [Vitis vinifera](#)  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;  
Vitales; Vitaceae; Vitis.  
REFERENCE 1  
AUTHORS Seibicke, T., Buchholz, G., Ruegner, A. and Kassemeyer, H.H.  
TITLE Investigations of PR-gene expression in grape  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (residues 1 to 345)  
AUTHORS Seibicke, T.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (10-MAY-2000) Seibicke T., Pflanzenschutz, Staatl.  
Weinbauinstitut, Merzhauserstr. 119, 79100 Freiburg, GERMANY  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..345  
/organism="Vitis vinifera"  
/cultivar="Pinot Noir"  
/db\_xref="taxon:29760"  
/country="Germany"  
[Protein](#) 1..345  
/product="beta 1-3 glucanase"  
CDS 1..345  
/gene="g1"  
/coded\_by="AJ277900.1:1..1038"  
/db\_xref="GOA:Q9M3U4"  
/db\_xref="HSSP:O22317"  
/db\_xref="InterPro:IPR000490"  
/db\_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q9M3U4"  
ORIGIN  
1 mamfdstvks ssrmailllv fgllmaslhl tvaqtgvcyg megdnlpppg qvvglynqys  
61 irrmrlydpn qaalqalrgs nielmigvpn dalqniasiq gnanswvqnn iknygnvrfr  
121 yvavgnevsp tgptaqfvlp amrnifnais aaglnqikv staidtgvlg tsyppskgaf  
181 kpevtsflnp iisflvknra pllvnlypyf sygntrdir ldyalfkapp vvvqdgqlgy  
241 knlfdailda vysalervgg gslqvvises gwpsaggtat tvgnaktyns nliqhvkggt  
301 pkkpggpiet yvfamfnenr kspeykhgw lflpnkqaky pinfn



## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

LOCUS AAB61590 222 aa linear PLN 25-JUN-1997  
DEFINITION VVTL1 [Vitis vinifera].  
ACCESSION AAB61590  
VERSION AAB61590.1 GI:2213852  
DBSOURCE locus AF003007 accession [AF003007.1](#)  
KEYWORDS .  
SOURCE Vitis vinifera  
ORGANISM [Vitis vinifera](#)  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;  
Vitales; Vitaceae; Vitis.  
REFERENCE 1 (residues 1 to 222)  
AUTHORS Tattersall,D.B., van Heeswijck,R. and Hoj,P.B.  
TITLE Identification and characterization of a fruit-specific  
thaumatin-like protein which accumulates at very high levels in  
conjunction with the onset of sugar accumulation and berry  
softening in Vitis vinifera  
JOURNAL Plant Physiol. (1997) In press  
REFERENCE 2 (residues 1 to 222)  
AUTHORS Tattersall,D.B.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (07-MAY-1997) Horticulture, Viticulture and Oenology, The  
University of Adelaide, Plant Research Center, PMB 1, Glen Osmond,  
SA 5064, Australia  
COMMENT Method: conceptual translation supplied by author.  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..222  
/organism="Vitis vinifera"  
/cultivar="Muscat of Alexandria"  
/db\_xref="taxon:29760"  
[Protein](#) 1..222  
/product="VVTL1"  
/name="osmotin-like protein, PR-5 protein"  
[CDS](#) 1..222  
/coded\_by="AF003007.1:76..744"  
/note="thaumatin-like protein"  
ORIGIN  
1 mrftttlpiI iplllsl1ft sthaatfdil nkctytwaa aspgggrrld sgqswitvn  
61 pgttnariwg rtsctfdang rgkcetgdcn gllecqygs ppntlaefal nqpnldyid  
121 islvdgfnip mdfggrgiq csvdingqcp selkapggcn npctvfkne ycctdggpsc  
181 gpttyskffk drcpdaysyp qddktslftc psgtnykvtf cp





## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

LOCUS Q9M4H4 220 aa linear PLN 24-JUL-2007  
DEFINITION Ripening-related protein grip22 precursor.  
ACCESSION Q9M4H4  
VERSION Q9M4H4.1 GI:75184387  
DBSOURCE swissprot: locus GRI22\_VITVI, accession [Q9M4H4](#);  
class: standard.  
created: Jan 24, 2006.  
sequence updated: Oct 1, 2000.  
annotation updated: Jul 24, 2007.  
xrefs: [AJ237989.1](#), [CAB85629.1](#)  
xrefs (non-sequence databases): InterPro:[IPR005132](#), Pfam:[PF03330](#)

KEYWORDS Secreted; Signal.  
SOURCE Vitis vinifera  
ORGANISM [Vitis vinifera](#)  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;  
Vitales; Vitaceae; Vitis.

REFERENCE 1 (residues 1 to 220)  
AUTHORS Davies,C. and Robinson,S.P.  
TITLE Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles  
during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs  
encoding putative cell wall and stress response proteins  
JOURNAL Plant Physiol. 122 (3), 803-812 (2000)  
PUBMED [10712544](#)  
REMARK NUCLEOTIDE SEQUENCE [MRNA], AND TISSUE SPECIFICITY.  
STRAIN=cv. Shiraz; TISSUE=Fruit  
COMMENT [SUBCELLULAR LOCATION] Secreted (Potential).  
[TISSUE SPECIFICITY] Expressed in ripening fruits.  
[SIMILARITY] Belongs to the kiwelín family.

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..220  
/organism="Vitis vinifera"  
/db\_xref="taxon:[29760](#)"  
gene 1..220  
/gene="grip22"  
Protein 1..220  
/gene="grip22"  
/product="Ripening-related protein grip22 precursor"  
Region 1..27  
/gene="grip22"  
/region\_name="Signal"  
/inference="non-experimental evidence, no additional  
details recorded"  
/note="Potential."  
Region 28..220  
/gene="grip22"  
/region\_name="Mature chain"  
/experiment="experimental evidence, no additional details  
recorded"  
/note="Ripening-related protein grip22."  
/FTId=PRO\_0000045797."

ORIGIN  
1 maksalwla svclvfnls lpflalglss cggscqtln d yegqlicing ecnddpevgt  
61 hicgnsstp spppstcqp sgtlackgk pkntytcsp itsstpavl nnnfekggd  
121 ggpsacdny hdnserval stgwynggsr cgkmiritaq ngrsvlakvv decdshhgcd  
181 kehagqppcd mivdgsnav wnalgl dini gevdtwsma

## Capítol 1.3:

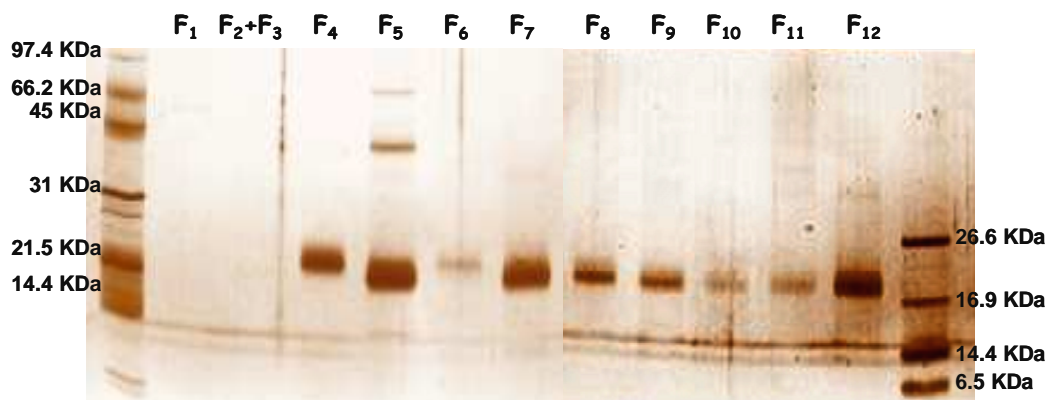
# Identificació de les proteïnes de les fraccions obtingudes per FPLC-IC.



## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

En el la publicació científica (apartat 1.1 d'aquest capítol), s'ha descrit els resultats obtinguts després d'aplicar la cromatografia d'intercanvi catiònic al precipitat i al vi abans de precipitar (Figure 3). Aquestes fraccions s'han processat per electroforesis en gel en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) amb la tinció de plata, el protocol que s'ha seguit està descrit en l'Annex 1 Materials i Mètodes. Aquestes fraccions també s'han analitzat per MALDI-TOF/TOF per poder identificar les proteïnes que formen part de cada fracció, el procediment a seguir per poder desenvolupar aquesta tècnica està descrit en l'Annex 1 Materials i Mètodes.

S'han obtingut 5 i 12 fraccions respectivament, després d'analitzar el precipitat i el vi abans de precipitar per cromatografia líquida d'intercanvi catiònic. Aquestes fraccions s'han dialitzat per tal d'eliminar el NaCl (solut utilitzat com a intercanviador per separar els analits retinguts en la columna d'intercanvi catiònic) i s'han analitzat per MALDI-TOF/TOF.



**Figura 1.** SDS-PAGE emprant tinció amb plata de les fraccions obtingudes per separació amb cromatografia líquida d'intercanvi catiònic del vi abans de precipitar.

No totes les fraccions resultants de la separació per intercanvi catiònic del vi abans de precipitar contenen proteïna, tal i com es pot observar en la Figura 1. Les fraccions F<sub>1</sub> i F<sub>2</sub>+F<sub>3</sub> no presenten cap banda i llavors podem deduir que el contingut d'aquestes fraccions és d'origen no proteic. De fet la fracció F<sub>1</sub> conté compostos que no s'enganxen a la columna, aquesta fracció elueix abans d'iniciar-se el gradient de concentració salina. Aquesta separació per intercanvi catiònic s'ha adquirit a dues longituds d'ona, 280 nm i 320 nm, aquesta fracció F<sub>1</sub> absorbeix a 320 nm, longitud d'ona en la que absorbeixen els derivats dels àcids hidroxicinàmics (Somers i Ziemelis, 1985; Gómez-Alonso i col., 2007).

S'observa com a mínim una banda en la resta de fraccions (de la F<sub>4</sub> a la F<sub>12</sub>), per tan el contingut d'aquestes fraccions en principi és d'origen proteic. Totes fraccions presenten una banda més o menys ampla entorn als 20 KDa; també podem observar una banda a 72, 49 i 11 KDa a la fracció F<sub>5</sub> i una banda a 41 KDa en la fracció F<sub>12</sub>.

El contingut de les fraccions F<sub>1</sub> i F<sub>2</sub>+F<sub>3</sub> del precipitat natural, també sembla que és d'origen no proteic ja que no s'observa cap banda en els carrils electroforètics

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

corresponents a aquestes fraccions (Figura 2). Ja s'ha descrit en el primer apartat d'aquest capítol, la presència en el precipitat natural de polisacàrids i de polifenols, aquests podrien estar presents en aquestes fraccions ja que la seva densitat de càrrega és molt baixa, i no s'enganxaran a la columna, essent així els primers pics que eluiran. En la fracció  $F_9$  tampoc no s'observa cap banda, en aquest cas però pot ser degut a la concentració de proteïna de la mostra, ja que en el cas del vi abans de precipitar si que s'observa banda. En la fracció  $F_6$  es poden deduir dues bandes entorn als 20 KDa.

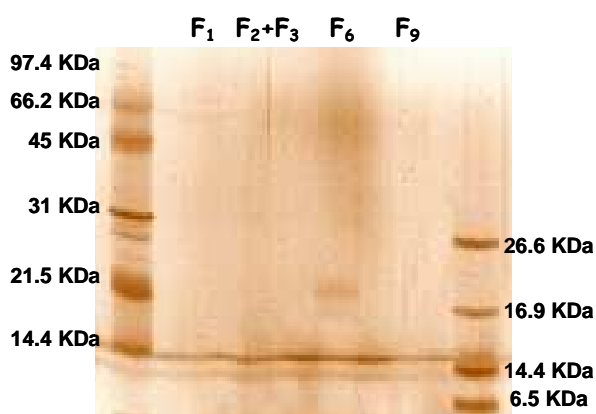
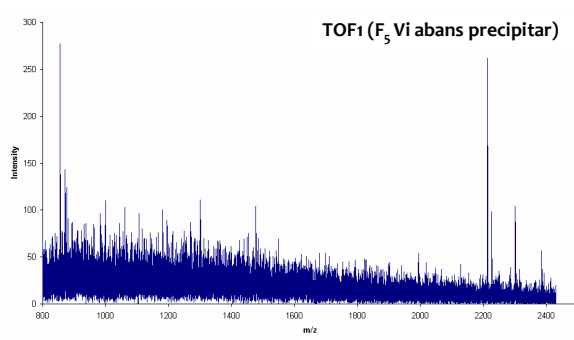
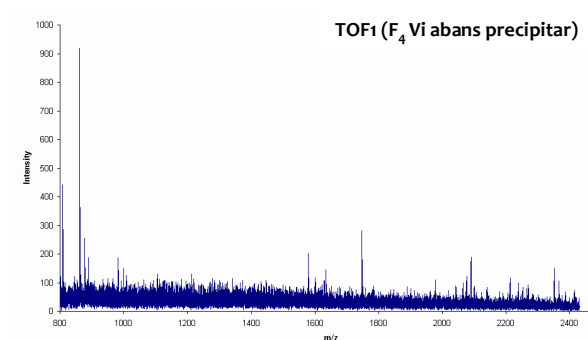
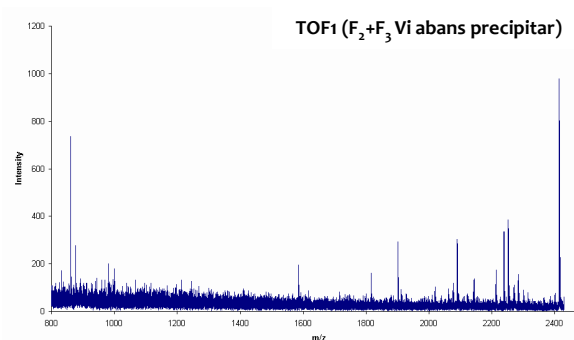
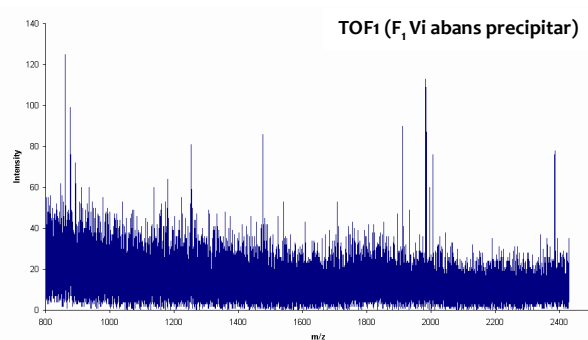
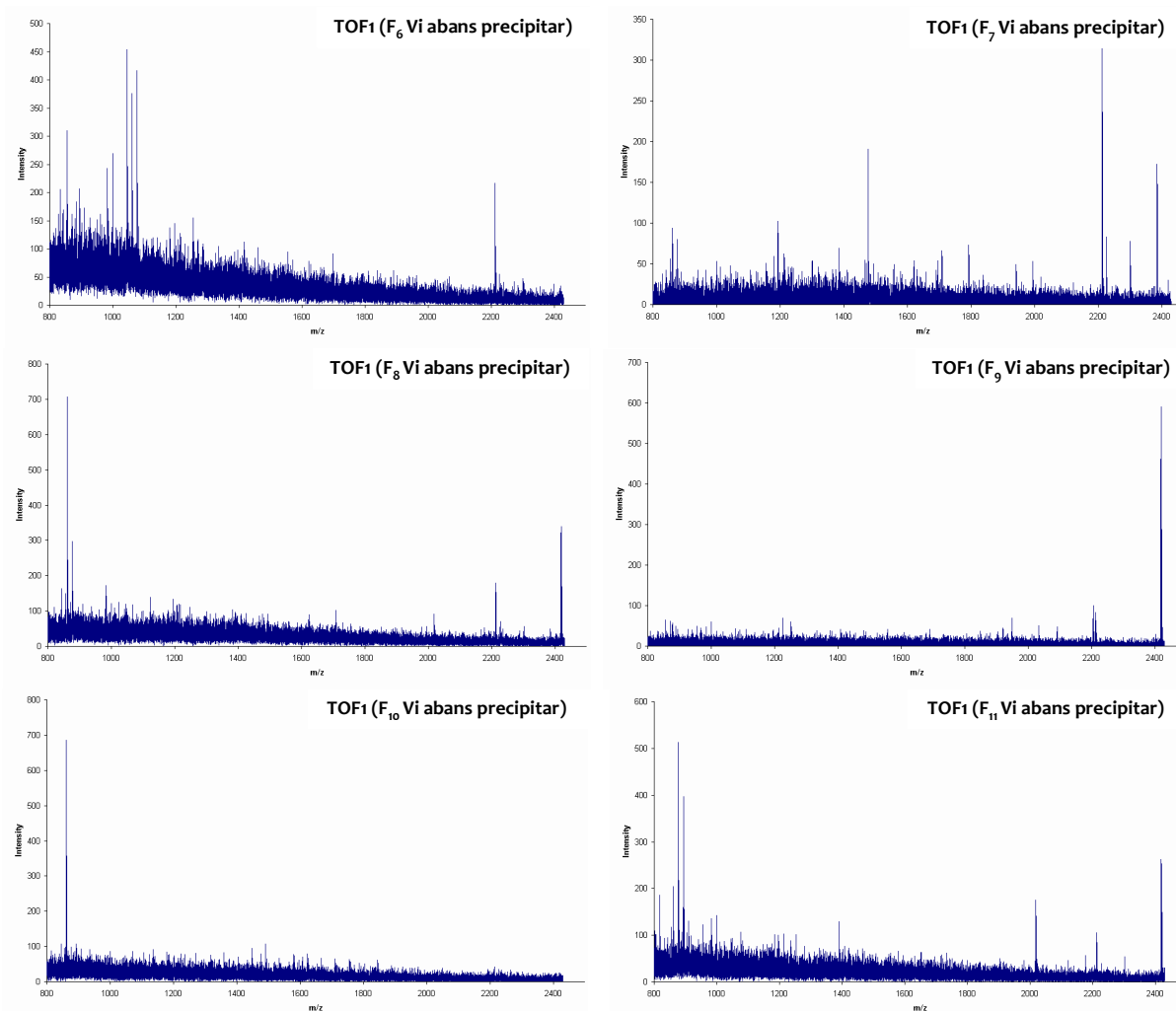


Figura 2: SDS-PAGE emprant tinció amb plata de les fraccions obtingudes per separació amb cromatografia líquida d'intercanvi catiònic del precipitat natural.

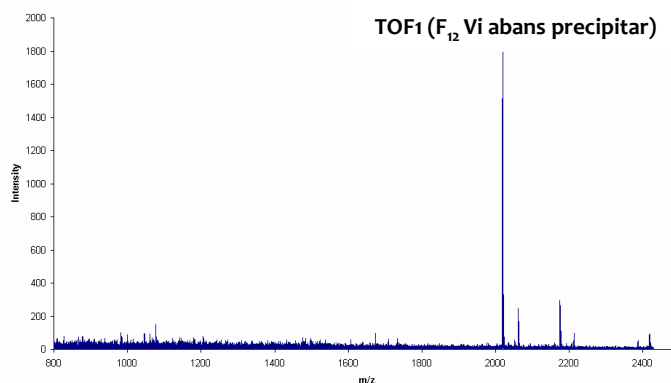
Només s'ha identificat proteïna en la fracció  $F_{12}$  del vi abans de precipitar, en la resta de fraccions malgrat haver-hi una concentració suficient de proteïna per la identificació mitjançant MALDI-TOF/TOF, els espectres generats presenten fragments de masses molt petites. Ja hem descrit en l'apartat anterior algunes de les causes per les quals aquests espectres no ens permeten la identificació de cap proteïna. Tot seguit es mostren els espectres de masses d'aquestes fraccions.



## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

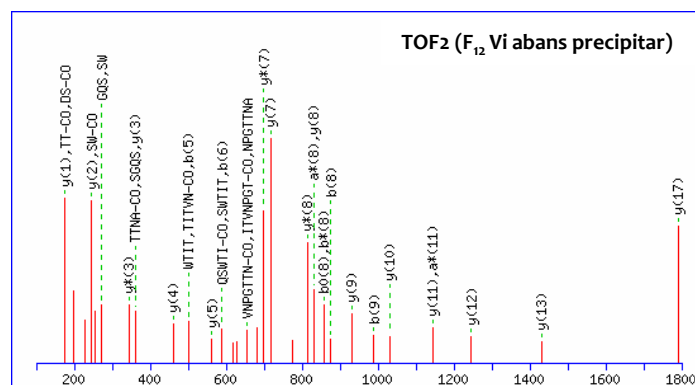


A continuació es mostra l'espectre de masses obtingut en la identificació per MALDI-TOF/TOF de la fracció F<sub>12</sub>. El primer espectre és el generat pel TOF1 i el segon pel TOF2. Segons la base de dades Mascot Search Results, aquests espectres de dades corresponen a la proteïna VVTL1 de *Vitis vinifera*.



Aquesta proteïna encara no s'havia identificat en el vi abans de precipitar, ja que sempre l'havíem detectat en el precipitat natural. La fracció F<sub>12</sub>, estarà formada per les proteïnes més carregades ja que serà la última fracció en eluir, necessitarà una concentració de NaCl molt elevada per poder desenganxar-se de la columna. La VVTL1 té un pI de 5.09, llavors les proteïnes de la resta de bandes del vi abans de precipitar, tenen un pI encara més baix.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.



Sequence Coverage: **9%**

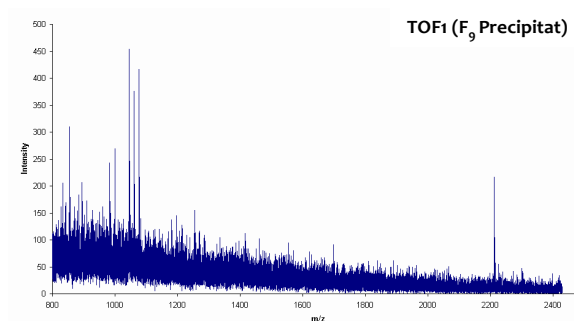
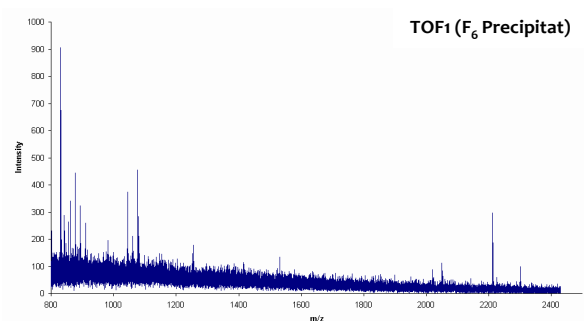
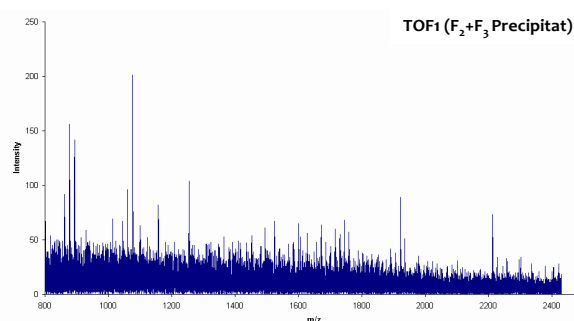
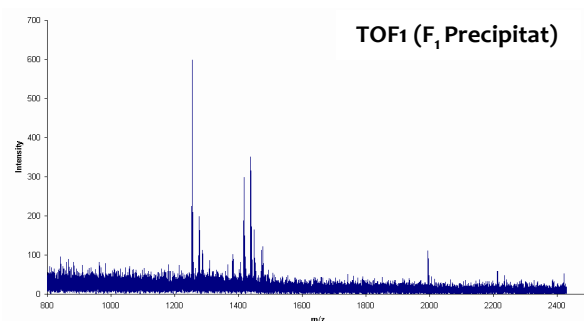
Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MRFTTTLPIIL IPLLLSLLFT STHAATFDIL NKCTYTVWAA ASPGGGRRLD
51 SGQSWTITVN PGTTNARIWG RTSCTFDANG RGK CETGDCN GLLECQGYGS
101 PPNTLAEFAL NQPNNLDYID ISLVDGFNIP MDFSGCRGIQ CSDVDINGQCP
151 SELKAPGGCN NPCTVFKTNE YCCTDGP GSC GPTTYSKFFK DRCPDAYSYF
201 QDDKTSLEFIC PSGTNYKVTF CP
    
```

	Accession	Mass	Score	Description
1.	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2213852">gi 2213852</a>	23953	182	VVTL1 [Vitis vinifera]

No s'ha identificat cap de les fraccions d'intercanvi catiónic del precipitat mitjançant MALDI-TOF/TOF, els espectres generats presenten fragments de masses molt petites, aquests espectres de masses es mostren a continuació.



La separació del precipitat per intercanvi catiónic no afavoreix la identificació de les proteïnes presents en aquest, a diferència de la exclusió molecular.

## Capítol 1.4:

# Electroforesis en gel del vi abans i després de la precipitació natural.



1. Electroforesis en gel en condicions desnaturalitzants: SDS-PAGE.
2. Electroforesis en gel en condicions no desnaturalitzants: Native-PAGE.
3. Isoelectroenfoc: IEF-PAGE.

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

En els apartats 1.1 i 1.2 s'ha descrit àmpliament la distribució proteica en el precipitat total, i en les diferents fraccions obtingudes per cromatografia líquida d'exclusió molecular ( $F_1+F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$ ), mitjançant la tècnica d'electroforesis en gel en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE), no desnaturalitzants (Native-PAGE) i en isoelectroenfoc (IEF-PAGE), emprant la tinció amb plata, amb Coomassie Blue i amb l'Àcid Periòdic o tinció de Schiff. Aquests resultats s'han contrastat amb els obtinguts després d'aplicar totes tres condicions d'electroforesis en gel amb totes tres tincions, en el vi abans i després de la precipitació natural. L'anàlisi qualitatiu dels resultats obtinguts pel vi abans i després de la precipitació natural i de la fracció  $F_3$  del precipitat (fracció en la que s'han identificat les proteïnes del precipitat natural), ens permet observar la desaparició o disminució en la intensitat d'algunes de les bandes presents en vi abans de la precipitació que estan presents en la fracció  $F_3$  del precipitat.

En el cas de la tinció amb l'Àcid Periòdic Schiff, la comparativa s'ha realitzat amb la fracció d'alt massa molecular del precipitat ( $F_1+F_2$ ), ja que els polisacàrids presents en el precipitat natural els trobem en aquesta fracció.

Totes les tècniques utilitzades estan descrites en l'Annex 1 Materials i Mètodes.

### 1. Electroforesis en gel en condicions desnaturalitzants: SDS-PAGE.

En la Figura 1 i en la Figura 2 es mostren els resultats obtinguts mitjançant electroforesis en gel en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) amb la tinció de plata i la de Coomassie Blue respectivament.

En la fracció  $F_3$  del precipitat, s'han identificat les dues bandes electroforètiques principals que s'observen en ambdues figures; corresponen a la  $\beta$ -1,3-Glucanasa (41 KDa) i a la VVTL1 (26-18 KDa). Si observem el carril electroforètic del vi després de la precipitació natural (VD), la àmplia banda de 26-18 KDa present en el vi abans de la precipitació (VA) és menys extensa i la banda de 41 KDa casi no s'observa, podem confirmar que en aquestes dues bandes s'observa una disminució d'intensitat força important. Per tan, sembla ser que aquestes proteïnes presents en el vi inicial (VA) precipitaran de manera natural i així la seva concentració en el vi final (VD) disminuirà.

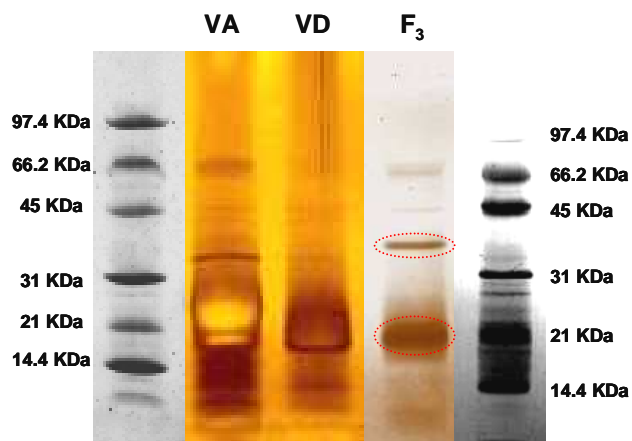


Figura 1: SDS-PAGE emprant la tinció amb plata.



## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

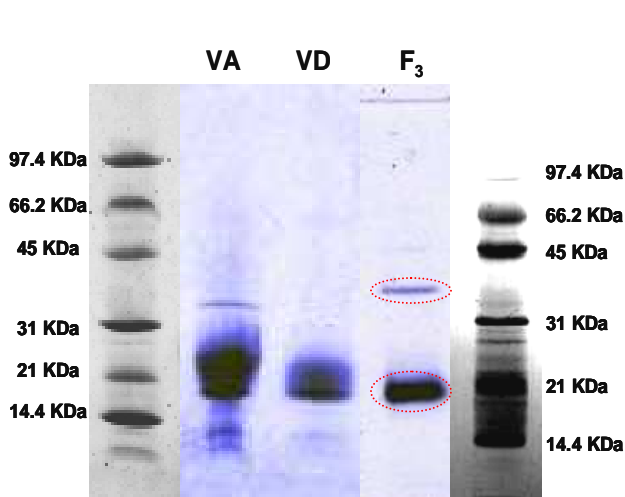


Figura 2: SDS-PAGE emprant la tinció amb Coomassie Blue.

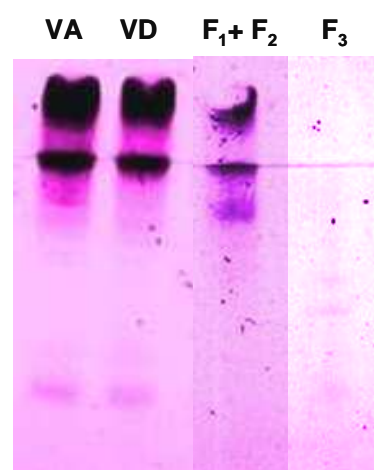


Figura 3: SDS-PAGE emprant la tinció amb l'Àcid Periòdic.

A la Figura 3 es pot observar els resultats obtinguts amb la tinció de l'Àcid Periòdic. S'observa dues bandes força intenses a l'inici del gel en la fracció  $F_1+F_2$  del precipitat, aquestes bandes també estan presents en el vi abans de la precipitació (VA), s'observa una lleugera disminució de la seva intensitat en el vi després de la precipitació (VD). Així doncs, sembla que la precipitació proteica dels vins blancs està acompanyada d'una precipitació polisacàridica. Aquestes bandes estan formades per compostos amb una elevada massa molecular ja que no arriben a entrar en la zona de separació del gel. En la fracció  $F_3$  es pot distingir una lleugera coloració rosada en les bandes corresponents a la VVTL1 i  $\beta$ -1,3-Glucanasa; en el vi abans i després de la precipitació natural s'observa clarament una banda entre 26-18 KDa.

## 2. Electroforesis en gel en condicions no desnaturalitzants: Native-PAGE.

En la Figura 4 es mostren els resultats obtinguts mitjançant electroforesis en gel en condicions no desnaturalitzants (Native-PAGE) emprant la tinció amb plata i amb Coomassie Blue respectivament. En la fracció  $F_3$  del precipitat natural s'han identificat 4 de les 7 bandes electroforètiques (marcades amb un punt en roig), les de recorregut electroforètic ( $R_f$ ) 0.28, 0.40, 0.50 i 1.00. La banda amb  $R_f$  0.28 correspon a Ripening-

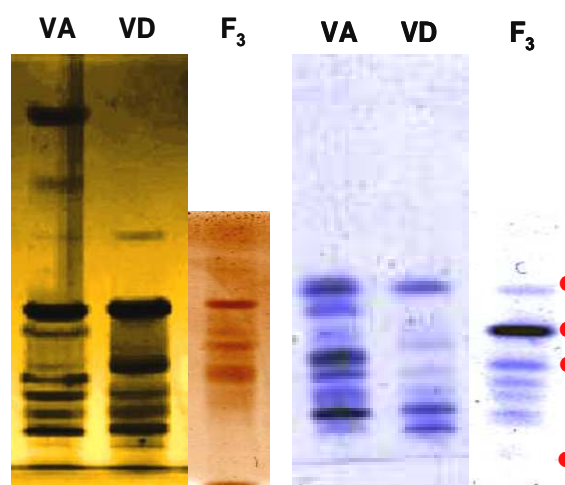


Figura 4: Native-PAGE emprant la tinció amb plata (marró) i amb Coomassie Blue (blau).

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

related protein Grip22 precursor i les altres tres bandes (Rf: 0.40, 0.50 i 1.00) a la VVTL1. En el vi abans de la precipitació natural (VA) s'observen aquestes bandes identificades en la fracció F<sub>3</sub> del precipitat natural, a més d'altres que també estan presents en la fracció F<sub>3</sub> del precipitat natural però que no s'han pogut identificar. En el vi després de la precipitació natural (VD), aquestes bandes han perdut intensitat o bé no s'observen. Així doncs podem confirmar que aquestes bandes presents en el vi inicial precipitaran de manera natural i la seva concentració disminuirà en el vi final.

En la Figura 5 es mostren els resultats obtinguts amb la tinció de l'Àcid Periòdic Schiff. Podem observar una banda força intensa i ampla a l'inici del gel en la fracció F<sub>1</sub>+F<sub>2</sub>, aquesta banda també està present en el vi abans de la precipitació natural (VA) i s'observa una lleugera disminució de la seva intensitat en el vi després de la precipitació natural (VD). Així doncs, la precipitació proteica dels vins blancs està acompanyada d'una precipitació polisacàridica, com ja s'havia vist en el cas de la electroforesis desnaturalitzant.

També es pot observar una banda amb un elevat recorregut electroforètic (Rf:1.00) que està present en el vi abans (VA) i després (VD) de la precipitació natural i que també s'observa en la fracció F<sub>3</sub>, aquesta banda s'ha identificat i correspon a la VVTL1.

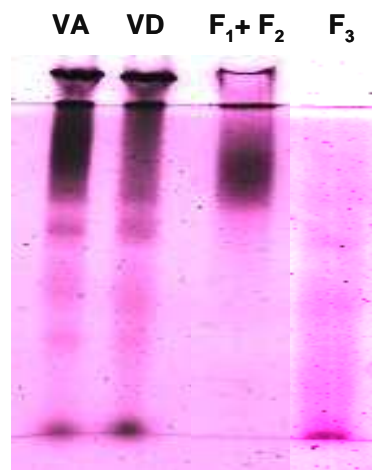


Figura 5: Native-PAGE emprant la tinció amb l'Àcid Periòdic.

### 3. Isoelectroenfoc: IEF-PAGE.

En la Figura 6 es mostren els resultats obtinguts mitjançant isoelectroenfoc (IEF-PAGE) emprant la tinció amb plata i amb Coomassie Blue (respectivament).

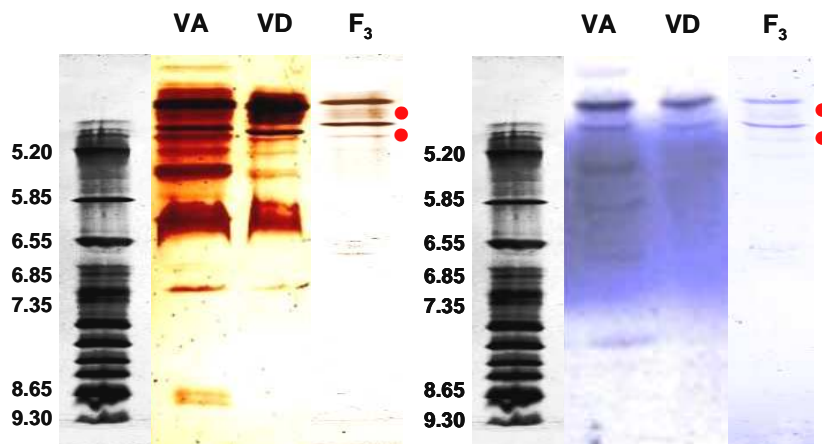


Figura 6: Isoelectroenfoc emprant la tinció amb plata (marró) i amb Coomassie Blue (blau).

## Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.

Podem observar que en la fracció  $F_3$  del precipitat hi ha 7 bandes, d'aquestes se n'ha identificat 4 (marcades amb roig) i totes elles corresponen a la VVTL1. Aquestes bandes també estan presents en el vi abans de precipitar (VA) i la seva intensitat disminueix en el vi després de precipitar (VD).

Així doncs podem confirmar que aquestes bandes presents en el vi inicial precipitaran de manera natural i la seva concentració disminuirà en el vi final. En el vi després de la precipitació natural (VD) no s'observa les dues bandes de pI 9.0 (presentes en el vi abans de precipitar), aquestes bandes però tampoc s'observen en cap de les fraccions del precipitat. Aquesta banda podria correspondre a la  $\beta$ -1,3-Glucanasa, amb pI 9.45.

En la Figura 7 es mostren els resultats obtinguts emprant la tinció amb l'Àcid Periòdic Schiff. S'observa una banda ampla a la zona àcida del gel en la fracció  $F_1+F_2$  (si ens fixem amb els patrons de punt isoelèctric de la tinció de plata o de la tinció de Coomassie Blue, Figura 6), aquesta banda també està present en el vi abans de la precipitació (VA) i s'observa una lleugera disminució de la seva intensitat en el vi després de la precipitació (VD). Així doncs, la precipitació proteica dels vins blancs està acompanyada d'una precipitació polisacàridica, com ja s'havia vist en el cas de la electroforesis en condicions desnaturalitzants i no desnaturalitzants. En la fracció  $F_3$  no s'observa cap banda.

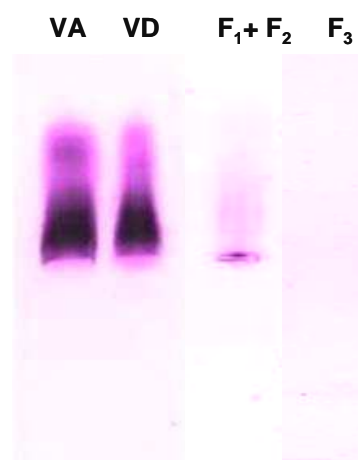


Figura 7: Isoelectrofocografia emprant la tinció amb l'Àcid Periòdic Schiff.

Podem concloure doncs, que totes les bandes electroforètiques de la fracció  $F_3$  del precipitat (fracció en la que es troben la majoria de les proteïnes del precipitat natural), estan presents en el vi abans de la precipitació i en la majoria dels casos aquestes bandes no s'observen o han disminuït la seva intensitat en el vi després de la precipitació natural, tot corroborant la seva presència en el precipitat.

## Capítol 2:

# Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.



Shirley Knight, *Autumn Vineyard*.

- 2.1. Comparació de l'eficàcia dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.
- 2.2. Contingut en proteïna i compostos fenòlics del vi abans i després d'aplicar els diferents tests d'estabilitat.

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

En aquest capítol es mostren els resultats obtinguts en l'estudi comparatiu dels diferents tests més utilitzats per tal de predir la inestabilitat proteica del vi blanc. Aquest estudi ha permès la publicació científica que es mostra en l'apartat 2.1, *Comparison of methods for estimating protein stability in white wines*. Igual com en el primer capítol, alguns dels resultats obtinguts no s'han pogut incloure en aquesta publicació i és per aquest motiu que s'inclouen en l'apartat 2.2, Contingut en proteïna i compostos fenòlics del vi abans i després d'aplicar els diferents tests d'estabilitat.

## **Capítol 1. Identificació de les proteïnes inestables del vi blanc.**

## **Capítol 2.1:**

# **Comparació de l'eficàcia dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.**



***“Comparison of methods for estimating protein stability in white wines”***

Article publicat a la revista

*American Journal of Enology and Viticulture*, 2009, 3, 302-311.

## **Comparison of Methods for Estimating Protein Stability in White Wines**

**Mireia Esteruelas<sup>1</sup>, Philippe Poinaut<sup>2</sup>, Nathalie Sieczkowski<sup>2</sup>, Sebastian Manteau<sup>2</sup>,  
Maria Francesca Fort<sup>1</sup>, Joan Miquel Canals<sup>1</sup> and Fernando Zamora<sup>1</sup>,**

<sup>1</sup> Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Grup de Recerca en Tecnologia Enològica (Tecnenol),  
Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, Campus de Sescelades, C/Marcel·lí  
Domingo s/n, 43007, Tarragona, Spain, and

<sup>2</sup> Station Oenotechnique de Champagne-Martin Vialatte Oenologie, 79 avenue Thévenet BP 1031  
Magenta, 51319 Epernay cedex, France.

**Acknowledgments:** The authors thank CICYT (AGL2007-66338 and AGL2004- 02309) and CDTI  
(Project CENIT Demeter) for financial support.

Corresponding author (email: fernando.zamora@urv.cat; fax: +34 97 755 8686)

**Am. J. Enol. Vitic. 60:3:302-311 (2009)**

Manuscript submitted November 2008; revised February 2009. Accepted for publication February 2009.

### **Abstract**

Several protein stability tests have been proposed, but as their results are not always consistent, winemakers may hesitate when determining a bentonite dose. The chemical composition of the naturally occurring protein precipitate of a Sauvignon blanc wine was compared with the precipitates obtained after using different protein stability tests. Chemical composition, molecular exclusion profiles, and electrophoresis profiles of stability test precipitates were compared with naturally occurring precipitate. All forced precipitates presented different chemical compositions than the naturally occurring precipitate. None of the tests is a perfect reproduction of the natural phenomenon. The slow heat test does not precipitate thaumatin-like proteins and the ethanol test precipitates a large quantity of polysaccharide, making neither test suitable. Results indicate the fast heat test is most similar to the natural precipitate in terms of its chemical composition and therefore is likely the most appropriate stability test. The results offer a thorough comparison of the chemical composition of a natural protein precipitate and precipitates obtained after applying different stability tests.

**Key words:** haze protein, stability test, turbidity, white wine.



## **Introduction**

The appearance of protein haze is one of the major problems in bottled wines (Bayly and Berg 1967, Hsu and Heatherbell 1987b, Waters et al. 1991). Some of the proteins in white and rosé wines can be denatured, which leads to the appearance of a haze or in some cases a precipitate. However, protein instability does not correlate well with total protein concentration because individual proteins behave differently (Bayly and Berg 1967, Hsu and Heatherbell 1987b). Some authors have suggested that other factors may also play an important role in protein precipitation (Waters et al. 1995, Siebert 1999), including sulfate (Pocock et al. 2007).

Several studies into the chemical nature of unstable proteins have been conducted. Bayly and Berg (1967) stated that the proteins with the lowest isoelectric points (pI) were the most unstable during the slow heat test. These data were confirmed by Hsu and Heatherbell (1987b), who reported that unstable proteins have a low pI (4.1-5.8) and a low relative molecular mass (13-30 kDa). Some years later, pathogenesis-related proteins, thaumatin-like proteins, and chitinases were identified as causes of haze (Waters et al. 1991, 1996, 1998). More recently, our research group has identified the presence of thaumatin-like proteins (VVTL1),  $\beta$ -(1-3)-glucanase, and the ripening-related protein Grip22 precursor in natural precipitates using MALDI-TOF/TOF (Esteruelas et al. 2009). These proteins all have a molecular weight between 20 and 45 kDa. Therefore, unstable proteins are present mainly within this range of molecular weight.

Since protein haze represents a major problem, wine-makers frequently treat white and rosé wines with bentonite in order to remove unstable proteins (Hsu and Heatherbell 1987a). Bentonite interacts electrostatically with proteins, which produces flocculation (Hsu and Heatherbell 1987a, Hsu et al. 1987). However, it has been demonstrated that bentonite treatment negatively affects the flavour (Lubbers et al. 1996) and texture (Guillou et al. 1998) of wine. Moreover, bentonite treatment is especially detrimental to sparkling wines because it drastically affects the quality and persistence of its foam (Martinez-Rodriguez and Polo 2003, Vanrell et al. 2007). Consequently, alternative treatments such as ultrafiltration (Hsu et al. 1987), chitin (Vincenzi et al. 2005), and zirconium oxide (Salazar et al. 2006) have been suggested, although their use is still experimental.

Selecting the correct dosage of bentonite for stabilizing wines is essential to its correct application. However, there are many different methods for estimating the protein stability of white wines (Berg and Akiyoshi 1961, Mesrob et al. 1983, Dubourdieu et al. 1988, Toland et al. 1996, Sarmiento et al. 2000, Borrot and Gresser 2000), and they differ in their results. Consequently, the calculated dose of bentonite necessary for stabilizing a wine may vary depending on the method used, representing a major challenge for enologists because there

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

is always a certain degree of uncertainty when determining the minimum dose of bentonite to ensure the protein stability of a given wine.

The different protein stability tests can be classified according to their mechanisms of action (Boulton 1980, Mesrob et al. 1983, Dawes et al. 1994, Sarmiento et al. 2000). The Bentotest and trichloroacetic acid (TCA) tests precipitate all the proteins in the sample and these methods have been reported to overestimate the amount of bentonite needed (Berg and Akiyoshi 1961, Dubourdiu et al. 1988, Dawes et al. 1994, Toland et al. 1996). Heat tests are probably the most commonly used method by the wine industry. However, different procedures have been described in the literature, which has led to some confusion and has caused reproducibility problems at different wineries (Dubourdiu et al. 1988, Toland et al. 1996, Sarmiento et al. 2000). All versions of the heat test are based on the accelerated oxidation, condensation, and precipitation of phenolic compounds with proteins at high temperatures (Sarmiento et al. 2000). Heat tests usually select a lower dose of bentonite to stabilize wine than other tests (Dubourdiu et al. 1988, Sarmiento et al. 2000).

The ethanol test is based on decreasing the dielectric constant of the solution, which reduces protein solubility (Lehninger 1981). The ammonium sulfate test precipitates proteins using a high salt concentration (salting out), but the precipitation is incomplete (Stryer 1975). The tannin precipitation test is based on the assumption that proteins precipitate in wine during storage by binding to phenolic compounds, such as tannins. This test provides information on the ability of some wine proteins to be precipitated by polyphenolic compounds. The tannin test is influenced by many intrinsic factors of wine: pH, total protein, and concentrations of iron, potassium, and copper. Hence, it is not a good indicator of the optimum dose of bentonite (Sarmiento et al. 2000). Finally, the Prostab stability test kit (Borrot and Gresser 2000) has been recently introduced on the market, but no information is available on its mechanism of action.

The aim of this work was to compare the chemical composition of a naturally occurring protein precipitate of a Sauvignon blanc wine with the precipitates obtained after applying the different protein stability tests in order to identify which tests are the most similar. The following eight stability tests were examined: fast heat, slow heat, tannin, ethanol, trichloroacetic acid (TCA), ammonium sulfate, Bentotest, and Prostab.

### Materials and Methods

**Chemicals.** All products were of high purity and suitable for fast protein liquid chromatography (FPLC). All solutions were previously filtered through 0.22 µm acetate

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

cellulose filters (Millipore GSE) and degassed using an ultrasonic water bath.

**Wine samples.** Research was carried out in 2006 at the experimental winery of the Faculty of Oenology in Tarragona (Rovira i Virgili University) in Constantí, A.O.C. Tarragona, Spain. Two thousand kg of Sauvignon blanc grapes were harvested at a sugar concentration of 210 g/L and with a titratable acidity of 6.9 g/L (expressed as tartaric acid). Grapes were pressed with a yield of 65% grape juice and 60 mg/L sulphur dioxide was added to protect the must against oxidation and microbiological spoilage. After cold settling (16°C), the must was inoculated with 20 g/L dry active yeasts (EC1118; Lallemand, Montreal, Canada). Once the alcoholic fermentation was complete, the wine was racked, sulfited (40 mg/L), and stored at 4°C for one month. Wine was centrifuged (10 min at 12.000 g), filtered (0.45 µm), and used for the stability tests. Simultaneously, 40 mL samples of wine were bottled and stored at room temperature (20-25°C) until natural precipitation occurred. Analytical parameters of the wine were 12.8% v/v ethanol, 6.2 g/L titratable acidity (expressed as tartaric acid), and pH 3.10.

**Stability tests.** All stability tests were performed in triplicate. All samples were equilibrated at room temperature (25°C) before measuring their turbidity.

*Fast heat:* 40 mL wine was subjected to a temperature of 90°C for 1 hr in a thermostatic water bath, followed by a temperature of 4°C for 6 hr in a refrigerator (Sarmiento et al. 2000).

*Slow heat:* 40 mL wine was stored at a temperature of 60°C for 4 days, and then maintained at 4°C for 6 hr (Sarmiento et al. 2000).

*Bentotest:* This reagent is a commercial solution of phosphomolybdic acid in hydrochloric acid. 4 mL Bentotest solution (Richard Wagner, Alzey, Germany) was added to 40 mL wine. The solution was then inverted three times and maintained for 20 min at room temperature (Toland et al. 1996).

*Tannin:* 1.0 g oenological wood tannin (Proenol, Gaia, Portugal) was dissolved in 10 mL distilled water at 70°C. When the tannin was well dissolved, 50 mL distilled water was then added and ethanol was added to make a total volume of 100 mL. 3.2 mL tannin solution was added to 40 mL wine. The solution was mixed, maintained at room temperature for 15 min, and then placed in a boiling water bath for 3 min (Mesrob et al. 1983).

*Ammonium sulfate:* 2.1 mL saturated solution of ammonium sulfate was added to 40 mL wine. The solution was then heated for 7 hr at 55°C (Toland et al. 1996).

*Trichloroacetic acid (TCA):* 4 mL trichloroacetic acid solution (55% w/v) was added to 40 mL wine. The solution was then heated in boiling water for 2 min (Berg and Akiyoshi 1961).

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

*Ethanol:* 40 mL pure ethanol was added to an equal volume of wine and maintained in closed tubs at room temperature for 2 hr (Sarmiento et al. 2000).

*Prostab:* A Prostab Kit (Martin Vialatte Oenologie, Epernay, France) was used. According to the manufacturer's instructions, 4 mL of reagent 1 was added to 40 mL wine. The mixture was homogenized and then 4 mL of reagent 2 was added. After homogenization, the solution was maintained at room temperature for 20 min.

**Measure of turbidity.** Samples were well stirred before reading to prevent sedimentation. Developed turbidity was measured against a blank using a Hach 2100N Turbidimeter (Hach Company, Loveland, CO). All stability tests were performed in triplicate.

**Selection of bentonite dose for wine stabilization.** A total of 2 g natural sodic bentonite in powder form (Volclay, Laffort, Renteria, Spain) was carefully hydrated with 100 mL deionized water. This mixture was maintained at room temperature for 24 hr before use. 1-L wine samples were added to enough bentonite solution to arrive at final concentrations of 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, and 1000 mg/L (corresponding to industrial doses 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 g/hL). After stirring, the samples were kept at room temperature for 2 hr. Aliquots of the supernatant were centrifuged and used for estimating protein stability with the different tests. In all cases, the wine was considered stable when the increase of turbidity in relation to the blank was lower than 2 NTU (Moine-Ledoux and Dubourdieu 1999).

**Precipitate manipulation.** The resulting wines after natural precipitation and after the application of the different stability tests were centrifuged and the supernatant was discarded. All precipitates were dissolved in 2.6 mL 50 mM disodium phosphate with 0.2% SDS and then maintained at a temperature of 80°C for 5 min to achieve total dissolution. A total of 0.4 mL dissolved precipitate was lyophilized and stored at -20°C for subsequent gel filtration analysis.

**Chemical analysis of precipitate.** The dissolved precipitates were assayed for protein using the Bradford dye-binding microassay method (Bradford 1976), polysaccharides using the phenol-sulphuric acid assay method (Segarra et al. 1995), and phenolic compounds using the Folin-Ciocalteu microassay method (Singleton et al. 1999).

**Gel filtration chromatography on FPLC.** The lyophilized precipitates were dissolved in 150 µL 0.3 M ammonium acetate solution. The samples were centrifuged (5 min at 12.000 g,

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

4°C) and the supernatant was used directly for FPLC analysis (Canals et al. 1998). Analyses were conducted with a Superdex 75 PC 3.2/30 column on a fast protein liquid chromatography (FPLC) system (Smart System, Pharmacia, Uppsala, Sweden). The samples (50 µL) were injected and eluted with a 0.3 M ammonium acetate solution at a flow of 40 µL/min. The column eluents were continuously monitored at 280 and 320 nm using a µPeak Monitor (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

**SDS-PAGE.** Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed using a precast discontinuous gel buffer system (Laemmli 1970). Phast-Gel Homogeneous 20 (Pharmacia) was used to adequately separate the proteins. Exclusion molecular fractions F<sub>1</sub>+F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub>, obtained from FPLC, were mixed, lyophilized, and resuspended in a buffer containing 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 10% glycerol, and 0.002% bromophenol blue, thus ensuring an SDS/protein ratio greater than three. The buffer volume was selected to obtain a protein concentration of 30 ng/µL for silver stain and 500 ng/µL for periodic acid-Schiff (PAS) stain. The samples were boiled for 5 min and subjected to electrophoresis.

Two molecular weight standards calibration kits for SDS-PAGE were used to determine the molecular weights (ref. 161-0304 and 161-0326; Bio-Rad, Hercules, CA). The low range molecular weight standards calibration kit was made up of phosphorylase b (97400 Da), serum albumin (66200 Da), ovalbumin (45000 Da), carbonic anhydrase (31000 Da), trypsin inhibitor (21500 Da) and lysozyme (14400 Da). The polypeptide molecular weight standards kit was made up of triosephosphate isomerase (26625 Da), myoglobin (16950 Da), α-lactalbumin (14437 Da), aprotinin (6512 Da), insulin b chain oxidized (3496 Da), and bacitracin (1423 Da). Electrophoresis was performed using a PhastSystem apparatus (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) and PhastSystem Separation Technique File No.111 (Pharmacia 1990).

**Stains.** The protocols for silver staining are described in Amersham Biosciences Automated Staining of Polyacrylamide Gels with Processor Plus (Pharmacia 1990). The reagents used for the silver stain were prepared according to Plus One Silver Stain Kit Protein Instructions (Pharmacia 1990). Periodic acid-Schiff (PAS) stain was carried out using a Glycoprotein Detection Kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO).

**Statistical analysis.** All numeric data are expressed as the arithmetic average ± standard deviation from three replicates. Statistical comparisons between means were established with a Student t test using StatView (software for Macintosh).

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

### Results and Discussion

The increase of turbidity after applying the different stability tests to the Sauvignon blanc wine under different bentonite doses is shown in Table 1. The Bentotest and tannin test produced the highest turbidity in the unfined wine, whereas the other tests produced comparable levels. All tests indicated that the unfined wine was very unstable, in that in all cases the increase of turbidity was greater than 2 NTU. Considering this value as the threshold of protein stability (Moine-Ledoux and Dubourdiou 1999), the different tests indicate different doses of bentonite to achieve wine protein stability. Specifically, the fast heat, slow heat, TCA, tannin, and Prostab tests indicated that the wine was stable after a treatment with 60 g/hL bentonite. However, the ammonium sulfate test indicated stability with 50 g/hL bentonite, the Bentotest indicated 80 g/hL bentonite, and the ethanol test indicated that the wine remained unstable even after treatment with 100 g/hL bentonite. According to these results, the dose of bentonite needed for stabilizing wine differs depending on the test used. This discrepancy raises concerns about the accuracy of the tests and could cause winemakers to overtreat wines to ensure their absolute protein stability.

**Table 1** Increase in turbidity of the Sauvignon blanc wine after applying the different stability tests and different bentonite dose treatments.

Bentonite	Fast heat	Slow heat	Bentotest	Ammonium sulfate	TCA	Tannin	Ethanol	Prostab
0 g/hl	125 ± 4	104 ± 3	597 ± 18	142 ± 4	172 ± 5	719 ± 22	75 ± 2	92 ± 3
10 g/hl	84 ± 3	86 ± 3	434 ± 13	92 ± 3	141 ± 4	590 ± 18	65 ± 2	76 ± 2
20 g/hl	51 ± 2	68 ± 2	297 ± 9	53 ± 2	110 ± 3	461 ± 14	57 ± 2	60 ± 2
30 g/hl	26.7 ± 0.3	51 ± 1	186 ± 10	25 ± 1	93.1 ± 0.8	379 ± 4	37.7 ± 0.7	48 ± 1
40 g/hl	9.5 ± 0.2	35 ± 2	103 ± 6	3.7 ± 0.1	35 ± 2	166 ± 5	29.4 ± 0.2	25 ± 1
50 g/hl	2.4 ± 0.3	3.8 ± 0.2	26 ± 1	0.9 ± 0.1*	2.5 ± 0.1	11 ± 2	27.7 ± 0.5	4 ± 1
60 g/hl	1.5 ± 0.2*	1.2 ± 0.1*	4.1 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2*	1.3 ± 0.2*	25.2 ± 0.7	1.1 ± 0.1*
70 g/hl	1.4 ± 0.3	1.2 ± 0.1	2.5 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1	21.6 ± 0.6	0.9 ± 0.1
80 g/hl	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.2*	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	22.1 ± 0.3	0.7 ± 0.2
90 g/hl	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	21.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1
100 g/hl	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	20.3 ± 0.1	0.9 ± 0.4

\*Bentonite dose needed to achieve protein stability.

The chemical compositions of the natural precipitate and the precipitates obtained after applying the different stability tests is shown in Table 2. In all cases, the application of the stability test generated more precipitate than natural precipitate: slow heat, three times more; fast heat and ammonium sulfate, four times more; Bentotest, TCA, and ethanol approximately six times more; tannin eight times more; and Prostab almost 11 times more. In addition, all forced precipitates resulted in different chemical compositions.

All the forced precipitates contained more protein, polyphenols, and polysaccharides than the natural precipitate. For proteins, the ethanol test precipitate contained twice as much protein than natural precipitate; slow heat, three times; fast heat, five times; ammonium sulfate, seven times; Bentotest, TCA, and tannin, approximately nine times; and Prostab,

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

sixteen times. For polyphenols, the ethanol and ammonium sulfate tests produced almost twice as many polyphenols as the natural precipitate; the fast and slow heat tests, Bentotest, and TCA, approximately three times; the Prostab, almost four times; and the tannin, eight times. The tannin test precipitated the most polyphenols, probably because the test uses tannin as a denaturing agent. With regard to polysaccharides, the ammonium sulfate and TCA tests precipitated approximately twice as many polysaccharides as the natural precipitate; fast heat, slow heat, and tannin test, five times; Bentotest, six times; Prostab, ten times; and ethanol, twenty-three times. Therefore, none of the stability tests produced a precipitate with exactly the same chemical composition as the natural precipitate.

**Table 2** Comparison of Bradford, Folin-Ciocalteu, and phenol sulfuric analyses of natural precipitate with precipitates obtained from the different stability tests. Equal letters indicate the absence of statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) among the samples.

	Protein		Polyphenols		Polysaccharides		Total
	mg	%	mg	%	mg	%	
Natural precipitate	0.32 ± 0.01 A	44 ± 2	0.25 ± 0.01 a	35 ± 1	0.16 ± 0.01 α	21 ± 1	0.73 ± 0.03 X
Fast heat	1.6 ± 0.1 B	53 ± 3	0.71 ± 0.02 b	24 ± 1	0.71 ± 0.07 β	24 ± 2	3.0 ± 0.2 Δ
Slow heat	1.1 ± 0.1 C	44 ± 4	0.62 ± 0.02 c	25 ± 1	0.74 ± 0.07 β	30 ± 3	2.4 ± 0.2 Φ
Bentotest	2.71 ± 0.06 D	63 ± 2	0.60 ± 0.07 c	14 ± 2	0.99 ± 0.08 χ	23 ± 2	4.3 ± 0.2 Γ
Ammonium sulfate	2.2 ± 0.1 E	73 ± 4	0.40 ± 0.02 d	14 ± 1	0.40 ± 0.03 δ	14 ± 1	3.0 ± 0.2 Δ
TCA	2.9 ± 0.2 DF	71 ± 5	0.79 ± 0.02 e	19 ± 1	0.40 ± 0.03 δ	10 ± 1	4.1 ± 0.2 Γ
Tannin	3.0 ± 0.1 F	51 ± 2	2.02 ± 0.08 f	34 ± 1	0.85 ± 0.08 βχ	14 ± 1	5.9 ± 0.3 ♢
Ethanol	0.59 ± 0.06 G	13 ± 1	0.36 ± 0.03 g	8 ± 1	3.6 ± 0.3 ε	79 ± 7	4.6 ± 0.4 Γ
Prostab	5.21 ± 0.06 H	67 ± 1	0.94 ± 0.05 h	12 ± 1	1.6 ± 0.1 φ	21 ± 2	7.8 ± 0.2 Π

In a previous study (Canals et al. 1998), we proposed a method that used FPLC to separate white wine proteins into different fractions. In all the studied wines, three or four fractions were obtained by molecular exclusion chromatography:  $F_1$  with a molecular weight MW >100 kDa,  $F_2$  with a MW of 60 kDa,  $F_3$  with a MW between 20 and 40 kDa, and  $F_4$  with a MW <20 kDa. Depending on the wine protein concentration,  $F_1$  and  $F_2$  were either two single peaks or one overlapped peak. This method was used to study the precipitate obtained by natural precipitation and by the application of the different stability tests.

The molecular exclusion chromatograms of natural precipitate differ from those of the different precipitates, especially in their absorbance at 280 and 320 nm (Figure 1). Absorbance at 280 nm is characteristic of all compounds with aromatic rings such as proteins and polyphenols, while absorbance at 320 nm is more characteristic of hydroxycinnamic acids and derivatives (Somers and Ziemelis 1985, Gómez-Alonso et al. 2007). The molecular exclusion chromatogram of the natural precipitate at 280 nm presented four major peaks corresponding to fractions  $F_1+F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$ , and  $F_5$ . The contribution of fraction  $F_2$  was relatively low and did not separate from fraction  $F_1$ . However, a new fraction of very low molecular weight ( $F_5$ ) was identified. This fraction had been overlaid with fraction  $F_4$  in previous studies (Canals et al. 1998, Esteruelas et al. 2009), but here it was clearly separated. In contrast, the molecular exclusion chromatogram of the natural precipitate

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

obtained at 320 nm showed only three peaks ( $F_1+F_2$ ,  $F_4$ , and  $F_5$ ), with lower peaks than those obtained at 280 nm. At this wavelength,  $F_3$  was not present.

Since the molecular weight of unstable proteins has been reported to range from 20 to 40 kDa (Hsu and Heatherbell 1987b, Waters et al. 1991, Esteruelas et al. 2009), haze proteins must be present in fraction  $F_3$ . Therefore, the presence of the other fractions ( $F_1+F_2$ ,  $F_4$ , and  $F_5$ ) in the natural precipitate may be attributed to other compounds such as polyphenols, polysaccharides, and peptides. The fact that natural precipitate contains significant amounts of these compounds (Table 2) coincides with this possibility. On the other hand, the chromatogram of the natural precipitate obtained at 320 nm seems to confirm the presence of hydroxycinnamic acids (or their derivatives), especially in fractions of lower molecular weight ( $F_4$  and  $F_5$ ).

The molecular exclusion chromatograms of natural and fast heat test precipitates presented similar profiles at 280 and 320 nm (Figure 1A). However, the fractions  $F_1+F_2$  and  $F_3$  of the fast heat precipitate overlap at both wavelengths, likely because the area of the peak corresponding to these fractions is much greater than in the natural precipitate. The fractions  $F_4$  and  $F_5$  were very similar to the fractions of the natural precipitate at both wavelengths. The slow heat precipitate (Figure 1B) produced similar exclusion molecular fractions to the fast heat, but  $F_4$  and  $F_5$  presented slightly higher peaks and eluted somewhat earlier than similar fractions of the natural precipitate.

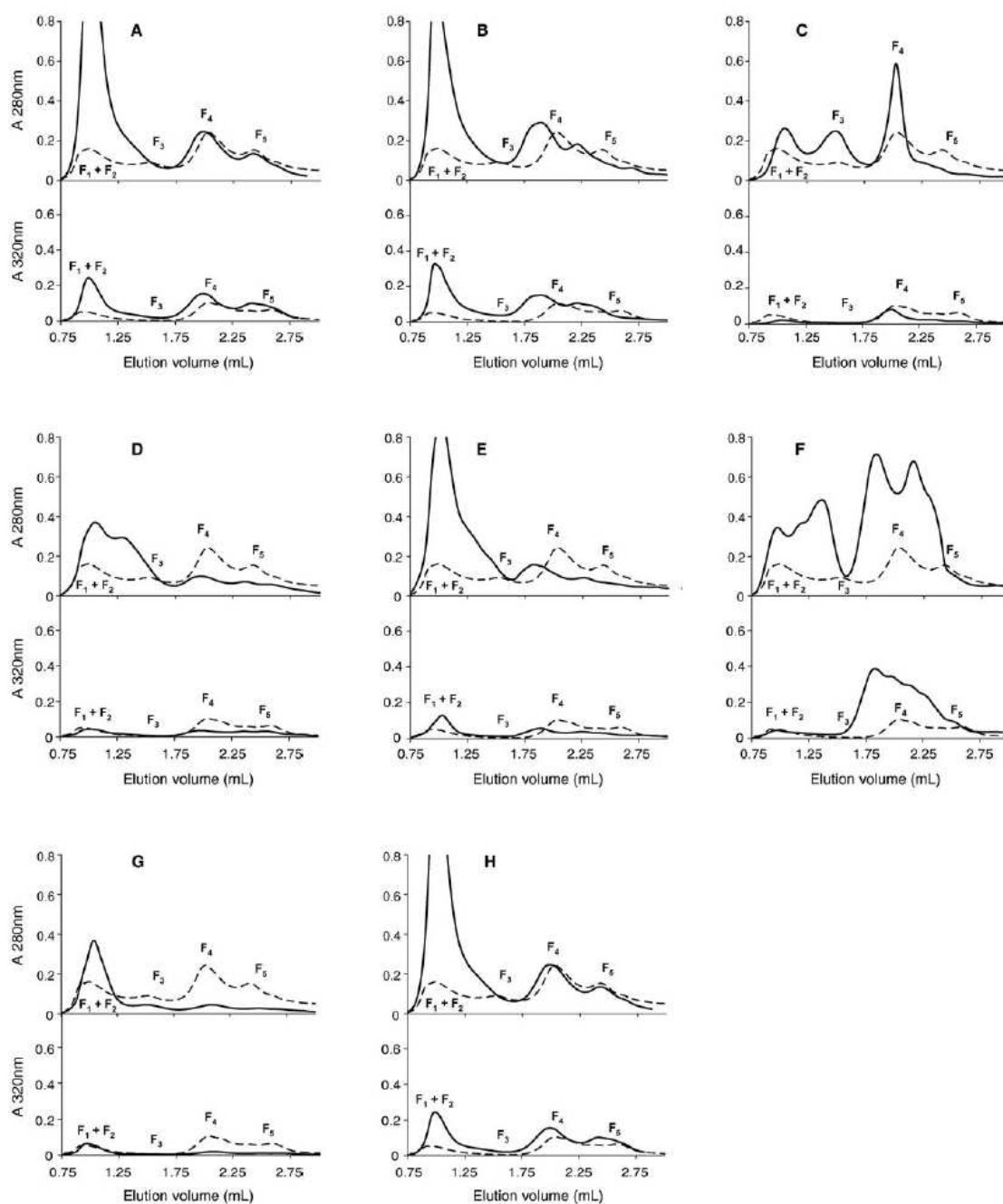
The molecular exclusion chromatograms of the natural and Bentotest precipitates presented the same fractions at 280 nm, but there are clear differences in their areas (Figure 1C). Specifically, the Bentotest precipitate presented more of the fractions  $F_1+F_2$ ,  $F_3$ , and  $F_4$  and less of  $F_5$ . At 320 nm, all the Bentotest precipitate fractions presented smaller peak areas than the natural ones.

Molecular exclusion chromatograms showed that the ammonium sulfate test generated a precipitate with the same fractions as natural precipitate (Figure 1D), but with clear size differences between their peaks. At 280 nm, fractions  $F_1+F_2$  and  $F_3$  overlapped and presented a larger area, whereas fractions  $F_4$  and  $F_5$  presented smaller areas. At 320 nm both profiles were more similar, although the areas of the low molecular fractions ( $F_4$  and  $F_5$ ) of ammonium sulfate precipitate were lower.

In the chromatograms of the natural and TCA precipitates, the fractions  $F_1+F_2$  and  $F_3$  of the TCA precipitate were overlapped at 280 nm and presented a much larger area than similar fractions of natural precipitate (Figure 1E). Furthermore, fractions  $F_4$  and  $F_5$  of the TCA precipitate presented slightly smaller areas and eluted somewhat earlier. At 320 nm, the area of the fractions  $F_1+F_2$  were slightly larger, while the areas of fractions  $F_4$  and  $F_5$  were slightly smaller and eluted somewhat earlier.



## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.



**Figure 1** Molecular exclusion chromatograms ( $F_1+F_2$ ,  $F_3$ , and  $F_4$ ) of fractions of natural precipitate and the precipitate of eight stability tests at 280 and 320 nm: (A) fast heat, (B) slow heat, (C) Bentofest, (D) ammonium sulfate, (E) trichloroacetic acid (TCA), (F) tannin, (G) ethanol, and (H) Prostab.

The tannin test resulted in a precipitate with a completely different profile than the natural precipitate, probably because of the presence of added tannins (Figure 1F). At 280 nm, all fractions presented much larger areas than the natural precipitate fractions and they were grouped in two major peaks, one overlapping the fractions  $F_1+F_2$  and  $F_3$  and the other overlapping fractions  $F_4$  and  $F_5$ . At 320 nm, fractions  $F_1+F_2$  of both precipitates were very similar, but a large peak overlapping fractions  $F_4$  and  $F_5$  was present in the tannin precipitate.

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

Chromatograms of the natural and ethanol test precipitates gave completely different profiles, inasmuch as the ethanol precipitate generated only one major fraction of a high molecular weight ( $F_1+F_2$ ) at both wavelengths (Figure 1G). Lastly, the chromatographic profile of the Prostab test precipitate at 280 nm differed greatly from the profile of the natural precipitate (Figure 1F). Although all fractions were present, all were more abundant, especially fractions  $F_4$  and  $F_5$ . At 320 nm, the fractions  $F_1+F_2$  were very similar, whereas fractions  $F_4$  and  $F_5$  also presented a larger area. These results suggest that some of the components of Prostab reagent are likely present in peaks  $F_4$  and  $F_5$ .

It therefore appears that none of the commonly used stability tests generates a precipitate with a chromatographic profile similar to that of natural precipitate. These results are in line with data previously presented (Table 2), which indicate that the chemical composition of the precipitates of all eight stability tests differ from the natural precipitate.

As noted previously, unstable proteins must be present in fraction  $F_3$ . The chromatograms of precipitates of all the stability tests indicate that all the tests, with the sole exception of ethanol, present fraction  $F_3$  with an area similar to or higher than the natural precipitate. The ethanol test, however, generated a fraction  $F_3$  with a smaller area than the natural precipitate. According to these data, all eight stability tests targeted the fraction containing unstable proteins. However, all tests also generated greater areas in the other fractions compared with the natural precipitate, which would confirm that these tests also precipitate other compounds apart from unstable proteins.

As the measurement of absorbance at 280 nm is not quite specific for protein estimation, no additional information can be extracted from molecular exclusion chromatograms. As SDS-PAGE with silver stain is more specific for protein analysis, electrophoresis was conducted for the purpose of comparing natural precipitates with those obtained from the different tests. In a previous study (Esteruelas et al. 2009), we verified that direct SDS-PAGE of natural wine protein precipitate produced a large smear without good band definition. In contrast, the SDS-PAGE of the fractions obtained by molecular exclusion FPLC presented more clearly defined bands, probably because of the elimination of some interference, such as phenolic compounds (Charmont et al. 2005).

Since the unstable proteins of the natural precipitate are mainly in fraction  $F_3$  (Hsu and Heatherbell 1987b, Waters et al. 1991, Esteruelas et al. 2009), only this fraction should be analyzed. However, all stability tests produced precipitate containing more protein, polysaccharides, and phenolic compounds than the natural precipitate. Moreover, most of the stability tests generated an overlapped fraction including  $F_1+F_2$  and  $F_3$ . For that reason, the ensemble of fractions  $F_1+F_2+F_3$  of the natural and test precipitates was collected and

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

used for SDS-PAGE analysis to determine which stability test would generate a protein precipitate most similar to the natural one.

The SDS-PAGE of fractions  $F_1+F_2+F_3$  of the natural and test precipitates dyed with silver stain is shown in Figure 2. The natural precipitate presented a major band at 18-22 kDa and another five minor bands at 10, 11, 48, 59, and 67 kDa. Some researchers have shown that unstable proteins are mainly thaumatin-like proteins with a molecular weight of 21 kDa and chitinases with a molecular weight of 25-26 kDa (Waters et al. 1998, Pocock et al. 2000, Hayasaka et al. 2001). Our results are generally in agreement with these findings, inasmuch as the major electrophoretic band is within a molecular weight interval in the vicinity of this value. Moreover, in a previous work (Esteruelas et al. 2009), we identified the presence of a thaumatin-like protein (VVTL1) in this band using MALDI-TOF/TOF. However, chitinase was not identified in any band of the natural precipitate.

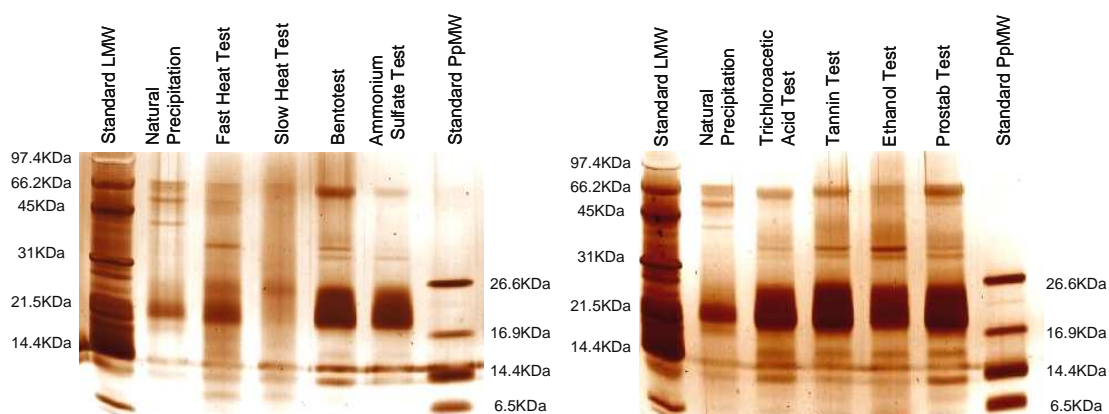


Figure 2 SDS-PAGE with silver stain of natural precipitate and stability test exclusion molecular protein fractions ( $F_1+F_2+F_3$ ).

All stability tests precipitate generated different bands from those generated by natural precipitate (Table 3). In general terms, nearly all tests produced more bands and these bands were more intense than those of the natural precipitate (Table 3, Figure 2). The fast heat test precipitate presented well-defined bands, although a smear throughout the entire electrophoretic band was clearly present. Specifically, a major band at 18-25 kDa and seven other minor bands at 9, 10, 11, 37, 51, 59 and 67 kDa were detected. Two bands can be distinguished within the major band, one in the interval between 18 and 21 kDa and the other between 22 and 25 kDa. In contrast, the slow heat test presented a more intense smear and more poorly defined bands, and only five bands at 9, 10, 11, 22-25, and 67 kDa were detected. Comparison with natural precipitate indicates that neither heat test precipitates exactly the same proteins.

The fast heat test produced bands at 9, 22-25, 37, and 51 kDa that were not present in the natural precipitate. Moreover, the band at 18-21 kDa, detected in the natural precipitate,

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

lengthened to 25 kDa in the fast heat precipitate, and it was possible to distinguish, as mentioned, two bands within this broad interval. The band at 48 kDa, present in the natural precipitate, was not detected in the fast heat precipitate.

Table 3 Summary of results corresponding to the protein bands obtained by SDS-PAGE of the natural precipitate and precipitates of the eight stability tests. Key: -, not detectable; +, low intensity band; ++, intermediate intensity band; +++, high intensity band; +++++, very high intensity band.

MW (kDa)	Natural	Fast heat	Slow heat	Bentotest	Ammonium sulfate	TCA	Tannin	Ethanol	Prostab
67	+	+	+	++	+	++	++	++	++
59	+	+	-	-	-	-	-	-	+
51	-	+	-	-	-	-	-	-	-
48	+	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	+	-	-	-	-	-
37	-	+	-	+	-	+	+	+	+
33	-	-	-	+	+	+	+	+	+
25-22	-	++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
22-18	+++	+++	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++
12	-	-	-	+	-	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	+	+	-	-	-	-	-	-

The slow heat test produced a band at 9 kDa that was not present in the natural precipitate and did not produce bands at 48 and 59 kDa, which were present in the natural precipitate. The broad band at 18-25 kDa, observed in the fast heat test, was shortened to 22-25 kDa in the slow heat test.

All the other stability tests generated similar results. All presented a very intense band at 18-25 kDa and four other bands at 10, 11, 33, and 67 kDa. All the tests, with the exception of ammonium sulfate, also presented bands at 12 and 37 kDa. The Bentotest and Prostab presented a supplementary band at 40 and 59 kDa, respectively. The bands at 10, 11, 18-25, and 67 kDa, detected in all tests, were also present in the natural precipitate. The major band detected at 18-25 kDa in all tests was more intense and had a greater range than the natural precipitate. On the other hand, the band at 33 kDa detected in all eight tests, the bands at 12 and 37 kDa detected in the Bentotest, TCA, tannin, ethanol, and Prostab tests, and the band at 40 kDa detected only in the Bentotest were not present in the natural precipitate. The natural precipitate also presented two bands at 48 and 59 kDa; the former was not precipitated by any of the tests and the latter was only present in the fast heat and Prostab tests.

It is interesting that in this broad interval (18-25 kDa), in which mainly unstable proteins are present, natural precipitate only contains a band within 18-21 kDa, the slow heat test only contains a band at 22-25 kDa, and all other tests present both bands. As noted previously, thaumatin-like proteins have a molecular weight of 21 kDa and chitinases of 25-26 kDa (Waters et al. 1998, Pocock et al. 2000, Hayasaka et al. 2001). According to this data, it is logical to presume that the band at 18-21 kDa corresponds to thaumatin-like proteins and the

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

band at 22-25 kDa corresponds to chitinases. Both proteins have been shown as present in this SDS-PAGE major band (Waters et al. 1996). Assuming this hypothesis, our results would indicate that natural precipitate contains thaumatin-like protein but not chitinases, the slow heat test precipitates chitinases but not thaumatin-like proteins, and all the other tests precipitate both proteins. This assumption may explain why, in a previous study using MALDI-TOF/TOF, it was possible to identify thaumatin-like proteins but not chitinases in a natural precipitate from a Sauvignon blanc wine, whereas other studies, which have worked with forced precipitates, have found both proteins (Waters et al. 1991, 1996, 1998, Pocock et al. 2000).

In SDS-PAGE of fractions  $F_1+F_2+F_3$  of natural and the stability test precipitates dyed with periodic acid-Schiff (PAS) stain, natural precipitate does not present any bands, whereas all the tests presented a band at the beginning of the lane (Figure 3). This band was especially intense in the ethanol precipitate. These results agree with data in Table 2 inasmuch as the stability tests, which precipitated a large quantity of polysaccharide, produced the most intense bands. As the natural precipitate contained very little polysaccharide, its presence was not detected in the gel. Meanwhile, all the other stability tests precipitated more polysaccharide and thus produced bands of a greater or lesser intensity. This data confirms that the ethanol test precipitated a large quantity of polysaccharide, which would explain why its use causes an overestimate of the bentonite dose needed to stabilize wine (Table 1).

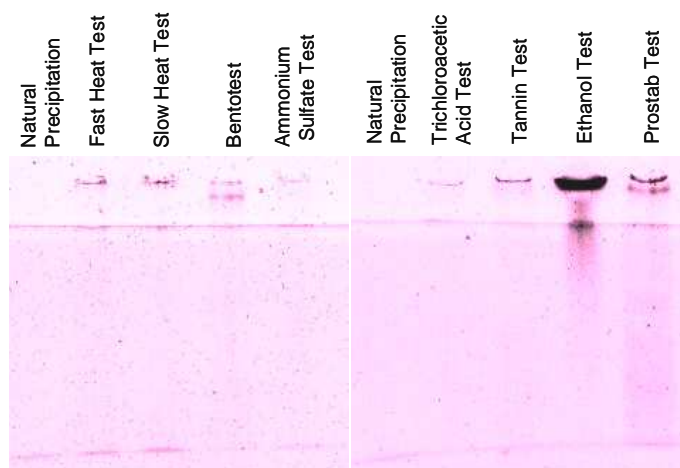


Figure 3 SDS-PAGE with periodic acid-Schiff (PAS) of natural precipitate and stability test exclusion molecular protein fractions ( $F_1+F_2+F_3$ ).

### Conclusions

Results showed that all eight stability tests produced higher amounts of precipitate with chemical compositions different than that of the natural precipitate. All tests precipitated more

protein, more polyphenols, and more polysaccharides. All tests targeted the molecular weight interval containing unstable proteins, with the sole exception of the slow heat test, which does not precipitate the 18-21 kDa range, which probably contains thaumatin-like proteins, and should therefore be abandoned. All other stability tests also precipitated other proteins that are not present in the natural precipitate. This is especially significant in the area of molecular weight between 22 and 25 kDa, which probably contains chitinases. Of all the stability tests, the fast heat test precipitates the least protein in this area and is therefore the most similar to the natural precipitate. The ethanol test precipitates a large quantity of polysaccharide, and thus likely overestimates the dose of bentonite necessary for wine stabilization. It should therefore also be abandoned. All other tests Bentotest, ammonium sulfate, TCA, tannin, and Prostab generated very similar results with regard to the protein composition of the precipitate. All these tests seem to precipitate nearly all the protein present in wine.

In short, all the stability tests generated precipitates very different than the natural precipitate and therefore none should be considered a perfect reproduction of the natural phenomenon. The fast heat test appears to be the most similar to the natural precipitate in terms of chemical composition, and therefore may be the most appropriate stability test.

### References

- Bayly, F.C., and H.W. Berg. 1967. Grape and wine proteins of white wine varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* 18:18-32.
- Berg, H.W., and M. Akiyoshi. 1961. Determination of protein stability in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 12:107-110.
- Borrot, G., and S. Gresser. 2000. Mise au point d'une méthode automatisée pour la détermination de la dose de bentonite nécessaire à la stabilisation protéique des vins. *Rev. Fr. Œnol.* 185:22-24.
- Boulton, R.1980. The nature of wine proteins. *In Proceedings of the Sixth Annual Wine Industry Technology Seminar of the Wine Institute*, pp. 46-58. Wine Institute, San Francisco.
- 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.
- Canals, J.M., L. Arola, and F. Zamora. 1998. Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:383-388.

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

- Charmont, S., E. Jamet, R. Pont-Lezica, and H. Canut. 2005. Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: Improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochemistry* 66:453-461.
- Dawes, H., S. Boyes, J. Keene, and D. Heatherbell. 1994. Protein instability in wines: Influence of protein isoelectric point. *Am. J. Enol. Vitic.* 45:319-326.
- Dubourdieu, D., M. Serrano, A.C. Vannier, and P. Ribéreau-Gayon. 1988. Étude comparée des tests de stabilité protéique. *Conn. Vigne Vin* 22:261-273.
- Esteruelas, M., P. Poinaut, N. Sieczkowski, S. Manteau, F. Fort, J.M. Canals, and F. Zamora. 2009. Characterization of natural haze protein in Sauvignon white wine. *Food Chem.* 113:28-35.
- Gómez-Alonso, S., E. García-Romero, and I. Hermosín-Gutierrez. 2007. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *J. Food Compos. Anal.* 20:618-626.
- Guillou, C., J.L. Aleixandre, M.J. García, and V. Lizama. 1998. Clarification influence upon sensorial and analytical characteristics of Muscat dry wine. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 32:111-119.
- Hayasaka, Y., K.S. Adams, K.F. Pocock, G.A. Baldock, E.J. Waters, and P.B. Hoj. 2001. Use of electrospray spectrometry for mass determination of grape (*Vitis vinifera*) juice pathogenesis related proteins: a potential tool for varietal differentiation. *J. Agric. Food Chem.* 49:1830-1839.
- Hsu, J.C., and D.A. Heatherbell. 1987a. Heat-unstable proteins in wine. I. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment. *Am. J. Enol. Vitic.* 38:11-16.
- Hsu, J.C., and D.A. Heatherbell. 1987b. Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice, and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 38:6-10.
- Hsu, J.C., D.A. Heatherbell, J.H. Flores, and B.T. Watson. 1987. Heat-unstable proteins in grape juice and wine. II. Characterization and removal by ultrafiltration. *Am. J. Enol. Vitic.* 38:17-22.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lehninger A.L. 1981. *Biochemistry*. Worth Publishers, New York.
- Lubbers, S., C. Charpentier, and M. Feuillat. 1996. Study of the binding of aroma compounds by bentonite in must, wine and model systems. *Vitis.* 35:59-62.
- Martinez-Rodriguez, A.J., and M.C. Polo. 2003. Effect of the addition of bentonite to the tirage solution on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chem.* 81:383-388.

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

- Mesrob, B., N. Gorinova, and D. Tzakov. 1983. Characterization of the electrical properties and of the molecular weights of the proteins of white wines. *Nahrung*. 27:727-733.
- Moine-Ledoux, V., and D. Dubourdieu. 1999. An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines. *J. Sci. Food Agric.* 79:537-543.
- Pharmacia LKB Biotechnology. 1990. PhastSystem Users Manual. Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden.
- Pocock, K.F., Y. Hayasaka, M. McCarthy, and E.J. Waters. 2000. Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape *Vitis vinifera* berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *J. Agric. Food Chem.* 48:1637-1643.
- Pocock, K.F., G.M. Alexander, Y. Hayasaka, P.R. Jones, and E.J. Waters. 2007. Sulfate-A candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine. *J. Agric. Food Chem.* 55:1799-1807.
- Salazar, F.N., I. Achaerandio, M.A. Labbe, C. Guell, and F. López. 2006. Comparative study of protein stabilization in white wine using zirconia and bentonite: Physicochemical and wine sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* 54:9955-9958.
- Sarmiento, M.R., J.C. Oliveira, M. Slatner, and R.B. Boulton. 2000. Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability tests. *Food Control*. 11:423-432.
- Segarra, I., C. Lao, E. López-Tamames, and M.C. De la Torre-Boronat. 1995. Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *Am. J. Enol. Vitic.* 46:564-570.
- Siebert, K.J. 1999. Protein-polyphenol haze in beverages. *Food Technol.* 53:54-57.
- Singleton, V.L., R. Orthofer, and R.M. Lamuela-Raventós. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.* 299:152-178.
- Somers, T.C., and G. Ziemelis. 1985. Spectral evaluation of total phenolic components in *Vitis vinifera*: Grapes and wines. *J. Sci. Food Agric.* 36:1275-1284.
- Stryer, L. 1975. *Biochemistry*. W.H. Freeman, San Francisco.
- Toland, T.M., K.C. Fugelsang, and C.J. Muller. 1996. Methods for estimating protein instability in white wines: A comparison. *Am. J. Enol. Vitic.* 47:111-112.
- Vanrell, G., R. Canals, M. Esteruelas, F. Fort, J.M. Canals, and F. Zamora. 2007. Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (cava). *Food Chem.* 104:148-155.
- Vincenzi, S., M. Polesani, and A. Curioni. 2005. Removal of specific protein components by chitin enhances protein stability in a white wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 56:246-254.



## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

- Waters, E.J., W. Wallace, and P.J. Williams. 1991. Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *Am. J. Enol. Vitic.* 42:123-127.
- Waters, E.J., N.J. Shirley, and P.J. Williams. 1996. Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins. *J. Agric. Food Chem.* 44:3-5.
- Waters, E.J., Z. Peng, K.F. Pocock, and P.J. Williams. 1995. Proteins in white wine. I. Procyanidin occurrence in soluble proteins and insoluble protein hazes and its relationship to protein instability. *Aust. J. Grape Wine Res.* 1:86-93.
- Waters, E.J., Y. Hayasaka, D.B. Tattersall, K.S. Adams, and P.J. Williams. 1998. Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines. *J. Agric. Food Chem.* 46:4950-4957.

## Capítol 2.2:

**Contingut en proteïna i compostos fenòlics del vi abans i després d'aplicar els diferents tests d'estabilitat.**



## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

En el primer apartat del capítol 2 (2.1) s'ha estudiat la composició química dels diferents precipitats obtinguts després d'aplicar els diferents tests d'estabilitat. La determinació de proteïnes i de compostos fenòlics, també s'ha realitzat en el vi abans i després d'aplicar els diferents tests d'estabilitat, per tal de poder comprovar la coherència en els resultats. El contingut en proteïna i compostos fenòlics del vi abans d'aplicar el test d'estabilitat ha de ser més o menys igual, al sumatori del contingut en el vi després d'aplicar el test d'estabilitat i el del precipitat. S'ha realitzat la determinació de proteïnes i de compostos fenòlics tal i com es descriu en l'Annex 1 Materials i Mètodes.

En la Taula 1 es mostren els resultats obtinguts en la determinació de la proteïna en el vi abans i després d'aplicar els 8 tests d'estabilitat, així com en els respectius precipitats.

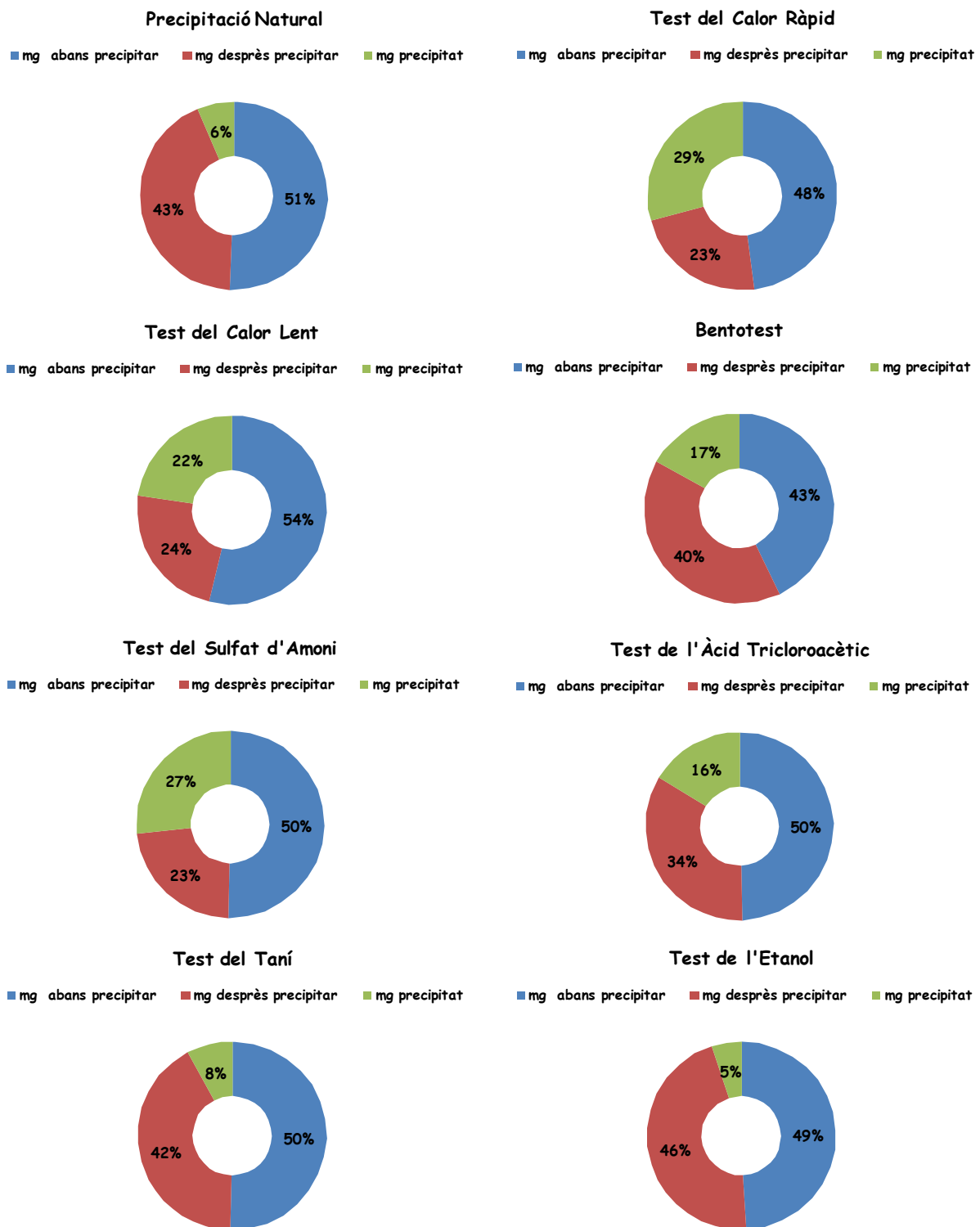
	mg proteïna		
	Vi abans test	Vi després test	Precipitat
<b>Precipitació Natural</b>	2.6 ± 0.2	2.2 ± 0.2	0.32 ± 0.01
<b>Test del Calor Ràpid</b>	2.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.1
<b>Test del Calor Lent</b>	2.6 ± 0.2	1.15 ± 0.05	1.1 ± 0.1
<b>Bentotest</b>	7.0 ± 0.3	6.5 ± 0.5	2.7 ± 0.1
<b>Test del Sulfat d'Amoni</b>	4.1 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.2 ± 0.1
<b>Test de l'Àcid Tricloroacètic</b>	8.8 ± 0.6	6.0 ± 0.5	2.9 ± 0.2
<b>Test del Taní</b>	20 ± 1	16 ± 1	3.0 ± 0.1
<b>Test de l'Etanol</b>	5.8 ± 0.2	5.4 ± 0.4	0.6 ± 0.1
<b>Prostab</b>	6.4 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.2 ± 0.1

Taula 1: mg de proteïna en el vi abans i després d'aplicar els diferents tests d'estabilitat i en el precipitat generat per cada test.

El vi utilitzat en la determinació del contingut en proteïna és igual en tots els casos, tot i així, tal i com s'observa en els resultats de la Taula 1 el contingut proteic del vi no és igual per a totes les mostres, això és degut a que cada test treballa amb uns reactius diferents que poden modificar o interferir en la matriu inicial i per això els valors poden no ser iguals. El vi que precipitarà espontàniament conté la mateixa quantitat de proteïna que el vi al que se li aplicarà el test del calor ràpid o lent, en ambdós tests no es necessària l'addició de cap reactiu, i per tant el contingut proteic és igual. En la resta de tests, l'addició de reactius interfereix en la determinació de proteïna i per això el contingut proteic en aquests casos és superior. El mateix comportament el podem observar en la determinació del contingut proteic del vi després d'aplicar el test d'estabilitat. Per això per tal de facilitar la interpretació dels resultats, he representat aquestes dades en forma de diagrama circular.

Podem observar que si sumem el contingut en proteïna del precipitat amb el del vi després d'aplicar el test d'estabilitat, aquest coincideix amb el del vi abans de precipitar; en els diagrames, el vi abans d'aplicar el test d'estabilitat representa el 50 % de la proteïna i el vi després d'aplicar el test d'estabilitat més el del precipitat representa el 50 % restant.

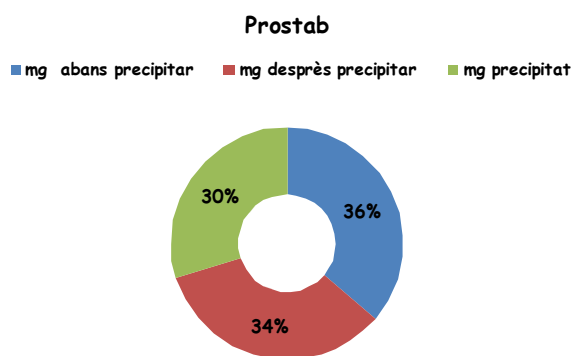
## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.



El precipitat natural, el test del calor ràpid, el test del calor lent, el test del sulfat d'amoní, el test de l'àcid tricloroacètic, el test del taní i el test de l'etanol segueixen les proporcions esperades, el vi abans d'aplicar els respectius tests d'estabilitat representa aproximadament el 50% del diagrama circular, la suma del vi després d'aplicar els tests més el precipitat representa aproximadament el 50% restant. El Bentotest s'allunya una mica

## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

d'aquestes proporcions ja que el contingut en proteïna del vi abans d'aplicar el test d'estabilitat és del 43%. El Prostab presenta resultats poc coherents ja que no es compleix aquesta proporcionalitat, pot ser degut als reactius emprats en aquest test, els quals poden interferir en l'analítica de determinació de proteïna tot donant aquesta incoherència en els resultats, no és coneix la naturalesa química d'aquests.



Tot i que els valors dels diagrames circulars es mostren en percentatge, les dades amb les que s'ha treballat són els mg, per això en la llegenda consta mg i no percentatge.

En aquests diagrames es pot observar que tots els tests d'estabilitat precipiten molta més proteïna que la precipitació espontània, ja que els mg dels respectius precipitats representen percentatges més alts que el del precipitat natural. El test del taní i el de l'etanol però precipiten percentatges de proteïna comparables amb la precipitació espontània. En la publicació científica (Table 2) s'observa que tots els precipitats contenen més mg de proteïna que el precipitat natural.

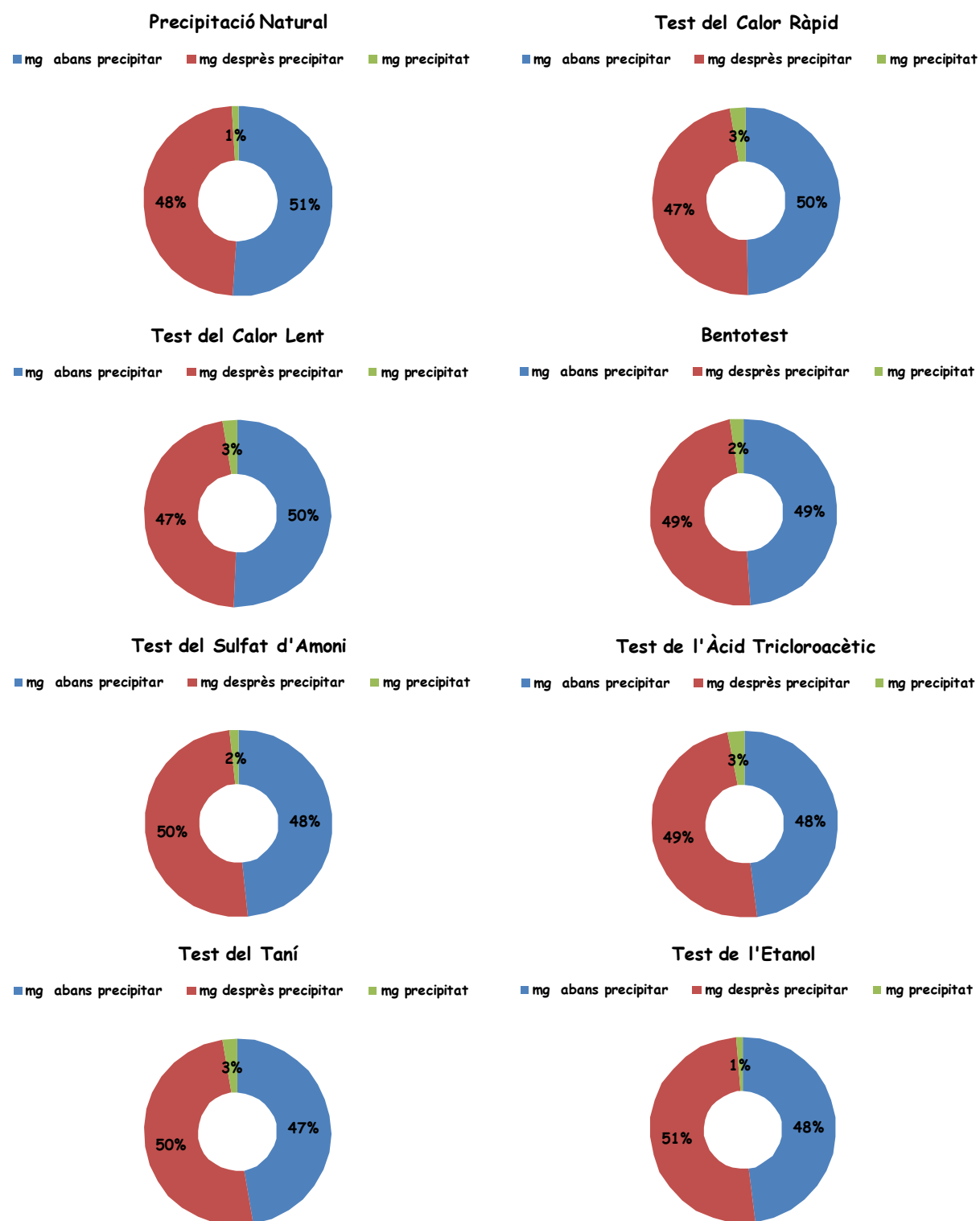
En la Taula 2 es mostren els resultats obtinguts en la determinació dels compostos fenòlics en el vi abans i després d'aplicar els 8 tests d'estabilitat, així com en els respectius precipitats.

	mg polifenols		
	Vi abans test	Vi després test	Precipitat
<b>Precipitació Natural</b>	12.4 ± 0.3	11.7 ± 0.6	0.25 ± 0.01
<b>Test del Calor Ràpid</b>	12.4 ± 0.3	11.8 ± 0.2	0.71 ± 0.02
<b>Test del Calor Lent</b>	12.4 ± 0.3	11.5 ± 0.1	0.62 ± 0.02
<b>Bentotest</b>	12.4 ± 0.3	12.41 ± 0.04	0.60 ± 0.07
<b>Test del Sulfat d'Amoni</b>	12.5 ± 0.2	12.9 ± 0.2	0.40 ± 0.02
<b>Test de l'Àcid Tricloroacètic</b>	12.6 ± 0.3	13.0 ± 0.1	0.79 ± 0.02
<b>Test del Taní</b>	38 ± 3	41 ± 1	2.02 ± 0.08
<b>Test de l'Etanol</b>	15 ± 1	16.3 ± 0.2	0.36 ± 0.03
<b>Prostab</b>	12.2 ± 0.3	12 ± 1	0.94 ± 0.05

Taula 2: mg de compostos fenòlics en el vi abans i després d'aplicar els diferents tests d'estabilitat i en el precipitat generat per cada test.

En la determinació dels compostos fenòlics presents en el vi també s'observa el mateix comportament que en la determinació de proteïna, en el cas del test del taní i del test de l'etanol hi ha un augment en el contingut de compostos fenòlics tot i ser el mateix vi inicial. L'etanol interfereix en la determinació de compostos fenòlics i per això la concentració d'aquests en el vi inicial és lleugerament superior, pel que fa al test del taní, el

reactiu que s'afegeix és un polifenol i per això augmenta de manera important el contingut en polifenol en aquest.



Tal i com passava amb el contingut en proteïna, el vi abans d'aplicar els respectius tests d'estabilitat representa aproximadament el 50% del diagrama circular, el 50 % restant

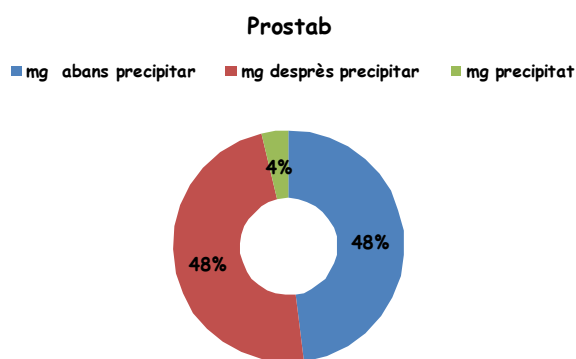
## Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.

correspon a la suma dels mg de compostos fenòlics del vi després d'aplicar el test d'estabilitat i del precipitat. Tots els tests d'estabilitat precipiten més polifenols que la precipitació espontània; el test de l'etanol però precipita el mateix percentatge. En la publicació científica (Table 2) s'observa que tots els precipitats contenen més mg de compostos fenòlics que el precipitat natural.

Basant-nos amb els resultats obtinguts, podem dir que en tots els tests d'estabilitat es precipita un percentatge de compostos fenòlics respecte el vi inicial, aquest és molt més petit que el de proteïna, ara bé en tots casos hi ha una disminució en el contingut respecte el vi inicial. La precipitació import s'observa respecte els mg de proteïna inicial, ja que en tots els casos representa un percentatge molt més elevat que de compostos fenòlics.

Aquest estudi s'ha realitzat per tal de corroborar el contingut de proteïna i de compostos fenòlics dels respectius precipitats ja que els mètodes colorimètrics utilitzats en la determinació no són prou fiables, tot i que ens donen una idea del seu contingut.

En el primer apartat del Capítol 2 (2.1) també s'ha estudiat el contingut en polisacàrids dels diferents precipitats; no s'ha realitzat la determinació d'aquests en el vi abans i després d'aplicar els tests d'estabilitat, ja que els resultats obtinguts en la determinació de polisacàrids en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) amb tinció de Schiff, ens corrobora els valors obtinguts. S'ha observat una bona correlació entre la concentració de polisacàrids del precipitat, i la intensitat de la banda en el gel. La tècnica d'electroforesis en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) i la tinció de Schiff es descriuen en l'Annex 1 Materials i Mètodes.



## **Capítol 2: Estudi comparatiu dels tests d'estabilitat proteica en vins blancs.**



## Capítol 3:

# Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.



Allan Baker, *Winter Vines*.

- 3.1. Compostos fenòlics presents en l'enterboliment proteic espontani en vi blanc de la varietat *Sauvignon Blanc*.
- 3.2. Espectres TOF dels compostos fenòlics identificats en el vi blanc.

### **Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.**

En aquest capítol es mostren els resultats obtinguts en l'estudi sobre la identificació dels compostos fenòlics presents en l'enterboliment proteic espontani del vi blanc. Aquest estudi s'ha enviat a la revista Food Research Interantional. Igual com en la resta de capítols, alguns dels resultats obtinguts no s'han pogut incloure en aquesta publicació i és per aquest motiu que s'inclouen en l'apartat 3.2, espectres TOF dels compostos fenòlics identificats en el vi blanc.

### **Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.**

## Capítol 3.1:

# Compostos fenòlics presents en l'enterboliment proteic espontani en vi blanc de la varietat *Sauvignon Blanc*.



***“Phenolic compounds presents in natural haze protein of  
Sauvignon white wine.”***

Article enviat a la revista *Food Research International*.

## **Phenolic compounds presents in natural haze protein of sauvignon white wine**

**Mireia Esteruelas, Nikolaos Kontoudakis, Mariona Gil, Maria Francesca Fort,  
Joan Miquel Canals and Fernando Zamora\***

Tecnología Enológica (Tecnenol), Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat  
d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, Campus de Sescelades, Marcel·lí  
Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain.

### **Abstract**

Protein haze in white wines remains a problem for wineries. In addition to protein composition, many other factors have been identified that can participate in and even trigger the appearance of hazes. Phenolic compounds may be one of the non-protein factors involved in protein haze formation. The aim of this study was to identify and quantify the polyphenols present in the natural precipitate of a Sauvignon wine. The identification and quantification of polyphenols present in wine before and after natural precipitation and also in a natural precipitate were carried out by CG/MS and HPLC/ESI-TOF. The natural precipitate was also hydrolyzed in acidic medium (Bate-Smith reaction). The results indicate that several phenolic compounds were present in the protein haze (tyrosol, trans-p-coumaric, trans-caffeic, vanillic, protocatechuic, syringic, gallic, ferulic, shikimic acids, (+)-catechin, ethyl coumaric acid ester and quercetin). Moreover, the detection of cyanidin after acid hydrolysis indicates the presence of proanthocyanidins.

**Keywords:** haze protein; phenolic compounds; white wine; natural precipitation.

### **Introduction**

One of the major problems in bottled wines is the instability of proteins (Bayly & Berg, 1967; Hsu & Heatherbell, 1987a). Slow denaturation of wine proteins is thought to lead to protein aggregation and flocculation in hazy suspension and, eventually, to the formation of precipitate. The appearance of haze in a bottle of wine affects its commercial value, making it unacceptable for sale. Currently, the best way to eliminate the risk of protein precipitation is bentonite fining (Hsu & Heatherbell, 1987b; Pocock & Waters, 2006). Alternative methods such as ultrafiltration (Hsu, Heatherbell, Flores & Watson, 1987) and zirconium oxide treatment (Salazar, Achaerandio, Labbe, Guell & Lopez, 2006) can also be effective but their use is still experimental.

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

Protein instability does not correlate well with total protein concentration because individual proteins behave differently. Some reports suggest that unstable proteins have a low isoelectric point (pI) and a low relative molecular mass (Bayly & Berg, 1967; Hsu & Heatherbell, 1987a). Pathogenesis-related proteins, thaumatin-like proteins and chitinases have been identified in heat forced precipitate (Waters, Wallace & Williams, 1991; Waters, Shirley & Williams, 1996; Waters, Hayasaka, Tattersall, Adams & Williams, 1998). More recently, using MALDI/TOF-TOF, our research group have identified the presence of *Vitis Vinifera* Thaumatin-like protein 1 (VvTL1),  $\beta$ -(1-3)-glucanase, and the ripening-related protein Grip22 precursor in natural precipitate (Esteruelas et al., 2009). In this work, we also detected the presence of a non-negligible proportion of polysaccharides and especially polyphenols, which suggest the possible implication of these compounds in natural protein precipitation.

Despite the extensive bibliography on this subject, the mechanism responsible for protein haze formation in wines essentially remains undetermined. In fact, some authors have suggested that other non-protein compounds, such as phenolic compounds, polysaccharides, wine pH, metal ions and even high ethanol content, may play a key role in protein precipitation (Waters, Peng, Pocock & Williams, 1995; Siebert, 1999; Pocock, Alexander, Hayasaka, Jones & Waters, 2007; Mesquita, Piçarra-Perreira, Monteiro, Loureira, Teixeira & Ferreira, 2001)). Researchers refer to the possible involvement of other non-protein compounds in haze formation by the enigmatic term of "X factor". However, the real contribution of these substances has not been studied in sufficient depth to understand its precise role in wine protein haze formation. Recently, Pocock, Alexander, Hayasaka, Jones and Waters (2007), using artificial model wine solutions, proposed sulfate anion as a candidate for the missing essential X factor.

Phenolic compounds are probably one of the non-protein factors potentially involved in protein haze formation. Several researchers (Oh, Hoff, Armstrong & Haff, 1980; Siebert, Troukhanova & Lynn, 1996) suggested a hydrophobic mechanism for the interaction, with a conceptual model proposed in which the protein has a fixed number of phenolic binding sites. More of these sites are exposed when the protein is denatured, such as during heating. Initially, protein and polyphenols complexes are soluble but the complex grows until it becomes insoluble, which results in turbidity (Siebert, 2006). It seems that the protein/polyphenols ratio has a strong influence on the amount of haze formed; the largest amount occurs when the number of polyphenols binding ends and protein binding sites are almost equal (Siebert, 1999). Koch and Sajak (1959) were among the first investigators to determine that isolated grape proteins of heat formed sediments were associated with tannins. Somers and Ziemelis (1973) suggested that approximately 50% of wine protein is

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

apparently bound to a minor quantity of grape phenolics, and this portion is thought to be responsible for protein haze. Yokotsuka, Ebihara and Sato (1991) found that tannins isolated from Riesling and Koshu wines interacted with isolated grape juice proteins to form a haze in a tartrate buffer solution. Waters, Peng, Pocock and Williams (1995) detected the presence of proanthocyanidins (0.02-4.9% w/w) in heat-induced and natural hazes isolated from various white wines. Pocock, Alexander, Hayasaka, Jones and Waters (2007) showed that PVPP fining of commercial wines results in a reduction in protein haze, which suggests that phenolic compounds play a modulating role in wine haze formation.

It can be assumed from the above that phenolic compounds are one of the main candidates involved in protein haze. However, to date there has not been a thorough study of the phenolic compounds composition of natural protein precipitates. The aim of this study, therefore, was the identification and quantification of polyphenols present in natural precipitate of a white Sauvignon wine.

#### Materials and Methods

**Chemicals.** All the products were of high purity and suitable for High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Gas Chromatography (GC). All solutions were previously filtered through 0.22 µm acetate cellulose filters (Millipore GSE) and degassed using an ultrasonic water bath.

**Standards.** The phenolic compounds used were: benzoic acids (gallic, protocatechuic, vanillic, and syringic acids), cinnamic acids (trans-caffeic, trans-p-coumaric and ferulic acids), flavonoids ((+)-catechin, (-)-epicatechin and quercetin), phenolic alcohols (tyrosol) and shikimic acid. These compounds were obtained from commercial sources (Sigma-Aldrich and Fluka). The derivatizing reagent N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) and pyridine were acquired from Sigma-Aldrich (Madrid, Madrid, Spain).

**Sample preparation.** This work was carried out in 2006 at the experimental winery of the Faculty of Oenology in Tarragona (Rovira i Virgili University) in Constantí (A.O.C. Tarragona). Two thousand kg of Sauvignon white grapes were harvested at a sugar concentration of 210 g/L and with a titratable acidity of 6.9 g/L (expressed as tartaric acid). Grapes were pressed with a yield of 65% for obtaining grape juice. 60 mg/L of Sulphur dioxide were added to protect the must against oxidation and microbiological spoilage. After cold settling (16°C) the must was inoculated with 20 g/L of dry active yeasts (EC 1118,

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

Lallemmand, Montreal, Canada). Once the alcoholic fermentation was finished, the wine was racked, sulphited (40 mg/L) and conserved at 4°C for one month.

After that, the wine was centrifuged (10 min at 12,000 g), filtered (0.45 µm), bottled (375 mL) and stored at room temperature until natural precipitation appeared.

The analytical parameters of the wine were the following: ethanol content: 12.8% (v/v); titratable acidity: 6.2 g/L (expressed as tartaric acid); pH: 3.10.

**Natural precipitate.** For phenolic compounds analysis of the natural precipitate, the bottles were vigorously stirred and all their contents homogeneously distributed in eight centrifuge tubes for each bottle. The tubes were then centrifuged (10 min at 12,000g) and the eight pellets were transferred to a previously weighed eppendorf. This sample was then lyophilized, weighted to determine the dry weight of the precipitate and conserved at -20°C until the day of the analysis. Subsequently, the samples were directly dissolved with a total volume of 2 mL of 50 mM disodium phosphate solution (pH 9.23).

**Acidic hydrolysis.** 600 µL of HCl 12 M were added to 300 µL of dissolved precipitate in a glass tube. The tube was closed and boiled in a water bath for 30 min in order to develop the Bate-Smith reaction (Bate-Smith, 1954; Ribéreau-Gayon & Stonestreet, 1966) to verify the presence of proanthocyanidins by means of the HPLC detection of cyanidin. Next, the sample was cooled to room temperature and 100 µL of ethanol were added. The sample was then lyophilized and dissolved in 500 µL of methanol.

**Wine.** 30 mL of wine before and after natural precipitation were concentrated to 15 mL at a temperature below 30°C to remove ethanol using a vacuum concentrator centrifuge (UniEquip, Planegg, Bavaria, Germany). This solution and the dissolved precipitate were passed through a Sep-Pak C18 cartridge (Waters Cromatografía, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain) which had previously been washed with 25 mL of 2% (v/v) formic acid in water (pH 3) and, subsequently, with 50 mL of water and 25 mL of methanol, then the cartridge was washed with 10 mL of 2% (v/v) formic acid in water (pH 3). The phenolics compounds were recovered by elution with 10 mL of methanol (Chamkha, Cathala, Cheyner & Douillard, 2003). The solvent was evaporated at a temperature below 30°C using a vacuum concentrator centrifuge (UniEquip, Planegg, Bavaria, Germany). The samples corresponding to the wines before and after natural precipitation were dissolved in 1.2 mL of methanol and the natural precipitate residue was dissolved in 500 µL of methanol.



### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

**GC/MS.** 100 µl of concentrated fraction were lyophilized and the residue was dissolved in 100 µl of 1:1 BSTFA/pyridine (v/v) using vigorous vortexing and incubating at 70 °C for 30 min (Soleas, Diamandis, Karumanchiri & Goldberg, 1997). The analysis was carried out on a Hewlett Packard 6890 Series gas chromatograph, equipped with a split/splitless injection port, interfaced to a 5973 mass-selective detector. An HP-5MS fused silica capillary column was used; the dimensions of the column were 30m×0.25mm I.D., 0.25 µm film thickness. The carrier gas-line pressure was set at 50 psi, column head pressure at 7 psi, and the septum purge was set at 0.8 mL/min. The temperature of the injector was maintained at 300 °C, and the sample volume injected was 1 µl in the splitless mode. The column temperature program was: oven equilibration time 1 min; initial temperature 120 °C for 3 min, then raised to 320 °C at a rate of 5 °C/min, with a final isotherm of 5 min. The analysis was conducted according to Minuti, Pellegrino and Teseo (2006).

Identification of each phenolic compound in each derivatized extract of wine was established by comparing their gas chromatographic retention times and silylated derivative mass spectra to those of the derivatized standards (Table 1). Mass spectral deconvolution using Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) was applied to detect phenolic compounds which had no standard.

A target ion and one or two qualifying ions were chosen for each of the compounds depending on the abundance and specificity of the compound (Table 1). The concentration of the identified phenolic compounds in each derivatized extract of wine was performed by relating the peak areas of the compound. All the derivatized extracts of wine were injected in triplicate.

**Table 1. Calibration parameters for silylated<sup>a</sup> standard compounds.**

Standard	RT(min)	Target ion (m/z) <sup>b</sup>	Qualifier ions (m/z) <sup>c</sup>	Cor. Coef. (r <sup>2</sup> )
1 Tyrosol	12.0	179	282 21 267 15 193 13	0.973
2 Vanillic acid	16.2	297	312 64 282 30 267 61	0.994
3 Protocatechuic acid	17.4	370	193 - 355 82 311 38	0.998
4 Shikimic acid	17.4	204	147 19 357 6 372 5	0.994
5 Syringic acid	18.9	327	342 73 312 68 297 54	0.987
6 trans-p-Coumaric acid	19.6	293	308 60 249 40 219 126	0.998
7 Gallic acid	20.3	281	443 28 458 81 - -	0.979
8 Ferulic acid	22.5	338	323 55 308 51 293 32	0.979
9 trans-Caffeic acid	23.4	396	381 23 219 96 191 17	0.991
10 (+)-Catechin	35.2	368	355 30 369 34 267 8	0.989

<sup>a</sup> Identified as trimethylsilyl (TMS) derivative. <sup>b</sup> Target ion was taken to be 100%. <sup>c</sup> Number in cursive represents the target ion:qualifier ion ratio expressed in percent.

**HPLC/ESI-TOF.** Analysis was carried out on an HPLC 1200 Series coupled with a MSD 6210 Time of Flight (Agilent Technologies, Madrid, Spain) equipped with electrospray ionization (ESI). Chromatographic separation was achieved on Eclipse Plus C18 column 4.6

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

x 250 mm, 5  $\mu$ m particle size (Agilent Technologies, Madrid, Spain). The solvent system used was a gradient of solvent A (formic acid, 0.2% v/v in MilliQ) and solvent B (acetonitrile, solvent A, 80/20, v/v). The elution conditions were as follows: flow rate 1.2 mL/min, temperature 30 °C; volume injection 50  $\mu$ L. For the elution program, the following proportions of solvent B were used: 0-5 min, 2%; 5-10 min, 6%; 10-15 min, 12%; 15-30 min, 22%; 30-35 min, 34%; 35-40 min, 100%; 40-45 min, 0%. Positive-ion mode electrospray ionization mass spectrometry (ESITOF) spectra was recorded. ESI was performed using the following conditions: 3.5 kV of capillary voltage; 350 °C of drying gas temperature and 12 L/min of drying gas flow at 60 psi of Nebulizer gas pressure. TOF was performed using the following conditions: the fragmentor voltage was 150 V, 65 V the skimmer voltage and 250 V the octapole voltage, the mass was scanned from m/z 50 to 2400. The analysis was conducted according to Chamkha, Cathala, Cheynier and Douillard (2003). Identification of each phenolic compound in each extract of wine was established by comparing their retention times to those of the standards (Table 2).

**Table 2. Calibration parameters for identified phenolic compounds by HPLC/ESI-TOF.**

Compound	RT(min)	Target ion (m/z)	Error(ppm)	Score	Fragment ion	Cor. Coef. (r <sup>2</sup> )
1 Gallic acid	13.8	[M+H] <sup>+</sup>	171.028	4.00	70.28	0.997
2 Protocatechuic acid	18.7	[M+H] <sup>+</sup>	155.033	8.93	85.04	[M+H] <sup>+</sup> - [H <sub>2</sub> O]; 137.023 0.998
3 trans-Caftaric acid	22.4	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	330.081	4.82	85.76	[M+H] <sup>+</sup> - [C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub> ]; 163.038 0.999
4 trans-Coutaric acid	25.7	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	314.086	2.65	74.18	[M+H] <sup>+</sup> - [C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub> ]; 147.043 0.982
5 (+)-Catechin	25.9	[M+H] <sup>+</sup>	291.085	1.61	77.03	1.000
6 Vanillic acid	27.7	[M+H] <sup>+</sup>	169.048	9.77	70.90	0.999
7 trans-Caffeic acid	28.5	[M+H] <sup>+</sup>	181.048	5.45	94.86	[M+H] <sup>+</sup> - [H <sub>2</sub> O]; 163.038 0.999
8 (-)-Epicatechin	30.6	[M+H] <sup>+</sup>	291.085	3.76	67.20	1.000
9 trans-p-Coumaric acid	35.5	[M+H] <sup>+</sup>	165.054	3.28	82.55	[M+H] <sup>+</sup> - [H <sub>2</sub> O]; 147.044 0.982
10 Ferulic acid	37.7	[M+H] <sup>+</sup>	195.064	3.89	80.90	1.000
11 Astilbin	38.9	[M+H] <sup>+</sup>	451.122	3.53	86.21	[M+H] <sup>+</sup> - [C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ]; 305.064; Dihydroquercetin 0.994
12 Quercetin	41.9	[M+H] <sup>+</sup>	303.049	2.82	74.70	0.994
13 Caffeic acid ethyl ester	42.3	[M+H] <sup>+</sup>	209.080	6.94	88.32	[M+H] <sup>+</sup> - [C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O]; 163.038 0.999
14 Coumaric acid ethyl ester	43.2	[M+H] <sup>+</sup>	193.084	6.37	88.05	[M+H] <sup>+</sup> - [C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O]; 147.043 0.982

We also used the deconvolution software to detect phenolic compounds which had no standard. The concentration of the identified phenolic compounds in each extract of wine was performed by relating the peak areas of the compound. The mean and the standard deviation were calculated from the three independent injections. The concentrated fractions of natural precipitate were used with and without acidic hydrolysis.

### Results and Discussion

Figure 1 shows the results corresponding to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis in selected ion monitoring (SIM) of phenolic compounds of the wine before and after natural protein precipitation. Only 9 phenolic compounds were identified. Tyrosol, vanillic acid, protocatechuic acid, syringic acid, trans-p-coumaric acid, gallic acid, ferulic

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

acid, trans-caffeic acid and (+)-catechin. Shikimic acid was also identified, which, although is not a phenolic compounds, is closely related to them. The quantitative determination of these compounds is shown in Table 3. Overall, both the phenolic compounds found, and their concentrations are generally consistent with those found in white wine by other wine researchers (Villiers, Majek, Lynen, Crouch, Lauer & Sandra, 2005; Ortega, Lopez-Toledano, Mayen, Merida & Medina, 2003; Zafrilla et al., 2003; Darias-Martin, Andrés-Lacueva, Díaz-Romero & Lamuela-Raventós, 2008).

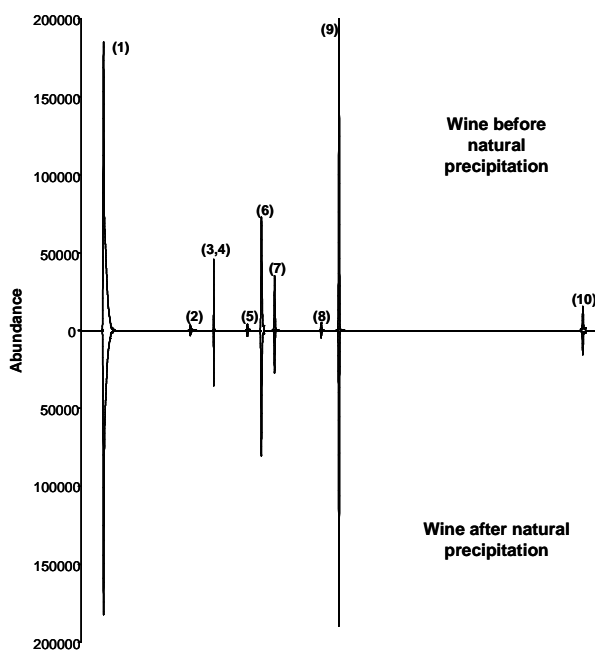


Figure 1. Identified phenolic compounds in wine after and before natural precipitation by CG/MS.

(1) Tyrosol; (2) Vanillic acid; (3) Protocatechuic acid; (4) Shikimic acid; (5) Syringic acid; (6) trans-p-Coumaric acid; (7) Gallic acid; (8) Ferulic acid; (9) trans-Caffeic acid; (10) (+)-Catechin.

Table 3. Identified phenolic compound in wine before and after natural precipitation and in natural precipitate by CG/MS.

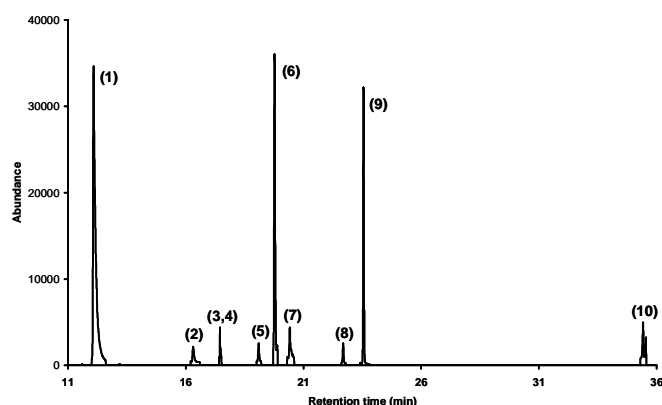
Identified Compound	Wine Before NP (ppm)	Wine After NP (ppm)	Natural Precipitate ( $\mu\text{g}$ )	% (w/w) <sup>a</sup>
1 Tyrosol	6.7 $\pm$ 0.2 a	6.6 $\pm$ 0.3 a	116 $\pm$ 2	0.95 $\pm$ 0.01
2 Vanillic acid	0.025 $\pm$ 0.002 a	0.029 $\pm$ 0.002 a	1.27 $\pm$ 0.08	0.011 $\pm$ 0.001
3 Protocatechuic acid	0.64 $\pm$ 0.03 a	0.63 $\pm$ 0.05 a	24.4 $\pm$ 0.3	0.204 $\pm$ 0.002
4 Shikimic acid	2.21 $\pm$ 0.09 a	1.5 $\pm$ 0.1 b	16 $\pm$ 1	0.13 $\pm$ 0.01
5 Syringic acid	0.194 $\pm$ 0.005 a	0.243 $\pm$ 0.009 b	7.3 $\pm$ 0.6	0.06 $\pm$ 0.01
6 trans-p-Coumaric acid	5.4 $\pm$ 0.2 a	6.78 $\pm$ 0.09 b	172 $\pm$ 7	1.40 $\pm$ 0.06
7 Gallic acid	1.32 $\pm$ 0.06 a	1.05 $\pm$ 0.03 b	6.9 $\pm$ 0.5	0.058 $\pm$ 0.004
8 Ferulic acid	1.48 $\pm$ 0.06 a	1.55 $\pm$ 0.03 a	39 $\pm$ 2	0.33 $\pm$ 0.01
9 trans-Caffeic acid	6.5 $\pm$ 0.3 a	6.4 $\pm$ 0.2 a	380 $\pm$ 18	3.13 $\pm$ 0.06
10 (+)-Catechin	0.24 $\pm$ 0.01 a	0.24 $\pm$ 0.01 a	6.2 $\pm$ 0.3	0.052 $\pm$ 0.001
<b>TOTAL</b>			<b>769 <math>\pm</math> 3</b>	<b>6.318 <math>\pm</math> 0.149</b>

<sup>a</sup> mg of phenolic compound in precipitate \* 100 / 12 mg of precipitate. (NP) Natural Precipitation. All data are expressed as the average of the three analysis  $\pm$  standard deviation. Different letters indicate the existence of statistically significant differences.

No statistically significant differences were found in tyrosol, vanillic acid, protocatechuic acid, ferulic acid, trans-caffeic acid or (+)-catechin between the wine before and after natural protein precipitation. Moreover, gallic acid and shikimic acid decreased 20 and 32% respectively. In contrast, syringic acid and trans-p-coumaric acid increased 25 and

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

26% respectively. The changes in the concentration of these compounds may be due to different reasons. On the one hand, the concentration of these compounds may decrease because they interact with proteins and therefore they precipitate (Siebert & Lynn, 1998) or they may transform into other compounds (esterification, glycosilation and oxidation) such as ethyl gallate, 3- and 4-O-glucosides of gallic acid and ellagic acid (Baderschneider & Winterhalter, 2001; Lu & Foo, 1999; Tulyathan, Boulton & Singleton, 1989). However, the concentration of these compounds may be increased by hydrolysis of other compounds such as esters (trans/cis-coumaric acid, trans-ethyl p-coumarate, glucose ester of trans-p-coumaric acid) or even glycosides (trans/cis-p-coumaric acid-4-O-glucoside) (Somers, Vérette & Pocock, 1987; Baderschneider & Winterhalter, 2001). Therefore, the observed changes that took place during wine protein precipitation are not necessarily directly related to the protein haze process because they can be produced by any of the other causes mentioned above.



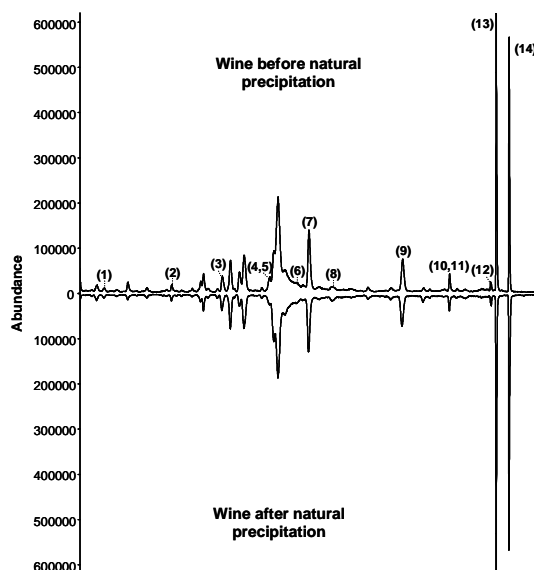
**Figure 2. Identified phenolic compounds in natural precipitate by CG/MS.**

(1) Tyrosol; (2) Vanillic acid; (3) Protocatechuic acid; (4) Shikimic acid; (5) Syringic acid; (6) trans-p-Coumaric acid; (7) Gallic acid; (8) Ferulic acid; (9) trans-Caffeic acid; (10) (+)-Catechin.

Consequently, to determine the composition of the protein precipitate in phenolic compounds it is necessary to analyze it directly. Figure 2 shows the phenolic compounds chromatogram obtained by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis in selected ion monitoring (SIM). All the phenolic compounds detected in the wine were also presents in the natural protein precipitate. Specifically, tyrosol, trans-p-coumaric acid and trans-caffeic acid. The most abundant phenolic compounds of the original wine were also the most abundant in the natural protein precipitate. The rest of the phenolic compounds, vanillic acid, protocatechuic acid, syringic acid, gallic acid, ferulic acid, (+)-catechin and shikimic acid were present in minor amounts. According to this data, the total amount of phenolic compounds represented 6.3% of the dry weight of the natural protein precipitate. In an earlier study (Esteruelas et al., 2009), we found that the percentage of phenolic compounds present in a natural precipitate, by the colorimetric method of Folin-Ciocalteu, was  $7.2 \pm 0.4\%$ . Both values are very concordant and confirm that phenolic compounds are a non-

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

negligible component of protein precipitate, thus suggesting also that they may play a role in the appearance of protein haze.



**Figure 3. Identified phenolic compounds in wine after and before natural precipitation by HPLC/ESI-TOF.**

- (1) Gallic acid; (2) Protocatechuic acid; (3) trans-Caftaric acid; (4) trans-Coutaric acid; (5) (+)-Catechin; (6) Vanillic acid; (7) trans-Caffeic acid; (8) (-)-Epicatechin; (9) trans-p-Coumaric acid; (10) Ferulic acid; (11) Astilbin; (12) Quercetin; (13) Ethyl caffeic acid ester; (14) Ethyl p-coumaric acid ester.

Phenolic compounds of the precipitate and wines before and after precipitation were also analyzed by HPLC/TOF-ESI. Figure 3 shows the extract ion chromatogram of the wine before and after the natural precipitation. Seven of the nine phenolic compounds detected by GC/MS, gallic acid, protocatechuic acid, (+)-catechin, vanillic acid, trans-caffeic acid, trans-p-coumaric acid and ferulic acid were also identified by HPLC/TOF-ESI although somewhat lower concentrations were obtained. However, tyrosol and shikimic acid were not detected by HPLC/TOF-ESI and 7 new compounds, trans-caftaric acid, trans-coutaric acid, (-)-epicatechin, astilbin, quercetin, ethyl caffeic acid ester and ethyl coumaric acid ester, were identified with this technique. Among them, caffeic and coumaric acid ethyl esters were clearly the most abundant. Overall, the concentrations of these compounds were within similar ranges to those previously described in white wines (Villiers, Majek, Lynen, Crouch, Lauer & Sandra, 2005; Ortega, Lopez-Toledano, Mayen, Merida & Medina, 2003; Zafrilla et al., 2003; Darias-Martin, Andrés-Lacueva, Díaz-Romero & Lamuela-Raventós, 2008).

No significant differences were detected in most of the phenolic compounds before natural protein precipitation. Only protocatechuic acid, ferulic acid and astilbin decreased slightly (18, 14 and 11%, respectively) whereas quercetin and ethyl coumaric acid ester increased (91 and 13%, respectively). Nevertheless, as stated above, the changes observed in the wine before and after the protein precipitation are not necessarily directly related to the

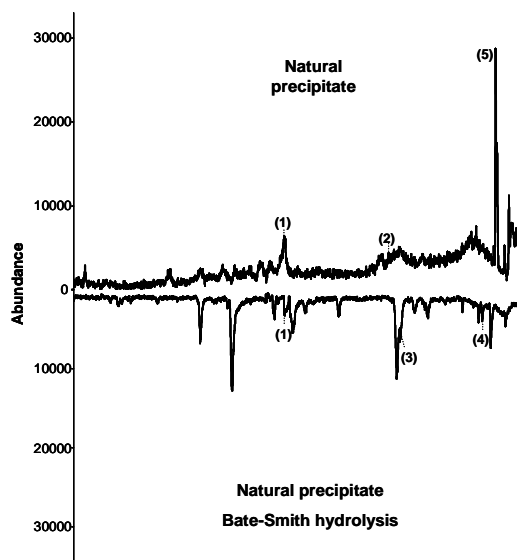
### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

protein haze process because this can be produced by any of the other causes mentioned previously.

**Table 4. Identified phenolic compound in wine before and after natural precipitation and in natural precipitate by HPLC/ESI-TOF.**

Identified Compound	Wine Before NP (ppm)	Wine After NP (ppm)	Natural Precipitate (µg)	% (w/w) <sup>a</sup>	NP Bate-Smith (µg)	% (w/w) <sup>a</sup>
1 Gallic acid	1.1 ± 0.1 a	1.1 ± 0.1 a	nd		nd	
2 Protocatechuic acid	0.39 ± 0.01 a	0.32 ± 0.01 b	nd		nd	
3 trans-Caftaric acid	0.68 ± 0.02 a	0.68 ± 0.03 a	nd		nd	
4 trans-Coutaric acid	0.33 ± 0.01 a	0.31 ± 0.01 a	nd		nd	
5 (+)-Catechin	0.16 ± 0.01 a	0.14 ± 0.01 a	nd		nd	
6 Vanillic acid	0.030 ± 0.001 a	0.031 ± 0.001 a	2.02 ± 0.07	0.017 ± 0.001	9.9 ± 0.4	0.082 ± 0.003
7 trans-Caffeic acid	2.7 ± 0.1 a	2.5 ± 0.1 a	nd		nd	
8 (-)-Epicatechin	0.030 ± 0.002 a	0.029 ± 0.002 a	nd		nd	
9 trans-p-Coumaric acid	0.87 ± 0.01 a	0.86 ± 0.02 a	68 ± 1	0.57 ± 0.01	nd	
10 Ferulic acid	0.99 ± 0.04 a	0.85 ± 0.02 b	nd		nd	
11 Astilbin	0.88 ± 0.01 a	0.78 ± 0.02 b	nd		nd	
12 Quercetin	0.11 ± 0.01 a	0.21 ± 0.01 b	nd		16 ± 2	0.13 ± 0.02
13 Caffeic acid ethyl ester	5.2 ± 0.1 a	5.2 ± 0.1 a	nd		nd	
14 Coumaric acid ethyl ester	2.4 ± 0.1 a	2.7 ± 0.1 b	99 ± 6	0.82 ± 0.05	nd	
15 Cyanidin	nd	nd	nd		47 ± 2	0.39 ± 0.02
<b>TOTAL</b>			<b>168 ± 7</b>	<b>1.4 ± 0.1</b>	<b>72 ± 1</b>	<b>0.60 ± 0.01</b>

<sup>a</sup> mg of phenolic compound in precipitate \* 100 / 12 mg of precipitate. (NP) Natural Precipitation. All data are expressed as the average of the three analysis ± standard deviation. Different letters indicate the existence of statistically significant differences.



**Figure 4. Identified phenolic compounds in natural precipitate by HPLC/ESI-TOF.**

(1) Vanillic acid; (2) trans-p-Coumaric acid; (3) Cyanidin; (4) Quercetin; (5) Ethyl coumaric acid ester.

Figure 4 shows the extract ion chromatogram of the natural precipitate directly and after applying the Bate-Smith reaction. When the dissolved precipitate was directly injected, only three peaks were identified, which had already been detected in the wine before precipitation. Specifically, we identified vanillic acid and trans-p-coumaric acid, which were also detected in the precipitate by GC/MS, and ethyl coumaric acid ester, which was not detected by GC/MS. Taken together, these three phenolic compounds accounted for 1.4% of the dry weight of the pellet. Nevertheless, trans-p-coumaric acid and its ethyl ester were major while vanillic acid was found in a very small proportion.

When acid hydrolysis (Bate-Smith reaction) was carried out with the natural precipitate, a completely different extract ion chromatogram was obtained (Figure 4). This

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

chromatogram was cleaner (less background) and allowed us to identify two new peaks of quercetin and cyanidin, which were present in a relatively low proportion (Table 4). It should be noted that both flavonoids were not detected when the dissolved natural precipitate was directly injected. In the case of cyanidin, its appearance after acid applying the Bate-Smith can be explained by the acid hydrolysis of proanthocyanidins (Bate-Smith, 1954; Ribéreau-stonnestreet, 1966). This finding confirms that proanthocyanidins were present in the natural precipitate as it has been described previously (Waters, Peng, Pocock & Williams, 1995). Some authors have also associated quercetin with a very unusual white wine flavonol haze (Somers & Ziemelis, 1985). However to our knowledge, nobody to date has described its presence in the protein haze. The fact that it was not detected before acid hydrolysis was carried out suggests that quercetin was strongly linked to proteins.

We conclude that phenolic compounds, although they are not easy to identify and quantify, are actually present in natural protein precipitate in a non-negligible proportion. This fact suggests that phenolic compounds are probably involved in the mechanism of haze appearance in white wines.

#### Acknowledgements

We thank CICYT (AGL2007-66338) and CDTI (Project CENIT Demeter) for financial support

#### Literature Cited

- Baderschneider, B., & Winterhalter, P. (2001). Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2788-2798.
- Bate-Smith, E. C. (1954). Astringency in foods. *Food*, 23, 124-127.
- Bayly, F.C., & Berg, H.W. (1967). Grape and wine proteins of white wine varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 24, 18-32.
- Chamkha, M., Cathala, B., Cheynier, V., & Douillard, R. (2003). Phenolic composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot noir vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3179-3184.
- Darias-Martin, J.J., Andrés-Lacueva, C., Díaz-Romero, C., & Lamuela-Raventós, R.M. (2008). Phenolic profile in varietal white wines made in the Canary Islands. *European Food Research and Technology*, 226, 871-876.
- Esteruelas, M., Poinaut, P., Siczkowski, N., Manteau, S., Fort, F., Canals, J.M., & Zamora, F. (2009). Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine. *Food Chemistry*, 113, 28-35.

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

- Hsu, J.C., & Heatherbell, D.A. (1987a). Heat-unstable proteins in wine. I. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 11-16.
- Hsu, J.C., & Heatherbell, D.A. (1987b). Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice, and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 6-10.
- 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, 17-22.
- Koch, J., & Sajak, E. (1959). A review and some studies on grape protein. *American Journal of Enology and Viticulture*, 10, 114-23.
- Lu, Y., & Foo, L.Y. (1999). Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 68, 81-85.
- Mesquita, P.R., Piçarra-Perreira, M.A., Monteiro, S., Loureira, V.B., Teixeira, A.R., & Ferreira, T.B. (2001). Effect of wine composition on protein stability. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 324-330.
- Minuti, L., Pellegrino, R.M., & Teseo, I. (2006). Simple extraction method and gas chromatography–mass spectrometry in the selective ion monitoring mode for the determination of phenols in wine. *Journal of Chromatography A*, 1114, 263-268.
- Oh, H.I., Hoff, J.E., Armstrong, G.S., & Haff, L. (1980). Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 394-398.
- Ortega, A., Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (2003). Changes in Color and Phenolic Compounds During Oxidative Aging of Sherry White Wine *Journal of food science*, 68, 2461-2468.
- Pocock, K.F., & Waters, E.J. (2006). Protein haze in bottled white wines: how well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 212-220.
- Pocock, K.F., Alexander, G.M., Hayasaka, Y., Jones, P.R., & Waters, E.J. (2007). Sulphate—a candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1799-1807.
- Ribéreau-Gayon, J., & Stonestreet, E. (1966). Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Analytique*, 48, 188-196.
- Salazar, F.N., Achaerandio, I., Labbe, M.A., Guell, C., & Lopez, F. (2006). Comparative study of protein stabilization in white wine using zirconia and bentonite: Physicochemical and wine sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9955-9958.
- Siebert, K.J., Troukhanova, N.V., & Lynn, P.Y. (1996). Nature of polyphenol-protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 80-85.



### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

- Siebert, K.J., & Lynn, P.Y. (1998). Comparison of polyphenol interactions with PVPP and haze-active protein. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56, 24-31.
- Siebert, K.J. (1999). Effects of Protein–Polyphenol Interactions on Beverage Haze, Stabilization, and Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 353-362.
- Siebert, K.J. (2006). Haze formation in beverages. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 987-994.
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Karumanchiri, A., & Goldberg, D.M. (1997). A multiresidue derivatization gas chromatographic assay for fifteen phenolic constituents with mass selective detection. *Analytical Chemistry*, 69, 4405-4409.
- Somers, T.C., & Ziemelis G. (1973). Direct determination of wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 24, 47-50.
- Somers, T.C., & Ziemelis G. (1985). Flavonol haze in white wines. *Vitis*, 24, 43-50.
- Somers, T.C., Vérette, E., & Pocock, K.F. (1987). Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40, 67-78.
- Tulyathan, V., Boulton, R., & Singleton, V.L. (1989). Oxygen uptake by gallic acid as a model for similar reactions in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 844-849.
- Villiers, A., Majek, P., Lynen, F., Crouch, A., Lauer, H., & Sandra, P. (2005). Classification of South African red and white wines according to grape variety based on the non-coloured phenolic content. *European Food Research and Technology*, 221, 520-528.
- Waters, E.J., Wallace, W., & Williams, P.J. (1991). Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 123-127.
- Waters, E.J., Peng, Z., Pocock, K.F., & Williams, P.J. (1995). 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., Shirley, N.J., & Williams, P.J. (1996). Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3-5.
- Waters, E.J., Hayasaka, Y., Tattersall, D.B., Adams, K.S., & Williams, P.J. (1998). Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4950-4957.
- Yokotsuka, K., Ebihara, T., & Sato, T. (1991). Comparison of soluble proteins in juice and wine from Koshu grapes. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 71, 248-253.

### **Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.**

Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J.M., Martínez-Cachá, A., Pardo, F., & López Nicolás, J.M. (2003). Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4694-4700.

## Capítol 3.2:

# Espectres TOF dels compostos fenòlics identificats en el vi blanc.



## Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

### 1. Compostos fenòlics presents en el vi blanc.

Tot seguit es mostren els compostos fenòlics que es van cercar en el cromatograma obtingut mitjançant l'anàlisi del precipitat i del vi abans i després de precipitar per HPLC/ESI-TOF. La major part d'aquests compostos fenòlics estan descrits en el *review* de Monagas i col. (2005). Tal i com es descriu en l'Annex 1, per tal de detectar la presència en el precipitat d'aquests compostos es van extreure els ions  $[M+H]^+$  amb la corresponent massa isotòpica. La massa isotòpica de la resta de ions ( $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ) s'utilitza per tal de corroborar la presència del compost, ja que la tècnica de HPLC/ESI-TOF utilitzada ens dóna espectres amb una fragmentació molt baixa.

		M	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+K]^+$	$[M+NH_4]^+$
Gallic Acid	C7H6O5	170.022	171.029	193.011	208.985	188.056
Gallic Acid Ethyl Ester	C9H10O5	198.053	199.061	221.043	237.017	216.087
Protocatechuic Acid	C7H6O4	154.027	155.034	177.016	192.990	172.061
Protocatechuic Acid Methyl Ester	C8H8O4	168.042	169.050	191.032	207.006	186.077
Protocatechuic Acid Ethyl Ester	C9H10O4	182.058	183.066	205.048	221.022	200.092
Vanillic Acid	C8H8O4	168.042	169.050	191.032	207.006	186.077
Vanillic Acid Methyl Ester	C10H12O4	196.074	197.081	219.063	235.037	214.108
Vanillic Acid Ethyl Ester	C9H10O4	182.058	183.066	205.048	221.022	200.092
Vanillic Acid Glucose Ester	C14H18O9	330.095	331.103	353.085	369.059	348.129
p-Hydroxybenzoic Acid	C7H6O3	138.032	139.040	161.021	176.995	156.066
p-Hydroxybenzoic Acid Ethyl Ester	C9H10O3	166.063	167.071	189.053	205.027	184.097
Syringic Acid	C9H10O5	198.053	199.061	221.043	237.017	216.087
Gentisic Acid	C7H6O4	154.027	155.034	177.016	192.990	172.061
trans-Caffeic Acid	C9H8O4	180.042	181.050	203.032	219.006	198.077
trans-Caffeic Acid-O-Glucoside	C15H18O9	342.095	343.103	365.085	381.059	360.129
trans-Caffeic Acid Ethyl Ester	C11H12O4	208.074	209.081	231.063	247.037	226.108
trans/cis-Caffeoyltartaric Acid (Caftaric Acid)	C13H12O9	312.048	313.056	335.038	351.012	330.083
trans-Ethyl Caffeoyltartrate	C14H14O9	326.064	327.072	349.054	365.027	344.098
trans-Diethyl Caffeoyltartrate	C15H16O9	340.079	341.087	363.069	379.043	358.114
2-S-Glutathionylcaftaric Acid	C19H23N3O10S	485.110	486.118	508.100	524.074	503.145
2-S-Cysteinylcaffeic Acid	C12H13NO6S	299.046	300.054	322.036	338.010	317.081
di-2,5-S-Cysteinylcaffeic Acid	C15H18N2O8S2	418.050	419.058	441.040	457.014	436.085
trans/cis-p-Coumaric Acid	C9H8O3	164.047	165.055	187.037	203.011	182.082
trans/cis-p-Coumaric Acid-O-Glucoside	C15H18O8	326.100	327.108	349.090	365.064	344.135
trans-p-Coumaric Acid Ethyl Ester	C11H12O3	192.079	193.086	215.068	231.042	210.113
trans/cis-p-Cumaroyltartaric Acid (Cutaric Acid)	C13H12O8	296.053	297.061	319.043	335.017	314.088
trans-Ferulic acid	C10H10O4	194.058	195.066	217.048	233.022	212.092
trans/cis-Ferulic Acid-4-O-Glucoside	C16H20O9	356.111	357.119	379.101	395.074	374.145
trans/cis-Feruloyltartaric Acid (Fertaric Acid)	C14H14O9	326.064	327.072	349.054	365.027	344.098
Sinapic Acid	C11H12O5	224.068	225.076	247.058	263.032	242.103
Sinapic Acid-O-Glucoside	C17H22O10	386.121	387.129	409.111	425.085	404.156
Apigenin	C15H10O5	270.053	271.061	293.043	309.017	288.087
Apigenin-7-O-Glucoside	C21H20O10	432.106	433.113	455.095	471.069	450.140
Luteolin	C15H10O6	286.048	287.056	309.038	325.011	304.082
Luteolin-7-O-Glucoside	C21H20O11	448.101	449.108	471.090	487.064	466.135
Myrecetin	C15H10O8	318.038	319.045	341.027	357.001	336.072
Myrecetin-3-O-Glucoside	C21H20O13	480.090	481.098	503.080	519.054	498.125
Myrecetin-3-O-Glucoronide	C21H18O14	494.070	495.077	517.059	533.033	512.104
Quercetin	C15H10O7	302.043	303.050	325.032	341.006	320.077
Quercetin-3-O-Glucoside (Isoquercitrin)	C21H20O12	464.096	465.103	487.085	503.059	482.130
Quercetin-3-O-Glucoronide	C21H18O13	478.075	479.083	501.065	517.038	496.109
Quercetin-3-O-Rhamnoside (Quercetrin)	C21H20O11	448.101	449.108	471.090	487.064	466.135
Quercetin-3-O-Rutinoides (Rutin)	C27H30O16	610.153	611.161	633.143	649.117	628.188
kaempferol	C15H10O6	286.048	287.056	309.038	325.011	304.082
kaempferol-3-O-Glucoside	C21H20O11	448.101	449.108	471.090	487.064	466.135
Kaempferol-3-O-Glucoronide	C21H18O12	462.080	463.088	485.070	501.044	480.114
Isorhamnetin	C16H12O7	316.058	317.066	339.048	355.022	334.093
Isorhamnetin-3-O-Glucoside	C22H22O12	478.111	479.119	501.101	517.075	496.146

## Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

		M	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
2,3-Dihydroquercetin (Taxifolin)	C15H12O7	304.058	305.066	327.048	343.022	322.093
2,3-Dihydroquercetin-3-O-Rhamnoside (Astilbin)	C21H22O11	450.116	451.124	473.106	489.080	468.151
2,3-Dihydroquercetin-3-O-Glucoside	C21H22O12	466.111	467.119	489.101	505.075	484.146
2,3-Dihydroquercetin-3-O-Xyloside	C20H20O11	436.101	437.108	459.090	475.064	454.135
2,3-Dihidrokaempfeol	C15H12O6	288.063	289.071	311.053	327.027	306.098
2,3-Dihidrokaempferol-3-O-Rhamnoside (Engeletin)	C21H22O10	434.121	435.129	457.111	473.085	452.156
2,3-Dihidrokaempferol-3-O-Glucoside	C21H22O11	450.116	451.124	473.106	489.080	468.151
Fisetin	C15H10O6	286.048	287.056	309.038	325.011	304.082
Galangin	C15H10O5	270.053	271.061	293.043	309.017	288.087
Morin	C15H10O7	302.043	303.050	325.032	341.006	320.077
Kaempferide	C16H12O6	300.063	301.071	323.053	339.027	318.098
Hyperoside	C21H20O12	464.095	465.103	487.085	503.059	482.130
(+)-Catechin / (-)-Epicatechin	C15H14O6	290.079	291.087	313.069	329.043	308.113
(-)-Epigallocatechin / (+)-Gallocatechin	C15H14O7	306.074	307.082	329.064	345.038	324.108
(+)-Catechin-3-O-Gallate / (-)-Epicatechin-3-O-Gallate	C22H18O10	442.090	443.098	465.080	481.054	460.124
Procyanidin B1/B2/B3/B4	C30H26O12	578.142	579.150	601.132	617.106	596.177
Procyanidin B1/B2/B3/B4 Gallate	C37H30O16	730.153	731.161	753.143	769.117	748.188
Procyanidin B1/B2/B3/B4 di-Gallate	C44H34O20	882.164	883.172	905.154	921.128	900.199
Procyanidin Trimer	C45H38O18	866.206	867.214	889.196	905.170	884.240
Procyanidin Trimer Gallate	C52H42O22	1018.217	1019.225	1041.207	1057.180	1036.251
Procyanidin Trimer di-Gallate	C59H46O26	1170.228	1171.236	1193.218	1209.191	1188.262
Procyanidin Trimer tri-Gallate	C66H50O30	1322.239	1323.247	1345.228	1361.202	1340.273
Ellagic Acid	C14H6C8	302.006	303.014	324.996	340.970	320.041
Ellagic Acid Glucosa	C20H16O13	464.059	465.067	487.049	503.023	482.093
Resveratrol	C14H12O3	228.079	229.086	251.068	267.042	246.113
trans-Resveratrol-3-O-Glucoside (Piceid / Polydatin)	C20H22O8	390.131	391.139	413.121	429.095	408.166
Tyrosol	C8H10O2	138.068	139.076	161.058	177.032	156.102
Hydroxytyrosol	C8H10O3	154.063	155.071	177.053	193.027	172.097
Cyanidin	C15H11O6	287.056	288.063	310.045	326.019	305.090
Delphinidin	C15H11O7	303.050	304.058	326.040	342.014	321.085

## 2. Espectres HPLC/ESI-TOF dels compostos fenòlics presents en el vi blanc.

En la identificació dels compostos fenòlics presents en el vi blanc de la varietat *Sauvignon Blanc* mitjançant la tècnica HPLC/ESI-TOF s'han obtingut els espectres de masses que es mostren a continuació.

Els espectres s'han extret del cromatograma deconvolucionat, quan el soroll de fons és elevat no s'extrauen tots els ions isotòpics corresponents a l'ió protonat, i ens dona errors elevats o bé puntuacions baixes (*Score*). Això també passa com és d'esperar en els casos en que el compost fenòlic presenta una concentració baixa ja que la tècnica HPLC/ESI-TOF té uns nivells de sensibilitat baixos.

Aquesta tècnica ens dona la massa isotòpica del compost amb una elevada precisió, quatre decimals, i només accepta un error en el segon decimal. En la majoria dels casos s'observa una baixa fragmentació del compost, com a molt un parell de pèrdues, aquestes es mostren en la molècula i en el corresponent espectre de masses.

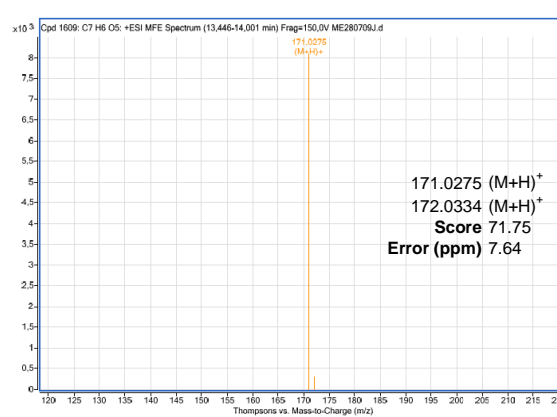
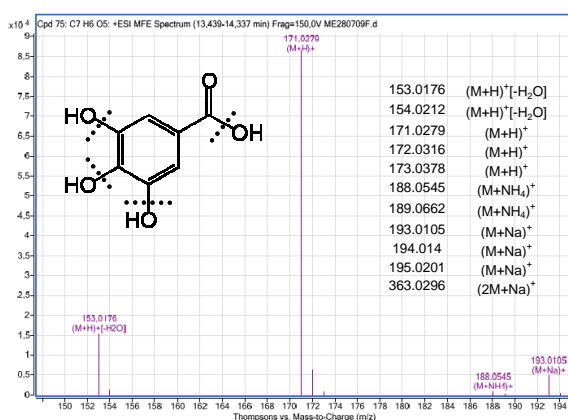
En cas de disposar de patró, primer es mostra l'espectre de masses obtingut corresponent a aquest i després el del compost fenòlic identificat en el vi blanc. A partir de la massa de cada ió de l'espectre es pot obtenir la seva fórmula molecular. En alguns casos es mostren dos espectres, el del compost identificat i el del compost amb la pèrdua respectiva, tot i estar en dos espectres diferents aquests ions estan presents en el mateix pic.

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

#### a) L'àcid Gàl·lic.

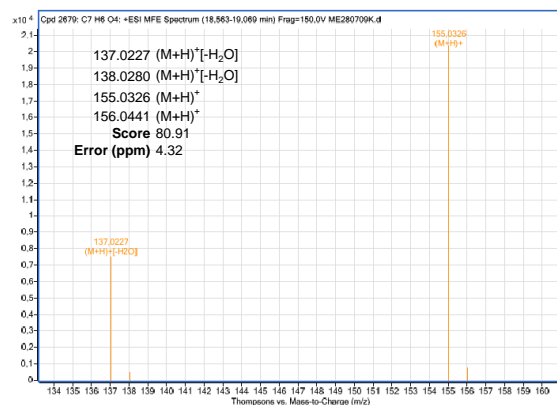
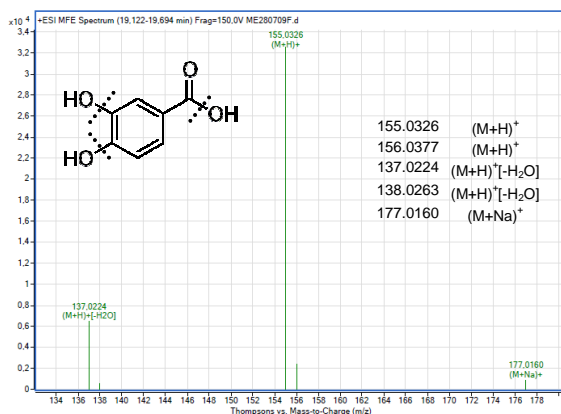
L'espectre de masses del patró mostra una fragmentació per pèrdua d'aigua, aquesta pèrdua pot provindre de l'hidroxil de l'àcid carboxílic o bé dels hidroxils de l'anell aromàtic. També s'observa els ions amb amoni i sodi, a més de l'ió protonat.

En l'espectre de masses de la mostra només es mostra l'ió protonat, per això l'error que ens dóna el programa és una mica alt (7.64 ppm), tot i que la puntuació és alta (71.75) ja que la massa isotòpica dels ions protonats (el del patró i el de la mostra), només varia en el quart decimal. Amb un sol ió en l'espectre de la mostra no podem confirmar la presència de l'àcid gàl·lic, però el patró d'àcid gàl·lic ens confirma el temps de retenció.



#### b) L'àcid Protocatechuic.

En l'espectre de masses del patró s'observa una pèrdua d'aigua, aquesta pot provindre de l'hidroxil de l'àcid carboxílic o bé dels hidroxils de l'anell aromàtic. També s'observa l'ió amb sodi, a més de l'ió protonat que és el majoritari.



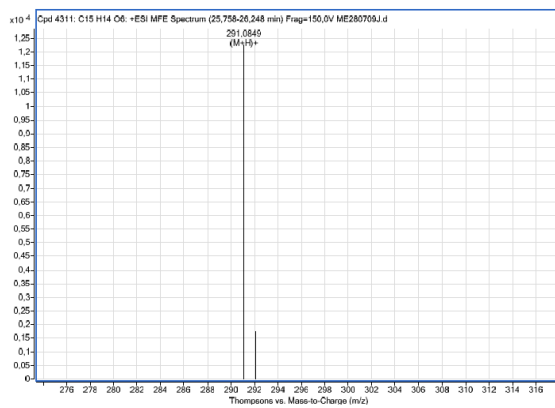
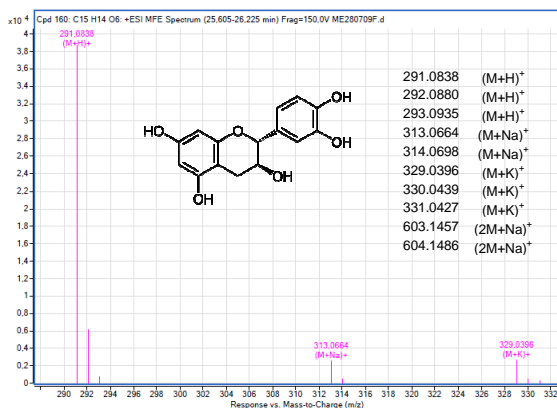
Observem la pèrdua d'aigua també en l'espectre de la mostra, la massa isotòpica d'aquest ió només difereix en l'últim decimal respecte la del patró. La massa isotòpica de l'ió protonat és exactament igual, l'error en la assignació és acceptable (< 5 ppm) i la puntuació

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

molt bona (80.91). No obtenim cap altre ió que ens corrobori la presència d'aquest compost en la mostra. El patró ens confirma el temps de retenció, i així la presència de l'àcid protocatechuic.

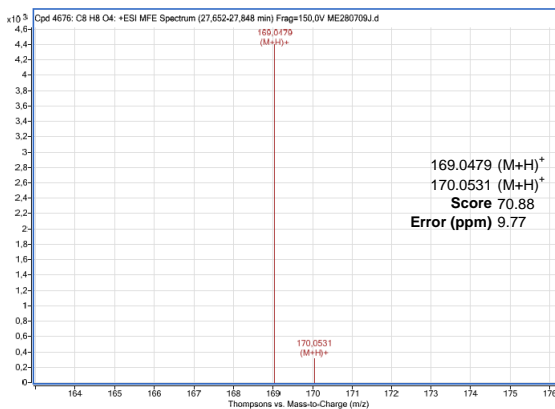
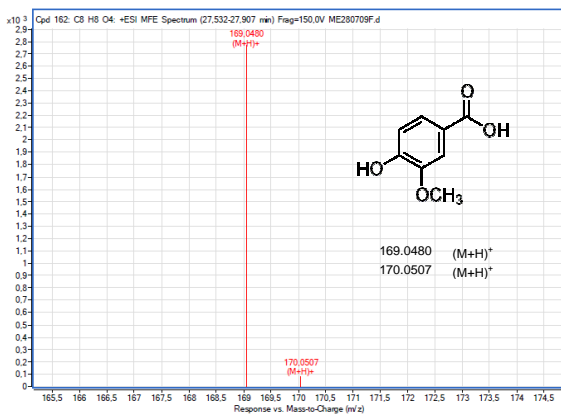
#### c) La (+)-Catequina.

No s'observa cap fragmentació ni en l'espectre de masses del patró ni en el de la mostra. L'espectre de masses de la mostra només conté l'ió protonat, en el del patró podem observar també els ions amb sodi i potassi. L'error és acceptable (< 5 ppm) i la puntuació és bastant elevada (77.69). La massa isotòpica dels ions protonats en aquest cas varia en el tercer decimal. Cal confirmar el temps de retenció amb el patró, per tal de corroborar la presència de catequina a la mostra ja que només disposem de l'ió protonat.



#### d) L'àcid vainílic.

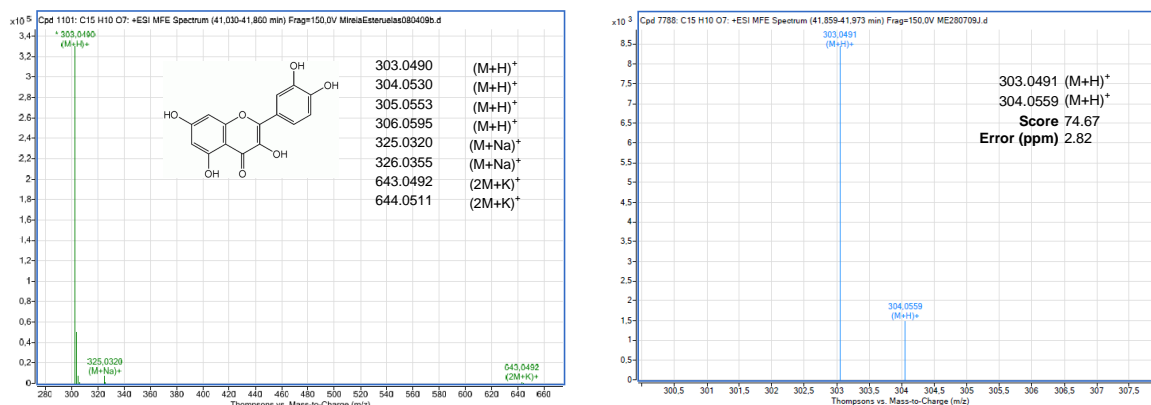
L'espectre de masses de la mostra i del patró només mostren l'ió protonat. L'error és força elevat (9.77 ppm) i la puntuació és bastant elevada (70.88). La massa isotòpica dels ions protonats varia en el tercer decimal. Cal confirmar el temps de retenció amb el patró per tal de corroborar la presència de l'àcid vainílic a la mostra.



### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

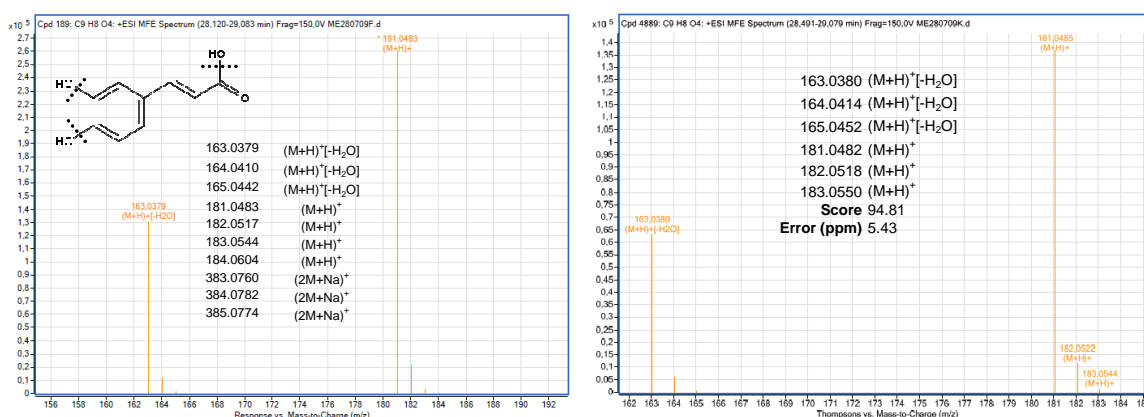
#### e) La quercitina.

En l'espectre de masses del patró s'observa l'ió protonat i els ions amb sodi i l'adducte amb potassi, no s'observa cap pèrdua. L'ió protonat del patró i de la mostra només difereix en el quart decimal, per aquest motiu l'error és molt baix (2.82 ppm) i la puntuació està força bé (74.67). No s'observa cap pèrdua en la mostra i tampoc cap ió complementari. El patró de quercitina ens confirma el temps de retenció del compost en la mostra, i així la seva presència.



#### f) L'àcid cis/trans-Caffeic.

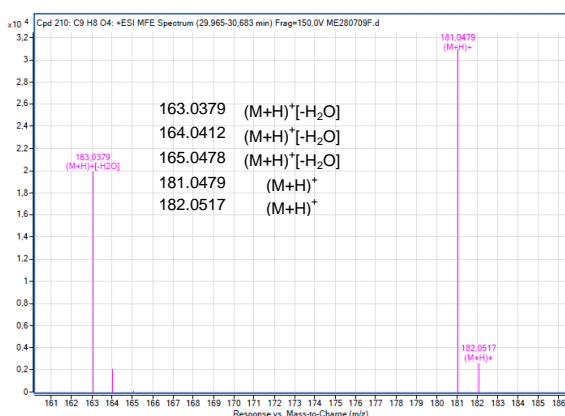
En tots dos espectres de masses es pot observar l'ió protonat i l'ió corresponent a la pèrdua d'aigua, ambdós ions només difereixen en el quart decimal. La pèrdua d'aigua correspon a la fragmentació dels hidroxils de l'anell aromàtic o bé a l'hidroxil de l'àcid carboxílic. L'error és acceptable ( $\approx 5$  ppm) i la puntuació és molt elevada (94.81). L'espectre del patró i el de la mostra són molt semblants, ja que estan dins del mateix rang de concentració. El patró ens confirma el temps de retenció.



L'espectre de masses de la mostra correspon a l'àcid trans-caffeic, per comparació amb el del cis-caffeic que es mostra a continuació. La massa isotòpica de l'ió protonat i del



### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

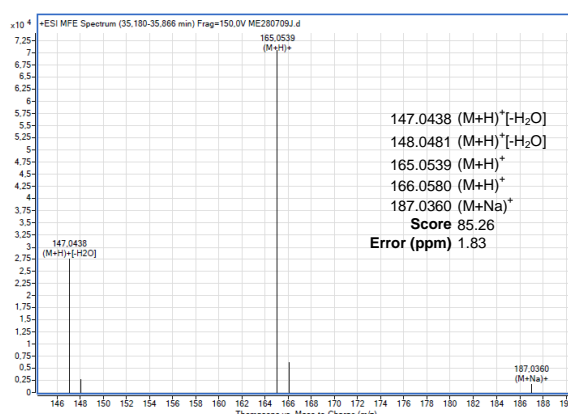
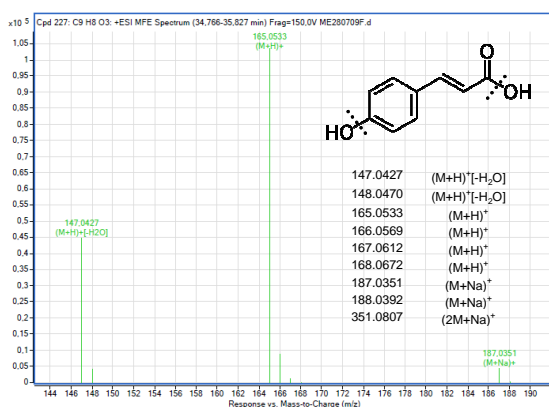


corresponent a la pèrdua d'aigua són iguals en el ambdós isòmers, ja que tots dos presenten la mateixa fórmula molecular, ara bé l'abundància relativa d'ambdós ions divergeix i per això podem diferenciar-los. L'ió corresponent a la pèrdua d'aigua de l'isomer trans presenta una abundància del 50.2% respecte l'ió protonat, mentre que per a l'isomer en cis és del 64.3%. L'àcid cafeïc de

la mostra és l'isomer trans ja que l'abundància relativa de l'ió amb pèrdua d'aigua és del 48.5%. A més també podem observar que l'isomer en cis té un temps de retenció diferent a l'isomer en trans.

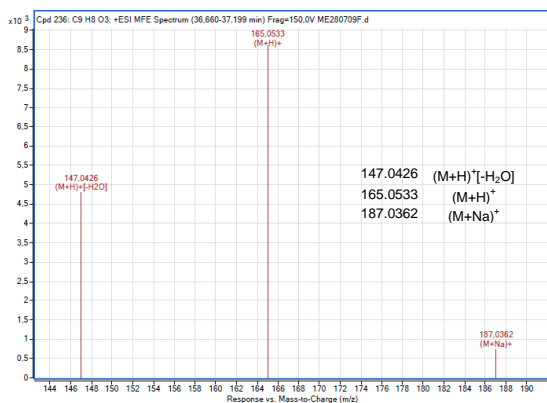
#### g) L'àcid cis/trans-p-Cumàric.

Podem observar tan l'ió protonat com el de pèrdua d'aigua, en tots dos espectres, també tenim l'ió amb sodi. La pèrdua d'aigua provindrà de l'hidroxil de l'àcid carboxílic o bé del de l'anell aromàtic. L'error és molt baix (1.83 ppm) i la puntuació elevada (85.26). En aquest cas si no tinguéssim patró, no passaria res, ja que amb tres ions es pot casi confirmar la presència d'un determinat compost, evidentment sempre és millor confirmar el temps de retenció de la mostra amb el del patró



Igual com passava amb els isòmers de l'àcid cafeïc, tot hi que els ions dels espectres de masses dels isòmers de l'àcid p-cumàric tinguin la mateixa massa isotòpica, es poden distingir per l'abundància relativa dels seus pics. L'abundància relativa de l'ió corresponent a la pèrdua d'aigua en el trans-p-cumàric és del 43.5%, mentre que per al cis-p-cumàric és del 55.7%. Ambdós isòmers també difereixen en el temps de retenció, ja que l'isomer trans és lleugerament més polar i per això elueix abans.

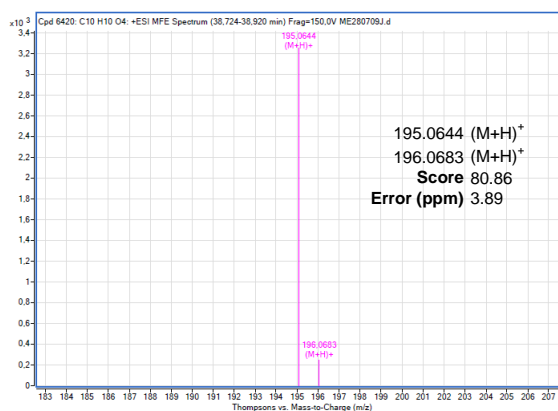
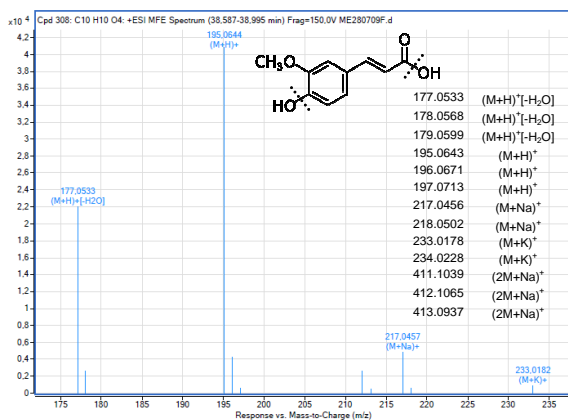
### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.



L'abundància relativa del ió amb pèrdua d'aigua de la mostra és de 39.2 %.

#### h) L'àcid ferúlic.

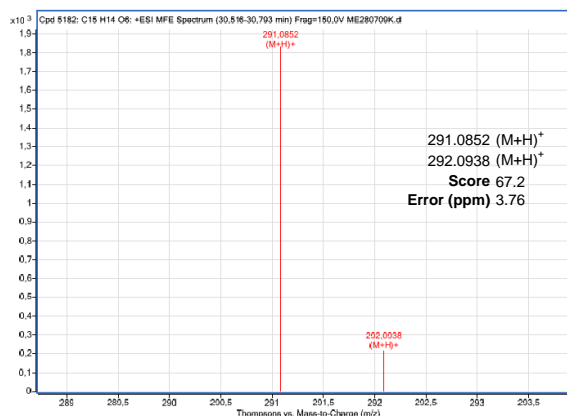
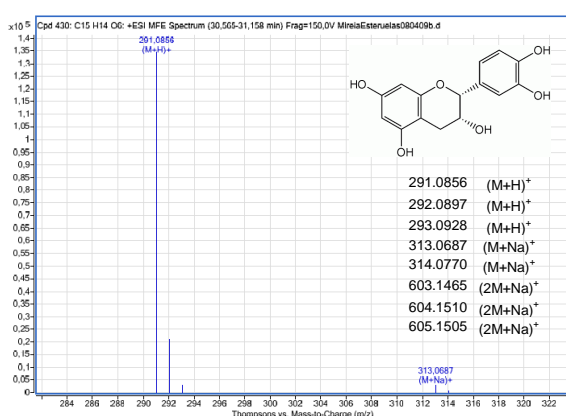
L'espectre de masses del patró mostra l'ió protonat, l'ió corresponent a la pèrdua d'aigua que prové de l'hidroxil de l'àcid carboxílic o bé de l'anell aromàtic, i els ions amb sodi i amb potassi. Només observem l'ió protonat en l'espectre de la mostra, aquest ió només difereix en el quart decimal respecte la massa isotòpica de l'ió protonat del patró. L'error és acceptable (< 5 ppm) i la puntuació elevada (80.86); tot i així com que només tenim l'ió protonat en l'espectre de la mostra, ens cal confirmar el temps de retenció amb el del patró.



#### i) La (-)-Epicatequina.

No s'observa cap ió corresponent a possibles pèrdues ni en l'espectre de masses del patró ni en el de la mostra. En la mostra només observem l'ió protonat, mentre que en el patró també s'observa l'ió amb sodi i el corresponent adducte. L'error és baix (3.76) ja que la massa isotòpica de l'ió protonat difereix en el quart decimal. Ara bé, la puntuació és baixa (67.2), el compost en la mostra hi està present a molt baixa concentració. El patró ens confirma el temps de retenció de la (-)-epicatequina i així la seva presència en el vi.

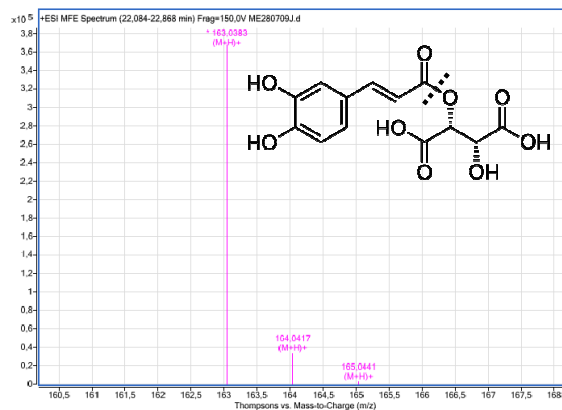
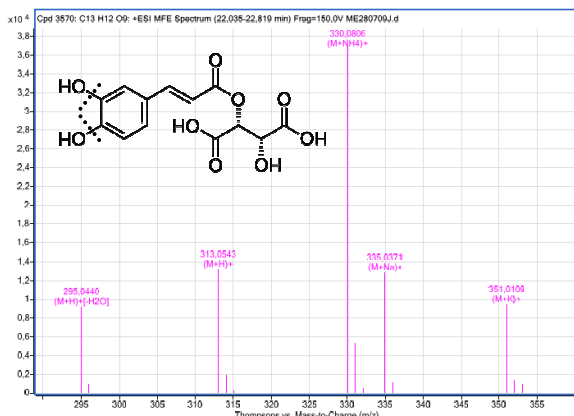
### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.



#### j) L'àcid trans-caftàric.

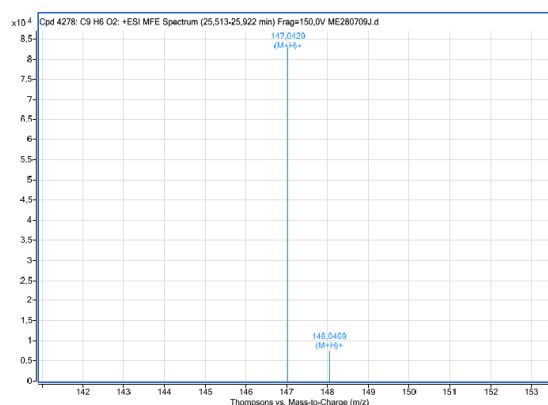
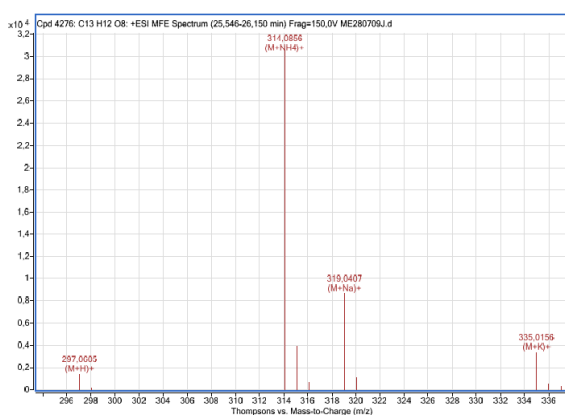
En l'espectre de la mostra de l'àcid trans-caftàric s'observa l'ió protonat amb una abundància relativa del 35.6%, ja que l'ió majoritari és el d'amoni. Podem observar que és un espectre de masses molt complert. Per una banda, tenim els ions amb sodi, amoni i potassi, també hi ha l'ió corresponent a la pèrdua d'aigua que pot provindre dels hidroxils de l'anell aromàtic. Per altra banda s'observa l'ió corresponent a la pèrdua del tartàric, aquest ió difereix en el tercer decimal respecte a la massa isotòpica de l'ió corresponent a la pèrdua d'aigua per part de l'àcid cafeïc (163.0379). Aquests sis ions ens confirmen la presència de l'àcid trans-caftàric a la mostra. Encara que a l'espectre de masses no s'observa, també es poden veure els ions dels adductes amb sodi i amb potassi. L'error en l'assignació d'aquests ions a la fórmula molecular de l'àcid caftàric és de 3.59 ppm i la puntuació és del 95.2 %. Tot i no disposar de patró totes les dades corroboren la presència en la mostra de l'àcid caftàric.

163.0383	(M+H) <sup>+</sup> [-tartàric]	335.0371	(M+Na) <sup>+</sup>
164.0417	(M+H) <sup>+</sup> [-tartàric]	336.0398	(M+Na) <sup>+</sup>
165.0441	(M+H) <sup>+</sup> [-tartàric]	351.0109	(M+K) <sup>+</sup>
295.0440	(M+H) <sup>+</sup> [-H <sub>2</sub> O]	352.0141	(M+K) <sup>+</sup>
296.0498	(M+H) <sup>+</sup> [-H <sub>2</sub> O]	353.0110	(M+K) <sup>+</sup>
313.0543	(M+H) <sup>+</sup>	642.1327	(2M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>
314.0581	(M+H) <sup>+</sup>	647.0838	(2M+Na) <sup>+</sup>
315.0591	(M+H) <sup>+</sup>	648.0879	(2M+Na) <sup>+</sup>
330.0806	(M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	649.0763	(2M+Na) <sup>+</sup>
331.0848	(M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	650.0760	(2M+Na) <sup>+</sup>
332.0751	(M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	651.0831	(2M+Na) <sup>+</sup>



### k) L'àcid trans-cutàric.

En l'espectre de la mostra de l'àcid trans-cutàric també s'observa, igual com passava amb l'àcid caftàric, que l'ió protonat no és el majoritari, presenta una abundància relativa del 4.6%, és un ió molt minoritari, l'ió majoritari és el d'amoni. S'observen els ions amb sodi, amoni i potassi. Per altra banda s'observa l'ió corresponent a la pèrdua del tartàric, aquest ió difereix en el quart decimal respecte a la massa isotòpica de l'ió corresponent a la pèrdua d'aigua per part de l'àcid p-cumàric (147.0427). Encara que a l'espectre de masses no s'observa, també es pot veure l'ió de l'adducte amb sodi. L'error és de 5.00 ppm i la puntuació de 90.8, a més tenim sis ions que ens permeten identificar aquest compost com l'àcid cutàric.

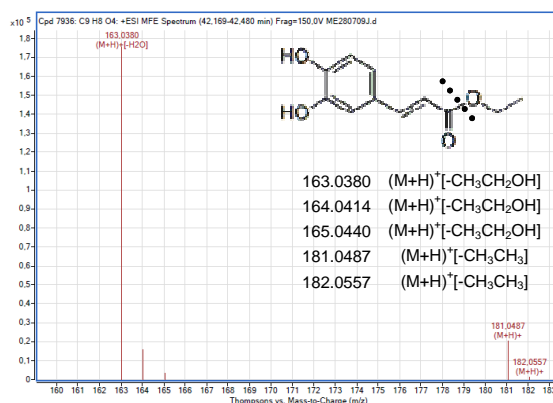
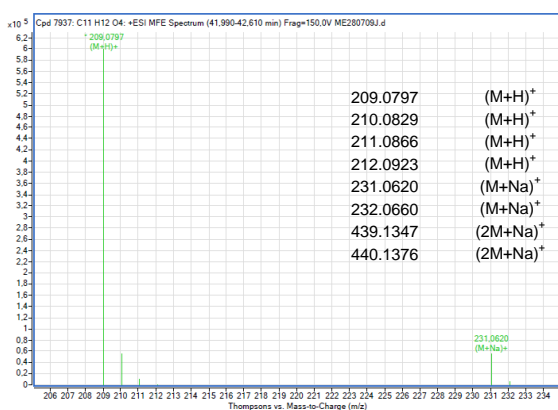


147.0429	(M+H) <sup>+</sup> [ <sup>-</sup> -tartàric]	319.0407	(M+Na) <sup>+</sup>
148.0469	(M+H) <sup>+</sup> [ <sup>-</sup> -tartàric]	320.0440	(M+Na) <sup>+</sup>
297.0605	(M+H) <sup>+</sup>	335.0156	(M+K) <sup>+</sup>
298.0670	(M+H) <sup>+</sup>	336.0190	(M+K) <sup>+</sup>
314.0856	(M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	337.0169	(M+K) <sup>+</sup>
315.0892	(M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	615.0926	(2M+Na) <sup>+</sup>
316.0962	(M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>		

### l) L'èster etílic de l'àcid cafeic.

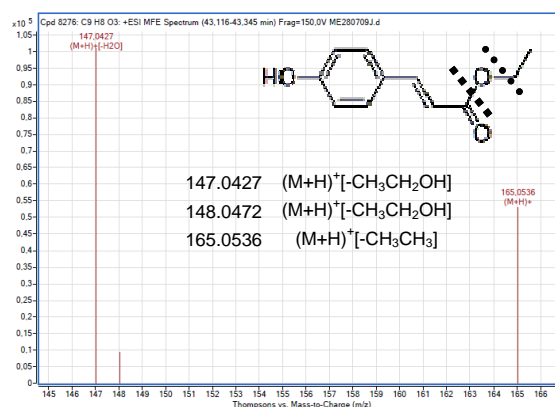
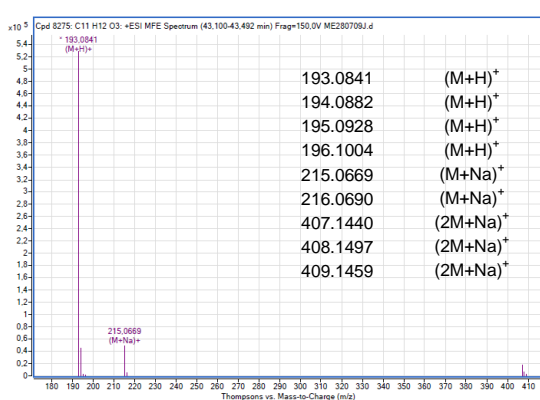
L'espectre de masses de la mostra presenta l'ió protonat que en aquest cas és el majoritari, l'ió amb sodi i també es detecta l'adducte amb sodi. Es pot observar l'ió molecular corresponent a la pèrdua d'etanol, i amb una abundància molt més petita l'ió molecular de la pèrdua de l'etil. La massa de l'ió corresponent a la pèrdua d'etil, amb la fórmula molecular de l'àcid cafeic, difereix en el quart decimal respecte al patró (181.0483). La massa de l'ió corresponent a la pèrdua d'etanol, difereix al tercer decimal si es compara amb la massa de l'ió per pèrdua d'aigua del patró de l'àcid cafeic (163.0379). L'error és de 5.23 ppm i la puntuació de 91.60. Tot i no tenir el patró de l'èster etílic de l'àcid cafeic podem identificar-lo a la mostra ja que tenim cinc ions que en confirmen la seva presència.

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.



#### m) L'èster etílic de l'àcid p-cumàric.

L'espectre de masses d'aquest compost segueix el mateix patró que el de l'èster etílic de l'àcid cafeic. S'observa l'ió molecular juntament amb l'ió de sodi i l'adducte pertinent. A més s'observa l'ió corresponent a la pèrdua d'etanol, la massa isotòpica del qual és exactament igual a la de l'ió corresponent a la pèrdua d'aigua de l'àcid p-cumàric (147.0427). També s'observa l'ió que es forma per pèrdua d'etil, aquest té la mateixa fórmula molecular que l'àcid p-cumàric i la seva massa isotòpica difereix en el quart decimal respecte la del patró. (165.0533). Tenim cinc ions que ens indiquen la presència de l'èster etílic de l'àcid p-cumàric en la mostra, tot i no tenir patró per confirmar el temps de retenció. L'error és acceptable (5.27 ppm) i la puntuació de 80.2.

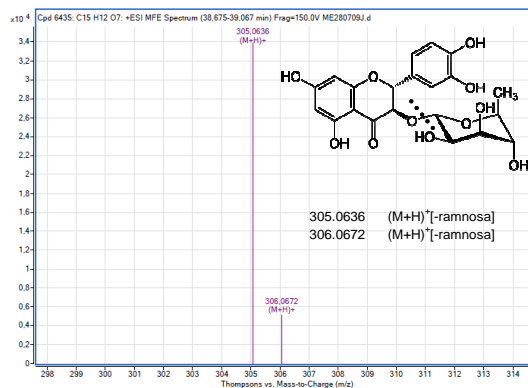
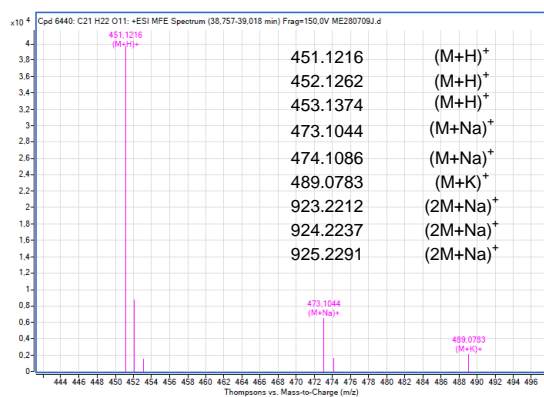


#### n) L'astilbina.

En l'espectre de masses de la mostra podem observar l'ió protonat, el sodiat i el corresponent adducte, i l'ió amb potassi. També es detecta l'ió molecular corresponent a l'aglicona, la dihidroquercitina sense la ramnosa. L'error és de 4.12 ppm i la puntuació de

### Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.

86.2. Tot i no disposar de patró per confirmar la presència de l'astilbina a la mostra, tenim cinc ions que ens permeten corroborar-la.



### **Capítol 3: Estudi sobre els compostos fenòlics presents en el precipitat natural.**

# Conclusions



Leon Roulette, *Wine Country Afternoon*.



## Conclusions

1. El precipitat responsable de l'enterboliment proteic espontani d'un vi blanc de la varietat *Sauvignon Blanc*, conté només un 10 % de proteïna referit al seu pes sec. A més a més, conté quantitats importants de polisacàrids, el 4,5 %, i de compostos fenòlics, el 7 %. La resta del precipitat probablement esta format per matèria no col·loïdal com les sals de l'àcid tartàric.
2. L'anàlisi directe per SDS-PAGE del precipitat espontani, dona lloc a electroferogrames molt poc definits que poden infravalorar la proteïna present. El tractament previ mitjançant FPLC d'exclusió molecular, permet obtenir bandes més intenses i millor definides, probablement degut a que s'eliminen substàncies que interfereixen tant en la migració com en les tincions.
3. L'anàlisi per FPLC d'exclusió molecular del precipitat natural, dona lloc a tres fraccions. El seu anàlisi posterior per SDS-PAGE, mostra que la fracció d'alta massa molecular ( $F_1+F_2$ ) està formada principalment per polisacàrids, mentre que la fracció de baixa massa molecular ( $F_3$ ) conté les proteïnes inestables. La fracció de massa molecular més petita ( $F_4$ ), conté majoritàriament els compostos fenòlics.
4. L'anàlisi per SDS-PAGE ha permès determinar que les proteïnes majoritàries presents en el precipitat natural, tenen una massa molecular entre 18 i 26 KDa. Altres proteïnes presents en menor proporció presenten masses moleculars de 14, 41, 53 i 69 KDa. L'anàlisi per isoelectroenfoc ha permès determinar que totes elles tenen punts isoelectrics baixos, que oscil·len entre 4.2 i 5.0.
5. Malgrat que l'anàlisi de les bandes electroforètiques mitjançant MALDI-TOF/TOF no ha permès identificar algunes de les bandes, s'ha identificat la presència de la VVTL1 (*Vitis vinifera Thaumatin-like protein*), la  $\beta$ -1,3-glucanase i el Ripening-Related Protein Grip22 Precursor.
6. L'aplicació dels diferents tests d'estabilitat per determinar la dosi necessària de bentonita a un mateix vi dona lloc a resultats heterogenis. Així el Bentotest i especialment el test de l'etanol aconsellen dosis més altes i el test del sulfat amònic més baixes que la resta de tests, lo que genera un elevat grau d'incertesa. A més, tots els tests d'estabilitat generen molta més quantitat de precipitat que el procés espontani amb continguts de proteïna, compostos fenòlics i polisacàrids més alts.

## Conclusions

7. Tots els precipitats forçats, excepte el test del calor lent, originen una banda entre 18 i 21 KDa que correspon a la massa molecular de les *Thaumatin-like Protein*, que és d'acord amb els nostres resultats i els descrits a la bibliografia la principal proteïna responsable de l'enterboliment. Per això, el test del calor lent hauria d'ésser desestimat. D'altre banda el test de l'etanol, també hauria de desestimar-se ja que origina una precipitació massiva de polisacàrids.
8. Tots els precipitats forçats, presenten moltes més bandes que el precipitat natural, el que sembla indicar que precipiten moltes de les proteïnes presents en el vi. Tot i això, el test del calor ràpid, es el que produeix un perfil electroforètic més semblant al del precipitat espontani, per la qual cosa sembla ésser el més aconsellable.
9. L'anàlisi per CG-MS i HPLC/ESI-TOF ha permès identificar un total de 13 compostos fenòlics diferents. Específicament per CG-MS, s'han identificat tirosol, catequina i els àcids p-cumàric, cafeic, vanillic, protocatechuic, syringic, gallic ferulic i shikimic. L'anàlisi directe per HPLC/ESI-TOF ha permès incloure també l'éster etílic de l'àcid p-cumàric i quan s'aplica una hidròlisi àcida, la reacció de Bate-Smith, s'han detectat també la quercitina i la cianidina. La presència d'aquest darrer compost indica la presència de proantocianidines en el precipitat natural.
10. El percentatge de compostos fenòlics presents en el precipitat natural, tot i que varia segons la metodologia aplicada en el seu anàlisi, sembla ésser de l'ordre del 6-7 % del seu pes sec. La seva presència en quantitats semblants a les de proteïna (10 %) i la seva marcada afinitat per lligar-se a les proteïnes, suggereix que els compostos fenòlics estiguin implicats en el mecanisme desencadenant de l'enterboliment proteic espontani en vins blancs.

## Annex 1: Materials i Mètodes

- 1)Preparació de la mostra.
- 2)Anàlisi química del precipitat natural.
  - a)Determinació de proteïnes: micro-mètode de Bradford.
  - b)Determinació de polifenols: micro-mètode de Folin-Ciocalteau.
  - c)Determinació de polisacàrids: mètode del fenol-sulfúric.
- 3)Anàlisi elemental orgànica.
- 4)Cromatografia líquida de proteïnes: FPLC.
  - a)Preparació de la mostra: diàlisi i liofilització.
  - b)Cromatografia d'exclusió molecular.
  - c)Cromatografia d'intercanvi catiònic.
- 5)Electroforesis en gel.
  - a)Electroforesis en condicions desnaturalitzants: SDS-PAGE.
  - b)Electroforesis en condicions no desnaturalitzants: Native-PAGE.
  - c)Isoelectroenfoc.
- 6)Tincions.
  - a)Tinció amb plata.
  - b)Tinció amb Coomassie Blue.
  - c)Tinció amb Periòdic Àcid Schiff (PAS).
- 7)Espectrometria de masses: MALDI-TOF/TOF.
- 8)Proves d'estabilitat en vins blancs.
- 9)Selecció de la dosi de bentonita necessària per estabilitzar el vi blanc.
- 10)Extracció en fase sòlida dels compostos fenòlics del vi i del precipitat.
- 11)Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses: CG/MS.
  - a)Derivatització de la mostra
  - b)CG/MS
- 12)HPLC/ESI-TOF.

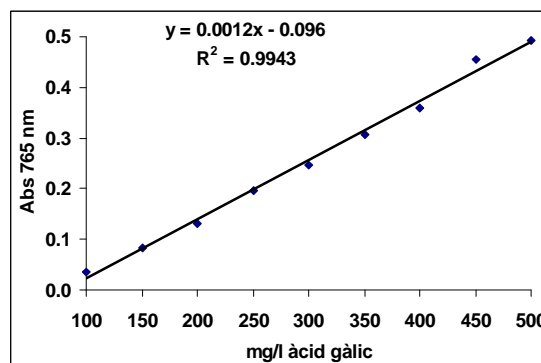


## Annex 1: Materials i Mètodes.

### b) Determinació de polifenols: micro-mètode de Folin-Ciocalteu.

La determinació de polifenols es va realitzar mitjançant el micro-mètode de Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer i Lamuela-Raventós, 1999). El reactiu de Folin-Ciocalteu es guarda a la nevera, i per a l'assaig es necessari temperar-lo abans de procedir a la determinació de polifenols. Directament a la cubeta espectrofotomètrica s'hi posa 790 µl d'aigua MilliQ, s'hi afegeix 10 µl de mostra i 50 µl del reactiu Folin-Ciocalteu. La barreja s'agita fins aconseguir una solució homogènia i es deixa a temperatura ambiental durant 10 min. Tot seguit s'afegeix 150 µl de carbonat de sodi al 20% (p/v) i es vortexa fins aconseguir una solució homogènia. Es deixa durant 2 h a temperatura ambiental i es llegeix l'absorbància a 765 nm.

El reactiu de Folin-Ciocalteu consisteix en una solució d'àcid fosfotúngstic i fosfomolibdic, aquests àcids es redueixen per oxidació dels polifenols de la mostra a òxid de tungstè i de molibdè respectivament. Aquests òxids presenten un màxim d'absorbància a 765 nm, essent l'augment d'absorbància directament proporcional a la concentració de polifenols present a la mostra. S'observa un canvi de coloració de groc (reactiu de Folin-Ciocalteu) a blau turquesa (òxids de tungstè i de molibdè).

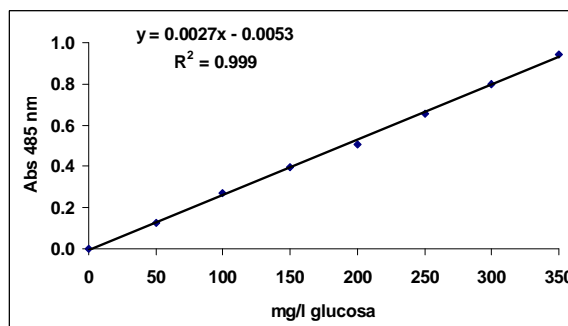


Per a la seva quantificació es realitza una recta patró amb àcid gàlic que es mostra a continuació.

### c) Determinació de polisacàrids: mètode del fenol-sulfúric.

La determinació de polisacàrids es va realitzar pel mètode del fenol-sulfúric (Segarra, Lao, López-Tamames i De la Torre-Boronat, 1995). Directament a la cubeta espectrofotomètrica s'hi posa 1 mL d'àcid sulfúric, s'hi afegeix 0.1 mL de mostra i s'agita vigorosament amb el vòrtex. Tot seguit s'hi afegeix 0.1 mL de la solució de fenol 18% (p/v) en etanol. Es torna a agitar vigorosament la mostra amb el vòrtex i es deixa durant 30 min a temperatura ambiental. Tot seguit es mesura l'absorbància a 485 nm.

En medi àcid fort els polisacàrids presents a la mostra s'hidrolitzen donant lloc als respectius monosacàrids, els quals en medi àcid es deshidraten donant lloc a les formes furfural i hidroximetilfurfural. Aquests reaccionen amb el fenol i s'obté un hemiacetal acolorat que absorbeix a 485 nm, essent l'augment d'absorbància directament proporcional a la concentració de hexoses i pentoses present a la mostra. S'observa un canvi de coloració de transparent a taronja-marró. Per a la seva quantificació es realitza una recta patró amb glucosa que es mostra a continuació.



## Annex 1: Materials i Mètodes.

### 3) Anàlisi elemental orgànica.

L'anàlisi elemental és una tècnica que ens proporciona el contingut total de carboni, hidrogen, nitrogen i sofre present en un ampli rang de mostres de naturalesa orgànica i inorgànica, tant sòlides com líquides. La tècnica està basada en la completa i instantània oxidació de la mostra, mitjançant una combustió amb oxigen pur a una temperatura aproximada de 1.020 °C. Els diversos productes de combustió, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O i N<sub>2</sub>, són transportats mitjançant el gas portador (Heli) a través d'un tub de reducció i, després, selectivament separats en columnes específiques, per a ser després desadsorbits tèrmicament. Finalment, els gasos passen de forma separada per un detector de conductivitat tèrmica, aquest ens proporciona un senyal proporcional a la concentració de cadascun dels components individuals de la barreja.

El precipitat obtingut després de la centrifugació del vi inestable, es liofilitza i es realitza l'anàlisi elemental mitjançant un analitzador elemental orgànic, proveït amb un cromatògraf de gasos i un detector de conductivitat tèrmic (Thermo Quest 1108, Carlo Erba, Milà, Itàlia). Els resultats obtinguts es representen com a mg de C, N, H o S per mg de precipitat. Per conèixer els mg de precipitat, es pesa l'ependorf buit i amb el precipitat liofilitzat, la diferència de pesada ens dona els mg de precipitat.

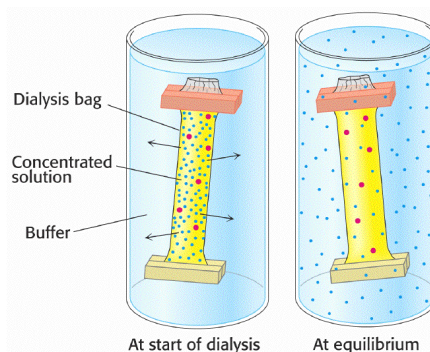
### 4) Cromatografia líquida de proteïnes: FPLC.

La separació de proteïnes per cromatografia líquida s'ha realitzat amb l'equip Smart System equipat amb un detector  $\mu$ -peak (Pharmacia Biotech). Consisteix en dues bombes (de pressió màxima 2.5 MPa) que permeten treballar en mode isocràtic o en gradient, una cambra de barreja, un injector automàtic de volum variable, un suport mòbil per a la columna, una cel·la de detecció, un conductímetre i un col·lector de fraccions. Està dotat d'un sistema de control de temperatura que permet treballar a qualsevol temperatura compresa entre 4 °C i la temperatura ambient. En el nostre cas s'ha escollit una temperatura de separació de 20 °C. El detector és per a UV-visible, amb un rang de longituds d'ona que va de 190 a 600 nm, i està connectat a la cel·la de mesura mitjançant un cable de fibra òptica, es poden llegir tres longituds d'ona a la vegada. Les longituds d'ona que s'han seleccionat han estat 280 i 320 nm. Les dades es recullen en un ordinador, juntament amb els valors de conductivitat, temperatura, pressió de treball i flux de cada bomba.

#### a) Preparació de la mostra: diàlisis i liofilització.

El vi conté una baixa concentració en proteïna, per això les mostres de vi abans i després de la precipitació natural se'ls ha aplicat el següent tractament previ a l'anàlisi per cromatografia líquida (Canals et al., 1998).

En el cas del precipitat no ha estat necessari realitzar aquest tractament de la mostra per l'anàlisi per exclusió molecular, pel contrari, s'ha aplicat la tècnica de la diàlisis per poder eliminar les sals de fosfat abans de realitzar l'anàlisi per intercanvi catiònic.



## Annex 1: Materials i Mètodes.

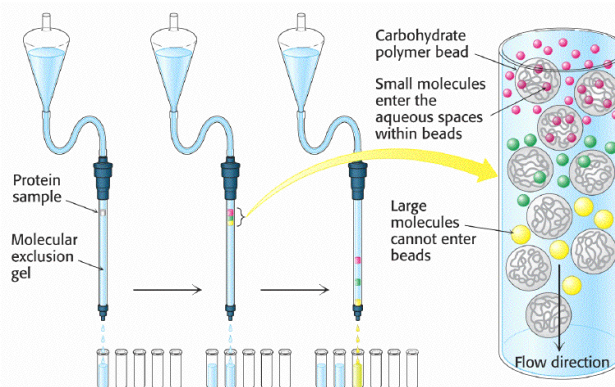
La diàlisi permet eliminar les substàncies presents en el vi amb una massa molecular inferior a 3.5 KDa, com són l'etanol, els sucres, el glicerol, alguns pèptids i aminoàcids, certs polifenols i oligosacàrids entre d'altres, mentre que els col·loides, polisacàrids i proteïnes, quedaran retinguts dintre del sac de diàlisi. La diàlisi és un tècnica de separació de la mostra amb finalitat sobretot preparativa.

El vi es centrifuga a 6.000 g, durant 6 min, a una temperatura de 4 °C. S'omplen tres sacs de diàlisi amb 30 mL de vi i se sotmeten a diàlisi (72 h, 4 °C) front a aigua MilliQ, que es va renovant regularment. Per a la diàlisi s'utilitzen sacs de membrana de cel·lulosa (Sigma) amb un tall de massa molecular de 3.5 kDa.

Després de la diàlisi ens cal concentrar la mostra i per això utilitzarem la tècnica de la liofilització. El contingut dels sacs de diàlisi es buida en una placa petri i es liofilitza (Christ-Alpha 1-4, Bräun Biotech). Per poder treballar més còmodament, es dissol el liofilitzat en 1.5 mL d'aigua destil·lada, es posa en un eppendorf i es torna a liofilitzar. Les mostres es guarden a -20 °C fins el moment d'analitzar-les.

### b) Cromatografia d'exclusió molecular.

Les molècules se separen en diferents fraccions, en funció de la seva massa molecular, sobre un gel format per una matriu de dextrà i un entrecreuament d'agarosa al 12%. El perfil d'elució s'obté mitjançant el seguiment continu de la densitat òptica a 280 i 320 nm. S'ha treballat amb una columna Superdex 75 PC 3.2/30, de 2.4 mL de volum total, empaquetada amb Superdex 75; el diàmetre de partícula és de



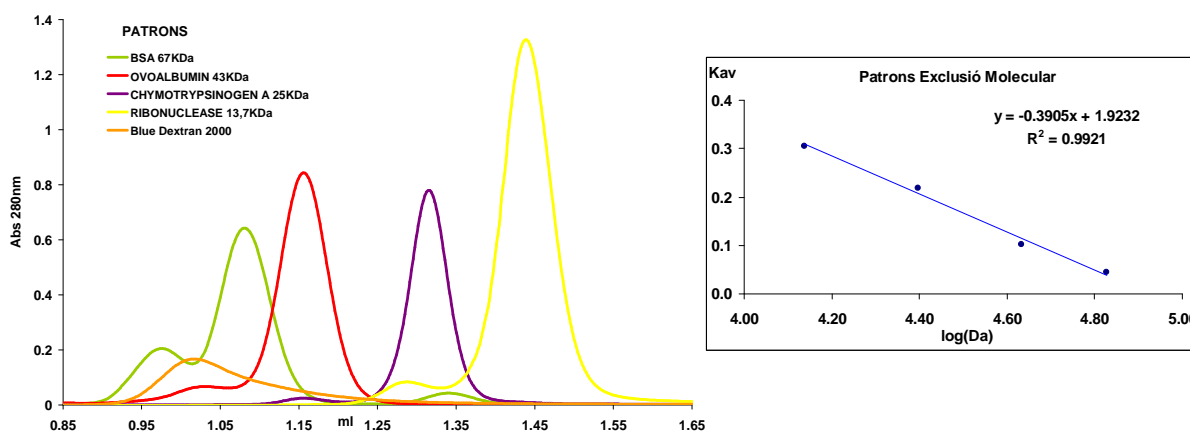
13 µm aproximadament, amb un volum d'exclusió de 100 kDa i un rang òptim de separació entre 3 i 70 kDa. La columna permet treballar a un flux de 100 µl/min, sempre que no se superi la pressió màxima de 2.4 MPa. El llaç d'injecció és de 50 µl de capacitat, i el flux d'elució és de 40 µl/min. El tampó utilitzat ha estat acetat d'amoni 0.3 M (pH 6.80), filtrat per 0.22 µm.

El calibrat de la columna s'ha realitzat per triplicat amb proteïnes de massa molecular coneguda: ribonucleasa A (13.7 kDa), quimotripsinògen A (25 kDa), ovoalbúmina (43 kDa) i seroalbúmina bovina (67 kDa). La relació entre el logaritme de la massa molecular i el volum d'elució és lineal, ajustant-se pel mètode de mínims quadrats. El volum d'exclusió es determina amb blau dextrà (massa molecular més gran de 2.000 kDa). A la pàgina següent es mostra la recta de calibrat i el cromatograma obtingut en la separació per separat dels diferents patrons.

Les mostres liofilitzades del vi abans i després de la precipitació natural es van dissoldre en 1.2 mL d'acetat d'amoni 0.3 M (pH 6.80). El precipitat es va liofilitzar i es va dissoldre en un volum adequat de solució d'acetat d'amoni 0.3 M (pH 6.80) per tal d'obtenir una concentració final de proteïna de 0.25 µg/µl. Les mostres es van centrifugar durant 5 min a 12.000 g i 4 °C, el sobrenedant

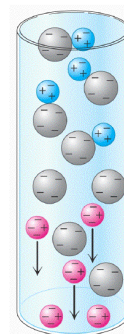
## Annex 1: Materials i Mètodes.

es va utilitzar directament per a l'anàlisi. Les diferents fraccions del precipitat s'han recollit en eppendorfs per la seva posterior liofilització i anàlisi mitjançant electroforesis en gel.



### c) Cromatografia d'intercanvi catiònic.

La separació i el fraccionament de les molècules es fa en funció de la seva càrrega elèctrica. En aquest cas la matriu de la columna està formada per un gel que presenta grups sulfonat ( $\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ ) que actuen com a intercanviadors forts de cations. Es troba fixat en forma de perletes a sobre d'un polímer hidròfil. Totes les molècules que presentin una càrrega neta positiva al pH de treball (en aquest cas serà pH 2.0), com ara les proteïnes, seran retingudes pel gel. L'elució s'efectua augmentant la força iònica del tampó, mitjançant un gradient salí continu de tres rampes. S'ha utilitzat la Columna Pharmacia MonoQ PC 1.6/5 (1,6mm x 50mm), el tampó inicial és àcid acètic 50 mM (pH 2.0) i el tampó d'elució correspon al tampó inicial amb NaCl 1 M. La columna s'equilibra amb 0.5 mL d'aquest mateix tampó inicial (100  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) i, quan s'injecta la mostra, es baixa el flux a 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  per assegurar l'adhesió de tota la proteïna a la columna. Després de la injecció, es treballa a un flux constant de 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  fins al final de la separació. S'aplica el gradient que es mostra a la taula adjunta. L'anàlisi es monitoritza a 280 i 320 nm.



Volum (ml)	Funció
0-0,5	Equilibrat
0,5-1	Injectar mostra
1-1,5	Gradient 0 a 5%
1,5-3,3	Gradient 5 a 30%
3,3-4	Gradient 30 a 100%
4-4,3	Neteja de la columna
4,3-4,8	Equilibrat

Les mostres liofilitzades del vi abans i després de la precipitació natural es van dissoldre en 1.2 mL de tampó inicial (àcid acètic 50 mM pH 2.0). El precipitat dialitzat, es va liofilitzar i es va dissoldre en un volum adequat de tampó inicial per tal d'obtenir una concentració de proteïna de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Les mostres es van centrifugar durant 5 min a 12.000 g i 4  $^{\circ}\text{C}$ , el sobrenedant es va utilitzar directament per a l'anàlisi.

### 5) Electroforesis en gel.

Els gels d'electroforesis s'utilitzen per a separar proteïnes en funció de les seves característiques físiques com la mida, la forma o el seu punt isoelectric. Els gels d'electroforesis són normalment realitzats amb propòsits analítics, però també tenen molta utilitat com a tècnica



## Annex 1: Materials i Mètodes.

preparativa per a purificar parcialment les proteïnes abans d'emprar altres tècniques, com l'espectrometria de masses o les transferències immunològiques per a la posterior caracterització.

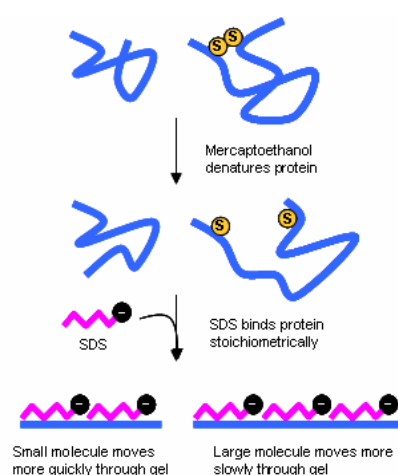
El gel que s'utilitza és un polímer entrelaçat d'acrilamida i poliactilamida amb una determinada densitat de porus, amb aspecte semblant a la gelatina que permetrà el pas del components. Per separar les molècules s'utilitza una força electromotriu (FEM) que empeny les molècules a través de la matriu de gel; col·locant les molècules en els pouets dels gels i aplicant-hi un corrent elèctric les molècules es mouran a través de la matriu a diferents velocitats, cap a l'ànode si està carregada negativament o cap al càtode si està carregada positivament, cal fer notar que el gel d'electroforesis opera com a una cèl·lula electrolítica i que per tant l'ànode és positiu i el càtode negatiu.

Les bandes dels diferents carrils que quan deixen de ser sotmeses al corrent estan a la mateixa distància de l'inici, contenen molècules que han passat a través del gel a la mateixa velocitat, cosa que habitualment ve a significar que tenen les mateixes propietats. La separació incompleta dels components pot conduir a bandes sobreposades o a *smears* indistingibles, representant múltiples components no caracteritzats. Hi ha diversos marcadors disponibles en el mercat que contenen una barreja de molècules amb propietats conegudes. Si un d'aquests marcadors ha corregut en el seu carril paral·lelament a una mostra, llavors es pot dir que tenen la mateixa massa molecular (quan la electroforesis es realitza en condicions desnaturalitzants). En cas que la mostra estigui en posició intermitja entre marcadors, es pot aproximar la seva massa mitjançant una recta de regressió de les distàncies del marcador i interpolant-ne la distància de la mostra. La distància a la que viatja una banda és aproximadament inversament proporcional al logaritme de la mida de la molècula. La separació s'ha realitzat en l'equip Phast System (Pharmacia, Uppsala, Suècia).

### a) Electroforesis en condicions desnaturalitzants: SDS-PAGE.

Les proteïnes són desnaturalitzades en presència de SDS (sodium dodecyl sulfate) que cobreix la proteïna amb una càrrega negativa. Generalment, la quantitat d'enllaços amb el SDS està relacionada amb la mida de la proteïna, de manera que les proteïnes desnaturalitzades resultants tenen una càrrega total negativa i una proporció massa/càrrega similar. En aquestes condicions les diferències de velocitat entre proteïnes es deuen bàsicament a la mida, no a la càrrega ni a la seva forma tridimensional.

El precipitat, així com les seves fraccions obtingudes per cromatografia d'exclusió molecular s'han liofilitzat i s'han dissolt en un solució tampó que contenia 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% de glicerol i 0.002% de bromofenol blau. Les mostres dissoltes en el tampó d'electroforesis es bullen durant cinc minuts i ja estan llestes per ser aplicades en els gels. La concentració de proteïna final ha estat diferent en funció de la tinció que s'ha utilitzat, ja que cada tinció presenta una determinada sensibilitat; 100 ng/ $\mu$ l per a la tinció amb nitrat de plata i 500 ng/ $\mu$ l per a la tinció amb Coomassie Blue R-250 i amb Periòdic Àcid Schiff.



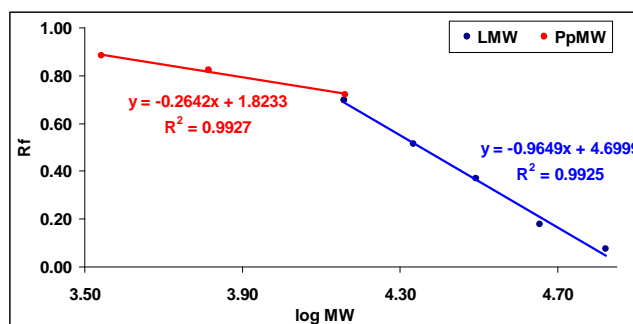
## Annex 1: Materials i Mètodes.

El gel utilitzat per separar les proteïnes en condicions desnaturalitzants ha estat PhastGel Homogeni 20 (Pharmacia, Uppsala, Suècia), aquest gel té aproximadament 0.45 mm de gruix i conté tampó Tris-acetat 0.112 M a pH 6.5. En la separació s'han utilitzat PhastGel SDS-PAGE Buffer Strips que contenen 0.2 M de tricina, 0.2 M de Tris i 0.55% de SDS a pH 8.1. El programa utilitzat en la separació de les proteïnes en condicions desnaturalitzants és el següent i està especificat en la Tècnica de Separació de PhastSystem No.111 (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990) del Phast System.

SAMPLE APPL.	DOWN AT	3.2	0 Vh
SAMPLE APPL.	UP AT	3.3	0 Vh
SEP 3.1	250 V 10 mA	3.0 W 15 °C	1 Vh*
SEP 3.2	250 V 1 mA	3.0 W 15 °C	1 Vh
SEP 3.3	250 V 10 mA	3.0 W 15 °C	99 Vh

\* For continuous buffer separations, pre-run for 60 Vh in step 1.

S'han utilitzat dues solucions de patrons amb massa molecular coneguda, una d'ells conté proteïnes de baixa massa molecular i l'altra conté polipèptids (ref. 161-0304 i ref. 161-0326, Biorad, Hercules, CA, els USA). La solució amb els estàndards de baixa massa molecular (LMW) conté fosforilasa b (97400 Da), seroalbúmina (66200 Da), ovoalbúmina (45000 Da), anhidrasa carbònica (31000 Da), inhibidor de tripsina de soja (21500 Da) i lisozima (14400 Da). La solució amb els polipèptids (PpMW) conté triosafosfat isomerasa (26625 Da), mioglobina (16950 Da),  $\beta$ -lactoalbúmina (14437 Da), aprotinina (6512 Da), la cadena b oxidada de la insulina (3496 Da) i bacitracina (1423 Da). Aquestes solucions d'estàndards ens permetran calcular la massa molecular de les bandes electroforètiques obtingudes en les diferents mostres a partir de les corresponents rectes de calibrat, així sabent el recorregut electroforètic (Rf) de la banda podem conèixer la seva massa molecular. Aquestes són les rectes de calibrat utilitzades.



### b) Electroforesis en condicions no desnaturalitzants: Native-PAGE.

En condicions no desnaturalitzants les proteïnes tenen diferents càrregues i formes complexes, de manera que no migraran en els gels a similars velocitats, en aquest cas la separació té lloc en funció de la càrrega, el tamany i la seva estructura quaternària.

El precipitat, així com les seves fraccions obtingudes per cromatografia d'exclusió molecular, s'han liofilitzats i s'han dissolt en aigua MilliQ, les mostres ja estan llestes per ser aplicades al gel. La concentració de proteïna final ha estat diferent en funció de la tinció que s'ha utilitzat; 100 ng/ $\mu$ l per a la tinció amb nitrat de plata i 500 ng/ $\mu$ l per a la tinció amb Coomassie Blue R-250 i amb Periòdic Àcid Schiff.

El gel utilitzat per separar les proteïnes en condicions no desnaturalitzants ha estat PhastGel Homogeni 20 (Pharmacia, Uppsala, Suècia), aquest gel té aproximadament 0.45 mm de gruix i conté tampó Tris-acetat 0.112 M a pH 6.5. En la separació s'han utilitzat PhastGel Native Buffer Strips que contenen 0.88 M L-alanina i 0.25 M de Tris a pH 8.8. El programa utilitzat en la separació de les proteïnes en condicions no desnaturalitzants és el següent i està especificat en la Tècnica de

## Annex 1: Materials i Mètodes.

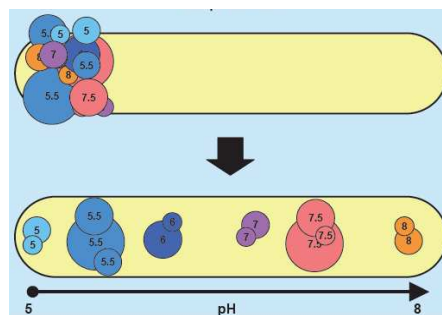
Separació de PhastSystem No.111 (Pharmacia LKB Biotecnology, 1990) del Phast System. En aquesta tècnica no es utilitzen estàndards i per això les bandes electroforètiques s'identifiquen amb el seu recorregut electroforètic (Rf).

SAMPLE APPL. DOWN AT	3.2	0 Vh
SAMPLE APPL. UP AT	3.3	0 Vh
SEP 3.1	250 V 10 mA	3.0 W 15 °C 1 Vh*
SEP 3.2	250 V 1 mA	3.0 W 15 °C 1 Vh
SEP 3.3	250 V 10 mA	3.0 W 15 °C 99 Vh

\* For continuous buffer separations, pre-run for 60 Vh in step 1.

### c) Isoelectroenfoc.

L'isoelectroenfoc és una tècnica ideal per separar molècules amfòteres, com poden ser les proteïnes segons el seu punt isoelèctric. Es realitza un gradient de pH mitjançant un camp elèctric per tampons amfotèrics, en què la regió de l'ànode és la regió més àcida i la regió del càtode la regió més bàsica, o per gradients immobilitzats en què el propi gel té grups tamponadors. Les substàncies amfòteres que es trobin en una regió en què el pH estigui per sota del seu punt isoelèctric tindran tendència a anar cap a la regió més bàsica i, per tant, es desplaçaran cap al càtode; les substàncies que es trobin en una regió amb un pH per sobre del seu punt isoelèctric tindran tendència a anar cap a la regió més àcida i, per tant, es desplaçaran cap a l'ànode. Les molècules amfòteres quedaran aturades quan la seva càrrega neta esdevingui 0, i això passarà quan el pH sigui igual al seu punt isoelèctric.



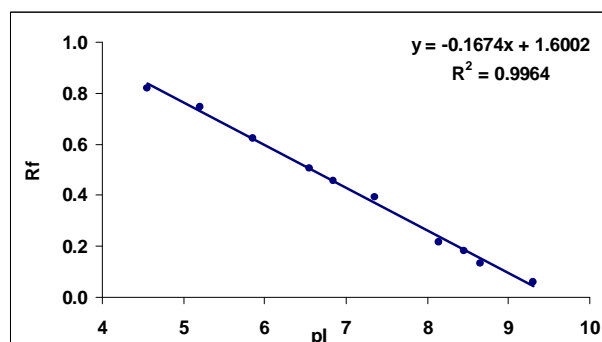
El precipitat, així com les seves fraccions obtingudes per cromatografia líquida d'exclusió molecular s'han liofilitzat i s'han dissolt en aigua MilliQ, les mostres ja estan llestes per ser aplicades al gel. La concentració de proteïna final ha estat diferent en funció de la tinció que s'ha utilitzat; 100 ng/µl per a la tinció amb nitrat de plata i 500 ng/µl per a la tinció amb Coomassie Blue R-250 i amb Periòdic Àcid Schiff.

El gel utilitzat en la separació per isoelectroenfoc és PhastGel IEF 3-9 (Pharmacia, Uppsala, Suècia), aquest conté entre un 2 i un 6% de l'amfòlit Pharmalyte™. El programa utilitzat en la separació de les proteïnes per isoelectroenfoc és el següent i està especificat en la Tècnica de Separació de PhastSystem Núm. 100 (Pharmacia LKB Biotecnology, 1990).

Per a la determinació del punt isoelèctric s'ha utilitzat una solució d'estàndards de punt isoelèctric que conté amiloglucosidasa (pI 3.50), vermell de metil (pI 3.75), inhibidor de tripsina de soja (pI 4.55), β-lactoglobulina A (pI 5.20), anhidrasa carbònica B humana (pI 5.85),

SAMPLE APPL. DOWN AT	1.2	0 Vh
SAMPLE APPL. UP AT	1.3	0 Vh
EXTRA ALARM TO SOUND AT	1.1	73 Vh
SEP 1.1	2000 V 2.5 mA	3.5 W 15°C 75 Vh
SEP 1.2	200 V 2.5 mA	3.5 W 15°C 15 Vh
SEP 1.3	2000 V 2.5 mA	3.5 W 15°C 410 Vh

The run takes 500 Vh or approximately 30 minutes. The prefocusing step takes approximately 10 minutes.



## Annex 1: Materials i Mètodes.

anhidrasa carbònica B bovina (pI 6.55), mioglobina àcida de cavall (pI 6.85), mioglobina bàsica de cavall (pI 7.35), lectina àcida de llenties (pI 8.15), lectina de llenties (pI 8.45), lectina bàsica de llenties (pI 8.65) i tripsinogen (pI 9.30) (ref. 17-0471-01, GE Bio-Sciences AB, Uppsala, Suècia). A partir d'aquests estàndards també s'ha realitzat un calibrat de pI, així a partir del recorregut electroforètic (Rf) de les bandes obtingudes per a cada mostra s'ha pogut conèixer el pI corresponent.

### 6) Tincions.

Després de la separació electroforètica, les proteïnes poden ser tenyides per a fer-les visibles, normalment s'utilitza la tinció de plata o el blau de Coomassie. Per a la detecció de les glicoproteïnes s'utilitza la tinció de l'àcid Periòdic o també coneguda com tinció de Schiff. Totes aquestes tincions es poden utilitzar tan en SDS-PAGE, Native-PAGE com en isoelectroenfoc.

#### a) Tinció amb plata.

La fixació de les proteïnes en el gel és el primer pas en els protocols de la tinció de plata. La solució de fixació conté un àcid, acètic o tricloroacètic. Aquest tractament àcid, deixa insolubles les macromolècules en el gel tot impedit la seva difusió. Pel contrari, les substàncies que interfereixen en la tinció de plata com són el tampó, els ions, els desnaturalitzants, els detergents o els amfòlits de transport seran eliminats del gel.

La segona etapa dels protocols de tinció de plata és la sensibilització. La solució de sensibilització conté reactius que químicament modifiquen proteïnes, tot augmentant la sensibilitat per reaccionar amb els ions de plata, i reactius que acceleren la reducció de l'ió plata (solució de tinció). Aquesta solució conté glutaraldehyd, que reacciona covalentment amb la proteïna cobrint-la amb grups aldehyd que poden reaccionar amb la plata, tot augmentat la sensibilitat davant de l'ió plata. A més, el glutaraldehyd també afavoreix la formació d'enllaços entre les proteïnes tot reforçant-ne la seva fixació en el gel. També conté tiosulfat de sodi que té una doble missió; serveix com a font d'ió sulfur que reacciona directament amb l'ió plata tot accelerant i realçant el revelat, i també forma un complex amb l'ió plata lliure que evita la seva reducció a argent metàl·lic tot reduint la tinció de fons. El reactiu de sensibilització ocasionen un nivell alt de tinció de fons, així el gel es renta minuciosament amb aigua MilliQ després del pas de sensibilització per tal d'eliminar les restes de la solució sensibilitzadora i així poder obtenir un fons net.

La següent etapa ja és la de tinció amb plata, el gel es tracta amb nitrat d'argent. Les condicions suaument àcides de la solució de tinció, eviten que l'ió de plata es redueixi a argent metàl·lic. El gel es renta breument amb MilliQ després d'aquest pas per netejar l'excés de solució de tinció de la superfície de gel.

La solució de revelat permet observar les bandes en les que s'ha dipositat l'ió plata per reacció amb les proteïnes. Aquesta solució conté formaldehyd, que redueix l'ió plata a argent metàl·lic mentre que ell s'oxida a àcid fòrmic. Aquesta reacció només es dona a pH bàsic i per això la solució de revelat conté el carbonat de sodi, que ofereix un pH de 12 propiciant una òptima reacció de revelat.

Quan ja s'han revelat les bandes de proteïna, s'ha de parar el procés de revelat per evitar obtenir un gel amb el fons negre, i la solució stop n'evita la continuació. S'utilitza el Na<sub>2</sub>-EDTA com a

## Annex 1: Materials i Mètodes.

quelant dels ions de plata lliures i així n'evita la seva reducció.

La solució de conservació conté glicerol, que impedeix al gel esquerdar-se.

Els reactius utilitzats es van preparar segons Plus One Silver Stain Kit Protein Instructions (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990) i es mostren a continuació. Els protocols utilitzats per a la tinció de plata es mostren a continuació i es descriuen a Amersham Biosciences Automated Staining of Polyacrylamide Gels with Processor Plus (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990). També es mostra el protocol que es va seguir en la tinció de plata compatible amb espectrometria de masses (Yan et al., 2000), aquesta tinció divergeix principalment en el procés de fixació de les proteïnes al gel.

1. Protocol de tinció de plata en SDS-PAGE				2. Protocol de tinció de plata en Native-PAGE			
	Solució	temps	Reactius		Solució	temps	Reactius
1	Fixació	30 min	Etanol 30% Àcid Acètic 10%	1a	Fixació	30 min	Àcid Tricloroacètic 20 %
2	Sensibilització	30 min	Etanol 30 % Acetat de Sodi 6.8 % Tiosulfat de Sodi 0.2 % Glutaraldehyd 0.125 %	1b	Fixació	20 min	Etanol 30% Àcid Acètic 4 %
3	Rentat	3 x 5 min	MilliQ	2	Sensibilització	30 min	Etanol 30 % Acetat de Sodi 6.8 % Tiosulfat de Sodi 0.2 % Glutaraldehyd 0.125 %
4	Tinció	20 min	Nitrat de plata 0.25 % Formaldehid 0.015 %	3	Rentat	4 x 5 min	MilliQ
5	Rentat	2 x 1 min	MilliQ	4	Tinció	20 min	Nitrat de plata 0.5 %
6	Revelat	4-6 min	Carbonat de Sodi 2.5 % Formaldehid 0.023 %	5	Rentat	2 x 1 min	MilliQ
7	Stop	10 min	EDTA-Na <sub>2</sub> 1.46 %	6	Revelat	4-6 min	Carbonat de Sodi 2.5 % Formaldehid 0.023 %
8	Rentat	3 x 5 min	MilliQ	7	Stop	10 min	EDTA-Na <sub>2</sub> 1.46 %
9	Conservació	20 min	Glicerol 8.7 %	8	Rentat	3 x 5 min	MilliQ
				9	Conservació	20 min	Glicerol 8.7 %
3. Protocol de tinció de plata en IEF-PAGE				4. Protocol de tinció de plata en SDS-PAGE / MS			
	Solució	temps	Reactius		Solució	temps	Reactius
1a	Fixació A	20 min	Àcid Tricloroacètic 20 %	1	Fixació	30 min	Metanol 50% Àcid Acètic 5%
1b	Fixació B	15 min	Etanol 10% Àcid Acètic 5%	1b	Rentat	15 min	Metanol 50% MilliQ
1b	Fixació B	15 min	Etanol 10% Àcid Acètic 5%	1c	Rentat	15 min	MilliQ
2	Sensibilització	20 min	Etanol 30 % Acetat de Sodi 6.8 % Tiosulfat de Sodi 0.2 % Glutaraldehyd 0.125 %	2	Sensibilització	1 min	Tiosulfat de Sodi 0.01 % MilliQ
1b	Fixació B	10 min	Etanol 10% Àcid Acètic 5%	3	Rentat	2 x 1 min	MilliQ
1b	Fixació B	20 min	Etanol 10% Àcid Acètic 5%	4	Tinció	20 min	Nitrat de plata 0.1 % MilliQ
3	Rentat	2 x 5 min	MilliQ	5	Rentat	2 x 1 min	MilliQ
4	Tinció	20 min	Nitrat de plata 0.25 %	6	Revelat	4-6 min	Carbonat de Sodi 2 % Formaldehid 0.04 % Àcid Acètic 5 %
5	Rentat	2 x 1 min	MilliQ	7	Fixació	5 min	Àcid Acètic 1 %, 4°C
6	Revelat	4-6 min	Carbonat de Sodi 2.5 % Formaldehid 0.023 %	8	Conservació		
7	Stop	10	EDTA-Na <sub>2</sub> 1.46 %				
8	Rentat	3 x 5 min	MilliQ				
9	Conservació	20 min	Glicerol 8.7 %				

### b) Tinció amb Coomassie Blue.

Es prepara una solució inicial amb una concentració de Coomassie 0.2 %. EL Coomassie es presenta en pastilles, es dissol una pastilla de Coomassie Blue en 80 mL de MilliQ i s'agita durant 10 min, tot seguit s'afegeix 120 mL de metanol i s'agita durant 5 min, finalment es filtra. A partir d'aquesta solució prepararem la solució de tinció.

Els reactius utilitzats es van preparar segons Fast Coomassie Staining Development Technique File No. 200 (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990) i es mostren a continuació. Els

## Annex 1: Materials i Mètodes.

protocols utilitzats per a la tinció amb Coomassie Blue R-250 es mostren a continuació i es descriuen a Amersham Biosciences Automated Staining of Polyacrylamide Gels with Processor Plus (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990).

### Protocol de tinció de Coomassie Blue en totes les tècniques

	Solució	temps	Reactius
1a	Fixació	20 min	(En IEF Àcid Tricloroacètic 20 %)
1b	Fixació	30 min	Metanol 40 % Àcid Acètic 5 %
2	Revelat	2 min	Metanol 30 % Àcid Acètic 10 %
3	Tinció	60 min	Coomassie Blue 0.02% Metanol 30 % Àcid Acètic 10 % (Afegir CuSO <sub>4</sub> 0.1 % en IEF )
4	Revelat	10 min	Metanol 30 % Àcid Acètic 10 %
5	Revelat	30 min	Metanol 30 % Àcid Acètic 10 %
6	Revelat	30 min	Metanol 30 % Àcid Acètic 10 %
7	Revelat	120 min	Metanol 30 % Àcid Acètic 10 %
8	Conservació	30 min	Glicerol 10 %

El protocol que es va seguir en la tinció de Coomassie compatible amb espectroscòpia de masses es descriu a continuació; la solució de tinció s'aplica durant 1 hora i conté solució de Coomassie al 0.1 % i metanol al 50 %, la solució de revelat conté metanol al 40 %. Aquesta solució es canvia entre 3-4 cops, al principi amb més freqüència ja que agafa una tonalitat blavosa més ràpid, en canvi els dos últims passos es poden allargar fins 2 hores perfectament. Els resultats milloren si una vegada que s'observen les bandes es retira la solució de revelat i es deixa en aigua MilliQ durant un dia.

### c) Tinció amb Periòdic Àcid Schiff (PAS).

La tinció de glicoproteïnes amb l'àcid periòdic Schiff (PAS) es realitza segons les instruccions de Sigma Glycoprotein Detection Kit (SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA). Aquest kit permet la detecció dels motius de sucre presents a les glicoproteïnes, així com els polisacàrids, i es pot utilitzar en totes les tècniques electroforètiques. El kit conté tres solucions, la d'oxidació, la de reducció i la que conté el reactiu de Schiff i es preparen segons les especificacions del kit. La Solució de fixació consisteix en metanol al 50% i la solució de conservació conté Àcid Acètic al 5 %. El passos que es segueixen en el procés de tinció es mostren a continuació.

Steps	Volumes		Time for gel thickness 0.5-0.75 mm or for membrane	Time for gel thickness 1.0-1.5 mm
	Size 16 x 18 cm	Size 8 x 10 cm		
1. Fixing	400 ml	200 ml	30 minutes	60 minutes
2. Washing	400 ml	200 ml	2 x 10 minutes	2 x 20 minutes
3. Oxidation	200 ml	100 ml	30 minutes	60 minutes
4. Washing	400 ml	200 ml	2 x 10 minutes	2 x 20 minutes
5. Staining	200 ml	100 ml	1-2 hours or until bands turn magenta	1-2 hours or until bands turn magenta
6. Reduction	200 ml	100 ml	60 minutes	120 minutes
7. Washing	400 ml	200 ml	Band color will intensify with changes of fresh water	Band color will intensify with changes of fresh water
8. Storage	400 ml	400 ml	overnight	overnight

## Annex 1: Materials i Mètodes.

### 7) Espectrometria de masses: MALDI-TOF/TOF.

Després d'aplicar les diferents tècniques electroforètiques (SDS-PAGE, Native-PAGE o isoelectroenfoc), amb la tinció de plata o de Coomassie Blue compatible amb espectrometria de masses, té lloc la digestió trípica de les bandes de proteïna obtingudes segons els protocols descrits més endavant (Shevchenko et al., 1996). Tot seguit es realitza l'anàlisi de les bandes mitjançant espectrometria de masses amb el Maldi-TOF/TOF, i s'obté un espectre de masses característic de cada analit, el qual s'introdueix a una base de dades i ens permet fer la identificació de la proteïna en concret.

Per tal d'obtenir les bandes dels gels, aquestes es tallen amb un bisturí i es separen del gel amb una punta de pipeta retallada, seguidament es dipositen en un eppendorf. Tot seguit es realitzen 2 rentats amb aigua MilliQ durant 10 min.

En les bandes obtingudes per tinció de plata es realitza un destenyit d'aquestes durant 10 min amb la solució de destenyit (ferrocianur potàssic 9.9 mg/mL, i tiosulfat sòdic 24.8 mg/mL). Seguidament es renten les bandes amb aigua MilliQ per tal d'eliminar la solució de destenyit. Tot seguit es dóna la deshidratació mitjançant acetonitril durant 5 min. Aquesta operació es realitza dos cops i el gel queda més o menys blanc. S'asseca la banda al buit en una centrífuga *Speed-Vac*. El següent pas és la reducció i alquilació de la proteïna. Es cobreixen les bandes amb una solució 10 mM amb DTT en bicarbonat amònic 25 mM durant 30 min a 56°C. Es deixa a temperatura ambient, i s'elimina el DTT, s'afegeix acetonitril que es retira ràpidament i tot seguit s'incuba amb iodoacetamida 10 mg /mL en bicarbonat d'amoni 25 mM durant 15 min a la foscor. Per tal d'eliminar la solució d'alquilació s'afegeix acetonitril durant 5 min i bicarbonat d'amoni 25 mM durant 5 min. Sense retirar el sobrenedant, s'afegeix igual volum de acetonitril i s'incuba durant 15 min. Finalment es retira el sobrenedant i s'asseca al buit amb una centrífuga *Speed-vac*. Els fragments obtinguts es digereixen amb tripsina porcina modificada amb una concentració de 8 ng/µl en carbonat d'amoni 50 mM durant 6 h a 37°C. Finalment s'afegeix àcid trifluoroacètic al 0.5% per extraure els pèptids.

Per l'anàlisi mitjançant Maldi-TOF/TOF es necessari la utilització d'una matriu que cocristal·litza amb els analits. La matriu, generalment un àcid aromàtic substituït, dificulta les interaccions analit-analit i actua com a mitjancera en el procés de transferència d'energia del feix làser als analits. En el procés de conversió de les molècules neutres d'analit a espècies carregades o ions (generalment protonats), la matriu juga un paper fonamental en cedir protons (H+) als analits. En aquest cas s'ha utilitzat una matriu formada per àcid  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinnàmic amb acetonitril al 33 % (v/v) i 0.25 % d'àcid trifluoroacètic.

L'espectrometria de masses és una tècnica analítica instrumental d'alta sensibilitat, capaç d'identificar qualitativa i quantitativament, i de manera inequívoca, qualsevol tipus de barreges de substàncies. Així mateix, aquesta tècnica permet també determinar la massa molecular d'un compost, a més dels diversos fragments que en resulten del trencament controlat, la qual cosa aporta una informació molt valuosa sobre l'estructura de la molècula.

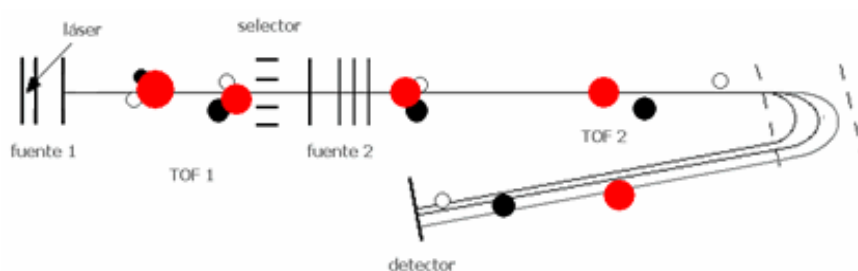
Quan una molècula se sotmet a ionització per impacte electrònic en un espectròmetre de masses, el procés primari consisteix en l'abstracció d'un electró per a donar un catió-radical. Aquest

## Annex 1: Materials i Mètodes.

catió-radical és l'ió molecular i tindrà major o menor tendència a fragmentar-se en funció de la seva estabilitat. Els ions moleculars molt estables tindran poca tendència a fragmentar-se i seran molt abundants. L'ió més abundant de l'espectre s'anomena pic base.

L'equip de Maldi-TOF/TOF conté un làser de N<sub>2</sub> encarregat de la desorció/ionització dels analits, i un analitzador TOF/TOF que genera l'espectre de fragmentació dels analits. En la desorció/ionització mitjançant làser sol emprar-se un làser de N<sub>2</sub>, que emet a 337 nm, per irradiar una petita àrea del portamostres (alguns mm<sup>2</sup>) sobre el qual ha cocrystal·litzat la mostra-matriu. La matriu absorbeix energia del pols làser i la transfereix als analits, els quals es desadsorbeixen i s'ionitzen. Les característiques diferencials de la radiació làser són: alta direccionalitat (la desviació respecte a un feix exactament paral·lel és de només alguns mil·liradians), la monocromaticitat (a causa dels límits imposats per la llei de Planck, i la condició que la longitud de la cavitat làser ha de ser un múltiple sencer de semilongituds d'ona), una brillantor extremadament elevada (ja que l'angle sòlid en el qual es distribueix la radiació és molt petit), coherència espacial i temporal (a causa que les ones associades a tots els fotons estan en fase). En el làser de N<sub>2</sub> s'aplica un pols d'alt voltatge (ca. 20 kV), la durada dels polsos sol ser d'uns 10 ns i la seva energia entorn de 10 mJ.

L'analitzador TOF/TOF proporciona un millor enfocament dels ions i més resolució que un analitzador TOF. En una primera etapa (TOF1), els ions són accelerats a baix voltatge (ca. 7 kV) en les condicions que afavoreixen la fragmentació metastable. Un botó temporal permet seleccionar un determinat ió pare i els seus ions fragment, aquest paquet d'ions és a continuació accelerat a un potencial major (ca. 20 kV). L'analitzador TOF2 permet separar els ions que componen el paquet, rics en energia però amb una distribució energètica estreta. D'aquesta forma s'obté informació de la seqüència de l'ió pare seleccionat, el qual permet descartar ambigüitats en la identificació de proteïnes mitjançant empremta peptídica i, en certs casos, determinar llocs de modificacions post-traduccionals o obtenir seqüències parcials mitjançant seqüenciació (Suckau et al., 2003).



Els espectres MALDI-TOF/TOF van ser calibrats internament emprant com a referència senyals de massa de dos ions que provenen de la hidròlisi de la tripsina amb  $m/z = 842,510$  i  $m/z = 2.211,105$ ; el calibratge es va realitzar amb els espectres dels ions fragment de les senyals protonades d'una barreja de pèptids que cobria l'interval  $m/z = 800-3.200$ . Les dades van ser combinades mitjançant el programa BioTools (Bruker-Daltonics) per buscar en una base de dades no redundants (NR;  $\sim 4 \times 10^6$  entrades; National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, EE.UU.) emprant el programari Mascot (Matrix Science, Londres, el Regne Unit) (Perkins et al.,



## Annex 1: Materials i Mètodes.

1999). Tant els espectres com els resultats de la cerca en bases de dades, van ser revisades manualment en detall utilitzant els programes a dalt esmentats i programes casolans.

### 8) Proves d'estabilitat en vins blancs.

Totes les proves d'estabilitat es van aplicar a 40 mL de vi i per triplicat. Totes les mostres es temperen a temperatura ambiental (25 °C) i es vortexen bé abans de llegir-ne la terbolesa. La terbolesa desenvolupada es va mesurar amb un Turbidímetre 2100N Hach (Hach Company, Loveland, Colorado, els USA). Tot seguit es descriuen les proves utilitzades:

a) Test del calor o test tèrmic ràpid: el vi s'escalfa a 90 °C durant 1 hora, tot seguit es refreda a 4 °C durant 6 hores. (Sarmiento i col., 2000).

b) Test del calor o test tèrmic lent: el vi es porta a 60 °C durant 4 dies, després es refreda a 4 °C durant 1 hora. (Sarmiento i col., 2000).

c) Bentotest: s'utilitza una solució formada per àcid fosfomolibdic (5%), sulfat de sodi (5%), glucosa (0.25 g) i àcid sulfúric(15%); és una solució ja preparada per ser aplicada directament en el vi. Consisteix en afegir 4 mL de la solució descrita anteriorment a 40 mL de vi; s'inverteix la mostra 3 cops i es deixa 20 minuts a temperatura ambient (Toland i col., 1996).

d) El test del TCA (àcid tricloroacètic): s'afegeix 4 mL d'una solució d'àcid tricloroacètic al 55% a 40 mL de vi. Es posa 2 minuts en aigua bullint i es deixa a temperatura ambient (Toland i col., 1996).

e) El test de l'etanol: consisteix en afegir 40 mL d'etanol absolut a 40 mL de vi, es tapa el tub per evitar evaporació i es deixa a temperatura ambient durant 2 hores (Sarmiento i col., 2000).

f) El test del taní: 1.0 g de taní enològic (Proenol, Gaia, Portugal) es dissol en 10 mL d'aigua destil·lada a 70°C, quan el taní ja està ben dissolt s'afegeix 50 mL d'aigua destil·lada i finalment s'afegeix etanol fins un volum final de 100 mL. El test consisteix en afegir a 40 mL de vi, 3.2 mL de solució de taní a l'alcohol (1% taní en 40% etanol (v/v)), s'agita i es deixa a temperatura ambient durant 15 minuts, després es posa en aigua bullint durant 3 minuts, es deixa a temperatura ambient (Mesrob i col., 1983).

g) El test del sulfat d'amoni: s'afegeix 3.2 mL de solució saturada de sulfat d'amoni a 40 mL de vi, la barreja es deixa a 55 °C durant 7 hores i després a temperatura ambient (Toland i col., 1996).

h) Prostab: en aquest cas es segueixen les especificacions del Kit Prostab (Martin Vialatte Oenologie, Epernay, França). 4 mL de Reactiu 1 s'afegeixen a 40 mL de vi, s'homogeneïtza i tot seguit s'afegeix 4 mL del reactiu 2, s'homogeneïtza i es deixa 20 minuts a temperatura ambient.

El precipitat obtingut després de la precipitació natural i després d'haver aplicat les corresponents proves d'estabilitat es va dissoldre en 2.6 mL de fosfat disòdic 50 mM que conté un 0.2% de SDS. Per tal d'aconseguir la dissolució total d'alguns dels precipitats, va ser necessari posar-los durant 5 min a 80°C.

(D'esquerra a dreta) Precipitat obtingut després d'aplicar la prova del taní, la del calor ràpid, la del calor lent, la del Prostab, la del Bentotest, la del sulfat d'amoni, la de l'àcid tricloroacètic, la de l'etanol i finalment la precipitació natural.

## Annex 1: Materials i Mètodes.



### 9) Selecció de la dosi de bentonita necessària per estabilitzar el vi blanc.

Es prepara una solució de bentonita al 2%: 2 g de Bentonita (Volclay, Laffort, Renteria, Espanya) en 100 mL d'aigua destil·lada, s'hidrata durant 24 h amb agitació. S'addiciona la quantitat necessària d'aquesta solució de bentonita al 2 % a 1 litre de vi per tal d'obtenir una concentració final de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 i 100 g/hL de bentonita, s'agita i es deixa a temperatura ambiental durant 2 hores. Totes les condicions es realitzen per triplicat. Tot seguit es centrifuga i s'apliquen les diferents proves d'estabilitat. El vi es considera estable quan l'augment de terbolesa respecte el blanc és inferior a 2 NTU (Moine-Ledoux & Dubourdieu 1999). El blanc és el valor de terbolesa del vi abans d'aplicar-li la prova d'estabilitat.

### 10) Extracció en fase sòlida dels compostos fenòlics del vi i del precipitat.

30 mL de vi abans i després de la precipitació natural es concentren fins 15 mL, s'utilitza una centrífuga de buit a una temperatura de 30 °C per tal d'eliminar l'etanol. Les mostres concentrades i el precipitat natural dissolt amb fosfat disòdic 50mM (apartat 1 Annex 1 Materials i Mètodes), es passen per un cartutx Sep-Pak C18 que ha estat prèviament condicionat (Chamkha i col., 2003). El cartutx Sep-Pak C18 conté una fase estacionària de sílice summament hidrofòbica, actua com una columna C18 de fase reversa, les columnes que s'acostumen a utilitzar en l'anàlisi dels polifenols del vi. Per tal d'eluir els compostos fenòlics enganxats en el cartutx, es passa 10 mL de metanol, el qual s'evapora mitjançant una centrífuga de buit fins a la sequedat. Seguidament les mostres corresponents al vi abans i després de la precipitació natural es dissolen amb 1.2 mL de metanol, i les del precipitat natural amb 500 µl de metanol. Aquests extractes fenòlics de les respectives mostres seran analitzats per cromatografia de gasos i per HPLC, analítiques que es descriuen a continuació.

### 11) Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses: CG/MS.

#### a) Derivatització de la mostra.

Una de les condicions indispensables en l'anàlisi per cromatografia de gasos és la necessitat de que les mostres tinguin la suficient volatilitat com per ser transportades per la fase mòbil fins al detector, a més a més, en aquesta tècnica s'utilitzen temperatures molt elevades, amb greus conseqüències per a les molècules inestables o termolàbils, i per tan és necessari la formació de derivats, més volàtils, estables o que siguin capaços de subministrar més informació respecte a la

## Annex 1: Materials i Mètodes.

seva estructura quan el detector és un espectròmetre de masses. Les raons principals per a la formació de derivats són conferir volatilitat, millora de l'estabilitat, millora de les propietats cromatogràfiques, separacions més eficaces, anàlisi de grups funcionals, modificació de les fragmentacions,...

En aquest estudi es va seguir el protocol experimental següent per tal de derivatitzar els compostos fenòlics de les mostres: 100 µl dels respectius extractes fenòlics es liofilitzen per tal d'eliminar el metanol ja que aquest interfereix en el procés de derivatització de la mostra, els residus es dissolen amb 100µl de 1:1 BSTFA / piridina (v/v) amb agitació vigorosa i tot seguit s'incuba a 70 °C durant 30 min (Soleas, et al., 1997). Aquestes mostres s'analitzen ràpidament per cromatografia de gasos ja que són inestables amb el temps.

La BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) és el derivatitzant que s'ha utilitzat en aquest estudi, reacciona amb els compostos polars tot substituint els hidrògens dels grups hidroxil pel grup trimetilsilà -Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

### b) CG/MS.

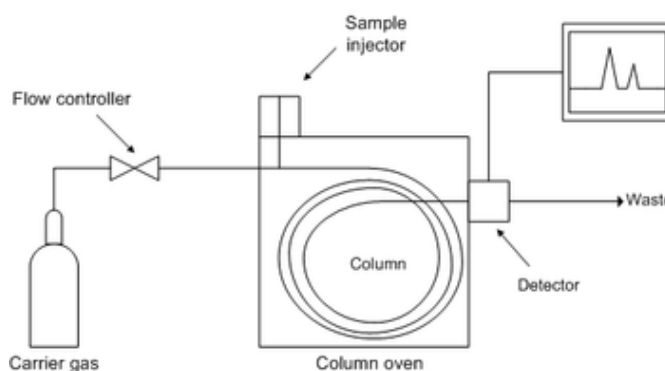
Tot seguit es mostra un esquema general d'un cromatògraf de gasos.

El gas portador és l'encarregat de transportar els components de la mostra, i crear una matriu adequada per al detector. Ha de ser inert per tal d'evitar interaccions amb l'analit o amb la columna (fase estacionaria), capaç de minimitzar la difusió gasosa, fàcilment disponible i pur,

econòmic i compatible amb detector que s'utilitzarà. La pressió del gas portador es regula a dos nivells, a la de sortida de la bombona i a l'entrada del cromatògraf.

La injecció de mostra ha de ser ràpida per tal d'evitar l'eixamplament de les bandes de sortida, aquest efecte es dona amb quantitats elevades d'analit. Es pot utilitzar una microxeringa (amb capacitat per a diversos microlitres), o bé un mostrejador automàtic. Per obtenir menor quantitat de volum, s'utilitza un divisor de flux (la injecció es coneix com a mode *Split*) a l'entrada de la columna, aquest rebutja part de l'analit introduït. Si s'utilitza tot el volum de mostra la injecció és de tipus *Splitless*, aquest tipus d'injecció ens permet determinar petites quantitats o traces. La mostra s'injecta a una cambra de vaporització instantània, aquesta estarà 50°C per sobre del punt d'ebullició del component menys volàtil, i està segellada per una junta de goma de silicona Septa o sèptum.

Es fan servir dos tipus de columnes, les empaquetades o de farciment i les tubulars obertes o capil·lars (major rapidesa i eficiència). La longitud d'aquestes columnes és variable, de 2 a 60 metres, i estan construïdes en acer inoxidable, vidre, sílice fosa o tefló. A causa de la seva longitud i de la necessitat de ser introduïdes en un forn, les columnes acostumen a enrotllar-se en una forma helicoida amb diàmetres de 10 a 30 cm, depenent de la mida del forn. Si la columna emprada és



## Annex 1: Materials i Mètodes.

farcida, el volum a injectar serà d'uns 20 µl, i en el cas de les columnes capil·lars aquesta quantitat és menor, d'1 µl.

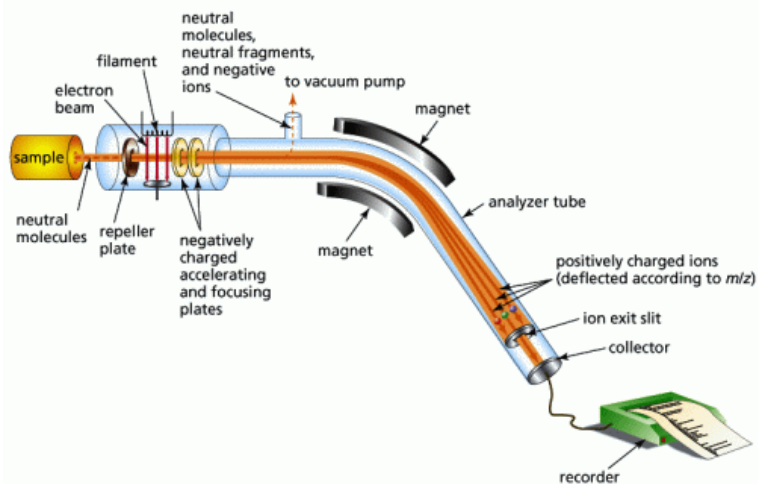
La temperatura és una variable important, ja que en dependrà el grau de separació dels diferents analits, per a això, s'ha d'ajustar amb una precisió de dècimes de grau. Aquesta temperatura depèn del punt d'ebullició de l'analit o analits, com també de la màxima temperatura de funcionament de la columna (fase estacionària), i en general s'ajusta a un valor igual o lleugerament superior a ell. És recomanable utilitzar temperatures baixes per a l'elució ja que encara que a major temperatura l'elució és més ràpida, es corre el risc de descompondre l'analit.

Després de la separació dels analits per la columna cromatogràfica, aquests seran detectats per l'espectròmetre de masses. Un espectròmetre de masses està format principalment per tres parts: la font d'ionització, l'analitzador de massa i el detector.

La font d'ionització permet mitjançant l'impacte electrònic abstraure un electró de la molècula per donar lloc a la formació d'un catió radical. En essència consisteix en el "bombardeig" de les substàncies que arriben a la font a través dels sistemes d'introducció de mostres, amb un feix d'electrons d'alta energia (normalment 70eV). Aquesta energia és suficient per produir, d'una banda, la ionització del compost sencer (formació de l'ió molecular), i a més, generar un cert grau de fragmentació del mateix, el que ens subministra una valuosa informació sobre la seva estructura.

Immediatament després del procés de ionització, els ions en fase gasosa entren a la regió de l'analitzador de masses, que és la zona de l'instrument on els ions, dins del rang de masses seleccionat, són separats en base a la seva relació massa/càrrega ( $m/z$ ). Aquesta part de l'instrument té un paper important pel que fa a la precisió i exactitud de les masses a mesurar. Els ions són aquí separats per camps magnètics, elèctrics, de radiofreqüència, per combinacions de diversos d'ells, o per mesura del temps de desplaçament dels ions al llarg d'una distància fixada prèviament.

L'element final de l'espectròmetre de masses és el detector, aquest registra tots els ions segons la seva relació  $m/z$  i els quantifica segons la seva abundància relativa. Podem obtenir dos tipus d'ions diferents per analit; l'ió molecular (pèrdua d'un electró), generalment no és el més abundant (perquè es fragmenta) i ens permet obtenir la massa molecular de la substància, i els ions corresponents a la fragmentació de l'ió molecular entre els quals hi ha el pic base que és l'ió més abundant de l'espectre (100% d'abundància relativa). Els espectres de massa es registren com a abundància relativa vers relació  $m/z$ .



Tot seguit es mostren les condicions que es van fixar per l'anàlisi de les mostres seguint el protocol descrit per Minuti et al. 2006:

## Annex 1: Materials i Mètodes.

<b>Pressió inlet:</b>	7 psi
<b>Model d'injecció:</b>	<i>splitless</i>
<b>T<sup>a</sup> inyector:</b>	300 °C
<b>Volum de mostra injectada:</b>	1 µl
<b>Columna:</b>	HP-5MS de (5% fenil)-metilpolisiloxà de 30 mx0.25 mmx0.25 µm
<b>Purga del sèptum:</b>	0.8 mL/min
<b>Flux de columna:</b>	0.7 mL/min
<b>Temperatura del forn:</b>	temperatura inicial de 120 °C durant 3 min; rampa de 5 °C/min fins 320 °C, durant 5 min.
<b>Temps total d'anàlisi:</b>	48 min
<b>Solvent delay:</b>	4 min

La cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses en permet realitzar un escorbat de masses entre un interval de masses determinat quan treballem en mode full SCAN, normalment s'utilitza quan ens interessa realitzar un anàlisi qualitatiu de la mostra; o bé la monitorització selectiva d'uns determinats ions, mode SIM, en aquest cas adquirim només els ions que ens interessin i així tenim un cromatograma molt més net i concret, a la vegada, pel fet d'eliminar masses que no ens interessin, es redueixen interferències i això ens permet una quantificació més exacta i real del compost identificat. El software AMDIS (Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System) ens permet interpretar els espectres dels diferents components de la mostra, de manera que s'extrau cadascun de forma independent i així per comparativa d'aquests espectres amb els de la llibreria *NIST*, podem arribar a identificar possibles compostos presents en la mostra dels quals en desconeixem el temps de retenció perquè no disposem de patró.

En el nostre estudi es va realitzar una adquisició en mode *full SCAN* en el que es va fixar un interval d'adquisició de *m/z* de 43 a 650; mitjançant el software *AMDIS* es van identificar alguns dels compostos fenòlics presents en les mostres per comparativa amb els espectres de la llibreria *NIST*. Tot seguit es va realitzar una adquisició en mode *SIM* en totes les mostres dels compostos fenòlics identificats. Els patrons també es van adquirir en mode *SIM*; a partir del temps de retenció i dels ions quantificadors (Tgt) i qualificadors (Q) dels respectius patrons es va confirmar la presència en la mostra dels diferents compostos fenòlics identificats.

### 12) HPLC/ESI-TOF.

La cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) és una tècnica molt utilitzada en l'anàlisi dels compostos fenòlics del vi. En la separació s'utilitza una columna C18 de fase reversa. Els analits s'adsorbeixen a la columna cromatogràfica més o menys fort en funció de la seva polaritat, els primers analits que s'eluiran seran els més polars i a mesura que augmentarà el percentatge en acetonitril de l'eluent es desadsorbiran els que són menys polars.

Tot seguit aquests analits seran ionitzats mitjançant la font d'ionització per electroesprai (ESI). La solució es fa passar a través d'un capil·lar al qual s'aplica un alt potencial elèctric, a la sortida del

## Annex 1: Materials i Mètodes.

capil·lar la solució es dispersa en forma d'esprai, format per petites gotes carregades, el solvent s'evapora ràpidament tot alliberant les molècules carregades a la fase gasosa. En aquest procés als ions generats se'ls a extret un electró donant lloc a un catió radical, aquests poden estar protonats de manera múltiple donant lloc a diferents espècies per a una mateixa molècula.

Aquests ions seran detectats per un TOF (Time-of-flight), on seran accelerats mitjançant un camp elèctric, i recorreran una determinada distància en funció de la seva càrrega, a més càrrega més distància recorreguda. La massa dels ions es calcula a partir de la mesura del temps que necessiten per a recórrer una distància determinada, i de la magnitud del camp elèctric que s'ha de fer servir per a accelerar-los.

Quan es realitza aquesta analítica s'obté un ió molecular corresponent a la massa isotòpica de l'analit més un protó, a més aquest també pot estar sodiat, amb amoni o amb potassi. La massa isotòpica del compost ha de coincidir amb els dos primers decimals de la massa teòrica del mateix, s'admet un error molt baix en el segon decimal ( $\pm 0.03$ ).

Aquesta analítica també ens permet realitzar una deconvolució del cromatograma i així directament podem obtenir l'espectre dels compostos presents en la mostra, a la vegada es pot calcular la fórmula molecular del compost. Aquest compost tindrà una puntuació (*score*) que ens interessa que sigui el més alta possible, i un error (en ppm) que correspon a la diferència entre l'espectre del compost present a la mostra i l'espectre teòric del compost amb aquesta massa isotòpica, aquest valor pot ser positiu o negatiu i ha de ser el més proper possible a; si el compost es troba a molt baixa concentració de vegades no tenim el segon isòtop perquè es confon amb el soroll de fons i llavors aquest error augmenta molt.

Tot seguit es mostren les condicions que es van fixar per l'anàlisi de les mostres seguint el protocol descrit per Chamkha et al. 2003:

<b>Columna:</b>	Eclipse C18 250mmx4.6mm 5µm mida de partícula
<b>Flux:</b>	0.8 mL/min
<b>Fase mòbil A:</b>	0.2% àcid fòrmic
<b>Fase mòbil B:</b>	80% Acetonitril / 20% Fase mòbil A
<b>Volum de mostra injectar:</b>	50 µl
<b>Temperatura de la columna:</b>	30 °C
<b>Gradient (% de Fase mòbil B):</b>	0 min, 0%; 5 min, 2%; 10 min, 6%; 15 min, 12%; 30 min, 22%; 35 min, 34%; 40 min, 100%; 45 min, 0%; 55 min, 0%.
<b>Capillary Voltage:</b>	3500 V
<b>Drying gas temperature:</b>	350 °C
<b>Drying gas flow:</b>	12 L/min
<b>Nebulizer gas pressure:</b>	60 psi
<b>Fragmentor voltage:</b>	150 V
<b>Skimmer voltage:</b>	65 V
<b>Octapol voltage:</b>	250 V
<b>Adquisition range:</b>	50-2400 m/z in positive mode

## **Annex 1: Materials i Mètodes.**

# Bibliografia



Diego Velázquez, *Los Borrachos* o *El Triunfo de Baco*.



## Bibliografia

- Abad L. R.; Paino D'Urzo M.; Liu D.; Narasimhan M. L.; Reuveni M.; Zhu J. K.; Niu X.; Singh N. K.; Hasegawa P. M.; Bressan R. A. **1996**. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science*, 118, 11-23.
- Acedo M. I.; Pueyo E.; Polo M. C. **1994**. Preliminary studies on peptides in wine by HPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 167-72.
- Achaerandio I.; Pashova V.; Güell C.; López F. **2001**. Protein adsorption by bentonite in a white wine model solution: effect of protein molecular weight and ethanol concentration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 122-6.
- Andrés-Lacueva C.; Gallard M.; López-Tamames E.; Lamuela-Raventós R. M. **1996**. Influence of variety and aging on foaming properties of sparkling wine (cava). 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3826-9.
- Anelli G. **1977**. The proteins of musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 200-203.
- Asano K.; Shinagawa K.; Hashimoto N. **1982**. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 40, 147-54.
- Baderschneider B.; Winterhalter P. **2001**. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2788-98.
- Bate-Smith E. C. **1954**. Astringency in foods. *Food*, 23, 124-7.
- Baxter N. J.; Lilley T. H.; Haslam E.; Williamson M. P. **1997**. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 36, 5566-77.
- Bayly F. C.; Berg H. W. **1967**. Grape and wine proteins of white wine varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 24, 18-32.
- Benítez P.; Castro R.; Barroso C. G. **2002**. Removal of iron, copper and manganese from white wines through ion exchange techniques: effects on their organoleptic characteristics and susceptibility to browning. *Analytica Chimica Acta*, 458, 197-202.
- Berg H. W.; Akiyoshi M. **1961**. Determination of protein stability in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 12, 107-10.
- Berthier L.; Marchal R.; Debray H.; Bonnet E.; Jeandet P.; Maujean A. **1999**. Isolation of isolectins from *Vitis vinifera* L. Cv. Chardonnay grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2193-7.
- Besse Ch.; Clark A.; Scollary G. **2000**. Investigation of the role of total and free copper in protein haze formation. *The Australian Grapegrower and Winemaker*, 437, 19-20.
- Bézier A.; Lambert B.; Baillieul F. **2002**. Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 111-20.

## Bibliografia

- Bianco A.; Chiacchio U.; Rescifina A.; Romeo G.; Uccella N. **1997**. Biomimetic supramolecular biophenol-carbohydrate and biophenol-protein models by NMR experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4281-5.
- Blade W. H.; Boulton R. B. **1988**. Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 193-9.
- Borrot G.; Gresser S. **2000**. Mise au point d'une méthode automatisée pour la détermination de la dose de bentonite nécessaire à la stabilisation protéique des vins. *Revue Française d'Œnologie*, 185, 22-4.
- Boulton R. **1980**. The nature of wine proteins. In *Proceedings of the Sixth Annual Wine Industry Technology Seminar of the Wine Institute*, 46-58.
- Bradford M. M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54.
- Brissonnet F.; Maujean A. **1991**. Identification of some foam-active compounds in champagne base wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 97-102.
- Brissonnet F.; Maujean A. **1993**. Characterization of foaming proteins in a champagne base wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 297-301.
- Brown S. L.; Stockdale V. J.; Pettolino F.; Pocock K. F.; de Barros Lopes M.; Williams P. J.; Bacic A.; Fincher G. B.; Høj P. B.; Waters E. J. **2007**. Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes *YOL155c* and *YDR055w*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1363-76.
- Cacho J.; Castells J. E.; Esteban A.; Laguna B.; Sagristá N. **1995**. Iron, cooper, and manganese influence on wine oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 380-4.
- Canals J. M.; Arola L.; Zamora F. **1998**. Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 383-8.
- Capelli N.; Diogon T.; Greppin H.; Simon P. **1997**. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 191, 51-6.
- Chamkha M.; Cathala B.; Cheynier V.; Douillard R. **2003**. Phenolic composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot noir vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3179-84.
- Charmont S.; Jamet E.; Pont-Lezica R.; Canut H. **2005**. Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochemistry*, 66, 453-61.
- Chattonnet P. **2000**. La contamination des vins par *Brettanomyces* au cours de la vinification et de l'élevage: incidence, détection et moyens de lutte. *Revue des Œnologues*, 96, 23-6.
- Cilindre C.; Jégou S.; Hovasse A.; Schaeffer C.; Castro A. J.; Clément C.; Van Dorselaer A.; Jeandet P.; Marchal R. **2008**. Proteomic approach to identify champagne wine proteins as modified by *Botrytis cinerea* infection. *Journal of Proteomic Research*, 7, 1199-208.
- Correa-Gorrospe I.; Polo M. C.; Hernandez. T. **1991**. Characterization of the proteic and the phenolic fraction in tartaric sediments from wines. *Food Chemistry*, 41, 135-46.

## Bibliografia

- Dadic M.; Belleau G. **1980**. Beer hazes. I. Isolation and preliminary analysis of phenolic and carbohydrate components. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 38, 154-8.
- Dambrouck T.; Marchal R.; Marchal-Delahaut L.; Parmentier M.; Maujean A.; Jeandet P. **2003**. Immunodetection of proteins from grapes and yeast in a white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2727-32.
- Danilewicz J. C. **2003**. Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 73-85.
- Danilewicz J. C. **2007**. Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 53-60.
- Darias-Martin J. J.; Andrés-Lacueva C.; Díaz-Romero C.; Lamuela-Raventós R. M. **2008**. Phenolic profile in varietal white wines made in the Canary Islands. *European Food Research and Technology*, 226, 871-6.
- Dawes H.; Boyes S.; Keene J.; Heatherbell D. **1994**. Protein instability in wines: influence of protein isoelectric point. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 319-26.
- Derckel J. P.; Legendre L.; Audran J. C.; Haye B.; Lambert, B. **1996**. Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science*, 119, 31-7.
- Derckel J. P.; Audran J. C.; Haye B.; Lambert B.; Legendre L. **1998**. Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiologia Plantarum*, 104, 56-64.
- Dizy M.; Bisson L. F. **1999**. White wine protein analysis by capillary zone electrophoresis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 120-7.
- 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, 235-42.
- Dubourdieu D.; Serrano M.; Vannier A. C.; Ribéreau-Gayon P. **1988**. Étude comparée des tests de stabilité protéique. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 22, 261-73.
- Dupin I. V. S.; McKinnon B. M.; Strockdale V. J.; Ryan C.; Boulay M.; Markides A. J.; Jones G. P.; Williams P. J.; Waters E. J. **2000a**. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: Their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3098-105.
- Dupin I. V. S.; Strockdale V. J.; Williams P. J.; Jones G. P.; Markides A. J.; Waters E. J. **2000b**. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: Evaluation of extraction methods and immunolocalization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1086-95
- Esteruelas M.; Poinssaut P.; Sieczkowski N.; Manteau S.; Fort M. F.; Canals J. M.; Zamora F. **2009**. Characterization of natural haze protein in Sauvignon white wine. *Food Chemistry*, 113, 28-35.
- Fariás M. E.; Manca de Nadra M. C. **2000**. Purification and partial characterization of *Oenococcus oeni* exoprotease. *FEMS Microbiology Letters*, 185, 263-6.

## Bibliografia

- Ferenczy S. **1966**. Etude protéines et substances azotées. *Bulletin de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*, 39, 1313-36.
- Fernández-Acero F. J.; Jorge I.; Calvo E.; Vallejo I.; Carbú M.; Camafeita L. E.; López J. A.; Cantoral J. M.; Jorrián J. **2006**. Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics*, 6, S88-96.
- Ferreira R. B.; Monteiro S.; Piçarra-Pereira M. A.; Tanganho M. C.; Loureiro V. B.; Teixeira A. R. **2000**. Characterization of the proteins from grapes and wines by immunological methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 22-8.
- Ferreira R. B.; Piçarra-Pereira M. A.; Monteiro S.; Loureiro V. B.; Teixeira A. R. **2002**. The wine proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 230-9.
- Ferreira R. B.; Monteiro S. S.; Piçarra-Pereira M. A.; Teixeira A. R. **2004**. Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *Trends in Biotechnology*, 22, 168-73.
- Feuillat M.; Brillant G.; Rochard J. **1980**. Mise en évidence d'une production de protéases exocellulaires par les levures au cours de la fermentation alcoolique du moût de raisin. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 14, 37-52.
- Feuillat M.; Ferrari G. **1982**. Hydrolyse enzymatique des protéines du raisin en vinification. *CR Académie d'Agriculture*, 68, 1070-5.
- Feuillat M.; Escot S.; Charpentier C.; Dulau, L. **2001**. Élevage des vins rouges sur lies fines. Intérêt des interactions entre polysaccharides de levures et polyphénols du vin. *Revue des Œnologues*, 98, 17-8.
- Fils-Lycaon B. R.; Wiersma P. A.; Eastwell K. C.; Sautiere P. **1996**. A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. *Plant Physiology*, 111, 269-73.
- Flores J. H.; Heatherbell D. A.; McDaniel M. R. **1990**. Ultrafiltration of wine: effect of ultrafiltration on white Riesling and Gewürztraminer wine composition and stability. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 207-14.
- Fournarion C.; Mazauric J. P.; Salmon J. M.; Moutounet M. **1999**. Observations sur la consommation de l'oxygène pendant l'élevage des vins sur lies. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 33, 79-86.
- Fournarion-Bonnefond C.; Camarasa C.; Moutounet M.; Salmon J. M. **2002**. New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: A bibliographic review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 36, 49-69.
- Francis I. L.; Sefton M. A.; Williams P. J. **1994**. The sensory effects of pre- or post-fermentation thermal processing on Chardonnay and Semillon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 243-51.
- Frevert J.; Ballou C. E. **1985**. *Saccharomyces cerevisiae* structural cell wall mannoprotein. *Biochemistry*, 24, 753-9.

## Bibliografia

- Fukuzaki S.; Urano H.; Nagata K. **1996**. Adsorption of bovine serum albumin onto metal oxide surfaces. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81, 163-7.
- Fuster A.; Escot S. **2002**. Élevage des vins rouges sur lies fines: choix de la levure fermentaire et ses conséquences sur les interactions polysaccharides pariétaux/polyphenols. *Revue des Œnologues*, 104, 20-2.
- Galani-Nikolakaki S.; Nallithrakas-Kontos N.; Katsanos A. A. **2002**. Trace element analysis of Cretan wines and wine products. *The Science of the Total Environment*, 285, 155-63.
- Gardner R. J.; McGuinness J. D. **1977**. Complex phenols in brewing-a critical survey. *Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas*, 14, 250-61.
- Gerbaud V.; Gabas N.; Bloiun J.; Pellerin P.; Moutounet M. **1997**. Influence of wine polysaccharides and polyphenols on the crystallization of potassium hydrogen tartrate. *International Journal of Vine and du Wine Sciences*, 31, 65-83.
- Giacomelli C. E.; Avena M. J.; De Pauli C. P. **1997**. Adsorption of bovine serum albumin onto TiO<sub>2</sub> particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 188, 387-95.
- Girbau T.; Stummer B. E.; Pocock K. F.; Baldock G. A.; Scott E. S.; Waters E. J. **2004**. The effect of *Uncinula necator* (powdery mildew) and *Botrytis cinerea* infection of grapes on the levels of haze-forming pathogenesis related proteins in grape juice and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 125-33.
- Goertges S. **1982**. Problems with protein stabilization in winemaking. *Weinwirtschaft*, 118, 931-935.
- Gómez S.; García E.; Hermosín I. **2007**. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618-26.
- González G.; Hardisson A.; Arias J. J. **1996**. Quantity of K, Ca, Na, Mg, Fe, Cu, Pb, Zn and ashes in DOC Tacoronte-Acentejo (Canary Islands, Spain) musts and wines. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 203, 517-21.
- González-Lara R.; Correa I.; Polo M. C.; Martín-Alvarez P. J.; Ramos M. **1989**. Classification of variety musts by statistical analysis of their electrophoretic protein pattern. *Food Chemistry*, 34, 103-10.
- González-Ramos D.; González R. **2006**. Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9411-6.
- Guillou C.; Aleixandre J. L.; García M. J.; Lizama V. **1998**. Clarification influence upon sensorial and analytical characteristics of Muscat dry wine. *International Journal of Vine and du Wine Sciences*, 32, 111-9.
- Hagerman A. E.; Butler L. G. **1981**. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 4494-7.

## Bibliografia

- Hayasaka Y.; Adams K. S.; Pocock K. F.; Baldock G. A.; Waters E. J.; Høj P. B. **2001**. Use of electrospray spectrometry for mass determination of grape (*Vitis Vinifera*) juice pathogenesis related proteins: a potential tool for varietal differentiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1830-9.
- Hayasaka Y.; Baldock G. A.; Pocock K. F.; Waters E. J.; Pretorius I. S.; Høj P. **2003**. Varietal differentiation of grape juices by protein fingerprinting. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 18, 27-31.
- Heatherbell D. A. **1976**. Haze and sediment formation in clarified apple juice and apple wine. II. The role of polyvalent cations, polyphenolics and proteins. *Food Technology in New Zealand*, 11, 17-23.
- Heatherbell D. A.; Ngaba P.; Fombin J.; Watson B.; García Z.; Flores J.; Hsu J. **1984**. Recent developments in the application of ultrafiltration and protease enzymes to grape juice and wine processing. In *Proceedings of the International Symposium on Cool Climate Viticulture and Enology*, Oregon State University, Corvallis, 418-45.
- Hejgaard J.; Jacobsen S.; Svendsen I. **1991**. Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. *FEBS Letters*, 291, 127-31.
- 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, 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, 11-6.
- Hsu J. C.; Heatherbell D. A.; Flores J. H.; Watson B. T. **1987c**. Heat-unstable proteins in grape juice and wine. II. Characterization and removal by ultrafiltration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 17-22.
- Hughes-Wassell D. T.; Embery G. **1996**. Adsorption of bovine serum albumin onto titanium powder. *Biomaterials*, 17, 859-64.
- Jacobs A. K.; Dry I. B.; Robinson S. P. **1999**. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology*, 48, 325-36.
- Jayasankar S.; Li Z. J.; Gray D. J. **2003**. Constitutive expression of *Vitis vinifera* thaumatin-like protein after *in vitro* selection and its role in anthracnose resistance. *Functional Plant Biology*, 30, 1105-15.
- Kment P.; Mihaljevic M.; Ettler V.; Sebek O.; Strnad L.; Rohlova L. **2005**. Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. *Food Chemistry*, 91, 157-65.
- Koch J.; Sajak E. **1959**. A review and some studies on grape protein. *American Journal of Enology and Viticulture*, 10, 114-23.
- Kraeva E.; Tesniere C.; Terrier N.; Romieu C.; Sauvage F. X.; Bierne J.; Deloire A. **1998**. Transcription of a  $\beta$ -1,3-glucanase gene in grape berries in a late developmental period, or earlier after wounding treatments. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 37, 107-11.

## Bibliografia

- Kwon S. W. **2004**. Profiling of soluble proteins in wine by nano-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7258-63.
- Lagace L.; Bisson L. **1990**. Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 141-55.
- Laemmli U. K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- Lamikanra O.; Inyang I. D. **1988**. Temperature influence on Muscadine wine protein characteristics. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 113-6.
- Lara R.; Cerutti S.; Salonia J. A.; Olsina R. A.; Martinez L. D. **2005**. Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 293-7.
- Lehninger A. L. **1981**. Biochemistry. New York: Worth publishers.
- Leske P. A.; Bruer N. G. C.; Capdeboscq V. **1995**. An evaluation of some characteristics of commercial bentonites. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 10, 73-7.
- Lu Y.; Foo L. Y. **2000**. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 68, 81-5.
- Lubbers S.; Leger B.; Charpentier C.; Feuillat M. **1993**. Effet colloïde-protecteur d'extraits de parois de levures sur la stabilité tartrique d'une solution hydro-alcoolique modèle. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 27, 13-22.
- Lubbers S.; Charpentier C.; Feuillat M.; Voilley A. **1994**. Influence of yeast walls on the behaviour of aroma compounds in a model base wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 29-33.
- Lubbers S.; Guerreau J.; Feuillat M. **1995**. Etude de l'efficacité déprotéinisante de bentonites commerciales sur un moût et des vins de cépages Chardonnay et Sauvignon. *Bulletin de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*, 68, 224-44.
- Lubbers S.; Charpentier C.; Feuillat M. **1996**. Study of the binding of aroma compounds by bentonites in must, wine and model systems. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 35, 59-62.
- Malvy J.; Robillard B.; Duteutre B. **1994**. Influence des protéines sur le comportement de la mousse des vins de champagne. *Sciences des Aliments*, 14, 87-98.
- Manca de Nadra M. C.; Farías M. E.; Moreno-Arribas M. V.; Pueyo E.; Polo M. C. **1997**. Proteolytic activity of *Leuconostoc oenos*. Effect on proteins and polypeptides from white wine. *FEMS Microbiology Letters*, 150, 135-9.
- Manca de Nadra M. C.; Farías M. E.; Moreno-Arribas M. V.; Pueyo E.; Polo M. C. **1999**. A proteolytic effect of *Oenococcus oeni* on the nitrogenous macromolecular fraction of red wine. *FEMS Microbiology Letters*, 174, 41-7.
- Manteau S.; Poinssaut P. Instabilité protéique des vins blancs et rosés. Partie 2/2 : Comparaison des tests de stabilité protéique dans les vins blancs et rosés et mise au point d'un nouveau test: l'ImmunoTest<sup>TM</sup>. *Revue des Œnologues*, 135, 23-7.

## Bibliografia

- Marchal R.; Bouquelet S.; Maujean A. **1996**. Purification and partial biochemical characterization of glycoproteins in a champenois Chardonnay wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1716-22.
- Marchal R.; Berthier L.; Legendre L.; Marchal-Delahaut L.; Jeandet P.; Maujean A. **1998**. Effects of *Botrytis cinerea* infection on the must protein electrophoretic characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4945-9.
- Martínez-Rodríguez A.; Polo M. C. **2000**. Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1081-5.
- Martínez-Rodríguez A. J.; Polo M. C. **2003**. Effect of the addition of bentonite to the *tirage solution* on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chemistry*, 81, 383-8.
- Mauch F.; Hadwiger L. A.; Boller T. **1988a**. Antifungal hydrolases in pea tissue. I. Purification and characterization of two chitinases and two  $\beta$ -1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. *Plant Physiology*, 87, 325-33.
- Mauch F.; Mauch-Mani B.; Boller T. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. **1988b**. *Plant Physiology*, 88, 936-42.
- McKinnon A. J.; Scollary G. R. **1997**. Size fractionation of metals in wine using ultrafiltration. *Talanta*, 44, 1649-58.
- McManus J. P.; Davis K. G.; Beart J. E.; Gaffney S. H.; Lilley T. H.; Haslam E. **1985**. Polyphenol Interactions. Part 1. Introduction: Some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1429-38.
- Mesquita P. R.; Piçarra-Pereira M. A.; Monteiro S.; Loureiro V. B.; Teixeira A. R.; Ferreira R. B. **2001**. Effect of wine composition on protein stability. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 324-30.
- Mesrob B.; Gorinova N.; Tzakov D. **1983**. Characterization of the electrical-properties and of the molecular-weights of the proteins of white wines. *Food Nahrung*, 27, 727-33.
- Miller G. C.; Amon J. M.; Gibson R. L.; Simpson R. F. **1985**. Loss of wine aroma attributable to protein stabilization with bentonite or ultrafiltration. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 256, 46-50.
- Minuti L.; Pellegrino R. M.; Tesei I. **2006**. Simple extraction method and gas chromatography–mass spectrometry in the selective ion monitoring mode for the determination of phenols in wine. *Journal of Chromatography A*, 1114, 263-8.
- Moine-Ledoux V.; Dulau L.; Dubourdieu D. **1992**. Interprétation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 26, 239-51.
- Moine-Ledoux V.; Perrin A.; Paladin I.; Dubourdieu D. **1997**. First results of tartaric stabilization by adding mannoproteins (Mannostab). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 31, 23-31.



## Bibliografia

- Moine-Ledoux V.; Dubourdieu D. **1999**. An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 537-43.
- Moine-Ledoux V.; Dubourdieu D. **2000**. Contribution of an invertase fragment and a mannoprotein to protein and tartrate stabilization of wines. *VigneVini*, 27, 50-3.
- Moine-Ledoux V.; Dubourdieu D. **2002a**. Rôle des mannoprotéines de levures vis-à-vis de la stabilisation tartarique des vins. *Bulletin de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*, 75, 471-82.
- Moine-Ledoux V.; Dubourdieu D. **2002b**. Une mannoprotéine à ancre GPI responsable de la stabilisation tartarique des vins. Derniers développements industriels. *Revue Française d'Œnologie*, 193, 32-5.
- Moio L.; Addeo F. **1989**. Focalizzazione isoelettrica delle proteine dei mosti e dei vini. *Vignevini*, 16, 53-7.
- Monagas M.; Bartolomé B.; Gómez-Cordovés C. **2005**. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 85-118.
- Monteiro S.; Piçarra-Pereira M. A.; Tanganho M. C.; Rente J. P.; Loureiro V. B.; Teixeira A. R.; Ferreira R. B. **1999**. Preparation of polyclonal antibodies specific for wine proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 772-8.
- Monteiro S.; Piçarra-Pereira M. A.; Mesquita P. R.; Loureiro V. B.; Teixeira A.; Ferreira R. B. **2001**. The wide diversity of structurally similar wine proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3999-4010.
- Monteiro S.; Piçarra-Pereira M. A.; Teixeira A. R.; Loureiro V. B.; Ferreira R. B. **2003a**. Environmental conditions during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4046-53.
- Monteiro S.; Barakat M.; Piçarra-Pereira M. A.; Teixeira A. R.; Ferreira R. B. **2003b**. Osmotin and thaumatin from grape: A putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology*, 93, 1505-12.
- Monteiro S.; Piçarra-Pereira M. A.; Batista L. M.; Loureiro V. B.; Teixeira A. R.; Ferreira R. B. **2006**. Electrophoretic analysis of the polypeptide composition during berry development. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 45, 149-51.
- Moreno-Arribas M. V.; Cabello F.; Polo M. C.; Martín-Alvarez P. J.; Pueyo E. **1999**. Assessment of the native electrophoretic analysis of total grape must proteins for the characterization of *Vitis vinifera* L. Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 114-20.
- Moreno-Arribas V.; Pueyo E.; Polo M. C. **2002**. Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines. *Analytica Chimica Acta*, 458, 63-75.
- Moretti R. H.; Berg H. W. **1965**. Variability among wines to protein clouding. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 69-78.
- Muhlack R.; Nordestgaard S.; Waters E. J.; O'Neill B. K.; Lim A.; Colby C. B. **2006**. In-line dosing for bentonite fining of wine or juice: contact time, clarification, product recovery and sensory effects. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 221-34.

## Bibliografia

- Murphey J. M.; Spayd S. E.; Powers J. R. **1989**. Effect of grape maturation on soluble protein characteristics of Gewürztraminer and white Riesling juice and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 199-207.
- Ogata C. M.; Gordon P. F.; de Vos A. M.; Kim S. H. **1992**. Crystal structure of a sweet tasting protein thaumatin I, at 1.65 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 228, 893-908.
- Oh H. I.; Hoff J. E.; Armstrong G. S.; Haff L. A. **1980**. Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 394-8.
- Ortega A. F.; Lopez-Toledano A.; Mayen M.; Merida J.; Medina M. **2003**. Changes in color and phenolic compounds during oxidative aging of sherry white wine. *Journal of Food Science*, 68, 2461-8.
- Paetzold M.; Dulau L.; Dubourdiou D. **1990**. Fractionnement et caractérisation des glycoprotéines dans les moûts de raisins blancs. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 24, 13-28.
- Palacios V. M.; Caro I.; Perez L. **2001**. Application of ion exchange techniques to industrial process of metal ions removal from wine. *Adsorption*, 7, 131-8.
- Pashova V.; Ferrando M.; Güell C.; López F. **2002**. Protein adsorption onto metal oxide materials in white wine model systems. *Journal of Food Science*, 67, 2118-21.
- Pashova V.; Güell C.; López F. **2004a**. White wine continuous protein stabilization by packed column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1558-63.
- Pashova V.; Güell C.; Pueyo E.; López-Barajas M.; Polo M. C.; López F. **2004b**. White wine protein stabilization by a continuous process using a packed column. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 195-8.
- Pellerin P.; Waters E.; Brillouet J. M. **1993**. Characterization of two arabinogalactan-proteins from red wine. *Carbohydrate Polymers*, 22, 187-92.
- 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, 213-25.
- Peng Z.; Pocock K. F.; Waters E. J.; Francis I. L.; Williams P. J. **1997**. Taste properties of grape (*Vitis vinifera*) pathogenesis-related proteins isolated from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4639-43.
- Perkins D. N.; Pappin D. J.; Creasy D. M.; Cottrell J. S. **1999**. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20, 3551-67.
- Pharmacia LKB Biotechnology. **1990**. PhastSystem Users Manual. Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden.
- Pocock K. F.; Rankine B. C. **1973**. Heat test for detecting protein instability in wine. *Australian Wine Brewing and Spirit Review*, 91, 42-3.
- Pocock K. F.; Hayasaka Y.; Peng Z.; Williams P. J.; Waters E. J. **1998a**. The effect of mechanical harvesting and long-distance transport on the concentration of haze-forming proteins in grape juice. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4, 23-9.

## Bibliografia

- Pocock K. F.; Waters E. J. **1998b**. The effect of mechanical harvesting and transport of grapes, and juice oxidation, on the protein stability of wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4, 136-9.
- Pocock K. F.; Hayasaka Y.; McCarthy M.; Waters E. J. **2000**. Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1637-43.
- Pocock K. F.; Høj P. B.; Adams K. S.; Kwiatkowski M. J.; Waters E. J. **2003**. Combined heat and proteolytic enzyme treatment of white wines reduces haze forming protein content without detrimental effect. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 56-63.
- Pocock K. F.; Waters E. J. **2006**. Protein haze in bottled white wines: How well do stability test and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 212-20.
- Pocock K. F.; Alexander G. M.; Hayasaka Y.; Jones P. R.; Waters E. J. **2007**. Sulfate-a candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55,1799-1807.
- Pohl P. **2007**. What do metals tell us about wine?. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 941-8.
- Poinsaut P.; Hardi G. **1995**. Les Bentonites (1re partie) - Caractérisation des bentonites. *Revue des Œnologues*, 75, 25-30.
- Poinsaut P.; Hardi G. **1995**. Les Bentonites – Analyses et comportements des bentonites (2e partie). *Revue des Œnologues*, 76, 17-21.
- Poinsaut P.; Hardi G. **1995**. Les Bentonites – Utilisation des bentonites en œnologie (3<sup>e</sup> partie). *Revue des Œnologues*, 77, 29-34.
- Powers J. R.; Nagel C. W.; Weller K. **1988**. Protein removal from a wine by immobilized grape proanthocyanidins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 117-20.
- Pueyo E.; Dizy M.; Polo M. C. **1993**. Varietal differentiation of must and wines by means of protein fraction. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 255-60.
- Pueyo E.; Martín-Alvarez P. J.; Polo M. C. **1995**. Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cavas (sparkling wines). *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 518-24.
- Renault A. S.; Deloire A.; Bierne J. **1996**. Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 35, 49-52.
- Ribéreau-Gayon P.; Stonestreet E. **1966**. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Analytique*, 48, 188-96.
- Ribéreau-Gayon J.; Peynaud E.; Ribéreau-Gayon P.; Sudraud P. **1976**. *Traité d'Œnologie: Sciences et Techniques du Vin*. Volum 3, Dunod, Paris.
- Ribéreau-Gayon P.; Glories Y.; Maujean A.; Dubourdieu D. **2006**. *Handbook of Enology*. Volume 2, The chemistry of wine: stabilization and treatments, John Wiley & Sons, Chichester.

## Bibliografia

- Robert N.; Roche K.; Lebeau Y.; Breda C.; Boulay M.; Esnault R.; Buffard D. **2002**. Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Science*, 162, 389-400.
- Robinson S. P.; Jacobs A. K.; Dry I. B. **1997**. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiology*, 114, 771-8.
- Rodríguez S.; García A.; Garrido J.; Ancín C. **1999**. Influence of decantation of viura must on the cation content. Evolution during wine fermentation and stabilization. *Food Research International*, 32, 683-9.
- Rodríguez-Delgado M. A.; Malovaná S.; Montelongo F. J.; Cifuentes A. **2002**. Fast analysis of proteins in wines by capillary gel electrophoresis. *European Food Research and Technology*, 214, 536-40.
- Salazar F. N.; Achaerandio I.; Labbe M. A.; Güell C.; López F. **2006**. Comparative study of protein stabilization in white wine using zirconia and bentonite: physicochemical and wine sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9955-8.
- Salzman R.; Tikhonova I.; Bordelon B. P.; Hasegawa P. M.; Bressan R. A. **1998**. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiology*, 117, 465-72.
- Santoro M. **1995**. Fractionation and characterization of must and wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 250-4.
- Sarmiento M. R.; Oliveira J. C.; Slatner M.; Boulton R. B. **2000a**. Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability tests. *Food Control*, 11, 423-32.
- Sarmiento M. R.; Oliveira J. C.; Boulton R. B. **2000b**. Selection of low swelling materials for protein adsorption from white wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 41-7.
- Sarmiento M. R.; Oliveira J. C.; Slatner M.; Boulton R. B. **2001**. Comparative quantitative analysis of the effect of cultivar, wine growing region and vinification method on the protein profiles of some white wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 759-66.
- Sarry J. E.; Sommerer N.; Sauvage F. X.; Bergoin A.; Rossignol M.; Albagnac G.; Romieu C. **2004**. Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *Proteomics*, 4, 201-15.
- Saulnier L.; Mercereau T.; Vezinhet F. **1991**. Mannoproteins from flocculating and non-flocculating *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54, 275-86.
- Saulnier L.; Brillouet J. M.; Moutounet M.; Hervé du Penhoat C.; Michon V. **1992**. New investigations of the structure of grape arabinogalactan-protein. *Carbohydrate Research*, 224, 219-35.
- Sauvage L.; Frank D.; Stearne J.; Millikan M. B. **2002**. Trace metal studies of selected white wines: an alternative approach. *Analytica Chimica Acta*, 458, 223-30.
- Segarra I.; Lao C.; López-Tamames E.; De la Torre-Boronat M. C. **1995**. Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharides levels in winemaking products. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 564-70.

## Bibliografia

- Shevchenko A.; Wilm M.; Vorm O.; Mann M. **1996**. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68, 850-8.
- Siebert K. J.; Troukhanova N. V.; Lynn P. Y. **1996a**. Nature of polyphenol-protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 80-5.
- Siebert K. J.; Carrasco A.; Lynn P. Y. **1996b**. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1997-2005.
- Siebert K. J.; Lynn P. Y.; Carrasco, A. **1996c**. Analysis of haze-active polyphenols and proteins in grape juices and wines. In *Proceedings of the 4th International Cool Climate Symposium on Viticulture and Enology*, Rochester, NY; New York State Agricultural Experiment Station: Geneva, NY, ,VII-18-VII-21.
- Siebert K. J.; Lynn Y. L. **1998**. Comparison of polyphenol interactions with polyvinylpyrrolidone and haze-active protein. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56, 24-31.
- Siebert K.J. **1999**. Effects of Protein–Polyphenol Interactions on Beverage Haze, Stabilization, and Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 353-62.
- Siebert K. J. **2006**. Haze formation in beverages. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 987-94.
- Singh N. K.; Bracker C. A.; Hasegawa P. M.; Handa A. K.; Buckel S.; Hermodson M. A.; Pfankoch E.; Regnier F. E.; Bressan R. A. **1987**. Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotin adaptation in plant cells. *Plant Physiology*, 85, 529-36.
- Singleton V. L.; Orthofer R.; Lamuela-Raventós R. M. **1999**. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-78.
- Slotstra J. W.; De Geus P.; Haas H.; Verrips C. T.; Meloen R. H. **1995**. Possible active site of the sweet-tasting protein thaumatin. *Chemical Senses*, 20, 535-43.
- Soleas G. J.; Diamandis E. P.; Karumanchiri A.; Goldberg D. M. **1997**. A multiresidue derivatization gas chromatographic assay for fifteen phenolic constituents with mass selective detection. *Analytical Chemistry*, 69, 4405-9.
- Somers T. C.; Ziemelis G. **1973**. Direct determination of wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 24, 47-50.
- Somers T. C.; Ziemelis G. **1985a**. Spectral evaluation of total phenolic components in *Vitis vinifera*: grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36,1275-84.
- Somers T. C.; Ziemelis G. **1985b**. Flavonol haze in white wines. *Vitis*, 24, 43-50.
- Somers T. C.; Vérette E.; Pocock K. F. **1987**. Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40, 67-78.
- Stintzi A.; Heitz T.; Prasad V.; Wiedemann-Merdinoglu S.; Kauffmann S.; Geoffrey P.; Legrand M.; Fritig B. **1993**. Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75, 687-706.
- Stryer L. **1975**. *Biochemistry*, W.H. Freeman, San Francisco.

## Bibliografia

- Suckau D.; Resemann A.; Schuereberg M.; Hufnagel P.; Franzen J.; Holle A. **2003**. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, 952-65.
- Takeda S.; Sato F.; Ida K.; Yamada Y. **1991**. Nucleotide sequence of a cDNA for osmotin-like protein from cultured tobacco cells. *Plant Physiology*, 97, 844-6.
- Tattersall D. B.; Heeswijck R.; Høj P. B. **1997**. Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiology*, 114, 759-69.
- Tattersall D. B. **1999**. Identification and characterization of *Vitis vinifera* pathogenesis-related proteins that accumulate during berry ripening. Ph.D. Thesis, University of Adelaide, 158 pp.
- Tattersall D. B.; Pocock K. F.; Hayasaka Y.; Adams K.; van Heeswijck R.; Waters E. J.; Høj P. B. **2001**. Pathogenesis related proteins-their accumulation in grapes during berry growth and their involvement in white wine heat instability. En *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*, K.A. Roubelakis-Angelakis. Kluwer Academic Publishers, 183-202.
- Toland T. M.; Fugeslsang K. C.; Muller C. J. **1996**. Methods for estimating protein instability in white wines: a comparison. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 111-2.
- Tulyathan V.; Boulton R. B.; Singleton V. L. **1989**. Oxygen uptake by gallic acid as a model for similar reactions in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 844-9.
- Tyson P. J.; Luis E. S.; Day W. R.; Walker B.; Lee T. H. **1981**. Research note on estimation of soluble protein in must and wine by high-performance liquid chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32, 241-3.
- Uknes S.; Mauch-Mani B.; Moyer M.; Potter S.; Williams. S.; Dincher S.; Chandler C.; Slusarenko A.; Ward E.; Ryals J. **1992**. Acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 4, 645-56.
- Van der Wel H.; Loeve K. **1972**. Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *European Journal of Biochemistry*, 31, 221-5.
- Van der Wel H.; Bel W. J. **1976**. Effect of acetylation and methylation on the sweetness intensity of thaumatin. *Chemical Senses*, 2, 211-8.
- Van Loon L. C. **1985**. Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, 4, 111-6.
- Van Loon L. C.; Rep M.; Pieterse C. M. J. **2006**. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135-62.
- Vanrell G.; Esteruelas M.; Canals J. M.; Zamora F.; Poinssaut P.; Sieczkowski N.; Lebouef D. **2005**. Influence du type de clarification du vin de base et des adjuvants de tirage sur la qualité de la mousse des vins effervescents. *Revue des Œnologues et des Techniques Vitivinicoles et Œnologiques*, 114, 28-30.
- Vanrell G.; Canals R.; Esteruelas M.; Fort F.; Canals J. M.; Zamora F. **2007**. Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chemistry*, 104, 148-55.

## Bibliografia

- Vidal S.; Francis L.; Williams P.; Kwiatkowski M.; Gawel R.; Cheynier V.; Waters E. J. **2004**. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry*, 85, 519-25.
- Vigers A. J.; Roberts W. K.; Selitrennikoff C. P. **1991**. A new family of plant antifungal protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4, 315-23.
- Villiers A.; Majek P.; Lynen F.; Crouch A.; Lauer H.; Sandra P. **2005**. Classification of South African red and white wines according to grape variety based on the non-coloured phenolic content. *European Food Research and Technology*, 221, 520-8.
- Vincenzi S.; Polesani M.; Curioni A. **2005**. Removal of specific protein components by chitin enhances protein stability in a white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 246-54.
- 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 and Food Chemistry*, 38, 248-51.
- Waterhouse A. L.; Laurie V. F. **2006**. Oxidation of wine phenolics: a critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 306-13.
- Waters E. J.; Wallace W.; Williams P. J. **1991**. Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 123-7.
- Waters E. J.; Wallace W.; Williams P. J. **1992**. Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1514-9.
- Waters E. J.; Wallace W.; Tate M. E.; Williams P. J. **1993**. Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 724-30.
- Waters E. J.; Pellerin P.; Brillouet J. M. **1994a**. A wine arabinogalactan-protein that reduces heat-induced wine protein haze. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 43-8.
- Waters E. J.; Pellerin P.; Brillouet J. M. **1994b**. A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydrate Polymers*, 23, 185-91.
- 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 either phenolic association or glycosylation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1, 94-9.
- Waters E. J.; Shirley N. J.; Williams P. J. **1996**. Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3-5.
- Waters E. J.; Hayasaka Y.; Tattersall D. B.; Adams K. S.; Williams P. J. **1998**. Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4950-7.
- 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, 212-5.

## Bibliografia

- Weiss K. C.; Yip T. T.; Hutchens T. W.; Bisson L. F. **1998**. Rapid and sensitive fingerprinting of wine proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 231-9.
- Weiss K. C.; Lange L. W.; Bisson L. F. **2001**. Small-scale fining trials: effect of method of addition on efficiency of bentonite fining. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 275-9.
- Williams K. M.; Fox P.; Marshall T. **1995**. A comparison of protein assays for the determination of the protein concentration of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 101, 365-9.
- Woloshuk C. P.; Meulenhoff J. S.; Sela-Buurlage M.; Van den Elzen P. J. M.; Cornelissen B. J. C. **1991**. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell*, 3, 619-28.
- Yan J. X.; Wait R.; Berkelman T.; Harry R. A.; Westbrook J. A.; Wheeler C. H.; Dunn M. J. **2000**. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 21, 3666-72.
- Yokotsuka K.; Ebihara T.; Sato T. **1991**. Comparison of soluble proteins in juice and wine from Koshu grapes. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 71, 248-53.
- Yokotsuka K.; Singleton V. L. **1997**. Glycoproteins: characterization in a hybrid grape variety (Muscat Bailey A) juice, fermenting must, and resultant red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 100-14.
- Zafrilla P.; Morillas J.; Mulero J.; Cayuela J. M.; Martínez-Cachá A.; Pardo F.; López Nicolás J. M. **2003**. Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4694-700.
- Zamora F. **2002**. La crianza del vino tinto con lías, una nueva tendencia. *Enólogos*, 19, 24-8.
- Zamora F. **2005**. Las mannoproteínas; origen e interés enológico. *Enólogos*, 36, 26-9.