

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Marinas



Uso de Polisacáridos Algales para la Clarificación de Proteínas de Vino Blanco

Tesis que para Obtener el Título de

Oceanólogo

Presenta

Héctor Gómez Pérez

Marzo 2012

RESUMEN

Baja California es el principal productor de algas marinas y vinos en México. Las algas marinas son exportadas como materia prima para la extracción de polisacáridos que son usados como agentes emulsificantes en diferentes industrias, incluyendo la alimenticia. Sin embargo, el uso de estos polisacáridos naturales ha sido desplazado por emulsificantes sintéticos lo que ha provocado un descenso en sus precios y consecuentemente un problema económico para las familias de pescadores dedicados a la cosecha de algas. Por otro lado, la estabilización de vinos comúnmente requiere el uso de agentes clarificantes con cargas electrostáticas negativas (e.g. bentonita) para remover proteínas que promueven turbidez en estas bebidas. Los polisacáridos agar, carragenano y ácido algínico extraídos de algas tienen cargas electrostáticas negativas a pH bajos, y por lo tanto pueden adsorber y precipitar proteínas con cargas positivas en medios acuosos. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue el de evaluar la capacidad del agar, carragenano y ácido algínico extraído de algas marinas para flocular y precipitar proteínas en vinos. La capacidad de floculación y precipitación de proteínas del carragenano purificado, carragenofitas secas, ácido algínico purificado y alginofitas secas fue dos veces mayor que la del agar y las agarofitas secas. La mayor capacidad de floculación del carragenano y el ácido algínico se debe a su mayor número de cargas negativas en relación a las del agar. No obstante que las proteínas fueron floculadas por los polisacáridos extraídos de algas, los taninos no fueron

adsorbidos y precipitados por el agar, carragenano o ácido algínico. La capacidad de adsorción del ácido algínico fue menor a $50 \text{ mg proteínas L}^{-1}$, sin embargo, la capacidad de adsorción de proteínas del carragenano fue mayor a 400 mg L^{-1} . La fracción de proteínas adsorbidas por el agar, carragenano, ácido algínico y algas secas en vino preparado a partir de uvas Chenin Blanc fue similar a la fracción de proteínas adsorbidas por la bentonita. Colectivamente, estos resultados indican que el carragenano y el ácido algínico tienen una mayor capacidad de estabilización del vino sin modificar su composición tánica en relación con el agar y la bentonita. Los resultados de este estudio indican que las algas pueden ser usadas como agentes clarificantes en la industria vinícola lo cual disminuirá costos de producción, pero más importante, abrirá una nueva línea de comercialización de las algas marinas y apoyará la economía de los pescadores ribereños.

Uso de Polisacáridos Algales para la Clarificación de Proteínas de Vino Blanco

Tesis

Que para obtener el Título de Oceanólogo presenta:

Héctor Gómez Pérez

Aprobada por:



Dr. Alejandro Cabello Pasini

Director



M.C. Arturo Siqueiros Valencia

Sinodal Propietario



M.C. Víctor Macías Carranza

Sinodal Propietario

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Niveles de proteínas en vino ($X \pm \text{Des. Estan.}$, $n = 4$) después de la clarificación con diferentes concentraciones de bentonita, agar purificado, *G. pacifica*, carragenano purificado, *C. crispus*, ácido algínico purificado y *M. pyrifera*. Símbolos negros indican agentes clarificantes secos, símbolos blancos indican agentes clarificantes extraídos de las algas con agua hirviendo.40
- Figura 2. Concentración de proteínas en el vino blanco ($X \pm \text{Des. Estan.}$, $n = 4$) después de clarificar con 0.01% y 0.025% de bentonita, carragenano puro, *C. crispus* y la alginofita *M. pyrifera*.41
- Figura 3. Electroforesis de gel de poliacrilamida (17.5%) de muestras de vino clarificado. Líneas: 1) vino sin clarificar, muestras concentradas 20 veces de 2) bentonita, 3) agar, 4) carragenano, 5) ácido algínico, 6) *C. crispus*, 7) *M. papillatus*, 8) *M. pyrifera*. STD = estándares de peso molecular.42
- Figura 4. Niveles de ácido gálico y proteínas ($X \pm \text{Des. Estan.}$, $n = 4$) después de ser clarificado con bentonita, *G. pacifica*, *C. crispus* y *M. pyrifera*.....43

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Rendimiento de agar, carragenano y ácido algínico así como razones de peso húmedo/seco de diferentes especies de algas marinas utilizadas en este estudio como agentes clarificantes 38
- Tabla 2. Cargas negativas libres (mEq g^{-1}) en bentonita, carragenano purificado carragenofitas, ácido algínico, y alginofitas usadas en este estudio....39

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	2
Votos Aprobatorios	4
Lista de Figuras	5
Lista de Tablas	6
Introducción	8
Hipótesis	10
Objetivo General	11
Objetivos Particulares	11
Justificación	12
Materiales y Métodos	13
Resultados	19
Discusiones	22
Literatura Citada	33

INTRODUCCIÓN

Las proteínas solubles afectan la estabilidad de los vinos. Proteínas inestables pueden tornarse insolubles y formar turbidez y sedimentos en vinos. Mientras que estas proteínas no imparten sabores al vino, la turbidez producida por estas proteínas es considerada como un defecto del producto final. Los vinicultores utilizan métodos tales como la clarificación, filtración y estabilización térmica para erradicar las proteínas del vino (Hsu & Heatherbell, 1987, Flores *et al.*, 1988, Sarni-Machado *et al.*, 1999, Marchal *et al.*, 2002).

La practica de utilizar bentonita para clarificar y asegurar la estabilidad proteica de vinos blancos ha sido ampliamente aceptada en la industria vitivinícola y a desplazado a procedimientos térmicos. El proceso de clarificación depende de la adsorción de proteínas cargadas positivamente sobre los agentes clarificantes cargados negativamente. La naturaleza catiónica de las proteínas está primariamente determinada por su punto isoeléctrico (pI) y el pH del vino en el que se encuentran. La mayoría de las proteínas tienen valores de pI superior al pH del vino y en consecuencia están cargadas positivamente (Santoro, 1995). Mientras que la gelatina mantiene cargas positivas al pH del vino, la bentonita, el dióxido de silicio, y otros agentes clarificantes tienen cargas negativas y se usan para adsorber y clarificar proteínas y polifenoles cargados positivamente (Hahn & Possmann, 1977, Marchal *et al.*, 2002). Estos agentes

clarificantes adsorben proteínas y forman agregados que se precipitan al fondo de los tanques de clarificación y posteriormente son eliminados por decantación.

Los polisacáridos extraídos de las algas marinas como el agar, carragenano y ácido algínico también están cargados negativamente cuando se diluyen en soluciones (Mackie & Preston, 1974). El agar y el carragenano consisten principalmente en cadenas alternadas y sulfatadas de (1-3)- β -galactosa y α -(1-4)-galactosa (Cosson *et al.*, 1995), sin embargo, la cantidad de grupos sulfato es mucho mayor en el carragenano que en el agar. El ácido algínico es polímero lineal de ácidos manurónico y gulurónico y también está cargado negativamente a bajos pHs (Sime, 1984). Debido a sus cargas negativas, estos polisacáridos tienen la capacidad de interactuar con muchas otras moléculas con carga electrostática opuesta. Las fuertes cargas electrostáticas de los polisacáridos de algas marinas, por ejemplo, han sido usadas para remover proteínas y metales pesados del agua de mar y aguas residuales (Imeson, 1984, Davis *et al.*, 2003). No obstante que los polisacáridos extraídos de algas tiene la capacidad de adsorber y precipitar proteínas en soluciones a bajos pHs, se desconoce su capacidad para ser utilizados como agentes clarificantes en vinos. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue el de evaluar la capacidad de los polisacáridos extraídos de algas para la clarificación de proteínas de vinos.

HIPÓTESIS

1. Debido su naturaleza electrostática negativa, los polisacáridos extraídos de algas tienen la capacidad de adsorber y precipitar proteínas de vinos.
2. Debido a su mayor cantidad de grupos sulfatos, el ácido algínico y el carragenano tiene mayor capacidad de adsorber y precipitar proteínas de vinos.
3. Debido a que la bentonita y los polisacáridos de algas tiene una similar naturaleza electrostática, el tamaño y tipo de proteínas floculadas y precipitadas por estos agentes clarificante será similar.
4. Debido a que los polifenoles y otras moléculas tiene una menor concentración de cargas negativas en relación a las proteínas no serán floculadas y precipitadas por los polisacáridos extraídos de algas.

OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo será la de evaluar la capacidad de los polisacáridos agar, carragenano y ácido algínico extraído de algas marinas para flocular y precipitar proteínas en vinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la capacidad de adsorción y precipitación de proteínas de vino blanco por el agar, ácido algínico y carragenano.
2. Determinar la concentración de cargas de la bentonita, agar, ácido algínico y carragenano.
3. Estimar la concentración de grupos sulfato del agar, ácido algínico y carragenano.
4. Determinar la capacidad de adsorción de proteínas de diferentes tamaños por agar, ácido algínico y carragenano.
5. Evaluar el efecto de la adición de polisacáridos de algas sobre la concentración de polifenoles, pH y acidez titulable de vino blanco.

JUSTIFICACIÓN

Baja California es el principal productor de algas marinas en el país. Estas algas son cosechadas por pescadores ribereños a lo largo de la costa de Baja California. Sin embargo, la cosecha de estas algas se ha suspendido o reducido drásticamente debido al desplome de precios de este producto. Estas algas eran cosechadas y exportadas como materia bruta para la extracción de polisacáridos en Estados Unidos. No obstante que Baja California es el principal productor de algas en el País, se han realizado muy pocos estudios para encontrar usos alternos de este producto marino. La utilización de las algas como agentes clarificantes de vinos podría ofrecer una nueva alternativa económica a las familias que se dedicaban a la cosecha de este recurso marino y que se vio interrumpida por la falta de mercado. Por otro lado, Baja California es el principal productor de vino en el país. Estas empresas importan agentes clarificantes valuados en millones de pesos como parte del proceso de elaboración de sus productos. No obstante el uso potencial de los polisacáridos extraídos de algas en la industria vinícola, así como la gran cantidad de algas cosechadas en Baja California con el potencial de ser utilizadas como agentes clarificantes, no existen estudios que caractericen las propiedades secuestrantes de los polisacáridos de estas plantas marinas. El uso de estas algas como agentes clarificantes en la industria vinícola podrían reducir costos de producción al tener una fuente local y de menor precio para la elaboración de los vinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las algas rojas (Rodófitas) *Gracilaria pacifica*, *Gelidium robustum*, *Chondracanthus canaliculatus* y *Mastocarpus papillatus*; y las algas pardas (Feofitas) *Macrocystis pyrifera* fueron colectadas manualmente en las costas de San Quintín, Baja California, durante la marea baja. La Rodofita *Chondrus crispus* fue obtenida de cultivos de la Universidad Autónoma de Baja California. Todas las algas fueron lavadas con agua dulce para eliminar sales. El material colectado fue secado en un horno a 40°C hasta obtener peso constante y posteriormente fueron molidas en un molino de acero inoxidable. Las muestras se tamizaron y las fracciones de 1 mm fueron utilizadas en los experimentos. Los polisacáridos se extrajeron hirviendo las muestras en agua destilada por una hora. El agar y el carragenano fueron purificados de acuerdo al método descrito por Craigie & Leigh (1978) y el ácido algínico fue purificado de acuerdo a Whyte (1988). La fracción de 1 mm de las algas secas, los extractos de polisacáridos en agua, los polisacáridos purificados (agar, carragenano y ácido algínico) fueron usados para precipitar levadura, proteínas y taninos de vino blanco.

Rendimiento de polisacáridos. Muestras de de la fracción de algas de 1 mm (aprox. 1 g) fueron secadas en un horno a 60°C por 24 h. Agar se extrajo de *G. pacifica* y *G. robustum*, carragenano se extrajo de *C. crispus*, *C. canaliculatus* y *M. papillatus* y el ácido algínico se extrajo de *M. pyrifera* de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. El peso del agar, carragenano

y ácido algínico extraído en relación al peso de la muestra de alga, representó el rendimiento de polisacárido.

Determinación de las cargas de los polisacáridos. Las cargas negativas libres fueron cuantificadas ligando calcio a los agentes clarificantes. Aproximadamente 0.1 g de muestra de alga (fracción 1 mm); agar, carragenano, ácido algínico purificados; y bentonita fueron introducidos en bolsas de diálisis (12-14 kD Spectra/Por, Spectrum Lab, EEUUA) con aproximadamente 10 mL de agua destilada. Las bolsas se incubaron por 24 h en 2 L de HCl 0.2 N con agitación constante para liberar todas las cargas en las muestras. Posteriormente el HCl se removió incubando las bolsas por 36 h con agua destilada cambiada cada 4 h. Las muestras se dializaron posteriormente durante 12 h en una solución de 0.03 M de carbonato de calcio para ligar todas las cargas negativas de los polisacáridos y la bentonita con iones calcio. Los iones de calcio no ligados fueron eliminados al incubar las bolsas de diálisis por 48 h en agua destilada que fue cambiada cada 4 h. Finalmente, la concentración de calcio ligada en los polisacáridos de las muestras fue determinada por compleximetría a EDTA usando el protocolo descrito por Greenberg *et al.* (1985). La cantidad de cargas negativas en los polisacáridos y la bentonita fue determinada cuantificando los mili-equivalentes de Ca^{2+} .

Vino Blanco y Modelo de Vino Blanco. Uvas Chenin blanc fueron molidas, prensadas y el jugo extraído fue fermentado con levadura Premier

Cuvee a temperatura ambiente. Después de haber terminado la fermentación alcohólica, el vino fue estabilizado con 50 mg L^{-1} de dióxido de azufre. Por otro lado, solución modelo de vino blanco se preparó a partir de etanol al 10% (v/v) en agua destilada tamponizada con ácido tartárico a pH 3.5. La concentración de proteínas en la solución se mantuvo entre 20 y 30 mg L^{-1} usando lisozima, ovoalbúmina y albúmina de suero bovino (BSA). El peso molecular y el pI de estas proteínas es similar al de la fracción que contribuye a la inestabilidad proteica en vinos (Hsu & Heatherbell, 1987). Los polifenoles se añadieron en forma de ácido gálico (aprox. 200 mg L^{-1}). Se añadieron células de levadura al modelo de vino blanco en una concentración aproximada de $6 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ para hacer las pruebas de precipitación de levadura.

Determinación de proteínas y taninos. La concentración de proteínas en el vino blanco fue determinado por el método de Marchal *et al.* (1997) y estandarizado con BSA. La concentración de ácido gálico y taninos en el vino se determinó modificando el método descrito por Harbertson & Adams (1978). Muestras de $875 \mu\text{L}$ se reaccionaron con una solución de $125 \mu\text{L}$ conteniendo 0.01 M de HCl y 10 mM de FeCl_3 . La curva estándar fue preparada con ácido gálico diluida en una solución conteniendo 10% (v/v) de etanol y tamponizada con ácido tartárico a pH 3.5. Las muestras y estándares fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente y la absorbancia determinada en un espectrofotómetro a 510 nm .

Precipitación de levadura, proteínas y taninos. Muestras de solución de vino (12 mL) conteniendo aproximadamente 6×10^5 cel mL⁻¹ se colocaron en tubos de centrifugación de 15 mL. Algas secas (fracción 1 mm), agar purificado, carragenano purificado, ácido algínico purificado y bentonita se añadieron a tubos individuales en un rango de 0% (control) a 1% (p/v). Las muestras fueron agitadas por 1 h en un rotador de muestras a 18 rpm. Las muestras fueron posteriormente centrifugadas a 1625 x g durante 10 min y la cantidad de células de levadura se cuantificaron utilizando un hematocitómetro y microscopio. La fuerza centrífuga y el tiempo de centrifugación fue determinado experimentalmente para provocar una precipitación del 10-20% de células de levadura en las muestras control (0% alga, polisacárido o bentonita). Las células

La precipitación de proteínas fue determinado en modelo de vino blanco conteniendo de 20 a 30 mg L⁻¹ de lisozima, ovoalbúmina y BSA. Una concentración de 0 a 0.5% (p/v) de algas secas (fracción 1 mm); agar, carragenano y ácido algínico purificados así como bentonita fueron añadidos a muestras de 12 mL del modelo de vino. Las muestras fueron agitadas por 1 h en un rotador de muestras a 18 rpm. Las muestras fueron posteriormente centrifugadas a 1625 x g durante 15 min y la concentración de proteínas en las muestras determinada como se describió anteriormente. La fuerza centrífuga y el tiempo de centrifugación no precipitó proteínas en las muestras control (0% alga, polisacárido o bentonita).

La precipitación de taninos usando polisacáridos fue evaluado en modelo de vino conteniendo 200 mg L^{-1} de ácido gálico. Una concentración de 0 a 0.2% (p/v) de algas secas (fracción 1 mm); agar, carragenano y ácido algínico purificados, así como bentonita fueron añadidos a muestras de 12 mL del modelo de vino. Las muestras fueron agitadas por 1 h en un rotador de muestras a 18 rpm. Las muestras fueron posteriormente centrifugadas a $1625 \times g$ durante 15 min y la concentración de proteínas y ácido gálico en las muestras determinada como se describió anteriormente. La fuerza centrífuga y el tiempo de centrifugación no precipitó proteínas ni ácido gálico en las muestras control (0% alga, polisacárido o bentonita).

Electroforesis de proteínas. La composición proteica del vino fue determinada mediante una electroforesis de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Harlow & Lane, 1998). Muestras de vino blanco fueron clarificadas usando 0.2% (v/v) bentonita, agar purificado, carragenano purificado, ácido algínico purificado y algas secas (fracción 1 mm) de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. Las muestras clarificadas fueron concentradas 20-veces usando filtros Centricon (3 kD MW, Milipore, EEUUA) y desnaturalizados por 3 min a 95°C en una solución conteniendo 125 mM Tris pH 6.8, 20% (v/v) glicerol, 10% (v/v) 2-mercaptoetanol, 4% (p/v) SDS y 0.0025% (p/v) azul de bromofenol. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida (17.5%) y visualizados mediante tinción de plata (Swain & Ross, 1995). La masa molecular de las

proteínas en el vino clarificado fue estimada de su migración relativa con respecto a estándares (Bio-Rad, EEUA).

Análisis estadístico. El efecto de las algas (fracción 1 mm); agar, carragenano y ácido algínico purificados; y bentonita sobre la clarificación del vino fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía (Sokal & Rohlf, 1995). Comparaciones múltiples se realizaron mediante una prueba Tukey utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Los resultados de este estudio muestran que hay una diferencia estadística ($p < 0.05$) en el rendimiento de polisacáridos entre las algas estudiadas (Tabla 1). El rendimiento de polisacáridos de *G. pacifica*, *C. canaliculata*, *M. papillatus* y *C. crispus* fue aproximadamente dos-veces mayor que el rendimiento de *G. robustum* y *M. pyrifera*. El agar extraído de *G. pacifica* y el carragenano extraído de *C. canaliculatus*, *M. papillatus* y *C. crispus* representó del 40 al 50% del peso seco de la algas. En contraste, el agar extraído de *G. robustum* y el ácido algínico extraído de *M. pyrifera* representó menos del 25% del peso seco del alga.

La cantidad de grupos electrostáticamente cargados fue significativamente diferente ($p < 0.05$) entre los diferentes agentes clarificantes usados (Tabla 2). El ácido algínico y la alginofita *M. pyrifera* mostraron los niveles más altos de cargas negativas ($2.5 - 3.5 \text{ mEq g}^{-1}$) en relación al resto de los agentes clarificantes usados. El carragenano purificado y las carragenofitas mostraron un nivel de cargas intermedio mientras que el agar y la bentonita mostraron de 2- a 3-veces menos cantidad de cargas por peso seco en relación al resto de los agentes clarificantes usados.

Las algas secas y los polisacáridos extraídos de estas floccularon y precipitaron las proteínas del vino eficientemente (Fig. 1). La concentración de proteínas disminuyó a menos del 10% de la concentración inicial cuando se

clarificó con 0.01 a 0.5% bentonita ($p < 0.05$). La agarofita *G. pacifica* y el agar purificado mostraron la menor capacidad para flocular y precipitar las proteínas ya que más del 70 % de las proteínas se mantuvieron en suspensión después de añadir 0.5% de estos agentes clarificantes. En contraste, el carragenano y al ácido algínico purificado así como las carragenofitas y alginofitas mostraron una gran afinidad por las proteínas suspendidas. Menos del 25% de las proteínas se mantuvieron en suspensión cuando el vino se clarificó con 0.05% de estos polisacáridos o algas deshidratadas (fracción 1 mm).

Como era de esperar, la adicción de 0.025% de agente clarificante floculó y precipitó mayores cantidades de proteínas que con 0.01% del mismo agente clarificante (Fig. 2). En general, la adición de 0.01 y 0.025% de bentonita, *C. crispus* y *M. pyriferá* adsorbieron hasta 50 mg L^{-1} de proteína, sin embargo, esta adsorción y precipitación disminuyó rápidamente cuando se presentaron mayores niveles de proteína. Cuando la concentración de proteínas era mayor a 100 mg L^{-1} , la adición de bentonita, *C. crispus*, *M. pyriferá*, *C. canaliculatus* (no mostrado) y *M. papillatus* (no mostrado) más del 60% de las proteínas se mantuvieron en suspensión. En claro contraste, la adición de 0.01 y 0.025% carragenano purificado adsorbió 16 veces más proteína (hasta 800 mg L^{-1}) que el resto de los agentes clarificantes.

La mayor concentración de proteínas en las muestras de vino blanco clarificado tuvieron un bajo peso molecular ($<31 \text{ kD}$) (Fig. 3). En este estudio se

observó una clara diferencia en cuanto a la cantidad pero no al tipo de proteína precipitada después de la clarificación del vino con bentonita, alga deshidratada (fracción 1 mm) y polisacárido purificado. En general, la precipitación de proteínas por los polisacáridos fue bastante efectiva y las muestras clarificadas tuvieron que ser concentradas 20 veces para poder ser visualizadas en una concentración similar a la del blanco (vino sin clarificar). Las muestras de vino clarificadas con carragenano, ácido algínico *C. crispus* y *M. pyrifera* floccularon y precipitaron mayor cantidad de proteínas que aquellas muestras clarificadas con agar. Muestras clarificadas con agar mostraron altas concentración de proteínas en el vino, lo cual indica baja capacidad como clarificante. La bentonita y los polisacáridos extraídos de algas mostraron una adsorción no selectiva de proteínas ya que la proporción de las seis proteínas visualizadas en la electroforesis mantienen la misma proporción entre las muestras.

El ácido gálico fue precipitado cuando las muestras de vino fueron clarificadas con una concentración de hasta 0.2% de bentonita, *G. pacífica*, *C. crispus* y *M. pyrifera* (Fig. 4). De igual manera, no se observó una co-precipitación del ácido gálico junto con las proteínas al incubarse el vino con los agentes clarificantes.

DISCUSIONES

El alto rendimiento de polisacáridos en *G. pacifica*, *C. canaliculatus*, *M. papillatus* y *C. crispus* podría sugerir que estas algas tienen un mayor potencial para flocular y precipitar proteínas de soluciones, con relación a las otras algas estudiadas.

La diferencia en la capacidad de floculación de las algas podría ser el resultado de la diferencia en rendimiento del polisacárido presentado por cada alga (ver Tabla 1). En general, se observó un mayor rendimiento de las carragenofitas en relación con las agarofitas y alginofitas. El mayor rendimiento de las carragenofitas y el mayor número de cargas libres del carragenano lo hacen tener una mayor capacidad de floculación y precipitación que el agar. Por otro lado, el uso de la alginofita seca *M. pyrifera* resultó en una mayor floculación y precipitación de proteínas del vino con relación al resto de las algas. No obstante que el rendimiento de ácido algínico fue menor comparado con los polisacáridos de las otras algas, la cantidad de cargas negativas en el ácido algínico es mayor que en el agar y el carragenano. Colectivamente, estos resultados indican que las bajas concentraciones de ácido algínico extraído de *M. pyrifera* es compensado por su gran cantidad de cargas libres lo que le da un mayor capacidad de floculación a esta alga. En general el uso de algas secas (fracción 1mm) mostró la misma capacidad de floculación que el uso del polisacárido purificado. Lo anterior sugiere que los polisacáridos del alga son

extraídos en el vino a temperatura ambiente en la primera hora de incubación y que las características de las moléculas son similares a las purificadas o extraídas mediante un tratamiento de calor (agua hirviendo).

La concentración de proteínas en vinos tintos y blancos generalmente fluctúa entre los 20 y 100 mg L⁻¹ (Fukui & Yokotsuka, 2003), sin embargo, los niveles de proteínas en los vinos blancos son menores a 60 mg L⁻¹ (Marchal *et al.*, 1997). Nuestros resultados en vino blanco Chenin Blanc indican que de una manera similar a la bentonita, concentraciones de entre 0.01 a 0.05% de carragenano purificado, las carragenofitas deshidratadas (fracción 1 mm) *C. crispus*, *C. canaliculatus*, *M. papillatus*, ácido algínico purificado y la alginofita *M. pyrifer* son eficientes en la floculación y precipitación de la mayoría de las proteínas de vino blanco en concentraciones mayores a 50 mg L⁻¹. En contraste a estas algas y sus polisacáridos, el agar purificado y las agarofitas *G. pacifica* y *G. robustum* tuvieron una menor capacidad para precipitar proteínas.

Los grupos sulfatos proveen las cargas negativas al agar y al carragenano y de esta manera interactúan con las cargas positivas de las proteínas. Sin embargo, la cantidad de iones sulfato en el agar es mucho menor que en el carragenano (Cosson *et al.*, 1995), y en consecuencia el agar tiene una menor capacidad para flocular y precipitar proteínas en relación con el carragenano. De una manera similar a esos estudios, nuestros resultados mostraron que el ácido algínico y el carragenano tiene de 2- a 3-veces más

grupos electrostáticamente cargados en relación con el agar. Lo anterior explica la mayor capacidad de floculación y precipitación de proteínas del carragenano y el ácido algínico con respecto al agar.

Se ha observado que los complejos electro-neutros (floculados) no se forman cuando se utilizan altos niveles de polisacáridos y en consecuencia las proteínas se mantienen en solución (Imeson, 1984). Lo anterior es consistente con nuestros resultados en donde más del 50% de las proteínas se mantuvieron en suspensión cuando agar purificado y la agarofita *G. pacifica* se añadieron al vino en concentraciones mayores de 0.1%. Agar es un agente con mayor fuerza gelificante que el carragenano, especialmente después de ser hervido. Además, mientras que el carragenano y el ácido algínico requieren iones potasio o calcio para formar geles, el agar no requiere ningún ion para formar geles. Durante la formación de geles, las moléculas de polisacáridos interactúan entre ellas (agar-agar, carragenano-carragenano, etc.), dejando menos cargas libres para interactuar con otras moléculas (Lobban & Harrison, 1996). En consecuencia, es probable que la ausencia de floculación de proteínas cuando se añadieron altas concentraciones de agar sea el resultado de la agregación de moléculas de agar-agar que resultó en la formación de micro-geles. En contraste con el agar, la floculación y precipitación de proteínas fue efectiva en un amplio rango de concentración de polisacáridos (0 a 0.5%) cuando se uso carragenano purificado, la carragenofita *C. crispus*, ácido algínico purificado y la alginofita *M. pyrifera*. En contraste con el agar, el carragenano y el ácido algínico requieren

potasio y/o calcio (>0.2%) para formar geles. Por lo anterior y debido a que la concentración de estos iones es muy baja en los vinos, es muy probable que el carragenano y el ácido algínico no se agregaron para formar geles y sus cargas libres interactuaron con las cargas de las proteínas aumentando así su capacidad de floculación.

La mayor concentración de proteínas en las muestras de vino blanco clarificado tuvieron un bajo peso molecular (<31 kD). Estos resultados son consistentes con los observados en otros estudios donde se ha encontrado que los polipéptidos de vino blanco son menores a 66 kD (Hsu & Heatherbell, 1987). En este estudio se observó una clara diferencia en cuanto a la cantidad pero no al tipo de proteína precipitada después de la clarificación del vino con bentonita, alga deshidratada (fracción 1 mm) y polisacárido purificado. En general, la precipitación de proteínas por los polisacáridos fue bastante efectiva y las muestras clarificadas tuvieron que ser concentradas 20 veces para poder ser visualizadas en una concentración similar a la del blanco (vino sin clarificar). Las muestras de vino clarificadas con carragenano, ácido algínico *C. crispus* y *M. pyrifera* floclularon y precipitaron mayor cantidad de proteínas que aquellas muestras clarificadas con agar. Muestras clarificadas con agar mostraron altas concentración de proteínas en el vino, lo cual indica baja capacidad como clarificante. La bentonita y los polisacáridos extraídos de algas mostraron una adsorción no selectiva de proteínas ya que la proporción de las seis proteínas visualizadas en la electroforesis mantienen la misma proporción entre las

muestras. Lo anterior indica que los polisacáridos extraídos de algas adsorben proteínas en respuesta a la cantidad de cargas libres y no en relación al tamaño de la proteína.

Las proteínas más abundantes en las muestras de vino tuvieron un peso molecular de aproximadamente 14, 35 y 55 kD independientemente del agente clarificante utilizado. Mientras que la naturaleza de las proteínas en el vino no se ha estudiado en detalle, se ha establecido que la mayoría de las proteínas se originan de las uvas y no de la lisis de las células de levadura (Ferreira *et al.*, 2000). La enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/ oxigenasa (RUBISCO) es la proteína más abundante en organismos autótrofos y cataliza la incorporación de CO₂ en el aparato fotosintético. No obstante que estas enzimas se encuentran primariamente en las hojas, la epidermis de las frutas tiene aparatos fotosintéticos funcionales (Mir *et al.*, 1988). La enzima RUBISCO está formada por 8 subunidades (polipéptidos) de aprox. 55 kD y 8 subunidades de aprox. 14 kD (Taiz & Zeiger, 2003). En consecuencia, es probable que los polipéptidos de 14 y 55 kD visualizados mediante la electroforesis en nuestro estudio, sean las sub-unidades pequeña y grande de RUBISCO extraídas durante el proceso de vinificación.

Las sustancias fenólicas o taninos, tales como el ácido gálico, galotanino, etc., proveen características y cualidades esenciales a los vinos. Estos taninos proveen astringencia a los vinos (Boulton *et al.*, 1998). Los taninos se pueden

acomplejar con las proteínas y formar moléculas no estables que se precipitan sin la ayuda de agentes clarificantes. En vinos tintos, por ejemplo, las altas concentraciones de taninos ayudan a precipitar las proteínas. En los vinos blancos, sin embargo, los bajos niveles de taninos y las generalmente más altas concentraciones de proteínas sugieren que ambas moléculas coexisten en solución. Mientras que la ultrafiltración y la clarificación con gelatina, gluten de trigo, dióxido de silicio y otras sustancias pueden precipitar los taninos y complejos proteína-tanino, la bentonita no adsorbe y precipita los taninos (Hsu & Heatherbell, 1987, Flores *et al.*, 1990, Sarni-Machado *et al.*, 1999), lo cual es consistente con lo observado con la bentonita en este estudio. Al igual que la bentonita, los polisacáridos de algas utilizados en este estudio tampoco adsorbieron y precipitaron los taninos en el vino. Esto sugiere que los polisacáridos extraídos de algas tienen una mayor interacción con las proteínas que con los taninos y también sugiere que las proteínas floculadas con los polisacáridos de algas no coprecipitan a los taninos.

La caracterización organoléptica del vino Chenin Blanc clarificado polisacáridos extraídos de algas no mostró la adición o eliminación de ningún sabor. Lo anterior era de esperarse ya que las gelatinas preparadas a base de agar, carragenano o ácido algínico son neutras al gusto no obstante que se preparan en concentraciones de aproximadamente 2% del polisacárido. Las concentraciones de polisacáridos de algas utilizadas para la clarificación de los vinos fueron de 200 a 1000 veces menos que las que se utilizan para preparar

gelatinas. Por lo anterior es poco probable que estas impartan sabores específicos a los vinos.

La estabilización y clarificación antes del embotellado es una práctica común en la industria vinícola para eliminar turbidez en el vino embotellado. Una gran cantidad de moléculas orgánicas (proteínas, gomas), minerales (bentonita, dióxido de silicio) y polímeros sintéticos (PVPP) han sido utilizados como agentes clarificantes. De estos, la bentonita ha sido mundialmente utilizada para adsorber y precipitar proteínas en el vino desde principios del siglo pasado (Saywell, 1934). En este estudio se reporta el uso del carragenano, agar y ácido alginico extraído de algas marinas para la adsorción de proteínas. La alta capacidad de floculación y precipitación de estas proteínas en vino blanco Chenin Blanc sugiere que los polisacáridos extraídos de algas pueden ser utilizados como agentes clarificantes en vino y posiblemente de otras bebidas como cerveza y jugos. Además, los polisacáridos extraídos de algas mostraron un comportamiento similar al de la bentonita por lo que el uso de estos geles no modificarán en nada las características organolépticas del vino.

En 1999, México produjo más de 142 millones de litros de vino y esta cantidad se ha ido incrementado en la última década (Hidalgo, 2002). Para la elaboración de este vino ha sido necesaria la eliminación de proteínas que producen turbidez en el producto final. La eliminación de estas proteínas se realiza principalmente mediante procesos de clarificación y filtración. Al igual

que en el resto del mundo, la clarificación de los vinos en México se lleva a cabo mediante la adición de bentonita. Este mineral es importado principalmente de los Estados Unidos y su costo llega a alcanzar los 100 pesos el kilogramo. Por otro lado, el costo de las carragenofitas y alginofitas utilizadas en este estudio son vendidas por los pescadores ribereños a un precio aproximado de 2 pesos por kilogramo. Como se demostró en este estudio, la concentración de algas secas o el polisacárido purificado, tienen la misma capacidad de floculación que la bentonita. Lo anterior sugiere que los costos de producción del vino se podrían reducir sustancialmente al utilizar a los polisacáridos extraídos de las algas como agentes clarificantes en las mismas dosis en las que se utiliza la bentonita.

México es uno de los principales productores de algas en el Mundo (Zertuche-Gonzalez, 1994). Baja California es el principal productor de algas en el País, sin embargo, esta producción ha disminuido dramáticamente debido a que los precios de mercado de los polisacáridos extraídos de algas se han desplomado. Este desplome en los precios se debe principalmente a una sustitución de los polisacáridos naturales por los polisacáridos sintéticos. Por lo anterior, se han buscado nuevas alternativas de mercado para asegurar la venta de las algas extraídas por los pescadores ribereños. Algunas algas se empiezan a utilizar como alimento para abulón y otros moluscos cultivados. En otros casos, las algas se comercializan para el consumo directo humano. En ambos casos, las algas han adquirido un valor agregado superior al de la venta directa

de este producto para la extracción de polisacáridos. El presente estudio demuestra que el uso de las algas como agente clarificante pueden ser una nueva alternativa para la comercialización de este producto.

Los resultados de este estudio indican que los polisacáridos extraídos de algas marinas pueden ser usados como agentes clarificantes en otras bebidas y no solamente en el vino. La industria cervecera produce volúmenes 50-veces mayores que los de la industria vinícola. En la producción de la cerveza, especialmente en las industrias micro-cerveceras, el uso del alga *Chondrus crispus* como agente clarificante es una práctica común desde hace cientos de años. El alga *C. crispus* es el alga carragenofita (productora de carragenano) que históricamente se ha utilizado como agente clarificante, principalmente porque, como se observó en nuestro estudio, presenta excelentes características de floculación de proteínas. Esta alga es muy común en las costas de Inglaterra donde la industria cervecera tiene cientos de años lo que hizo que históricamente se convirtiera en el alga de elección para la clarificación de cervezas. En consecuencia, la cosecha y exportación de esta alga para ser usada como agente clarificante en la industria cervecera a nivel mundial está dominada por Inglaterra y los estados del Este de Estados Unidos. No obstante que en las costas de México no se desarrolla esta alga carragenofita, en Baja California se cosechan otras algas carragenofitas. Estas algas de Baja California son utilizadas para la extracción de polisacáridos que son usados como agentes emulsificantes en la industria farmacéutica y alimenticia. Nuestro

estudio demostró que estas algas son excelentes agentes clarificantes lo cual sugiere que las algas de Baja California podrían ser industrializadas para suplir el mercado de polisacáridos para la clarificación de vinos y cervezas.

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que

1. Los polisacáridos extraídos de algas marinas rojas y pardas así como muestras deshidratadas de estas algas tienen una capacidad de floculación proteínas en vinos similar o mejor que la de la bentonita.
2. La mejor adsorción del carragenano y al ácido algínico es el resultado de la mayor cantidad relativa de cargas negativas libres comparado con la bentonita y el agar.
3. El carragenano, el agar, y el ácido algínico mostraron una afinidad a proteínas de peso molecular similar a la afinidad presentada por la bentonita.
4. Los polisacáridos extraídos de algas no flocularon y precipitaron los polifenoles del vino debido a su menor cantidad de cargas electrostáticas en relación con las proteínas.
5. Las características organolépticas de los vinos no se vio alterada por la adición de polisacáridos extraídos de algas.

En general, la sustitución de la bentonita por los polisacáridos extraídos de algas podría abrir una nueva línea de comercialización para las algas de Baja California. Esto podría reactivar la cosecha de algas en Baja California y reduciría costos de producción en la industria vinícola al sustituir la bentonita importada por un producto local.

LITERATURA CITADA

- Boulton, R.; V. Singleton; L. Bisson & R. Kunkee, 1998: Principles and Practices of Winemaking. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland.
- Cosson, J.; E. Deslandes; M. Zinoun & A. Mouradi-Givernaud, 1995: Carrageenans and agars, red algal polysaccharides. In: (F. E. Round & D. J. Chapman, Eds.), Prog. Phycol. Res. Biopress Ltd, New York: 270-324.
- Craigie, J. S. & C. Leigh, 1978: Carrageenans and agars. In: (J. A. Hellebust & J. S. Craigie, Eds.), Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods. Cambridge University Press, London: 109-131.
- Davis, T.; B. Volesky & A. Mucci, 2003: A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Wat. Res.* **37**:4311-4330.
- Ferreira, R.; S. Monteiro; M. Picarra-Pereira; M. Tanganho; V. Loureiro & A. Teixeira, 2000: Characterization of the proteins from grapes and wines by immunological methods. *Am. J. Enol. Vitic.* **51**:22-28.
- Flores, J.; D. Heatherbell; J. Hsu & B. Watson, 1988: Ultrafiltration (UF) of white Riesling juice: Effect of oxidation and pre-UF juice treatment on flux, composition, and stability. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**:180-187.

- Flores, J.; D. Heatherbell & M. McDaniel, 1990: Ultrafiltration of wine: effect of ultrafiltration on white Riesling and Gewurztraminer wine composition and stability. *Am. J. Enol. Vitic.* **41**:207-214.
- Fukui, M. & K. Yokotsuka, 2003: Content and origin of protein in white and red wines: changes during fermentation and maturation. *Am. J. Enol. Vitic.* **54**:178-188.
- Greenberg, A. E.; R. R. Trussell & L. S. Clesceri, 1985. Calcium: EDTA Titrimetric Method, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Baltimore, Port City Press.
- Hahn, G. & P. Possmann, 1977: Colloidal silicon dioxide as a fining agent for wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **28**:108-112.
- Harbertson, J. & D. Adams, 1978: Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26**:809-812.
- Harlow, E. & D. Lane, 1998: *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor.
- Hidalgo, L., 2002: *Tratado de Viticultura General*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

- Hsu, J. & D. Heatherbell, 1987: Heat-unstable proteins in wine. I. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**:11-16.
- Imeson, A., 1984: Recovery and utilization of proteins using alginates. In: (G. Phillips; D. Wedlock & P. Williams, Eds.), *Gums and stabilizers for the food industry*. Pergamon Press, Oxford: 189-199.
- Lobban, C. S. & P. J. Harrison, 1996: *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, NY.
- Mackie, W. & R. Preston, 1974: Cell wall and intercellular region polysaccharides. In: (W. Stewart, Ed. *Algal Physiology and Biochemistry*. University of California Press, Berkeley, CA: 40-85.
- Marchal, R.; M. Marchal-Delahaut; F. Michels; M. Parmentier; A. Lallement & P. Jeandet, 2002: Use of wheat gluten as clarifying agent of musts and white wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **53**:308-314.
- Marchal, R.; V. Seguin & A. Maujean, 1997: Quantification of interferences in the direct measurement of proteins in wines from the Champagne region using the Bradford method. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**:303-309.

- Mir, N.; M. Wendorf & R. B. Perez, R., 1988: Chlorophyll fluorescence as affected by some superficial defects in stored apples. *Journal of Horticultural Science and Technology* **73**:846-850.
- Santoro, M., 1995: Fractionation and characterization of must and wine proteins. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**:250-254.
- Sarni-Machado, P.; A. Deleris; S. Avallone; V. Cheynier & M. Moutounet, 1999: Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by proteins used as fining agent in enology. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**:81-86.
- Saywell, L., 1934: Clarification of wine. *Industrial and Engineering Chemistry* **26**:981-982.
- Sime, W., 1984: The practical utilization of alginates in food gelling systems. In: (G. Phillips; D. Wedlock & P. Williams, Eds.), *Gums and stabilizers for the food industry*. Pergamon Press Ltd., Oxford, UK.: 177-188.
- Sokal, R. R. & F. J. Rohlf, 1995: *Biometry*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Swain, M. & N. W. Ross, 1995: A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **16**:942-951.

Taiz, L. & E. Zeiger, 2003: Plant Physiology. Amsea Group Publishing, Inc, New York.

Whyte, J. N. C., 1988: Extraction of alginic acid from a brown seaweed. In: (C. S. Lobban; D. J. Chapman & B. P. Kremer, Eds.), Experimental Phycology: A Laboratory Manual. Cambridge University Press, New York: 168-173.

Zertuche-Gonzalez, J. A., 1994: Situacion actual de la industria de las algas marinas productoras de ficocoloides en Mexico. Programa Cooperativo Bigubernamental FAO-Italia **13**:33-37.

Tabla 1. Rendimiento de agar, carragenano y ácido algínico así como razones de peso húmedo/seco de diferentes especies de algas marinas utilizadas en este estudio como agentes clarificantes.

Especie	Rendimiento de Polisacárido (%)
Rodofitas	
Agarofitas	
<i>Gracilaria pacifica</i>	47.1 ± 3.8
<i>Gelidium robustum</i>	22.3 ± 1.8
Carragenofitas	
<i>Chondracanthus canaliculatus</i>	39.2 ± 2.4
<i>Mastocarpus papillatus</i>	53.6 ± 1.1
<i>Chondrus crispus</i>	47.1 ± 0.7
Feofitas (alginofita)	
<i>Macrocystis pyrifera</i>	19.5 ± 1.8

Tabla 2. Cargas negativas libres (mEq g⁻¹) en bentonita, carragenano purificado, carragenofitas, ácido algínico, y alginofitas usadas en este estudio.

Clarificante	Cargas libres mEq g ⁻¹	% relativo al ácido algínico
Bentonita	1.10 ± 0.14	31.1
Agar	1.20 ± 0.36	34.0
Carragenano purificado	2.23 ± 0.12	63.2
<i>Chondrus crispus</i>	2.10 ± 0.36	59.4
<i>Mastocarpus papillatus</i>	1.53 ± 0.06	43.4
<i>Chondracanthus canaliculatus</i>	2.07 ± 0.23	58.5
Ácido algínico purificado	3.53 ± 0.12	100.0
<i>Macrocystis pyrifera</i>	2.47 ± 0.29	69.8

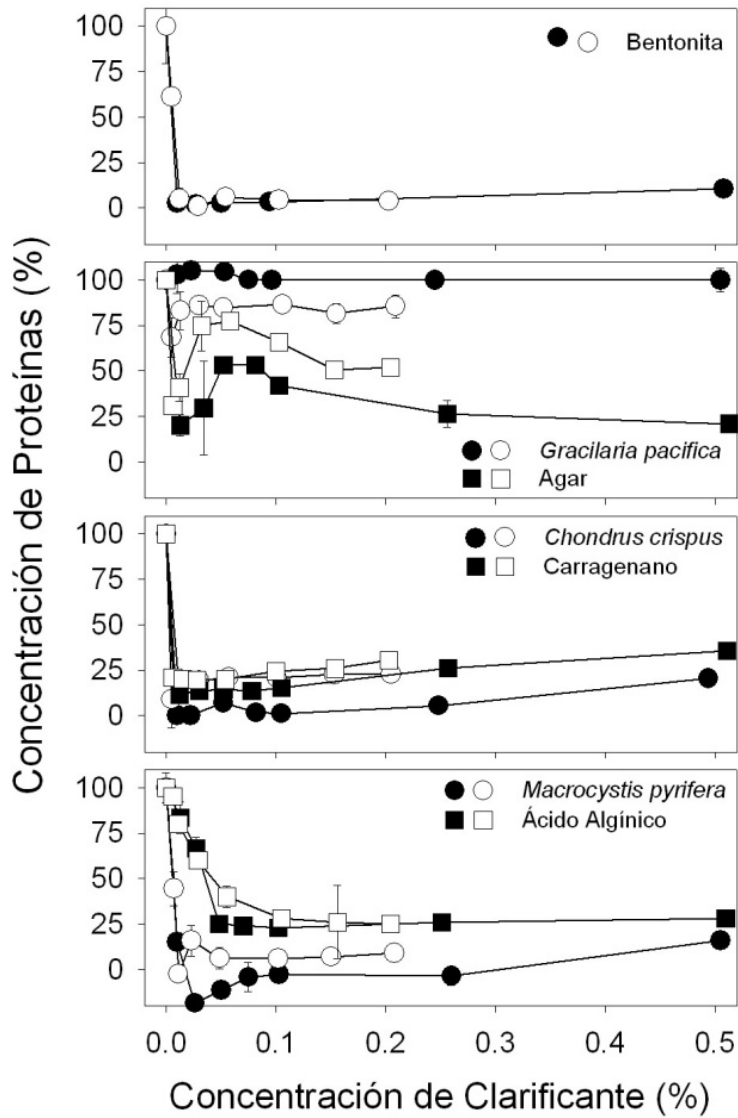


Figura 1. Niveles de proteínas en vino ($X \pm \text{Des. Estan.}$, $n = 4$) después de la clarificación con diferentes concentraciones de bentonita, agar purificado, *G. pacifica*, carragenano purificado, *C. crispus*, ácido algínico purificado y *M. pyrifera*. Símbolos negros indican agentes clarificantes secos, símbolos blancos indican agentes clarificantes extraídos de las algas con agua hirviendo.

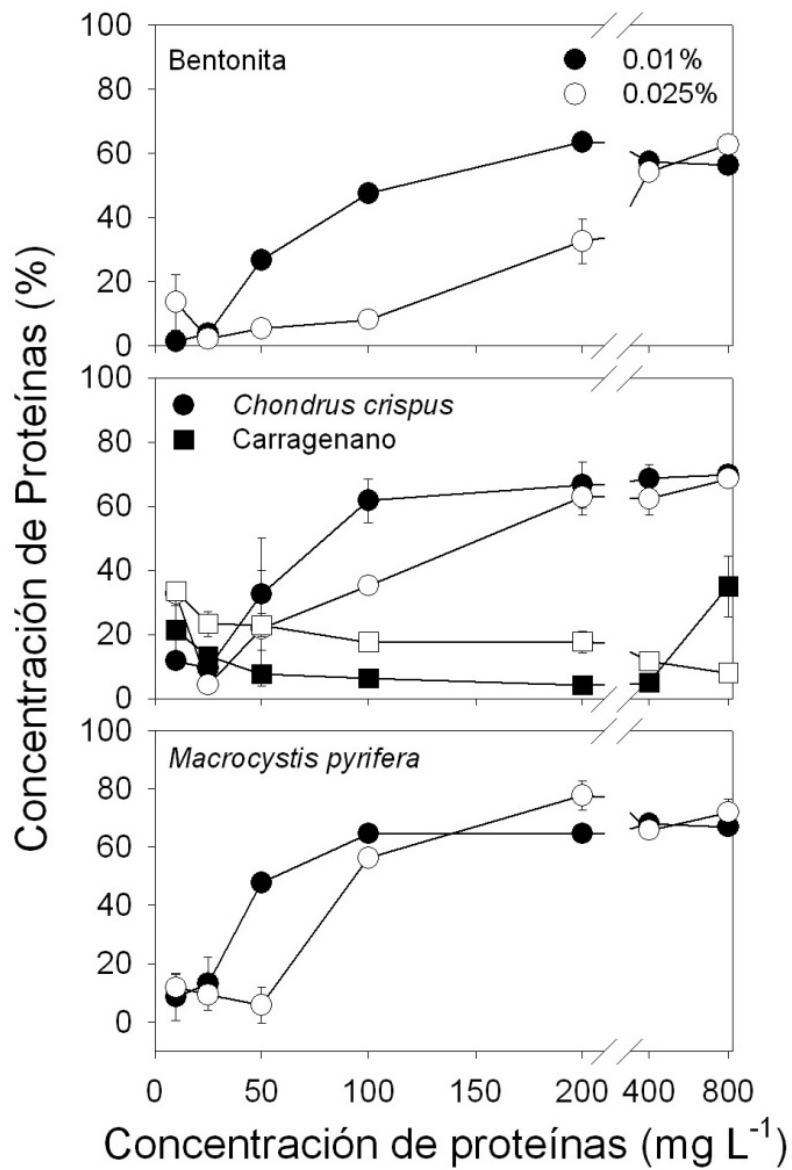


Figura 2. Concentración de proteínas en el vino blanco ($\bar{X} \pm \text{Des. Estan.}$, $n = 4$) después de clarificar con 0.01% y 0.025% de bentonita, carragenano puro, *C. crispus* y la alginofita *M. pyrifera*.

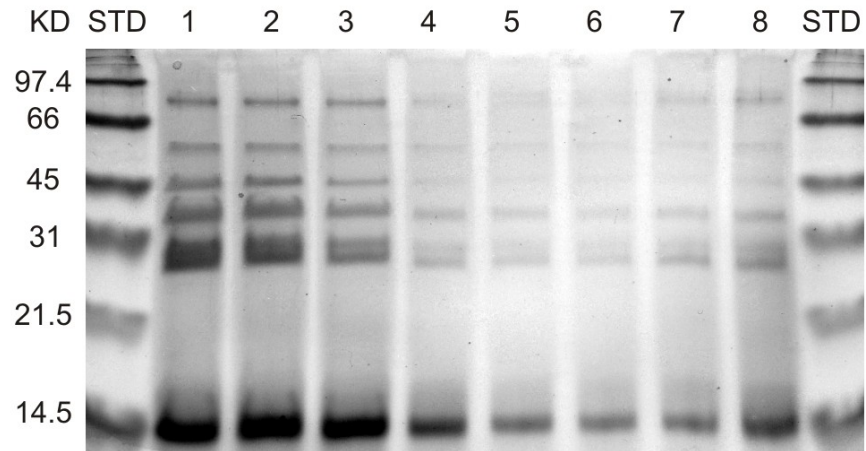


Figura 3. Electroforesis de gel de poliacrilamida (17.5%) de muestras de vino clarificado. Líneas: 1) vino sin clarificar, muestras concentradas 20 veces de 2) bentonita, 3) agar, 4) carragenano, 5) ácido algínico, 6) *C. crispus*, 7) *M. papillatus*, 8) *M. pyrifer*. STD = estándares de peso molecular.

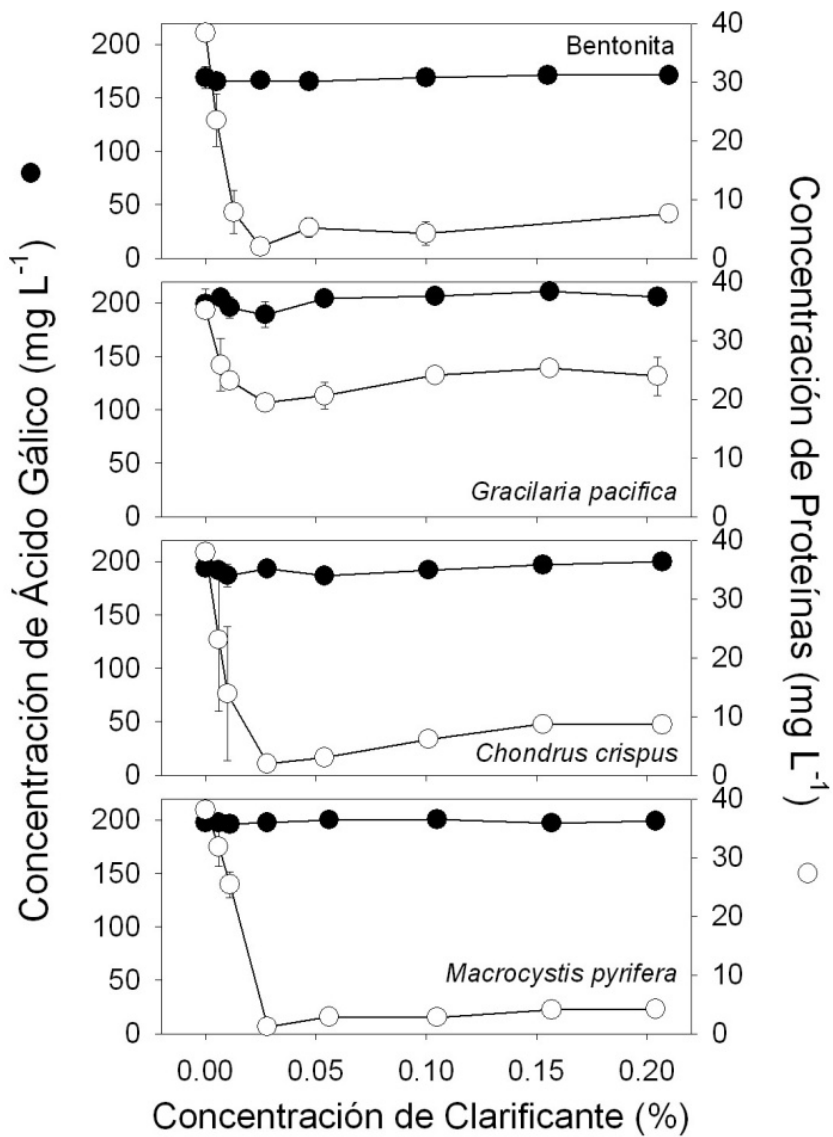


Figura 4. Niveles de ácido gálico y proteínas ($X \pm \text{Des. Estan.}$, $n = 4$) después de ser clarificado con bentonita, *G. pacifica*, *C. crispus* y *M. pyrifera*.