



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS
GRADO EN ENOLOGÍA**

**APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES
HIDROSTÁTICAS Y ENZIMAS
PROTEOLÍTICAS EN MOSTOS PARA
MEJORAR LA ESTABILIDAD PROTEICA
DE LOS VINOS BLANCOS**

Alumno/a: SARA JUAN OVEJERO

Tutor/a: JOSÉ MANUEL RODRÍGUEZ NOGALES

Cotutores/as: ENCARNACIÓN FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

JOSEFINA VILA-CRESPO

Palencia. Julio 2015

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, José Manuel Rodríguez Nogales, por guiarme desde el inicio de este trabajo con sus correcciones y comentarios, puesto no habría llegado a la calidad con la que se ha finalizado sin su ayuda y apoyo.

A Miguel Ángel García Esteban por su ayuda, tanto en la bodega como en el laboratorio de la universidad durante todo el proceso experimental.

A la empresa “Hiperbaric” (Burgos) por permitirnos utilizar sus instalaciones para llevar a cabo este trabajo.

A mis amigos por todo el apoyo que han dado, tanto en los buenos como en los malos momentos con esos mensajes de ánimo desde cualquier lugar en el que estuvieran.

A mi familia, en especial a mis padres, porque sin su apoyo incondicional y ánimos a lo largo de toda la carrera, así como todo lo que me han permitido realizar, no hubiese llegado hasta este punto y final.

ÍNDICE	PÁGINA
1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	6
2.1. PROTEÍNAS DEL VINO	6
2.2. QUIEBRA PROTEICA	6
2.3. ACTUACIÓN A NIVEL ENOLÓGICO	6
2.4. ALTERNATIVAS A LA ESTABILIZACIÓN PROTEICA	7
2.4.1. Enzimas proteolíticas	7
2.4.1.1. Tipos de enzima proteolíticas	7
2.4.1.2. Estudios previos con enzimas proteolíticas	9
2.4.2. Altas presiones hidrostáticas	9
2.4.2.1. Modificación de las estructuras de las proteínas	9
2.4.2.2. Actuación sobre la actividad microbiana del vino	10
2.4.2.3. Modificaciones en la composición y análisis sensorial de los vinos	11
2.4.2.4. Equipo altas presiones hidrostáticas	11
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. OBJETIVOS	12
5. MATERIAL Y MÉTODOS	13
5.1. PROCESO DE VINIFICACIÓN	13
5.2. TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES	13
5.3. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS	14
5.4. MÉTODOS ANALÍTICOS	15
5.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	16
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
6.1. SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	16
6.2. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS	17

6.2.1.Efecto sobre la concentración de proteínas solubles	17
6.2.2.Efecto sobre la estabilidad proteica	17
6.3. EFECTO DE LAS ENZIMAS	18
6.3.1.Efecto sobre la concentración de proteínas solubles	18
6.3.2.Efecto sobre la estabilidad proteica	21
6.4. EFECTO COMBINADO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y LAS ENZIMAS	22
7. CONCLUSIONES	23
8. BIBIOGRAFÍA	24

1. RESUMEN

Actualmente se están buscando alternativas al uso de la bentonita como agente clarificante para vinos blancos, puesto que afecta a la características organolépticas de estos. Por esta razón, en este estudio, se ha analizado la posibilidad de emplear de manera combinada las altas presiones hidrostáticas en mostos y las enzimas proteolíticas en vinos. En ambos caso, tanto en los mostos tratados a altas presiones hidrostáticas durante 1 min, 3 min y 15 min a 600 MPa como en los vinos tratados con enzimas proteolíticas a dosis bajas a una temperatura de 20°C, no se observan diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteínas solubles ni en la estabilidad proteica de los vinos. Pero cuando se habla del efecto combinado de ambos tratamientos, se ha observado que, cuando se produce una disminución en la concentración de proteínas, la inestabilidad proteica de los vinos es mayor.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. PROTEÍNAS DEL VINO

La mayoría de las proteínas responsables de la quiebra proteica proceden de la uva, teniendo puntos isoeléctricos y peso molecular bajos (Van Sluyter et al., 2015; Waters et al., 2005).

Estas proteínas son importantes en la estabilidad coloidal y en la claridad del vino blanco. Dentro de las proteínas responsables de la quiebra proteica en los vinos blancos, se han identificado las proteínas relacionadas con la patogénesis, como la taumatina, las quitinasas y las β -glucanasas, estando presentes tanto en el mosto como en el vino (Waters et al., 2005).

Son de peso molecular bajo (20-30kDa), resistentes a proteólisis y cargadas positivamente en el pH del vino, siendo capaces de sobrevivir a la fermentación, permaneciendo posteriormente en el vino y dando lugar a posibles quiebras proteicas, originado esa característica turbidez en determinados vinos blancos (Tabilo-Munizaga et al., 2014).

El origen de estas proteínas en el vino, puede ser debido a las que se encuentran en la uva en mayor proporción y también por la transferencia al vino de los procedentes de las levaduras durante su autólisis.

2.2. QUIEBRA PROTEICA

Es un proceso multifactorial donde la presencia de proteínas es un prerrequisito, el cual se atribuye a la lenta desnaturalización de proteínas térmicamente inestables (Tabilo-Munizaga et al., 2014), produciéndose la formación de un conjunto y su posterior floculación, siendo este conjunto una interacción entre las proteínas y los compuestos no proteicos del vino dando lugar a estructuras multimoleculares insolubles (Pinelo, Zeuner, & Meyer, 2010). Las etapas de este proceso son: despliegue de las proteínas en respuesta a estímulos como elevadas temperaturas de almacenamiento, unión de las proteínas entre ellas o con compuestos no proteicos y por último floculación de estos agregados dando lugar a la presencia de turbios visibles por el ojo (Van Sluyter et al., 2015).

También el potencial de un vino para formar la quiebra no es predecible por la concentración en proteínas que contenga, puesto que existen dos alternativas que pueden explicar la insolubilización de las proteínas. Estas dos alternativas son que las proteínas tienen un comportamiento individual diferente a la sensibilidad al calor y la turbidez es controlada por uno o más factores que no son de origen proteico (Batista, Monteiro, Loureiro, Teixeira, & Ferreira, 2009) como son los polifenoles, los sulfatos, los polisacáridos, el pH del vino y los ácidos orgánicos (Van Sluyter et al., 2015).

Este proceso, ocasiona una turbidez en el vino que, no dando problemas para la salud, si genera una problemática a la hora de su presentación para la venta al consumidor.

2.3. ACTUACIÓN A NIVEL ENOLÓGICO

En cuanto a los procedimientos que se están llevando a cabo para evitar esta quiebra proteica a nivel enológico, se encuentra el uso de agentes de clarificación. El principal es la bentonita, una arcilla montmorillonita, que actúa electrostáticamente con

las proteínas debido a su capacidad de intercambio catiónico (Waters et al., 2005), ocasionado su floculación.

Se ha observado también, que la efectividad y la dosis de bentonita depende del momento de aplicación, así como de la concentración de proteínas en el vino (Ferreira, Piçarra-Pereira, Monteiro, Loureiro, & Teixeira, 2001). Pero debido a que el empleo de esta arcilla, genera modificaciones organolépticas en los vinos, se están buscando alternativas a su uso, para conseguir una mayor calidad de los vinos (Tabilo-Munizaga et al., 2014).

Otro producto diferente a la bentonita es el carragenato, de origen natural procedente de algas rojas y que se encuentra formando parte de la pared hidrocóide de éstas. El carragenato está formado por grupos fosfato, dando lugar a que esté cargado negativamente, lo que provoca que actúe en condiciones favorables en el vino (Marangon et al., 2013). Aunque el empleo de este producto, según diversos estudios, también puede producir quiebra proteica debido a que, si no existen proteínas en el vino, puede reaccionar con otros compuestos no proteicos existentes en el vino (Marangon et al., 2013).

2.4. ALTERNATIVAS A LA ESTABILIZACIÓN PROTEICA

A parte del empleo de la bentonita y el carragenato para la clarificación del vino, existen otras alternativas a la estabilización proteica, como son el uso de enzimas proteolíticas y la modificación de la estructura proteica mediante el uso de tratamientos físicos.

2.4.1. Enzimas proteolíticas

El uso de enzimas como alternativa a la bentonita como clarificante, se está extendiendo debido a que su empleo, genera una problemática por su efecto desfavorable sobre las características sensoriales del vino y la producción de lías como posterior desecho (Pocock, Hoj, Adams, Kwiatkowski, & Waters, 2003). Estas enzimas proteolíticas lo que llevan a cabo es la hidrólisis de los enlaces peptídicos (Theron & Divol, 2014). Las proteasas catalizan los enlaces peptídicos a través de ataques nucleofílicos y/o reducen los enlaces disulfuro durante la vinificación por la reducción enzimática de las reductasas proteína disulfuro (Van Sluyter et al., 2015).

Existen estudios precedentes en los que se emplearon enzimas proteolíticas procedentes de *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Botrytis cinerea*, pero no han sido capaces de degradar eficazmente las proteínas del vino debido a su alta resistencia a la proteólisis, además de que las temperaturas de trabajo fueron desfavorables (Marangon et al. 2012).

2.4.1.1. Tipos de enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas se dividen tres grupos según a qué parte de la proteína afecten (Fig. 1). Estas enzimas se encargan de hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas, teniendo como función más importante el reciclaje del carbono y el nitrógeno de las proteínas. Además, estas pueden dividirse en las exopeptidasas, que se adhieren a un grupo N-terminal o C-terminal y en las endopeptidasas que actúan en el interior de la cadena polipeptídica y se subdividen según su peso molecular, carga, especificidad del sustrato, mecanismo catalítico, estructuras tridimensionales y los residuos aminoácidos presentes su lugar catalítico (Theron & Divol, 2014).

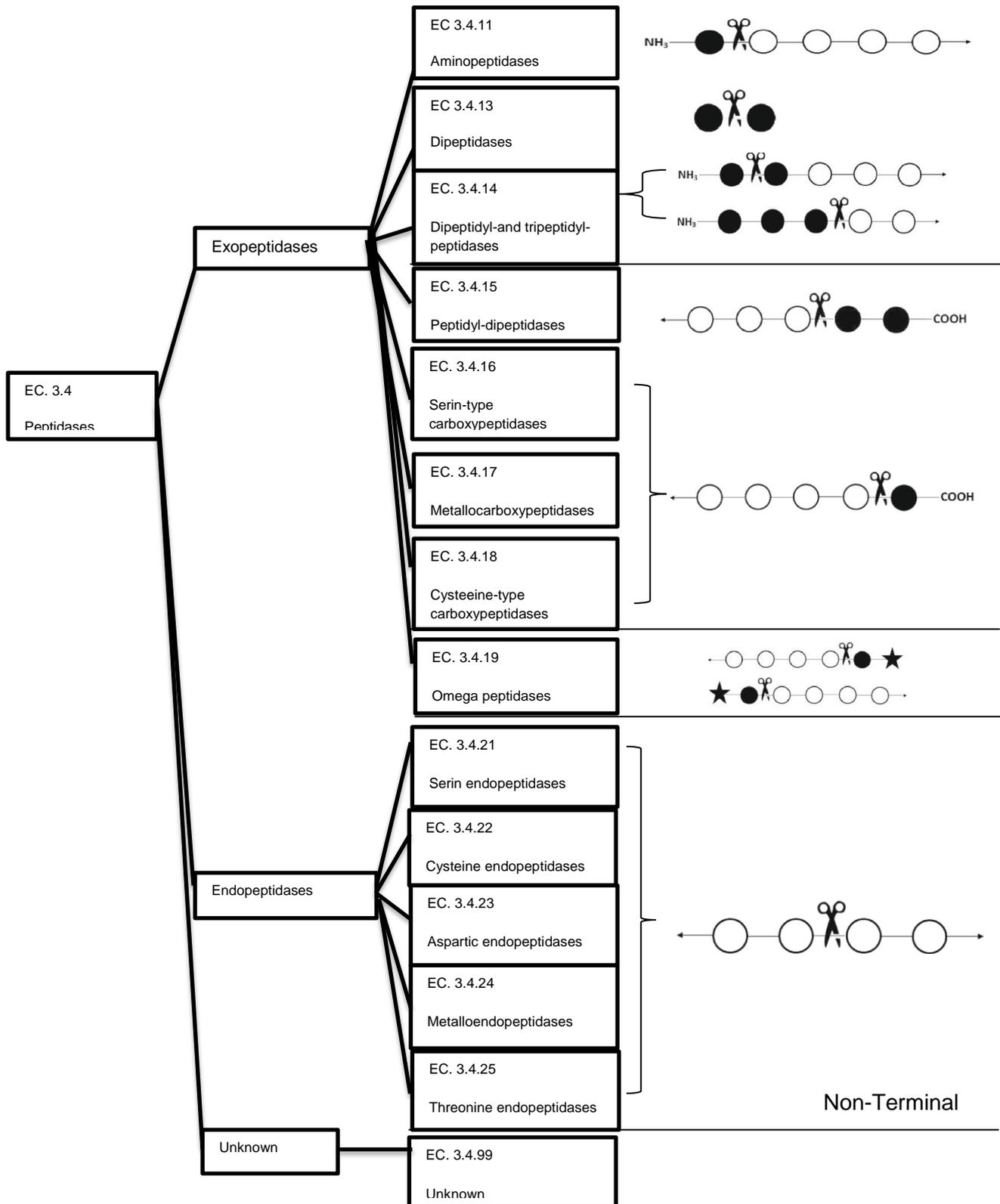


Figura 1. Clasificación de las proteasas (Theron & Divol, 2014)

En estudios previos se emplearon diferentes enzimas con resultados diversos. Realizándose estos con diversas dosis de enzima, tiempo de actuación y temperatura del vino.

2.4.1.2. Estudios previos con enzimas proteolíticas

Con poco éxito se ha empleado la bromelina para hidrolizar las proteínas del vino. Su nombre es debido a que ha sido encontrada en el tejido de la planta *Bromeliceae*. La bromelina pertenece al grupo de las cistein-proteasas, cuyo residuo de cisteína es del cual depende la actividad de la enzima (Benucci, Liburdi, Garzillo, & Esti, 2011).

Otros estudios previos han empleado una mezcla de Aspergillopepsina I y II que actúan al pH del vino y a altas temperaturas, siendo las dos endopeptidasas ácidas extracelulares. La Aspergillopepsina I es una proteinasa aspártica tipo pepsina que actúa a pH 2,0-4,0 mientras que la Aspergillopepsina II es una proteinasa aspártica no tipo pepsina, resistente a los inhibidores de estas proteinasas como la pepstatina y cuyo pH óptimo es entre 1,8-2,4. Las dos enzimas son inactivas irreversiblemente por encima de pH 6,0 (Marangon et al., 2012). El principal inconveniente del uso de esta enzima es que se ha de emplear altas temperaturas (70°C) para observarse una acción proteolítica sobre las proteínas del vino.

También se ha investigado el uso de una proteasa prolina-específica obtenida a partir del hongo *Aspergillus niger*. En esta enzima la estrecha especificidad de su sustrato se dirige hacia las proteínas ricas en prolina. Se produce una reducción de la longitud de las cadenas, las proteínas activas para la quiebra proteica se vuelven menos hidrofóbicas y no pueden contribuir a la formación de grandes redes de proteína-polifenol (Lopez & Edens, 2005). Se observaron resultados favorables frente a las proteínas del vino al aplicar altas concentraciones de enzima.

2.4.2. Altas presiones hidrostáticas

La alta presión hidrostática es un proceso técnico no térmico que somete a productos a presiones entre 100 y 1000 MPa. Es una tecnología verde ya que usa agua como medio compresor y energéticamente es muy eficiente. Su uso en plantas industriales se lleva a cabo sobre lotes a los cuales se les va a someter la alta presión. Se introducen en una cámara de alta presión y a su vez en un recipiente cerrado, al cual se va a transmitir la alta presión (Santos, Nunes, Saraiva, & Coimbra, 2012).

De este proceso sobre el producto, son esperadas reacciones químicas influenciadas por las altas presiones hidrostáticas, según el principio de Le Chatelier que, según explica, la reducción de volumen puede resultar en un cambio en el equilibrio de las reacciones (Tao et al., 2013).

Hasta el momento, se ha empleado esta técnica dentro del aspecto antimicrobiano, para la reducción del uso de dióxido de azufre (SO₂) ya que elimina microorganismos patógenos e inhibe enzimas como las polifenoloxidasas (Santos et al., 2012).

2.4.2.1. Modificación de la estructura de las proteínas.

Recientemente se ha descrito que la presurización del vino modifica la estructura α -helicoidal y β -helicoidal de las proteínas del vino. Únicamente afecta a los enlaces no covalentes (iónicos, hidrofóbicos y puentes de hidrógeno). La estructura primaria permanece sin cambio, mientras que la secundaria, terciaria y cuaternaria se

desdobra y disocia. A presiones de 450 MPa, la estructura α -helicoidal de las proteínas disminuye, lo que podría estar relacionado con el incremento de las reacciones intermoleculares entre las proteínas y los componentes no proteicos del vino. Como consecuencia de la ruptura de los enlaces no covalentes dentro de las proteínas se observa, posteriormente, una reformación de enlaces intra e intermoleculares dentro o entre las proteínas. Diferentes interacciones pueden contribuir a la estabilización de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria en las proteínas del vino (Tabilo-Munizaga et al., 2014).

Muchas estructuras cuaternarias no se ven afectadas por la presión o muestran un comportamiento complejo, como la disociación seguida de la agregación de subunidades o precipitación. En cambio, las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas pueden ser modificadas significativamente a presiones mayores de 200 MPa.

Según el diagrama de fase específica de la Fig. 2, el área presión temperatura es en la cual las proteínas mantiene su estructura nativa.

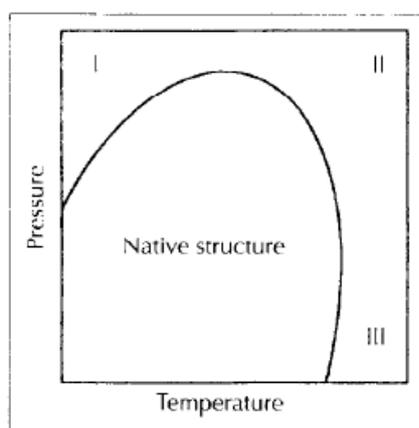


Figura 2. Esquema general de la presión-temperatura del diagrama de proteínas (Messens, VanCamp, & Huyghebaert, 1997)

Las condiciones límite para la desnaturalización siguen una característica forma elipsoidal. A altas temperaturas, un incremento en las temperaturas de desnaturalización se combina con un incremento de la presión para modificar la estructura de la proteína (zona III). Si se encuentra por debajo de la temperatura máxima de transición, la desnaturalización de la proteína ocurre a bajas temperaturas al mismo tiempo que se emplean altas presiones (zona II). Por encima de la temperatura correspondiente a la máxima presión de transición, la desnaturalización ocurre a bajas presiones empleando bajas temperaturas (zona I) (Messens et al., 1997)

2.4.2.2. Actuación sobre la actividad microbiana del vino

Hasta la fecha, la aplicación más estudiada del uso de las altas presiones hidroestáticas es como proceso antimicrobiano, que posibilita su uso como sustitutivo al dióxido de azufre (SO_2) en el embotellado. En general, el empleo de este tratamiento no afecta a la composición química o sensorial salvo en contadas ocasiones que se verán el apartado siguiente.

La utilización de altas presiones hidroestáticas a 400 MPa durante 2 minutos y a una temperatura de 20°C da lugar a la inactivación de *Leuconostoc oenos*,

Lactobacillus spp, *Acetobacter* y *Botrytis cinerea*. Si la presión y el tiempo cambian a 500 MPa y 5 minutos respectivamente, se produce la inactivación de *Saccharomyces*, *Brettanomyces* y *Oenococcus oeni* (Santos et al., 2012).

2.4.2.3. Modificaciones en la composición y análisis sensorial de los vinos

Existen modificaciones en la composición de los vinos, siendo estas debidas sobre todo al empleo de altas presiones severas, más grandes y durante más tiempo (650 MPa, 1 hora y 2 horas) que las que se han venido utilizando habitualmente en la industria alimentaria y enológica.

La consecuencia de esta alta presión es el posible cambio de las características físico-químicas del vino tinto, disminuyendo la intensidad del color y los compuestos fenólicos (debido al incremento de las reacciones de condensación de los estos compuestos fenólicos) (Santos et al., 2013) así como en los antocianos, ésteres tartáricos, flavonoides y taninos. El cambio de color durante la crianza del vino se debio, principalmente, por la polimerización de los antocianos (Tao et al., 2012).

En cuanto a las modificaciones en el aspecto sensorial se vieron cambio tras el empleo de una presión de 500 MPa seguido de varios meses de almacenamiento. Estos vinos poseían más aroma a fruta compotada y a especias, y los vinos no tratados con altas presiones eran menos frutales y florales (Santos et al., 2013).

En otros estudios llevados a cabo, pero con una presión mayor (600 MPa durante 2 horas) se vio que desde un punto de vista de la crianza de vinos, las altas presiones hidrostáticas pueden modificar las propiedades organolépticas, acelerando así este proceso de envejecimiento de los vinos, pero en vinos con potencial de crianza bajo (Tao et al., 2012).

2.4.2.4. Equipo altas presiones hidrostáticas

Los equipos de alta presión hidrostática (Fig. 3) están formados por una cámara de presurización (cilíndrica de acero de elevada resistencia), un generador de la presión (generalmente un sistema de bombeo constituido por una bomba hidráulica y un sistema multiplicador de presión) y un sistema de control de temperatura.

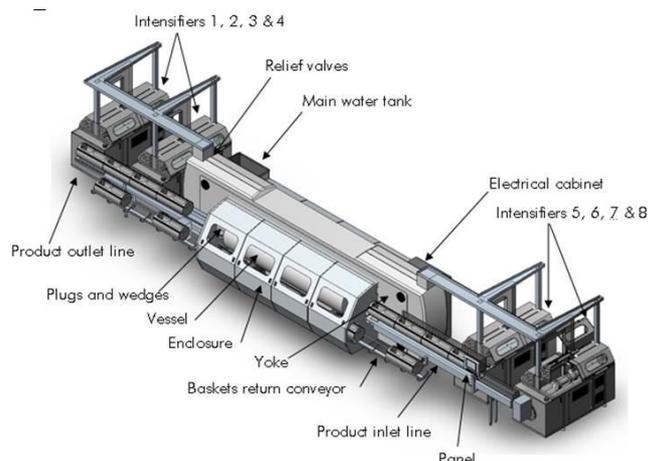


Figura 3. Esquema del diseño de la máquina de altas presiones hidrostáticas.

En este caso el equipo empleado tiene un funcionamiento discontinuo, donde las muestras a tratar se colocan estas en el interior de pequeños contenedores y se

introducen en la cámara de presurización (Fig.4). El sistema de bombeo irá sustituyendo el aire de la cámara por el fluido de presurización hasta su total llenado y posteriormente, incrementará la presión hasta los niveles establecidos. Una vez alcanzada la presión deseada, una válvula que cierra el circuito, permitirá su mantenimiento, sin necesidad de aporte adicional de energía, el tiempo estipulado (Herrero & Romero de Avila, 2006).

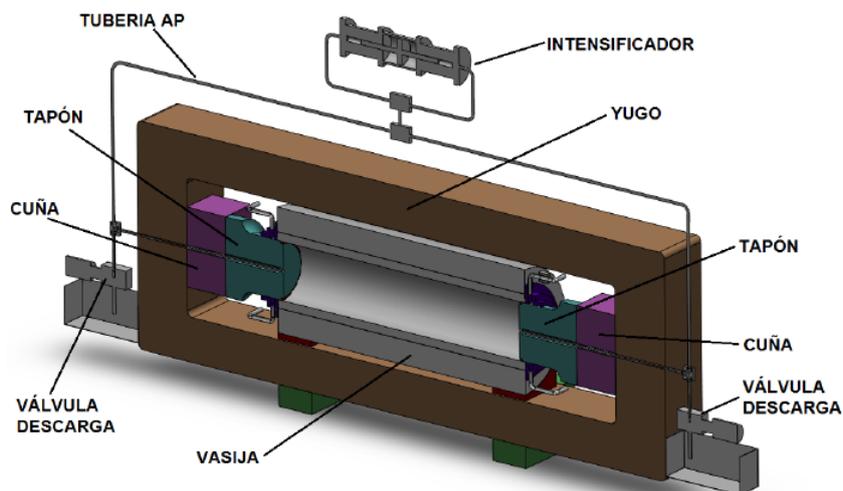


Figura 4. Esquema del interior de la máquina, donde el mosto a tratar fue introducido.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se están buscando métodos alternativos a la bentonita para estabilizar los vinos blancos frente a la quiebra proteica. La aplicación de esta arcilla presenta efectos negativos sobre la calidad sensorial del vino, además de generar pérdidas de vino y problemas ambientales por los residuos generados.

Una estrategia para sustituir o reducir la cantidad de bentonita podría ser el uso de proteasas. Sin embargo, es necesario un proceso previo de desnaturalización de las proteínas causantes de la turbidez proteica para que el ataque proteolítico sea eficaz. Existen estudios, como mayor o menor eficacia, que han empleado un tratamiento térmico desnaturalizante para mejora la acción de las proteasas. Sin embargo, este calentamiento del vino puede provocar importantes pérdidas en la calidad del vino.

En este estudio, se propone la aplicación de una técnica de presurización del mosto (sin calentamiento) para provocar la modificación de la estructura de las proteínas causantes de la quiebra proteica y, de este modo, favorecer la acción de las proteasas. Es conocido que la aplicación de altas presiones en mostos modifica las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas del vino.

4. OBJETIVOS

Los objetivos de este Trabajo Fin de Grado fueron:

- Estudiar el efecto de la aplicación de altas presiones hidrostáticas en mostos blancos sobre la estabilidad proteica de los vinos.
- Analizar el uso de diversas enzimas proteolíticas en vinos, tratado previamente el mosto a alta presión sobre la estabilidad proteica de los vinos.

Para realizar el primer objetivo se decidió realizar un tratamiento de altas presiones a 600MPa a tiempos bajos de 1 y 3 min, para que el proceso fuese rentable desde el punto de vista económico, y a 15 min, para comprobar el efecto de un alto tiempo de aplicación. Para el segundo objetivo se seleccionaron endo y exoproteasas ácidas con distintos mecanismos de acción.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. PROCESO DE VINIFICACIÓN

El mosto utilizado para este estudio procedía de uvas de la variedad Verdejo de la vendimia 2014, vendimiadas de los viñedos existentes en la Finca Zamadueñas perteneciente al ITACyL (Valladolid). Una vez que las uvas fueron vendimiadas y procesadas en la bodega experimental de la ETSIIA del Campus de Palencia de la Universidad de Valladolid. El análisis del mosto fue realizado en los laboratorios de la bodega experimental. A continuación se muestra la composición general del mismo:

- Densidad: 1105 g/l
- Grado Brix: 24,2
- Grado probable: 14%
- Acidez Total: 3,9 g/l de ácido tartárico
- pH: 3,44
- NFA: 175 mg/l
- IPT: 66
- IC: 20

Después de los análisis, se corrige la acidez del vino a una dosis de 0,75 g/l y el NFA hasta 300 mg/l. Una vez realizado los tratamientos de altas presiones hidrostáticas el mosto fue fermentado en recipiente de 3 L. Cada uno de estos recipientes contenía el mosto procedente de cada tratamiento a 0, 1, 3 y 15 minutos a 600 MPa respectivamente. La fermentación del mosto se realizó mediante la inoculación de levaduras comerciales para vinos blancos de la especie *Saccharomyces cerevisae* (Viniferm, AGROVIN) a una dosis de 25 g/hl en un ambiente controlado a 20°C en estufa, haciéndose un control diario de temperatura y densidad hasta el final de fermentación. Una vez fermentado el mosto, se trasegó el vino y se sulfitó a una dosis de 30 mg/l de sulfuroso total.

5.2. TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES

En este estudio la aplicación de las altas presiones hidrostáticas se realizó directamente sobre el mosto desfangado. Se repartió el mosto obtenido en botellas de 0,250 L hasta el cuello de las mismas. La máquina empleada para realizar este tratamiento fue el modelo "Hiperbaric 420" (Hiperbaric, Burgos), en la cual introdujimos a su vez, las botellas de mosto en pequeños contenedores que llenamos también con agua según el tratamiento que se aplicaría y posteriormente fueron puestos en el interior de la vasija de la máquina.

La presión que se aplicó sobre el mosto fue la máxima permitida por la máquina que iba a realizar el proceso: 600 MPa. Las duraciones de los tratamientos que se decidieron aplicar fueron: 0, 1, 3 y 15 min. Los tratamientos de 1 y 3 min se realizaron porque son los más viables económicamente y el tratamiento de 15 min porque se quiso realizar para comprobar el efecto de tiempos mayores de tratamiento.

Su codificación la llevamos a cabo relacionando la duración del tratamiento de altas presiones hidrostáticas y el número de réplica correspondiente (Tabla 1). Cada una de estas replicas se hizo en una botella. Como por ejemplo, para el tratamiento sin altas presiones hidrostáticas, la codificación fue M0R, para el de la duración de 1 min fue M1R, para el de 3 min M3R y para el de 15 min M15R.

Tabla 1. Codificación de las muestras según la duración del tratamiento de altas presiones hidrostáticas.

Código	Duración tratamiento altas presiones hidrostáticas
M0R1	0 min a 600 MPa
M0R2	0 min a 600 MPa
M0R3	0 min a 600 MPa
M1R1	1 min a 600 MPa
M1R2	1 min a 600 MPa
M1R3	1 min a 600 MPa
M3R1	3 min a 600 MPa
M3R2	3 min a 600 MPa
M3R3	3 min a 600 MPa
M15R1	15 min a 600 MPa
M15R2	15 min a 600 MPa
M15R3	15 min a 600 MPa

5.3. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS

Se ensayaron cuatro tipos preparados comerciales con actividad proteolítica: prolina endoproteasa, glucoamilasa, pepsina y aminopeptidasa. La preparación de glucoamilasa contiene una proteasa sin caracterizar. Las enzimas prolina endoproteasa, glucoamilasa y aminopeptidasa son líquidas, por lo que aplicamos una dosis de 50 µl/l de cada una y la pepsina como estaba en estado sólido, lo que una dosis de 0,1 g/l según las dosis recomendadas por cada fabricante para que fuera económicamente viable. Estos tratamientos enzimáticos se realizaron sobre el vino una vez que el mosto fue fermentado, al que se aplicó los tratamientos de altas presiones hidrostáticas previos a su fermentación.

La codificación de las muestras con las enzimas se encuentra en la Tabla 2, siguiendo el patrón que se estableció previamente para el tratamiento de altas presiones:

Tabla 2. Codificación de las muestras con tratamiento altas presiones y enzimas.

Código	Duración del tratamiento	Enzima añadida y dosis
M0R1B, M0R2B, M0R3B	0 min a 600 MPa	50 µl/l de prolina endoproteasa
M0R1C, M0R2C, M0R3C	0 min a 600 MPa	50 µl/l de glucoamilasa
M0R1D, M0R2D, M0R3D	0 min a 600 MPa	0,1 g/l de pepsina
M0R1E, M0R2E, M0R3E	0 min a 600 MPa	50 µl/l de aminopeptidasa
M1R1A, M1R2A, M1R3A	1 min a 600 MPa	Sin enzima
M1R1B, M1R2B, M1R3B	1 min a 600 MPa	50 µl/l de prolina endoproteasa
M1R1C, M1R2C, M1R3C	1 min a 600 MPa	50 µl/l de glucoamilasa
M1R1D, M1R2D, M1R3D	1 min a 600 MPa	0,1 g/l de pepsina
M1R1E, M1R2E, M1R3E	1 min a 600 MPa	50 µl/l de aminopeptidasa
M3R1A, M3R2A, M3R3A	3 min a 600 MPa	Sin enzima
M3R1B, M3R2B, M3R3B	3 min a 600 MPa	50 µl/l de prolina endoproteasa
M3R1C, M3R2C, M3R3C	3 min a 600 MPa	50 µl/l de glucoamilasa
M3R1D, M3R2D, M3R3D	3 min a 600 MPa	0,1 g/l de pepsina
M3R1E, M3R2E, M3R3E	3 min a 600 MPa	50 µl/l de aminopeptidasa
M15R1A, M15R2A, M15R3A	15 min a 600 MPa	Sin enzima
M15R1B, M15R2B, M15R3B	15 min a 600 MPa	50 µl/l de prolina endoproteasa
M15R1C, M15R2C, M15R3C	15 min a 600 MPa	50 µl/l de glucoamilasa
M15R1D, M15R2D, M15R3D	15 min a 600 MPa	0,1 g/l de pepsina
M15R1E, M15R2E, M15R3E	15 minutos a 600MPa	50 µl/l de aminopeptidasa

A modo de ejemplo, le corresponde a M0R1B, Mosto (M) sin tratamiento de altas presiones (0) siendo la réplica número 1 (R1) de la muestra con prolina endoproteasa (B). Para las sucesivas muestras la codificación sigue el mismo patrón: Mosto (M), 1 min, 3 min y 15 min (1, 3, 15), réplicas 1, 2 y 3 (R1, R2, R3) y sin enzima, con prolina endoproteasa, con glucoamilasa, con aminopeptidasa y con pepsina (A, B, C, D, E respectivamente).

Una vez que el vino estuvo codificado, se incubaron las muestras durante 15 días a una temperatura controlada de 20°C en una estufa hasta los posteriores análisis.

5.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

- Determinación de proteínas totales en el vino:

Para la determinación de las proteínas totales en el vino se ha empleado el método de Bradford (Bradford, 1976) con las modificaciones propuestas por (Murphey, Powers, & Spayd, 1989). Este método se basa en la capacidad del colorante azul brillante de Coomassie de unirse a las proteínas ya que el máximo de absorbancia cambia a 595 nm cuando se a estas.

- Test de estabilidad térmica por calentamiento

Para conocer las proteínas inestables del vino que pueden causar turbidez o quiebra proteica empleamos este test en periodos cortos de tiempo a altas temperaturas (80°C durante 2 horas) (Pocock & Waters, 2006).

5.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Con todos los datos ya obtenidos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con el propósito de comprobar si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los datos tras llevar a cabo los métodos analíticos ($p < 0,05$), comprobando el efecto de los tratamientos de altas presiones hidrostáticas y enzimáticos sobre las muestras. Posteriormente se utilizó el test de Turkey para la realización de los diferentes subconjuntos homogéneos. Estos análisis se realizaron con el programa Statgraphics Centurion XVI.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

El seguimiento de la fermentación alcohólica se realizó mediante el control de la densidad, no observándose una modificación de la temperatura durante la fermentación, ya que se realizó en una estufa a 20°C. Se decidió que la fermentación alcohólica estuvo finalizada cuando el valor de la densidad se mantuviera durante varios días en el mismo valor, en este caso a 990 g/l. En la Fig. 5 se encuentra la cinética de fermentación del mosto control y los mostos presurizados.

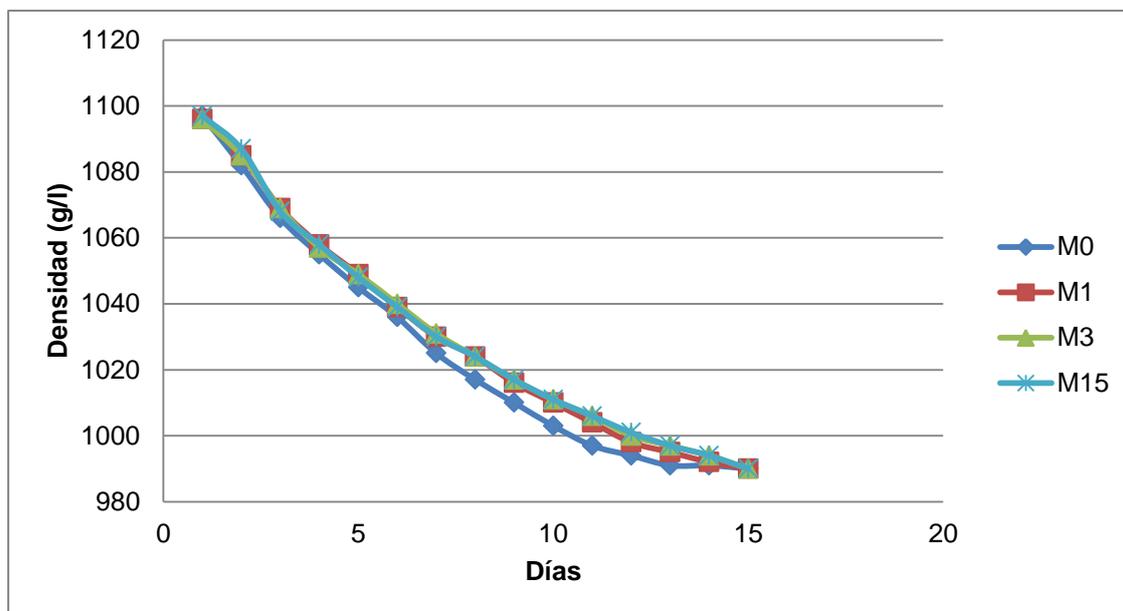


Figura 5. Desarrollo de la fermentación alcohólica.

Como se observa en la Fig.5, la cinética de fermentación de la muestra M0, que no ha sido tratada con altas presiones, es mayor cuando empieza la fase tumultuosa por lo que esto puede ser debido a que las levaduras no *Saccharomyces*

presentes en el vino producen proteasas que pueden incrementar el nitrógeno fácilmente asimilable (Dizy & Bisson, 2000; Reid, Theron, du Toit, & Divol, 2012) y por lo tanto acelerar la cinética de la fermentación. Como en los mostos tratados con las altas presiones hidrostáticas la población microbiana se encuentra muy reducida o es inexistente, la acción de las proteasas es muy baja o nula (Buzrul, 2012).

6.2. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

6.2.1. Efecto sobre la concentración de proteínas solubles

En el caso del efecto de las altas presiones hidrostáticas en el vino, no se aprecia estadísticamente diferencias significativas (Fig. 6), por lo que podemos considerar que las altas presiones no han tenido ningún efecto sobre el mosto este parámetro.

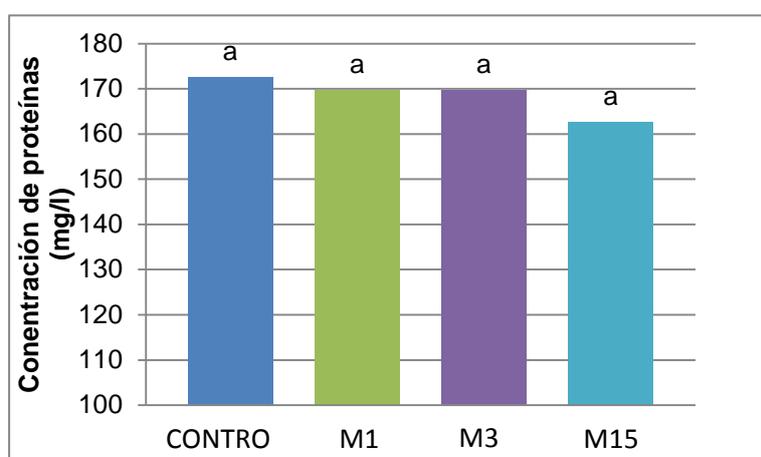


Fig 6. Efecto de las altas presiones hidrostáticas en la concentración de proteínas

Aunque no existan diferencias estadísticamente significativas, sí que se puede apreciar que existen indicios de que hay una menor concentración de proteínas solubles en el vino que se trató durante 15 min a 600 MPa (M15). Recientemente, Tabilo-Muzinaga et al. (2014) estudió el efecto de las altas presiones hidrostáticas en la estructura de las proteínas vínicas de Sauvignon blanc. Estos autores observaron que la presurización de los vinos a presiones de 300-400 MPa (durante 3-5 min) modificaban la estructura secundaria hélice alfa y hoja plegada beta de las proteínas.

Dependiendo de la intensidad del tratamiento, estas modificaciones pueden provocar una desnaturalización de las proteínas y dejar expuestas zonas hidrofóbicas de las proteínas, posibilitando la formación de agregados por entrecruzamiento entre las proteínas. Si bien, hay que señalar que según un reciente modelo para la formación de turbios proteicos propuesto por (Ferreira et al., 2001), además de una desnaturalización de las proteínas es necesaria la presencia de compuestos no proteicos como polifenoles, sulfatos, polisacáridos y sales para formar precipitados.

6.2.2. Efecto sobre la estabilidad proteica

Si se analiza por otro lado el efecto que han tenido las altas presiones hidrostáticas sobre la estabilidad proteica del vino, se observa (Fig. 8) que tampoco existen diferencias estadísticamente significativas como se ha visto en el anterior caso cuando se ha referido a su efecto en la concentración de proteínas.

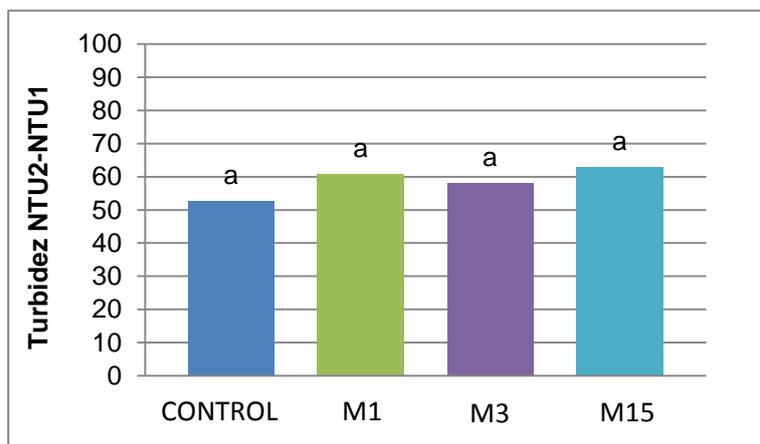


Fig 7. Efecto de las altas presiones hidrostáticas en la estabilidad proteica.

Nuestros resultados no se correlacionan con los obtenidos por Tabilo-Muzinaga et al. (2014) en vinos presurizados de la variedad Sauvignon blanc. Estos autores señalan que los vinos tratados a 450 MPa contribuyen significativamente a la estabilización del vino. Sin embargo, estos vinos presurizados siguen teniendo valores de Δ NTU de 82-89, después del ensayo de estabilidad proteica. Estos resultados aún andan muy lejos de una óptima estabilización proteica de un vino (<2NTU) (Pashova, Guell, & Lopez, 2004). Además, señalan que la estabilidad del vino depende de la intensidad del tratamiento altas presiones hidrostáticas.

6.3. EFECTO DE LAS ENZIMAS

6.3.1. Efecto sobre la concentración de proteínas solubles

Con respecto al efecto de las enzimas en la concentración de proteínas solubles no se ha observado estadísticamente diferencias significativas entre las muestras (Fig. 8) a las que se añadieron preparados comerciales con actividad proteolítica y la muestra sin ningún tipo de enzima e incubada a 0°C.

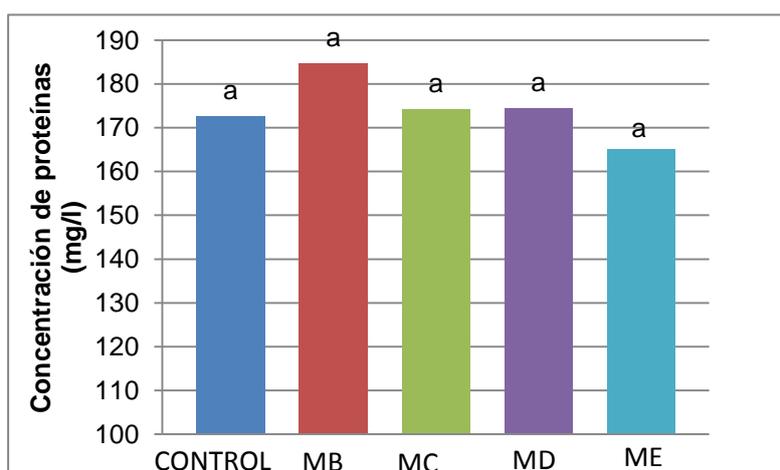


Fig. 8 Efecto de las enzimas sobre la concentración de proteínas

Se ha observado también que proteasas para uso enológico tienen que actuar bajo condiciones extremas como pH 3-4, presencia de inhibidores (alcohol, sulfuroso, etc.) y bajas temperaturas. Además, la resistencia de las proteínas (que dan lugar a la

quiebra proteica) hacia la hidrólisis enzimática es alta debido a sus estructuras. Tanto las quitinasas como las taumatinas son pequeñas y compactas (Theron, Divol 2014) y presentan enlaces disulfuro que potencian su estabilidad. Estas circunstancias particulares hacen que el ataque de las proteasas sea complejo bajo condiciones de vinificación.

A la temperatura de trabajo (20°C) y a las concentraciones ensayadas, se observa una clara resistencia de las proteínas causantes de la turbidez proteica al ataque por las endoproteasas ensayadas (prolina endoproteasas (MB) y pepsina (MC)). Al no existir un tratamiento desnaturante previo al enzimático, la estructura globular de las proteínas se encuentra muy cerrada y permanece estable, impidiendo a las enzimas endoproteasas actuar en el interior de las proteínas. Algunas estrategias de degradación de proteínas basadas en un desnaturación térmica de las proteínas (70-90°C) junto con un tratamiento enzimático proteolítico han sido propuestas (Landbo, Pinelo, Vikbjerg, Let, & Meyer, 2006; Pocock et al., 2003). Sin embargo, el tratamiento térmico provoca un fuerte disminución de la calidad del vino.

Como resultado un poco más claro respecto a la disminución de la concentración de proteínas se observa el del empleo del preparado comercial de aminopeptidasa (ME). Esta enzima es una exoproteasa que actúa en los enlaces terminales N-terminal de las proteínas (Theron & Divol, 2014), por lo que en este caso, aunque no haya habido tratamiento desnaturante que haya desdoblado las estructuras, esta enzima puede haber afectado a los extremos N-terminal, si bien, como se ha dicho no presenta diferencia estadísticamente significativa con el vino control.

Como se ha comentado anteriormente, las condiciones de trabajo ensayadas (temperatura de 20°C y una baja concentración de enzima viable económicamente) fueron muy desfavorable para la proteólisis de las proteínas vínicas. Para obtener un conocimiento más profundo sobre el efecto de la temperatura de proteólisis y la dosis de enzima, se evaluó el contenido de las proteínas solubles de vinos procedentes de mostos sin presurizar y tratados con una endoproteasa (pepsina) y una exopeptidasa (aminopeptidasa). Además, se incluyó el preparado comercial de glucoamilasa con proteasas residuales sin caracterizar. Estos ensayos se realizaron a dos temperaturas (25°C y 45°C) y a una alta dosis de enzima (1ml/l para las aminopeptidasa y la glucoamilasa, y 1g/l para la pepsina).

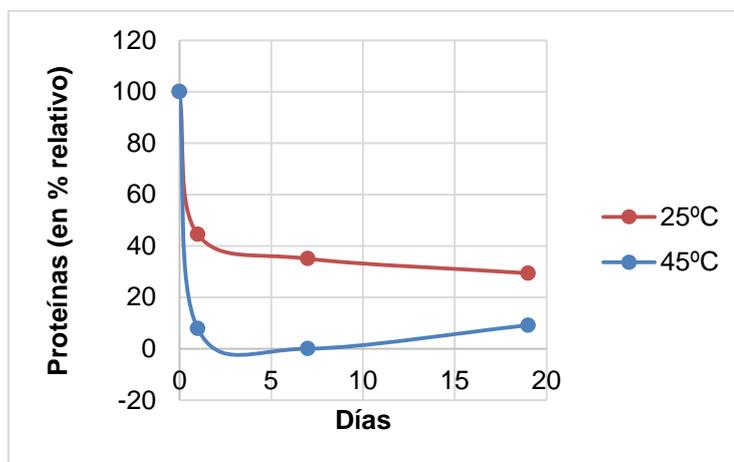


Fig 9. Porcentaje relativo de disminución de la concentración de proteínas respecto a la pepsina.

En la Fig. 9 se observa que con una alta dosis de enzima y tanto a 25°C como a 45°C se produce una disminución de la concentración de proteínas, si bien los mejores resultados se obtuvieron a la temperatura más alta. Esto se puede explicar porque la acción de la enzima en este ensayo se realizó a temperaturas más próximas a su óptima temperatura de actividad, sobre todo en la muestra que se realizó a 45°C, ya que las temperaturas óptimas de las enzimas se encuentran entre 50 y 60°C (Bakalinsky & Boulton, 1985)

Para la pepsina (Fig. 9) y la proteasa procedente del preparado rico en glucoamilasa (Fig. 10) los mejores resultados se alcanzaron a 45°C, si bien, esta diferencia entre las temperaturas no fue tan clara para la aminopeptidasa (Fig. 11) donde después de 20 días de tratamiento la reducción en el nivel de proteínas fue similar.

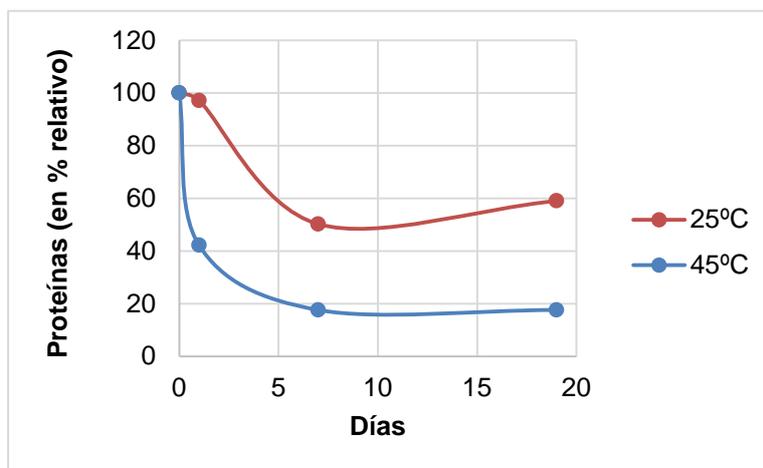


Fig.10. Porcentaje relativo de disminución de la concentración de proteínas respecto a la glucoamilasa.

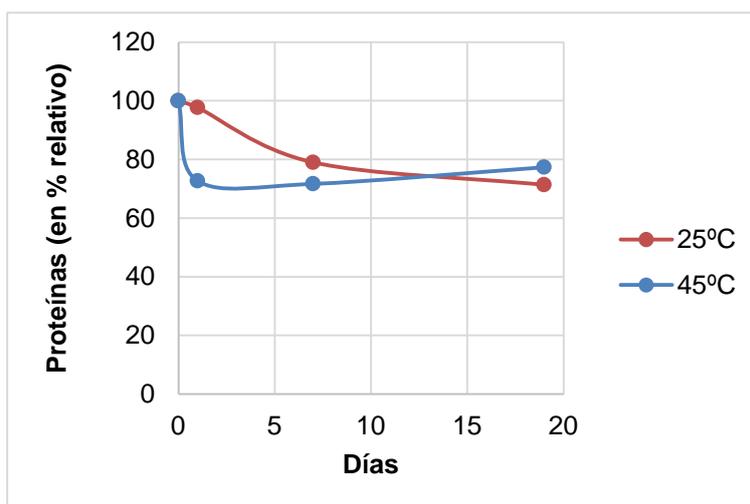


Fig.11. Porcentaje relativo de disminución de la concentración de proteínas respecto a la aminopeptidasa.

6.3.2. Efecto sobre la estabilidad proteica

Fijándose en la estabilidad proteica de los vinos después del tratamiento enzimático con los preparados comerciales se observan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras (Fig. 12). Los mejores resultados se obtuvieron con la enzima MB (prolina proteasa) y los peores para la enzima ME (aminopeptidasa), si bien, sin diferencias estadísticamente significativas con el control.

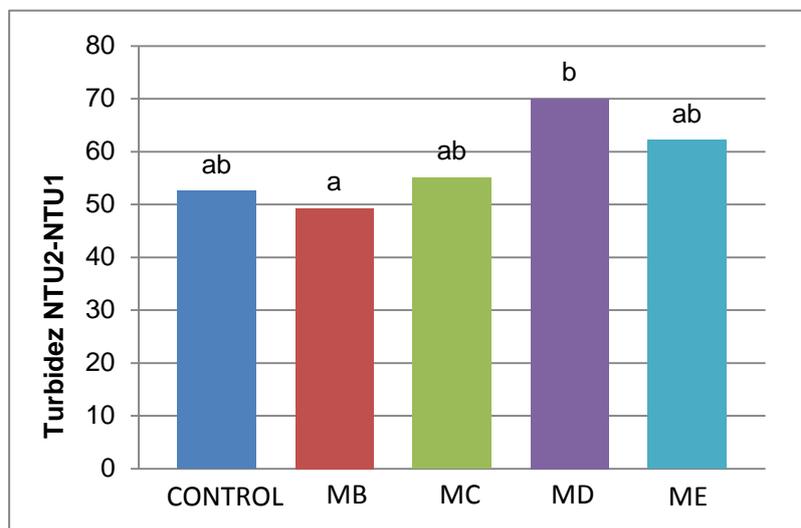


Fig 12. Efecto de las enzimas sobre la estabilidad proteica.

Como se comentó en el anterior punto, se evaluó el efecto de la temperatura (25°C y 45°C) sobre la estabilidad proteica de los vinos tratados con una alta dosis de enzima. En la Fig. 13 se encuentran los resultados de la estabilidad proteica (expresada en % de reducción del incremento de NTU) después de 20 días de tratamiento enzimático.

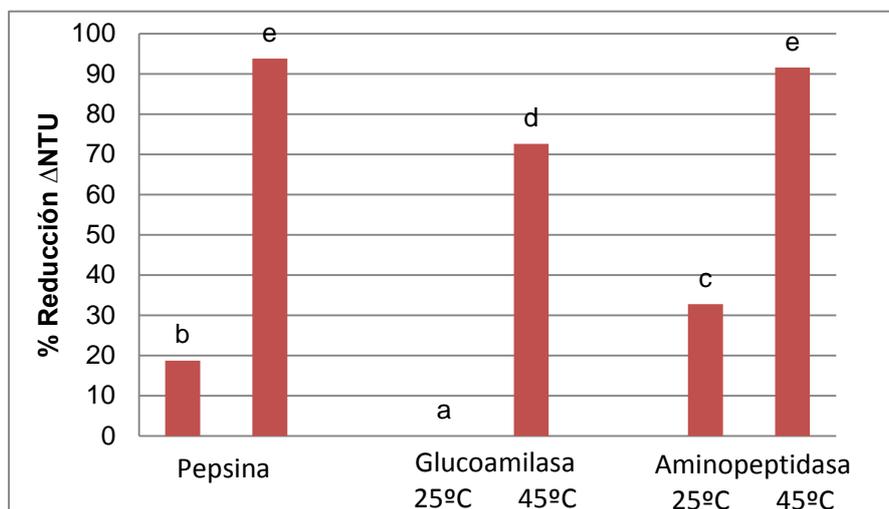


Fig 13. Porcentaje de reducción de Δ NTU.

En la Fig. 13 se ve claramente que el porcentaje de reducción de Δ NTU es mayor a 45°C, por lo que a una temperatura más próxima a la óptima de la actividad de la enzima la inestabilidad proteica es mucho menor. Los mejores resultados se alcanzaron para la pepsina y la aminopectidasa a 45°C.

Estos resultados, junto los señalados para la concentración de proteínas, evidencian que, sin una etapa previa de desnaturalización de las proteínas, es posible una degradación enzimática de las proteínas. Sin embargo son necesarias altas temperaturas de trabajo (45°C) difícilmente aplicables en vinos y dosis altas de enzima que no hacen viable su uso desde un punto de vista económico.

6.4. EFECTO COMBINADO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y LAS ENZIMAS

En la Fig. 14 se analiza el efecto combinado de las altas presiones hidrostáticas y las proteasas para la concentración de proteínas. De manera general, en los vinos tratados enzimáticamente se observa que el tratamiento de presurización más largo (15 min) provoca una mayor disminución en la concentración de proteínas. Este tratamiento es más eficaz cuando se usa junto a la pepsina (MD) y la aminopeptidasa (ME).

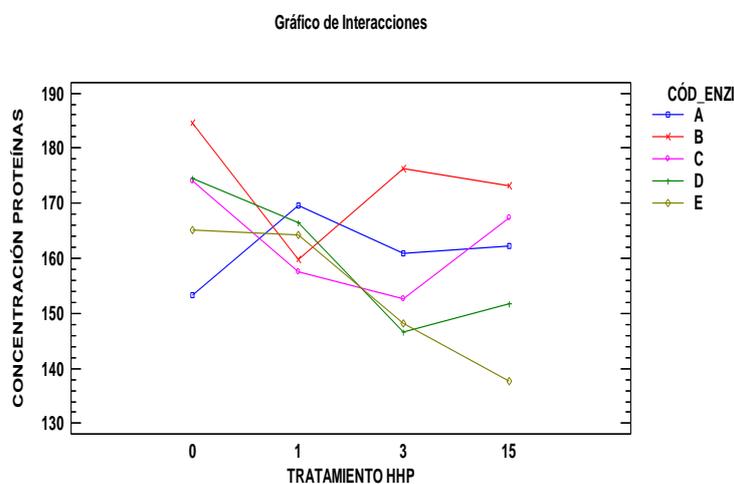


Fig. 14. Efecto combinado de las altas presiones hidrostáticas y las enzimas en la concentración de proteínas solubles.

Si se analiza el efecto combinado de ambas variables (altas presiones hidrostáticas y proteasas) en cuanto al incremento de NTU en el vino (que se relaciona directamente con la estabilidad proteica del vino), se observa un mayor incremento de NTU en los vino tratados durante más tiempo (15 min) a 600 MPa que en los que menos (Fig.15). Este comportamiento es más pronunciado para los vinos tratados con pepsina (MD) y la aminopeptidasa (ME).

Bajo las condiciones de ensayo, se ha observado que la aplicación conjunta de altas presiones hidrostáticas y proteasas posibilita una disminución en el nivel de proteínas solubles. Probablemente la presurización del mosto durante 15 min provoque una modificación de la estructura secundaria de las proteínas, dejando accesible zonas de ataque para las enzimas pepsina y aminopeptidasa. Sin embargo, estos resultados no se correlacionan con un incremento en la estabilidad proteica de estos vinos. Como se ha señalado anteriormente, las muestras de vino procedentes de mostos sometidos a un largo tiempo de presurización y tratados con las enzimas pepsina (MD) y aminopeptidasa (ME) son las menos estables, a pesar de mostrarse una disminución notable en su contenido en proteínas. Este comportamiento podría deberse a que las modificaciones causadas por las altas presiones y estas enzimas en

la estructura de las proteínas provoquen una mayor susceptibilidad hacia su desnaturalización térmica y/o favorezcan los entrecruzamientos proteicos y la formación de agregados con componentes no proteicos del vino, que finalmente causen turbidez (Ferreira et al., 2001).

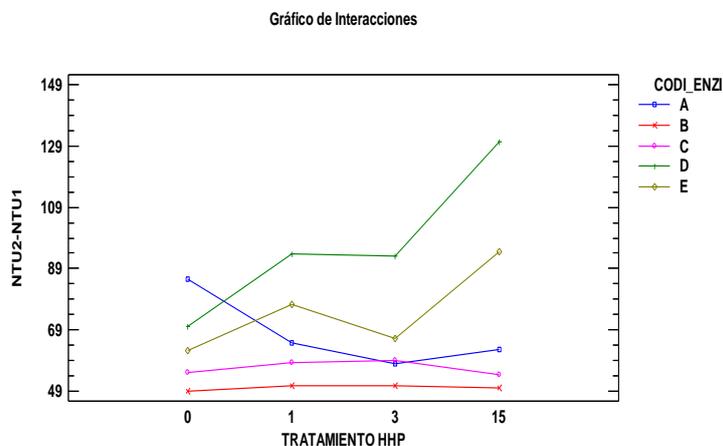


Fig. 15. Efecto combinado de las altas presiones hidrostáticas y las enzimas sobre la estabilidad proteica.

7. CONCLUSIONES

Se han extraído las siguientes conclusiones de los análisis después de haber realizado los tratamientos de altas presiones hidrostáticas y de los tratamientos enzimáticos en las muestras.

- Todos los vinos acaban la fermentación alcohólica, por lo que no se modifica la fermentabilidad de los mostos, aunque las altas presiones hidrostáticas provocan un ligero retraso en el desarrollo de la fermentación en los mostos tratados.
- La aplicación de altas presiones hidrostáticas en mostos no modificó la concentración de proteínas solubles ni la estabilidad proteica de los vinos.
- La aplicación de enzimas en vinos procedentes de mostos no tratados con altas presiones hidrostáticas no modificó la concentración de proteínas solubles y tampoco mejoró la estabilidad proteica en las condiciones de trabajo (temperatura 20°C y baja dosis de enzimas).
- La aplicación de altas temperaturas (25°C y 45°C) y alta dosis de enzimas redujo notablemente el contenido en proteínas solubles y mejoró la estabilidad proteica siendo esto más acusado a 45°C.
- El efecto combinado de altas presiones hidrostáticas y preparados comerciales con actividad enzimática, disminuyó la concentración de proteínas solubles pero aumentó la inestabilidad de los vinos bajo las condiciones de ensayo.

8. BIBLIOGRAFÍA

Bakalinsky, A. T., & Boulton, R. (1985). The study of an immobilized acid protease for the treatment of wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(1), 23-29.

Batista, L., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2009). The complexity of protein haze formation in wines. *Food Chemistry*, 112(1), 169-177.

Benucci, I., Liburdi, K., Garzillo, A. M. V., & Esti, M. (2011). Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application. *Food Chemistry*, 124(4), 1349-1353.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Buzrul, S. (2012). High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13(0), 1-12.

Dizy, M., & Bisson, L. (2000). Proteolytic activity of yeast strains during grape juice fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(2), 155-167.

Ferreira, R. B., Piçarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., & Teixeira, A. R. (2001). The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 12(7), 230-239.

Herrero, A. M., & Romero de Avila, M. D. (2006). [Innovations in food processing: Nonthermal methods]. [Innovaciones en el procesado de alimentos: tecnologías no térmicas.] *Revista De Medicina De La Universidad De Navarra*, 50(4), 71-4.

Landbo, A. R., Pinelo, M., Vikbjerg, A. F., Let, M. B., & Meyer, A. S. (2006). Protease-assisted clarification of black currant juice: Synergy with other clarifying agents and effects on the phenol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6554-6563. doi:10.1021/jf060008d

Lopez, M., & Edens, L. (2005). Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7944-7949. doi:10.1021/jf0506535

Marangon, M., Stockdale, V. J., Munro, P., Trethewey, T., Schulkin, A., Holt, H. E., & Smith, P. A. (2013). Addition of carrageenan at different stages of winemaking for white wine protein stabilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6516-6524. doi:10.1021/jf401712d

Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Robinson, E. M. C., Muhlack, R. A., Holt, H. E., Haynes, P. A., . . . Waters, E. J. (2012). Degradation of white wine haze proteins by aspergillopepsin I and II during juice flash pasteurization. *Food Chemistry*, 135(3), 1157-1165.

Messens, W., VanCamp, J., & Huyghebaert, A. (1997). The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 8(4), 107-112. doi:10.1016/S0924-2244(97)01015-7

Murphey, J. M., Powers, J. R., & Spayd, S. E. (1989). Estimation of soluble-protein concentration of white wines using coomassie brilliant blue G-250. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(3), 189-193.

Pashova, V., Guell, C., & Lopez, F. (2004). White wine continuous protein stabilization by packed column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1558-1563. doi:10.1021/jf034966g

Pinelo, M., Zeuner, B., & Meyer, A. S. (2010). Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3), 259-265.

Pocock, K. F., Hoj, 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(1), 56-63. doi:10.1111/j.1755-0238.2003.tb00232.x

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(3), 212-220. doi:10.1111/j.1755-0238.2006.tb00061.x

Reid, V. J., Theron, L. W., du Toit, M., & Divol, B. (2012). Identification and partial characterization of extracellular aspartic protease genes from *metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1123 and *candida apicola* IWBT Y1384. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 6838-6849. doi:10.1128/AEM.00505-12

Santos, M. C., Nunes, C., Cappelle, J., Goncalves, F. J., Rodrigues, A., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2013). Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, 141(3), 2558-2566. doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.022

Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: Review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234(1), 1-12. doi:10.1007/s00217-011-1614-6

Tabilo-Munizaga, G., Gordon, T. A., Villalobos-Carvajal, R., Moreno-Osorio, L., Salazar, F. N., Pérez-Won, M., & Acuña, S. (2014). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of sauvignon blanc wine. *Food Chemistry*, 155(0), 214-220.

Tao, Y., Sun, D., Górecki, A., Błaszczak, W., Lamparski, G., Amarowicz, R., . . . Jeliński, T. (2012). Effects of high hydrostatic pressure processing on the physicochemical and sensorial properties of a red wine. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16(0), 409-416.

Tao, Y., Wu, D., Sun, D., Górecki, A., Błaszczak, W., Fornal, J., & Jeliński, T. (2013). Quantitative and predictive study of the evolution of wine quality parameters during high hydrostatic pressure processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20(0), 81-90.

Theron, L. W., & Divol, B. (2014). Microbial aspartic proteases: Current and potential applications in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(21), 8853-8868. doi:10.1007/s00253-014-6035-6

Van Sluyter, S. C., McRae, J. M., Falconer, R. J., Smith, P. A., Bacic, A., Waters, E. J., & Marangon, M. (2015). Wine protein haze: Mechanisms of formation and advances in prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(16), 4020-4030. doi:10.1021/acs.jafc.5b00047

Waters, E. J., Alexander, G., Muhlack, R., Pocock, K. F., Colby, C., O'Neill, B. K., Jones, P. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 215-225. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00289.x