

ORIGINAL

Estabilidad de dos alérgenos utilizados habitualmente como clarificantes en el proceso de vinificación

Carolina Gómez Sordo^{1*}, Elena Meléndez Álvarez¹, Óscar Hernández Betancourt¹

¹ Estación Enológica de Haro. Laboratorio de Microbiología. Bretón de los Herreros 4. Haro (La Rioja) 26200. España.

* Autor de contacto: cgomez@larioja.org

Recibido 13 de febrero de 2025 / Aceptado 03 de marzo de 2025 / Publicado 1 de septiembre de 2025

RESUMEN

Diversos productos clarificantes son utilizados en las bodegas con la finalidad de eliminar partículas en suspensión, así como elementos inestables presentes en el vino, Ej; exceso de taninos, polifenoles, proteínas, metales y de esta forma, obtener un vino limpio, transparente y estable en el tiempo. Dos ejemplos de estos productos clarificantes son las proteínas de la clara de huevo (PCH) y la caseína, una importante proteína de la leche. Debido a que ambas moléculas son considerados alérgenos potenciales, sus valores deben declararse en la etiqueta cuando los mismos sean iguales o superiores al límite máximo de 0,25 mg/l establecido por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) y aceptado por la UE (Reglamento UE 33/2019). Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue investigar la estabilidad de estos alérgenos en una matriz compleja como es el vino. Se estudió la estabilidad de la PCH y de la caseína en dieciocho muestras de vino analizadas en la Estación Enológica de Haro (EEH) entre 2019 y 2022 mediante el empleo de la técnica ELISA tipo sándwich. Los ensayos mostraron que estas proteínas no son estables en el vino y su cuantificación disminuye entre los 30 días y los seis meses una vez iniciados los estudios en las muestras seleccionadas.

PALABRAS CLAVES

Alérgenos del vino, ovoalbúmina, proteína del huevo, caseína, agentes clarificantes, ELISA.

ABSTRACT

A variety of fining products are used in wineries to eliminate suspended particles and unstable elements present in the wine, as excessive tannins, polyphenols that cause high astringency, proteins, metals, and thus obtain a clean, transparent and stable wine over time. Examples

of these fining products are Egg White Proteins (EWP) and Casein, a major milk protein. Due to the allergenic potential of both molecules values equal to or greater than the maximum limit of 0.25 mg/l established by the International Organisation of Vine and Wine (OIV) (Resolution OIV-COMEX 502-2012 and OIV-SECSAN 709-2022) and which must be declared on the label (Chapter IV Section I Article 9 of Regulation Nº 1169/2011 and Article 80 of Regulation Nº 1308/2013). For this reason, the aim of this work was to assess the stability of these proteins in a matrix as complex as wine. The stability of EWP and Casein was studied in eighteen wine samples analyzed at the Oenological Station of Haro (EEH) between 2019 and 2022 using the sandwich ELISA technique. The assays showed the instability of these analytes in wine, a quantification decrease was observed during the extent of the assays.

KEYWORDS

Wine allergens, ovalbumin, egg protein, casein, clarifying agents, ELISA.

INTRODUCCIÓN

La práctica enológica conocida como "clarificación" implica la adición al mosto o al vino de materiales de absorción/adsorción denominados agentes clarificantes, los cuales son empleados para reducir o eliminar la presencia de algunos compuestos no deseados. Por este motivo, el clarificado es un paso fundamental en el proceso de elaboración del vino, ya que ayuda por un lado a reducir el amargor y la astringencia, así como a mejorar la presencia del vino, proporcionando un producto brillante, mucho más atractivo para el consumidor. La clarificación puede modificar el color, la textura o el sabor del vino y, sobre todo, asegurar su estabilidad en el tiempo (Resolución OIV-OENO-SECSAN 520-2014).

	Total de muestras	Muestras positivas (> LC método)	(%)	> 0.25 mgL-1* (%)
PCH	1643	23	1.4	1.2
Caseína	1822	11	0.8	0.7

*Porcentaje de muestras con valores superiores al límite legal establecido por la OIV

Tabla 1. Porcentaje de muestras positivas analizadas durante los experimentos llevados a cabo en la EEH.

Algunos de los productos clarificantes utilizados en las prácticas enológicas actuales, son proteínas potencialmente alergénicas que constituyen un motivo de preocupación, ya que pueden inducir una gran variedad de reacciones de hipersensibilidad en personas susceptibles. Por este motivo, el Parlamento Europeo, redactó la Directiva 2003/89/CE, modificada por el Reglamento UE 2011/1169, que enumera los alimentos alergénicos que deben declararse en las etiquetas. En julio de 2012, se declaró obligatorio indicar en las etiquetas el uso de productos derivados de la leche o del huevo siempre que se utilicen como clarificantes y se detecten en el vino (Reglamento UE 33/2019) en niveles iguales o superiores a 0,25 mg/l. Para detectar trazas de estos agentes clarificantes en el vino, se han desarrollado ensayos inmunoenzimáticos ELISA muy sensibles para la detección de trazas (Peñas y col., 2015).

Sin embargo, tras la revisión de una amplia bibliografía, no se encontraron estudios que evalúen la estabilidad de estos alérgenos una vez detectados en el vino. Por este motivo, el laboratorio de microbiología de la Estación Enológica de Haro (EEH), estudió la estabilidad de estos alérgenos a lo largo del tiempo tanto en vinos dopados experimentalmente como en muestras naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Conservación de las muestras.

Los resultados mostrados en este trabajo, corresponden a muestras que se conservaron a temperatura ambiente entre (20-25 °C).

2. Selección de muestras para el ensayo y cuantificación de proteínas.

Las muestras recibidas en el laboratorio en el periodo comprendido entre 2019 y 2022, que una vez analizadas dieron valores positivos (> LC del método), fueron seleccionadas para los estudios.

Se hizo un seguimiento de los alérgenos en cada muestra de vino realizando análisis periódicos sobre las mis-

mas hasta que el valor de proteína (mg/l), fue inferior al límite de cuantificación de ambos métodos. Cada muestra se ensayó en duplicado mediante la técnica de ELISA tipo sándwich (ensayo inmunoenzimático), acreditada en la matriz vino por ENAC (Acreditación Nº 183/LE407).

Se utilizaron dos kits comerciales de diagnóstico, RIDAS-CREEN FAST Egg Protein (Ref; R6402) de R-Biopharm y CASEIN (Ref; 14113) de BioSystems, para la cuantificación de la proteína de la clara de huevo (PCH) y de la caseína (CAS), respectivamente.

La extracción de ambos alérgenos se realizó siguiendo las instrucciones de ambos fabricantes.

Brevemente, para la PCH se mezcló 1 ml de la muestra de vino previamente homogeneizada con 19 ml de tampón de extracción, mientras que para la extracción de CAS se añadieron 0,5 ml de muestra a 9,5 ml de tampón de extracción. Posteriormente, las muestras se incubaron a 60°C durante 10 y 15 minutos respectivamente. Antes de su aplicación por duplicado en la placa de ELISA, las muestras se atemperaron entre 20 y 25 °C.

Las soluciones Biosystem EGG WHITE (Ref;14158) y CASEIN (Ref; 14151) se utilizaron como “spikes” para preparar los controles positivos con el fin de evaluar la recuperación a diferentes niveles de concentración. Los límites de cuantificación (LC) de los métodos acreditados utilizados para la determinación de PCH y Caseína son de 0,13 mg/l y 0,20 mg/l respectivamente. Ambos LC son inferiores al límite definido por la OIV (0,25 mg/l) para su consecuente declaración obligatoria en etiqueta según el Reglamento Europeo, sobre la presencia de alérgenos en el vino.

RESULTADOS

En la EEH se analiza anualmente un gran número de muestras y cabe destacar que menos del 5 % son positivas (muestras con resultados mayores que LC del método utilizado) para cualquiera de los dos alérgenos analizados (Tabla 1).

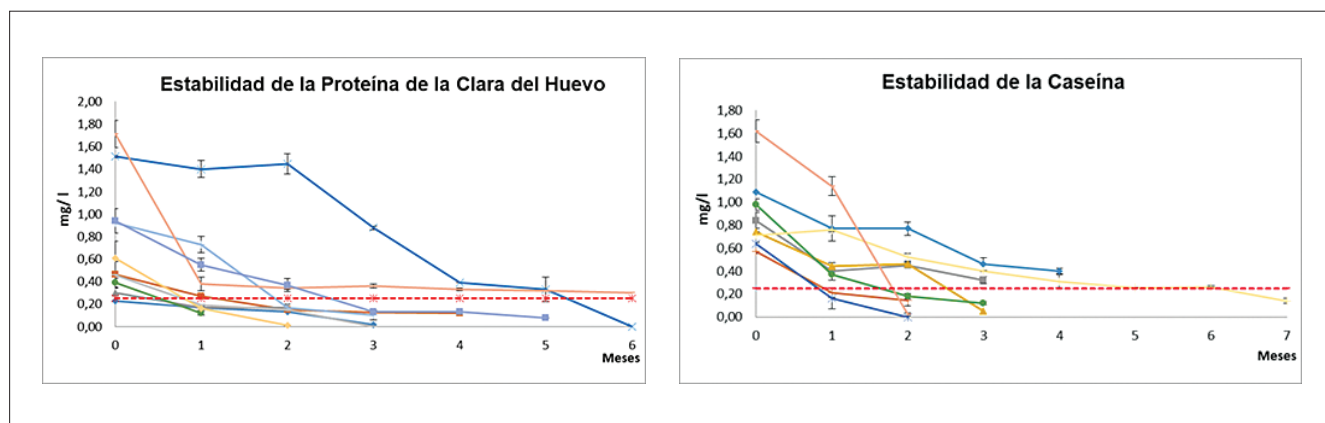
Estabilidad de dos alérgenos utilizados habitualmente como clarificantes en el proceso de vinificación

Figura 1. Estabilidad de la proteína de clara de huevo (PCH) y de la caseína (CAS) en muestras de vino.

Se muestran los valores de las concentraciones medias de los ensayos realizados por duplicado en cada muestra. La cuantificación se realizó mensualmente.

Durante el periodo de estudio, de 1643 muestras analizadas para PCH y 1822 para Caseína, sólo el 1,2 % y el 0,7 % respectivamente superaron el límite establecido (0,25 mg/l). Dieciocho de estas muestras con diferentes concentraciones de alérgenos fueron seleccionadas para el estudio.

Los ensayos mostraron que los analitos estudiados evidencian una inestabilidad en el vino, las concentraciones de ambas proteínas disminuyeron con el tiempo durante la duración del estudio (Figura 1).

Se demostró que esta inestabilidad era independiente de la concentración de alérgenos en el vino de partida, es decir, que muestras con concentraciones iniciales elevadas podían disminuir rápidamente mientras que otras con concentraciones iniciales más bajas, podían persistir y cuantificarse en el vino durante un periodo de tiempo más prolongado.

Por otra parte, se observó que esta inestabilidad también era independiente de la temperatura de almacenamiento de la muestra, aunque mostraban ser más estable cuando las mismas fueron conservadas a -20 °C (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

La PCH y la Caseína son productos comerciales utilizados por muchos enólogos para mejorar la calidad del vino. El potencial alergénico de estos dos productos es ampliamente conocido. (Peñas y col., 2015).

Una pregunta importante a la que teníamos que dar respuesta fue conocer cuánto tiempo podían permanecer estas proteínas en el vino después de su tratamiento en las bodegas. Los estudios revelaron que tanto las proteí-

nas de la clara de huevo como la caseína eran inestables durante el almacenamiento del vino.

Esto puede deberse a un cambio conformacional (agregación, desenrollamiento, plegamiento) o a la degradación de estas moléculas debido a la complejidad de la matriz, que puede afectar su detección por los detectores del kit, es decir, los anticuerpos empleados. La modificación de la estructura de estas proteínas clarificantes puede afectar el reconocimiento antígeno/anticuerpo. Por otra parte, el cambio conformacional no implica necesariamente una pérdida de alergenicidad de las proteínas estudiadas, dependerá de qué tipo de epítipo (lineal o conformacional) intervenga en el mecanismo desencadenante de la respuesta inmune. (Dall'Antonia y col., 2014).

Para entender la pérdida de estabilidad de estas proteínas en el vino, debemos comprender los factores que actúan sobre la conformación nativa de estas proteínas que pueden desestabilizarlas y, en consecuencia, llevar al cambio reversible o no de su estructura.

Hay algunos factores que deben tenerse en cuenta al estar estos relacionados con la estabilidad de las proteínas, dos de estos factores son el pH y la temperatura del medio en el que se encuentran las proteínas. Los vinos tratados durante el proceso de clarificación, tienen un pH ácido. Hegg y col., 1979 encontraron que la ovoalbúmina, principal proteína de la PCH, tiene una estabilidad máxima a valores de pH entre 6-10, valores muy distantes a los pH del vino. Sin embargo, en un estudio realizado por (Koseki y col., 1988), los autores indicaron que la conformación globular de la ovoalbúmina a pH ácido es similar a la de pH neutro, y encon-

Carolina Gómez Sordo, Elena Meléndez Álvarez, Óscar Hernández Betancourt

traron que las moléculas se volvían más flexibles a medida que el pH disminuía.

En relación con la caseína (aproximadamente el 80 % de la proteína total de la leche), forma una estructura coloidal, un biocoloide, conocido como micela de caseína. Estudios recientes han demostrado que las micropartículas obtenidas a partir de micelas de caseína permanecen estables en el intervalo de pH ácido y neutro, sin embargo, la concentración de calcio y citrato, dos elementos químicos presentes en los vinos, influye significativamente en la estabilidad de las caseínas. (Asaduzzaman y col., 2022).

Todo lo explicado anteriormente sugiere que el pH del vino *per se*, no parece ser el factor crítico en la pérdida de estabilidad de estos alérgenos utilizados como agentes clarificantes.

La temperatura es otro factor importante a tener en cuenta para la estabilidad de las proteínas, ya que generalmente su estructura sufre cambios irreversibles cuando se someten a altas temperaturas, llegando a su

desnaturalización. En relación con esta, hay que decir que el almacenamiento de los vinos raramente supera los 20 °C, y en muchos casos se almacenan a temperaturas más bajas, que oscilan entre 14 y 18 °C, lo cual puede favorecer la estabilidad de los alérgenos en el tiempo.

Estudios preliminares obtenidos en nuestro laboratorio donde se comparó la estabilidad de estas proteínas a diferentes temperaturas (datos no publicados), evidenciaron que estos dos alérgenos fueron más estables cuando los vinos fueron almacenados a -20 °C (temperatura no utilizada en la práctica comercial).

Otro factor no menos importante a tener en cuenta en los estudios de estabilidad de la PCH y la caseína, son los niveles de alcohol (grado alcohólico) del vino donde se encuentran estos agentes clarificantes. De acuerdo a la definición de la OIV, los vinos presentan valores de alcohol adquirido superiores a 8,5 % vol. Paulinelli y col., (1997) describen que la ovoalbúmina, la proteína mayoritaria de la PCH, tiene dos formas, una forma nativa y la



Naturity by Amorim Cork

Liderando el camino en innovación, naturalmente.

Tratamiento opcional de cera de abeja de origen biológico

BeeW



-56,4g
Huella de carbono negativa*

AMORIM CORK

 amorimcorkstoppers
[amorimcork.com](https://www.amorimcork.com)

* Producto estándar. Para más información, acceda a nuestros certificados de Huella de Carbono:
<https://www.amorimcork.com/es/sostenibilidad/estudios-y-certificados/>

forma "ovoalbúmina S", la cual presenta una estructura secundaria termoestable. Miyakami, 1988, estudió el efecto de los alcoholes sobre la estabilidad de estas variantes, el autor demostró que la forma "S" de la ovoalbúmina es más estable en presencia de alcohol que la forma nativa. Este estudio confirma que la inestabilidad creada por los alcoholes depende de sus grupos alquilo y sus ramificaciones, que interfieren creando inestabilidad en el núcleo hidrofóbico de la molécula. Por otra parte, otros estudios realizados con estructuras micelares de caseína por Kruzely col., (2004), demostraron que el alcohol inducía cambios conformacionales en la estructura de esta proteína.

Teniendo en cuenta lo explicado anteriormente, entendemos que tanto los factores mencionados con anterioridad, así como otros asociados a los componentes propios de esta matriz, deben influir en mayor o menor medida en la pérdida de la estabilidad observada en estas moléculas. Podría pensarse que la unión de estas proteínas clarificantes a compuestos estructuralmente complejos y variados como los polifenoles para formar agregados moleculares, afecten la estabilidad de las mismas y consecuentemente también su detección y cuantificación.

CONCLUSIONES

El estudio demostró la inestabilidad en el tiempo de las proteínas empleadas como clarificantes del vino (PCH y Caseína) y que, por consiguiente, la fecha de análisis de estos alérgenos influye en su detección.

La estabilidad de estas proteínas duró aproximadamente entre uno a seis meses, dependiendo de cada muestra de vino y fue independiente de su concentración inicial o de partida.

El porcentaje de vinos con valores superiores al límite legal establecido por la Organización Internacional de la Viña y el Vino para su declaración obligatoria (0,25mg/l) fue bajo (aproximadamente el 1 %).

Otros estudios serán necesarios para poder evaluar los cambios estructurales en ambos alérgenos, así como su correlación con la pérdida o no de alergenidad de estas proteínas. El presente trabajo no puede dar respuesta a estas cuestiones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo, a la Dirección General de Agricultura y Ganadería del Gobierno de La Rioja, por su apoyo, sin el cual este trabajo no hubiera sido posible.

REFERENCIAS

Asaduzzaman, M.D. Pütz T., &Gebhardt, R. (2022). Citrate effect on the swelling behaviour and stability of casein microparticles. *Scientific Reports*. 12 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23096-x>

Commission Delegated Regulation (EU) 2019/33 of 17 October 2018 supplementing Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council as regards applications for protection of designations of origin, geographical indications and traditional terms in the wine sector, the objection procedure, restrictions of use, amendments to product specifications, cancellation of protection, and labelling and presentation.

Dall'Antonia, F., Pavkov-Keller, T., Zangger, K., & Keller W. (2014). Structure of allergens and structure based epitope predictions. *Methods*, 66(1): 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.024>

Directive 2003/89/EC of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003 amending Directive 2000/13/EC as regards indication of the ingredients present in foodstuff.

Hegg, P-O., Martens, H. &Löfqvist. B. (1979). Effects of pH and neutral salts on the formation and quality of thermal aggregates of ovalbumin. A study on thermal aggregation and denaturation. *Journal of Food and Agricultural Sciences*, 30(10), 981–993. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740301006>.

Koseki, T., Kitabatake, N., &Doi E. (1988). Conformational Changes in Ovalbumin at Acid pH. *J. Biochem.* 103 (3), 425-430. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122286>

Kruzel, M.L., Polanowski, A., Wilusz, T., Sokołowska, A., Pacewicz, M., Bednarz, R. &GeorgiadesJ.A.. (2004). The alcohol-induced conformational changes in casein micelles: a new challenge for the purification of colostrinin. *Protein J*, 23(2):127-33. <https://doi.org/10.1023/B:JOPC.0000020079.76155.9d>

Miyakami, K. (1988). Kinetics of the denaturation of ovalbumin and S-Ovalbumin by alcohols. *Bull.Chem. SocJpn*, 61. 3043-3047. <https://doi.org/10.1246/bcsj.61.3043>

Paolinelli, C., Barterib, M., Boffi, F., Forastieri3, F., Gaudianob, M. C., Della Longac, S. &Congiu A. (1997). Structural Differences of Ovalbumin and S-Ovalbumin Revea-

led by Denaturing Conditions. *Z. Naturforsch.* 52c, 645-653. <https://doi.org/10.1515/znc-1997-9-1012>

Peñas, E., di Lorenzo, C., Uberti, F., & Restani, P. (2015). Allergenic Proteins in Enology: A Review on Technological Applications and Safety Aspects. *Molecules* (20) 13144-13164. <https://doi.org/10.3390/molecules200713144>

Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending.

Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004.

Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council of 17 December 2013 establishing a common organisation of the markets in agricultural products and repealing Council Regulations (EEC) No 922/72, (EEC) No 234/79, (EC) No 1037/2001 and (EC) No 1234/2007.

Resolution OIV-COMEX 502-2012. Review of the limits of detection and limits of quantification of potentially allergenic residues of fining proteins in wine.

Resolution OIV-OENO-SECSAN 520-2014. Code of good fining practices for wine to be applied in the use of proteinaceous wine fining agents with allergenic potential (casein and egg white).

Resolution OIV-SECSAN 709-2022. Update of OIV/OENO Resolution 427/2010 on criteria for the quantification of allergens.



Nuevo sistema de prefiltración



www.multifiltration.com - 977 65 31 35 - info@multifiltration.com