



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS,**  
**NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA**

**EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS DE LA UVA AL VINO.  
PAPEL DE LOS ENZIMAS DE  
MACERACIÓN**

**INMACULADA ROMERO CASCALES**  
**2008**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS,**  
**NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA**

**EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS DE LA UVA AL VINO.  
PAPEL DE LOS ENZIMAS DE  
MACERACIÓN**

Memoria presentada para aspirar al grado de  
Doctor por la Universidad de Murcia

**Inmaculada Romero Cascales, 2008**





# UNIVERSIDAD DE MURCIA

---

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE  
ALIMENTOS, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

D<sup>a</sup> **ENCARNA GÓMEZ PLAZA**, Catedrática de Universidad del Área de Tecnología de Alimentos y Director del Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Murcia, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA UVA AL VINO. PAPEL DE LOS ENZIMAS DE MACERACIÓN” ha sido realizada por D<sup>a</sup>. Inmaculada Romero Cascales, bajo mi inmediata dirección y supervisión y la del Dr. José María Ros García, en el Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia, a 11 de Marzo de 2008

Fdo. Encarna Gómez Plaza





# UNIVERSIDAD DE MURCIA

---

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE  
ALIMENTOS, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

D<sup>a</sup>. **ENCARNA GÓMEZ PLAZA**, Catedrática del Area de Tecnología de Alimentos y D. **JOSÉ MARÍA ROS GARCÍA**, Profesor Titular de Universidad del Área de Tecnología de Alimentos en el Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Murcia, AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral “EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA UVA AL VINO. PAPEL DE LOS ENZIMAS DE MACERACIÓN” realizada por D<sup>a</sup>. Inmaculada Romero Cascales, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión en el Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 11 de Marzo de 2008

Fdo. Encarna Gómez Plaza

Fdo. José María Ros García



La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Proyecto de Investigación “ESTUDIO DE LA MADUREZ POLIFENÓLICA DE LAS UVAS MONASTRELL. REPERCUSIONES ENOLÓGICAS Y FACTORES QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS”, subvencionado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, con número de referencia AGL2003-01957.

La firmante de esta Memoria ha disfrutado de una beca concedida por la Fundación Séneca y actualmente disfruta de una beca concedida por la Fundación CajaMurcia



## AGRADECIMIENTOS.

*En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, la Dra Encarna Gómez Plaza, Catedrática del Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología y el Dr José María Ros García, Profesor Titular del Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, por su dedicación y orientación en la realización de esta Tesis.*

*Nuevamente, a la Dra Encarna Gómez Plaza, ejemplo de dedicación y trabajo para todos nosotros.*

*Al Dr José María López Roca, Catedrático del Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, padre del grupo, por su apoyo y su preocupación por todos los componentes del mismo.*

*A todo el equipo de la Estación Enológica de Jumilla, por su apoyo y su cariño durante tantos años, y especialmente a José Ignacio Fernández Fernández, mis primeros pasos en el ámbito de la investigación fueron contigo y gracias a ti descubrí este maravilloso mundo de la Enología.*

*Al equipo del SACE de las áreas de Microscopía (Maruca, Manolo, Paquita, Paco y Pepa) y Cromatografía (María José y Pepe).*

*To Doctors Geoff Fincher and Maria Hrmova of the Australian Centre for Plant Functional Genomics, University of Adelaide, and Doctors Toni Bacic and Filomena Pettolino, of the Plant Cell Biology Research Centre, School of Botany, University of Melbourne, for allowing me to learn in their laboratories, to know other ways of working, for putting all their resources within my reach and for their patience with my English.*

*A todos mis compañeros del Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología: Luis Javier, Belén y Ana que siguen su camino lejos de nosotros, Marta amiga además de compañera ¿no?, Angie y Shere con quien siempre había tiempo para unas risas, Alberto,*

*Pedro y Rafa ya era hora de un grupo mixto!!!, todos nuestros alumnos internos siempre dispuestos a echar una mano sobre todo a Alfonso y Benoit (parecía que vivían aquí), a los chicos del fondo del pasillo: Pedro, Pere, Gema, Mariano, Amarillis e Inés por todos los buenos momentos, a Sancho por acogerme en el núcleo duro y a Antonio que siempre me hace reír.*

*A Nati y a Lorenzo que forman parte del grupo como uno más y siempre se apuntan a pasar un buen rato con nosotros.*

*A mi madre, Inmaculada y a mi hermano, Agustín, por todo su amor y apoyo sin condiciones y a mi nueva familia: Joaquín, Fulgencia, Rosa, John, José David y Mamen por su apoyo siempre y a los peques: Ana, Joaquinete, Lucía y Jakob porque un rato jugando con ellos es la mejor terapia antiestrés.*

*A Joaquín, por ser mi mayor apoyo en los momentos más difíciles de esta etapa, por animarme a seguir adelante y sobre todo, por quererme.*

*A mis amigos de siempre: Jose, Silvia, Fran, Diego, Cristóbal, Paco, Pedro, Damián, Antonio, Teresa, Hernán, Alexia y Bárbara y a los "nuevos": Ingrid, Fermín, Pablo, Patricia, Ignacio, Pilar, MariaJo, José Carlos, Merche, Fernando, Fran, Diego, Ana e Isa porque no sólo de investigar vive el hombre y siempre acuden al rescate.*

*Y a todos aquellos que de alguna manera han colaborado en la realización de este proyecto.*

*Quiero dedicar este trabajo:*

*A mi madre, Inmaculada, mi ejemplo a seguir y  
la persona que siempre me ha animado a luchar por mis sueños*

*A Joaquín, por todo, TE QUIERO*



## **ÍNDICE**

<b>1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>5</b>
<b>2.1. El color del vino.</b>	<b>7</b>
2.1.1. <i>Antocianos.</i>	7
2.1.2. <i>Taninos.</i>	9
2.1.3. <i>Extracción de los compuestos fenólicos y estabilidad del color del vino.</i>	13
2.1.3.1. <i>Potencial fenólico de la uva.</i>	14
2.1.3.2. <i>Maceración.</i>	16
2.1.3.3. <i>Condiciones del medio.</i>	17
2.1.3.3.1. pH.	17
2.1.3.3.2. Presencia de anhídrido sulfuroso.	19
2.1.3.3.3. Fenómeno de copigmentación.	19
2.1.3.4. <i>Evolución del color en el tiempo.</i>	21
2.1.3.4.1. Reacciones de condensación.	21
2.1.3.4.2. Formación de nuevos pigmentos derivados de los antocianos.	23
2.1.3.4.3. Influencia de las características del vino en la evolución del color.	24
2.1.3.4.3.1. Concentración de antocianos y taninos.	25
2.1.3.4.3.2. pH del vino.	25
2.1.3.4.3.3. Presencia de oxígeno.	26
2.1.3.4.3.4. Levaduras.	27
<b>2.2. La pared celular y los enzimas.</b>	<b>28</b>
2.2.1. <i>Estructura y composición de la pared celular.</i>	28
2.2.1.1. <i>Estructura.</i>	29
2.2.1.2. <i>Composición.</i>	31
2.2.1.2.1. Polisacáridos de la pared celular.	31
2.2.1.2.1.1. Celulosa.	31
2.2.1.2.1.2. Polisacáridos no celulósicos.	33
2.2.1.2.2. Proteínas.	36

2.2.1.2.3. Compuestos fenólicos.	38
2.2.1.2.4. Lignina.	38
2.2.2. <i>Acción de los enzimas en diferentes sustratos de la pared celular.</i>	38
2.2.2.1. <i>Pectinasas.</i>	39
2.2.2.1.1. Pectínesterasa (EC 3.1.1.11).	41
2.2.2.1.2. Poligalacturonasas (EC 3.2.1.15).	42
2.2.2.1.3. Pectato (EC 4.2.2.2) y Pectín Liasas (EC 4.2.2.10).	43
2.2.2.2. <i>Hemicelulasas.</i>	44
2.2.2.3. <i>Celulasas (EC 3.2.1.4).</i>	45
2.2.2.4. <i>Otros enzimas.</i>	45
2.2.2.4.1. $\alpha$ - y $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.22 y EC 3.2.1.23).	45
2.2.2.4.2. Proteasas (EC 3.4).	46
2.2.3. <i>El uso de enzimas comerciales en enología.</i>	47
2.2.3.1. <i>Producción de preparados enzimáticos para enología.</i>	48
2.2.3.2. <i>Enzimas para la extracción de color.</i>	49
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	55
<b>3.1. Diseño experimental.</b>	55
3.1.1. <i>Campaña 2003-2004.</i>	55
3.1.2. <i>Campaña 2004-2005.</i>	57
3.1.3. <i>Campaña 2005-2006.</i>	58
3.1.3.1. <i>Efecto del tiempo de maceración.</i>	58
3.1.3.2. <i>Efecto del grado de madurez de las uvas.</i>	58
<b>3.2. Material vegetal.</b>	59
<b>3.3. Control del grado de maduración de la uva.</b>	59
3.3.1. <i>Obtención del mosto.</i>	60
3.3.2. <i>Madurez tecnológica de la uva.</i>	60
3.3.2.1. <i>Grado Brix.</i>	60
3.3.2.2. <i>pH.</i>	61
3.3.2.3. <i>Acidez total.</i>	61
3.3.3. <i>Madurez polifenólica.</i>	61

3.3.3.1. <i>Antocianos totales.</i>	62
3.3.3.2. <i>Compuestos fenólicos totales (CFT).</i>	62
3.3.4. <i>Determinación de antocianos en el hollejo de la uva.</i>	62
<b>3.4. Vinificaciones.</b>	64
<b>3.5. Métodos de análisis en vino.</b>	65
3.5.1. <i>Determinaciones espectrofotométricas.</i>	65
3.5.1.1. <i>Intensidad de color y tono.</i>	66
3.5.1.2. <i>Parámetros CIELab.</i>	66
3.5.1.3. <i>Parámetros de copigmentación.</i>	66
3.5.1.4. <i>Taninos totales.</i>	68
3.5.2. <i>Determinación del perfil de antocianos por HPLC.</i>	69
3.5.3. <i>Análisis sensorial.</i>	69
<b>3.6. Análisis de los orujos procedentes de las vinificaciones.</b>	71
3.6.1. <i>Determinación del perfil de antocianos por HPLC.</i>	71
3.6.2. <i>Aislamiento de las paredes celulares.</i>	71
3.6.3. <i>Análisis de los componentes de las paredes celulares.</i>	72
3.6.3.1. <i>Determinación de proteína.</i>	72
3.6.3.2. <i>Determinación de compuestos fenólicos.</i>	72
3.6.3.3. <i>Determinación de azúcares neutros.</i>	73
3.6.3.3.1. <i>Hidrólisis de Saeman.</i>	73
3.6.3.3.1.1. <i>Prehidrólisis.</i>	74
3.6.3.3.1.2. <i>Hidrólisis.</i>	74
3.6.3.3.2. <i>Hidrólisis directa sin prehidrólisis.</i>	74
3.6.3.3.3. <i>Reducción.</i>	75
3.6.3.3.4. <i>Acetilación.</i>	75
3.6.3.3.5. <i>Cuantificación de los acetatos de alditol.</i>	76
3.6.3.4. <i>Determinación de ácidos urónicos.</i>	76
3.6.3.5. <i>Determinación del grado de metilación y acetilación de pectinas.</i>	77
<b>3.7. Determinación de las actividades enzimáticas presentes en los preparados enzimáticos comerciales para la extracción de color.</b>	78
3.7.1. <i>Actividades poligalacturonasa (PG) y endo-poligalacturonasa (endoPG).</i>	79

3.7.2. <i>Actividades celulasa, xilanasa y galactanasa.</i>	81
3.7.3. <i>Actividades pectato y pectín liasa.</i>	81
3.7.4. <i>Actividad pectín metilesterasa (PME).</i>	82
3.7.5. <i>Actividades <math>\alpha</math>-galactosidasa y <math>\beta</math>-galactosidasa.</i>	82
3.7.6. <i>Actividad <math>\beta</math>-glucosidasa.</i>	83
3.7.7. <i>Actividad proteasa.</i>	83
<b>3.8. Análisis estadístico.</b>	<b>84</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>87</b>
<b>4.1. Dinámica de la extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino y características de las paredes celulares de los orujos obtenidos.</b>	<b>89</b>
4.1.1. <i>Extracción de los compuestos fenólicos.</i>	90
4.1.2. <i>Caracterización de las paredes celulares de los orujos durante la maceración.</i>	98
<b>4.2. Diferencias en la extractabilidad de los compuestos fenólicos de distintas variedades de uva, características de los vinos obtenidos y de las paredes celulares de los orujos.</b>	<b>103</b>
4.2.1. <i>Características de la uva a la entrada en bodega.</i>	104
4.2.2. <i>Características cromáticas de los vinos.</i>	109
4.2.2. <i>Caracterización de las paredes celulares de los orujos.</i>	117
<b>4.3. Caracterización de diferentes enzimas comerciales. Efecto en la vinificación y en las paredes celulares de los orujos obtenidos.</b>	<b>123</b>
4.3.1. <i>Caracterización enzimática.</i>	124
4.3.2. <i>Características cromáticas de los vinos.</i>	130
4.3.3. <i>Caracterización de las paredes celulares de los orujos.</i>	139
<b>4.4. Efecto de enzimas comerciales en la vinificación en función del estado de maduración de la uva y de la técnica de elaboración.</b>	<b>143</b>
4.4.1. <i>Efecto en las características cromáticas de los vinos elaborados con distinto tiempo de maceración y en las paredes celulares de los orujos obtenidos.</i>	145
4.4.1.1. <i>Características cromáticas de los vinos.</i>	145
4.4.1.2. <i>Caracterización de las paredes celulares de los orujos.</i>	162

<i>4.4.2. Efecto en las características cromáticas de vinos elaborados con uvas con distinto grado de maduración y en las paredes celulares de los orujos obtenidos.</i>	167
<i>4.4.2.1. Características de la uva a la entrada en bodega.</i>	167
<i>4.4.2.2. Características cromáticas de los vinos.</i>	171
<i>4.4.2.3. Caracterización de las paredes celulares de los orujos.</i>	185
<i>4.4.3. Efecto en las características cromáticas de vinos elaborados con uvas con distinto índice de extractabilidad y en las paredes celulares de los orujos obtenidos.</i>	189
<i>4.4.3.1. Características de la uva a la entrada en bodega.</i>	190
<i>4.4.3.2. Características cromáticas de los vinos.</i>	191
<i>4.4.3.3. Caracterización de las paredes celulares de los orujos.</i>	203
<b>5. CONCLUSIONES.</b>	207
<b>6. BIBLIOGRAFIA.</b>	213



## **1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.**



La evolución del mercado actual de los vinos está dirigida principalmente a la elaboración de vinos de alto contenido polifenólico, con color intenso, mucho cuerpo y equilibrados. Esto hace necesaria la búsqueda de alternativas, tanto en el cultivo como en la vinificación, para satisfacer las exigencias de esta nueva demanda, que permitan la elaboración de vinos de calidad en las D.O. de la Región de Murcia.

Los compuestos polifenólicos de las uvas tintas, en particular antocianos y taninos, son los principales responsables de las características de color y gustativas buscadas en la actualidad (Mazza et al., 1999).

Es bien sabido que la calidad de un vino está íntimamente relacionada con la calidad de la uva de partida, pero se ha constatado que uvas altamente coloreadas no siempre dan lugar a vinos muy coloreados. La sola observación de la evolución de la concentración de antocianos en la piel de la baya no sirve como medida del potencial de esa baya para dar vinos con mucho color. La extracción de los compuestos fenólicos, que se localizan fundamentalmente en las células del hollejo de las uvas, va a depender de la degradación de la pared celular, puesto que a mayor disgregación más se debería facilitar la difusión de éstos al vino. Si la piel de la uva no se degrada con facilidad, aunque ésta contenga muchas sustancias coloreadas, no se producirá la transferencia de los compuestos polifenólicos durante la maceración. Por ello, paralelamente a los estudios clásicos de maduración, cada vez más se realizan estudios de "madurez polifenólica" midiendo la extractabilidad de los compuestos polifenólicos de las pieles y las pepitas conforme avanza la maduración.

A la vista de lo comentado anteriormente, el uso de enzimas pectolíticas que degraden la pared celular de las células de la piel de la uva, favoreciendo la solubilización de antocianos y taninos, podría ser una técnica adecuada para la obtención de vinos con mayor carga polifenólica

y repercutir en un menor tiempo de maceración durante el periodo de elaboración del vino tinto.

La utilización de preparados enzimáticos comerciales es una práctica común en enología, habiéndose llevado a cabo numerosos estudios sobre la efectividad de la utilización de estas enzimas, aunque se han encontrado resultados contradictorios. Así, mientras unos autores como Felix y Villettaz (1983), Servili et al. (1992), Zent e Inama (1992), Gil y Vallés (2001), Clare et al. (2002) y Revilla y González-San-José (2003) muestran un aumento en el color de los vinos elaborados con enzimas, otros no han encontrado una mejora en la intensidad colorante de los mismos (Capdeboscq et al., 1994; Wightman y Wrolstrad, 1995; Wightman et al., 1997; Alvarez et al., 2005).

Por todo ello, los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

- Determinar la extractabilidad de los compuestos fenólicos de la uva al vino y la cinética de extracción de éstos durante el proceso de maceración.
- Determinar la utilidad del uso de enzimas pectolíticos en la extracción de color en la vinificación en tinto, comprobando el efecto de enzimas comerciales que presentan distintas actividades enzimáticas.
- Determinar las condiciones de madurez de la uva y las condiciones de elaboración en las que la utilización de enzimas exógenos presenta mayor efectividad.
- Determinar la acción de los enzimas exógenos sobre las paredes celulares de la uva, lo que podría ayudar a determinar su mecanismo de acción y las condiciones en las que realmente su aplicación será efectiva.

## **2. INTRODUCCIÓN.**



## **2.1. EL COLOR DEL VINO.**

El color es una de las características organolépticas del vino tinto que van a definir su calidad. En el proceso de cata es el primer atributo en ser evaluado y va a ofrecer información sobre la calidad, el posible aroma, ciertas características gustativas y el estado de conservación del vino.

Los compuestos fenólicos presentes en la piel de la uva tinta van a ser los mayores responsables del color del vino tinto. Estos se clasifican como no flavonoides (ácidos benzoicos, ácidos cinámicos y estilbenos) y flavonoides (flavonoles, antocianos y flavanoles). Los antocianos y los taninos (flavanoles polimerizados o procianidinas) van a ser los compuestos más relevantes en relación al color y estabilidad de los vinos tintos.

### **2.1.1. ANTOCIANOS.**

Los antocianos son responsables del color de los vinos tintos y están involucrados en las reacciones de polimerización que suceden durante el envejecimiento.

Su estructura se caracteriza por un esqueleto básico de quince átomos de carbono (C6-C3-C6) de tipo 2-fenil benzopirona. Son sales de flavilio (de núcleo favilio polihidroxilado y/o metoxilado) y glucósidos (están unidos por enlace glucosídico a una molécula de azúcar). Los antocianos se llaman también antocianinas y sus derivados privados del azúcar se denominan antocianidinas (o antocianidoles). Son más estables bajo la forma heterosídica que bajo la forma aglicona.

En *Vitis vinífera* se distinguen cinco tipos de moléculas de antocianinas, dependiendo del número de hidroxilos (OH) y grupos metoxilo (OCH<sub>3</sub>) en el anillo B (Figura 2.1.1). Existe una mayor diversidad de estos compuestos debido a la acilación de los azúcares con los ácidos acético, p-cumárico y cafeico. En otras especies del mismo género, como

*Vitis riparia* o *Vitis rupestris*, los antocianos aparecen como diglucósidos, con dos moléculas de glucosa en las posiciones 3 y 5.

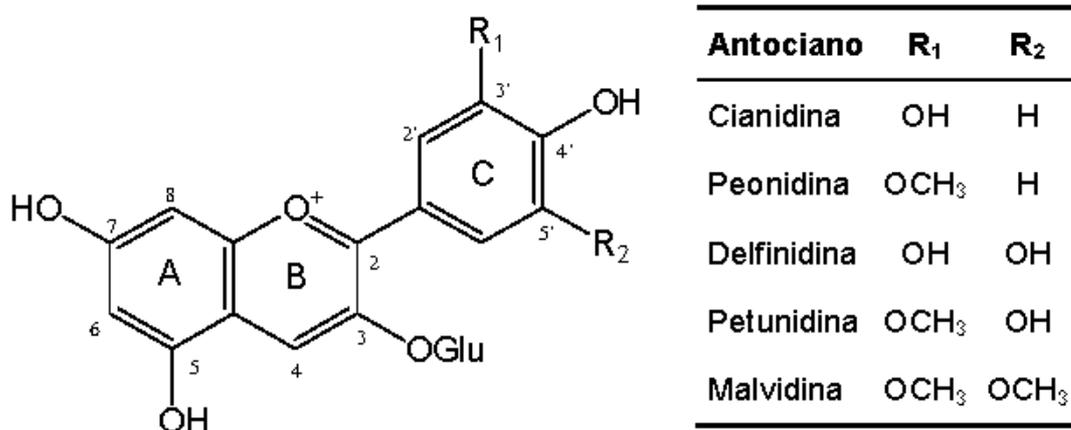
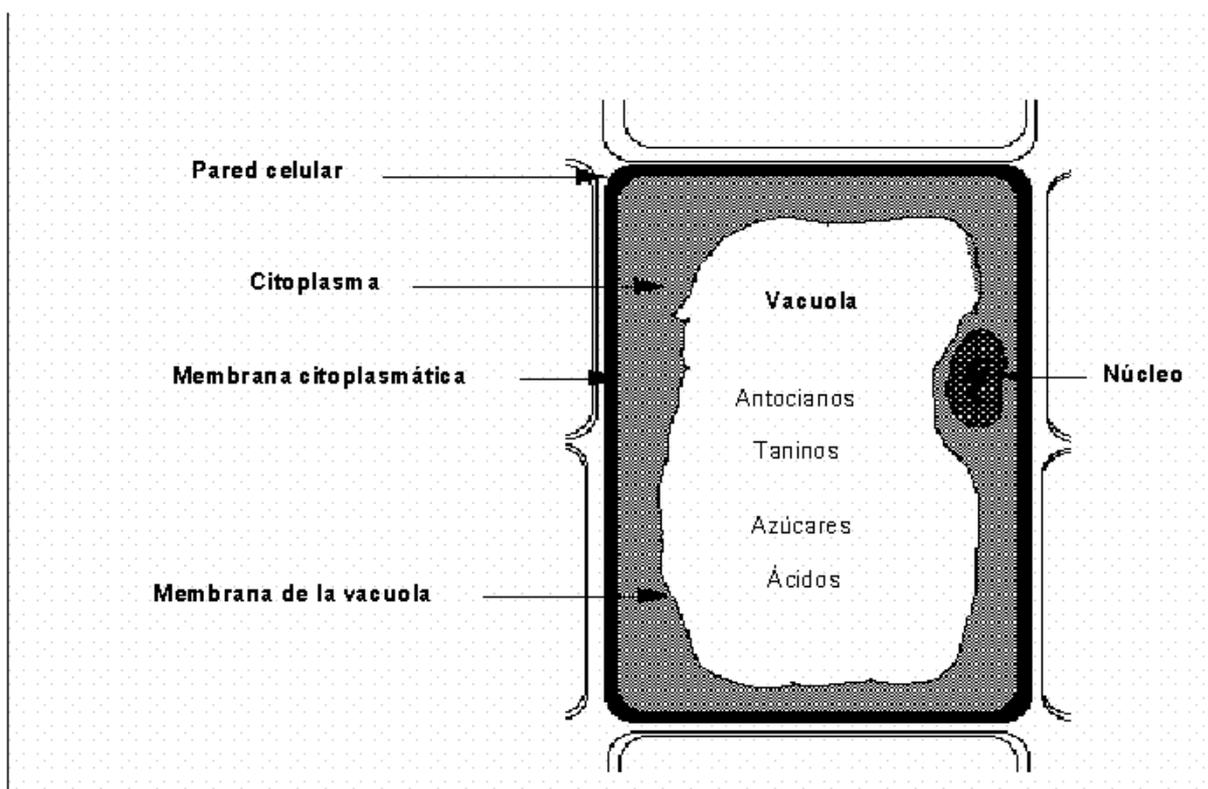


Figura 2.1.1. Estructura de los principales antocianos encontrados en *Vitis vinifera*.

La variabilidad debida a esta diversidad estructural permite discriminar variedades y especies (Mazza y Miniati, 1993; Ortega-Regules et al., 2006). En función del perfil antocianico y de la concentración, que varía entre 500 y 3000 mg/kg, es posible clasificar estadísticamente vinos elaborados con distintas variedades (González-San José et al., 1990; Katalinic y Males, 1997; Holbach et al., 1997; Hesford y Schneider, 1997; Kallithraka et al., 2001; García-Beneytez et al., 2002). Hay factores que pueden incidir en el nivel de antocianos en uvas como son la temperatura, las condiciones de insolación y del terreno (Larice et al., 1989; Esteban et al., 2001; Arozarena et al., 2002) y las prácticas vitícolas: el sistema de conducción, la fertilización o el riego (Castia et al., 1992; Keller y Hrazdina, 1998; Sipiora y Gutiérrez Granda, 1998; De la Hera et al., 2002 y 2005). Aún así, diversos trabajos han mostrado que el perfil de antocianos es bastante estable para una determinada variedad, lo que permite su utilización taxonómica (Arozarena et al., 2000 y 2002; Košir et al., 2004; Von Baer et al., 2005; Casavecchia et al., 2007)

Los antocianos se localizan en el hollejo de las uvas tintas, en las tres o cuatro primeras capas celulares de la hipodermis, excepto en variedades tintoreras donde también se hallan en la pulpa (Moskowitz y

Hrazdina, 1981; Ros Barceló et al., 1994; Souquet et al., 1996a). Además están presentes en las hojas, sobre todo al final del ciclo vegetativo. A nivel subcelular, estas moléculas hidrosolubles se encuentran normalmente dentro de las vacuolas (Figura 2.1.2), donde se pueden acumular en unas vesículas esféricas denominadas “antocianoplastos” o “inclusiones antociánicas vacuolares” (Markham et al., 2000). En el transcurso de la maduración ocupan cada vez más espacio en detrimento del citoplasma.



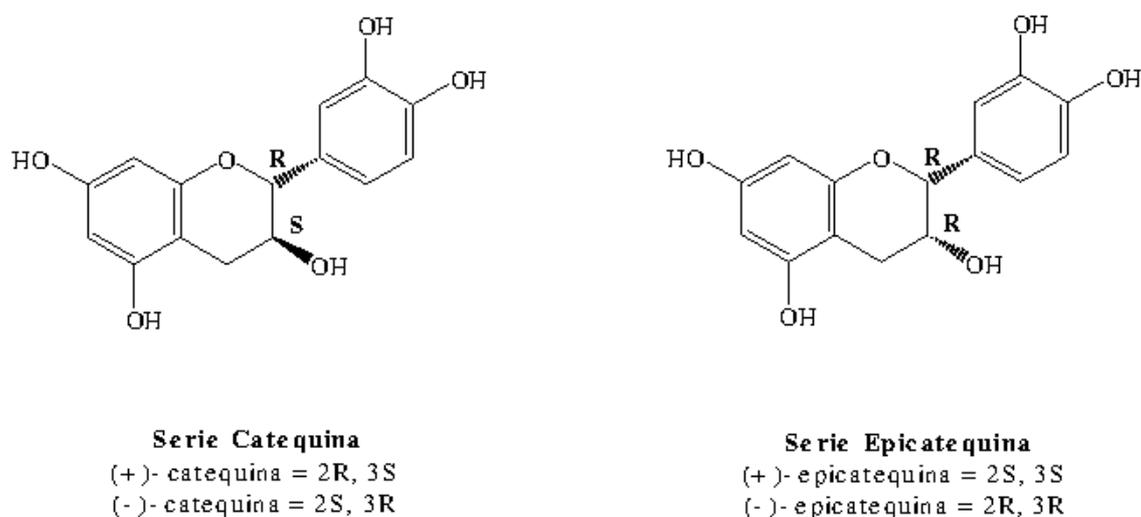
**Figura 2.1.2.** Representación esquemática de la localización de antocianos a nivel subcelular.

### 2.1.2. TANINOS.

Los taninos presentes en la uva y en los vinos juegan un papel preponderante en la calidad de los vinos, al conferir propiedades de astringencia, de color y de estructura. También contribuyen a la

estabilización del color durante el envejecimiento (Pérez-Magariño y González-San José, 2001).

La estructura de los taninos se basa en polímeros más o menos complejos formados por unidades de flavan-3-oles o 3-flavanoles. Los flavan-3-oles, comúnmente llamados catequinas poseen dos ciclos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado saturado (núcleo fenil-2 cromano). Esta estructura presenta dos carbonos asimétricos (C2 y C3) que originan cuatro isómeros (Figura 2.1.3). La (+)-catequina y la (-)-epicatequina corresponden a las formas más abundantes, así como los derivados de la epicatequina en forma de éster gálico.



**Figura 2.1.3.** Estructura de los flavan-3-oles, unidades básicas de las procianidinas.

Los oligómeros y polímeros de estos flavan-3-oles se conocen también con el término de proantocianidinas (o proantocianidoles), porque en presencia de ácidos minerales liberan antocianidinas por ruptura de las uniones intermonoméricas. Dentro de las proantocianidinas, reciben el nombre de procianidinas aquéllas que derivan de la catequina y la epicatequina, que en hidrólisis ácida generan la molécula de cianidina; y el nombre de prodelfinidinas a aquéllas derivadas de la galocatequina y la epigalocatequina, que se hidrolizan en delfinidina en medio ácido.

Las procianidinas oligoméricas corresponden a polímeros formados por un número amplio de unidades flavanoles (de tres a una decena). Las formas poliméricas (Figura 2.1.4) representan la mayor parte de los 3-flavonoles. En los hollejos de algunas variedades se han encontrado fracciones con grado de polimerización superiores a 80 unidades (Souquet et al., 1996b).

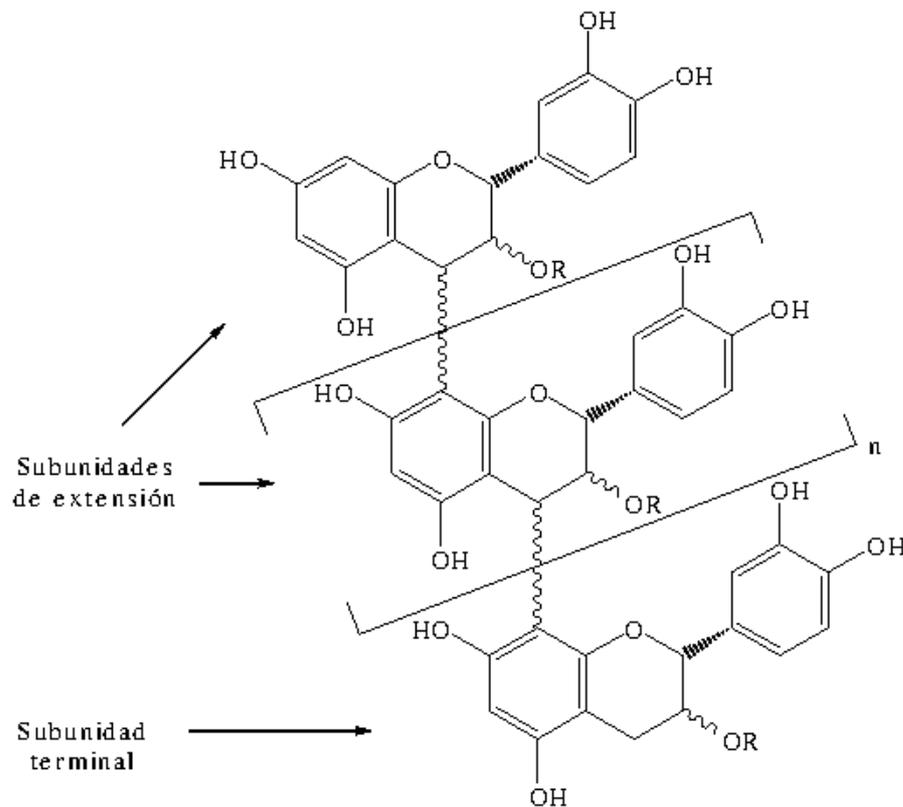
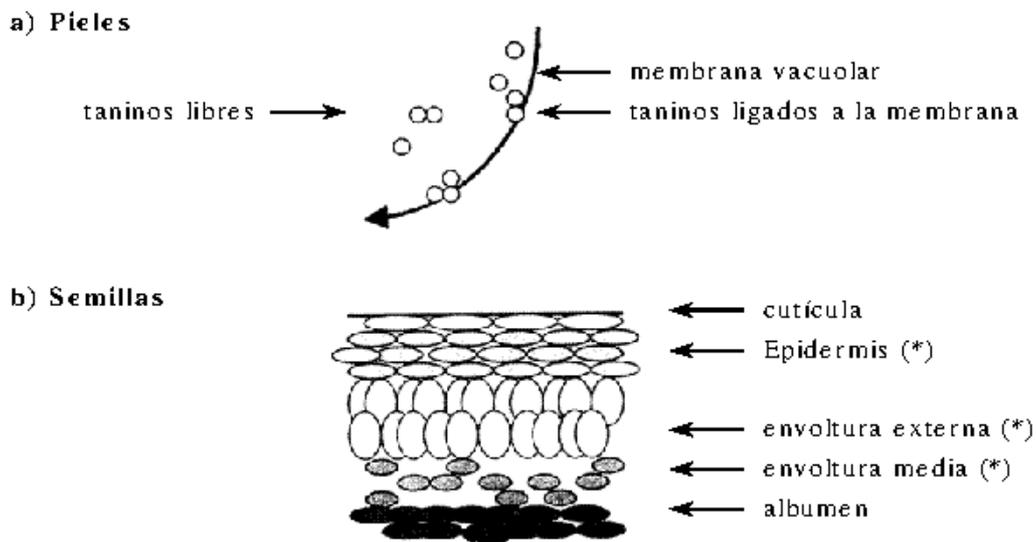


Figura 2.1.4. Estructura general de los taninos.

Los valores de concentración de las procianidinas se sitúan generalmente en valores alrededor de 200-700 mg/kg de uva. Existe una amplia variabilidad en las concentraciones de catequinas y proantocianidinas en raspones, pieles y semillas, en relación con la variedad de uva. Así, las uvas Pinot Noir presentan valores globales muy altos de catequinas y proantocianidinas (Kovac et al., 1990). La variedad Cabernet Sauvignon también ha sido descrita como una variedad con contenidos elevados de catequina y proantocianidinas (Auw et al., 1996). A diferencia de lo que sucede con los antocianos, las variedades blancas

no son menos ricas en taninos que las variedades tintas (Souquet et al., 1996a).

Los 3-flavanoles (flavan-3-oles), tanto monómeros como en formas más o menos polimerizadas, se localizan principalmente en las semillas, aunque se han localizado también trazas de monómeros y dímeros en la pulpa (Bourzteix et al., 1986; Ricardo da Silva et al., 1992). Otra fuente importante de taninos es el hollejo de las uvas, donde se han identificado tres tipos de taninos (Figura 2.1.5): taninos presentes bajo forma libre en el jugo vacuolar (localizados en forma condensada en las células próximas a la epidermis y como granulaciones difusas en las células internas del mesocarpo), taninos unidos fuertemente a la membrana proteofosfolipídica (tonoplasto) y taninos ligados a los polisacáridos de la pared celular (Amrani Joutei et al., 1994).



(\*) presencia de taninos (reacción al  $\text{FeCl}_3$ )

**Figura 2.1.5.** Localización de taninos en la baya (Saint-Cricq et al., 1999).

Thorngate y Singleton (1994) sugieren que la extracción en la vinificación de los taninos de la semilla puede ser debida a que éstos se encuentran localizados en las capas superficiales de la misma. Estos compuestos ocupan una posición de defensa del embrión en las

envolturas externas e internas y su difusión al medio exterior depende de la solubilización de la cutícula.

Los taninos de los hollejos difieren de los de las semillas por la presencia de prodelphinidinas, mayor grado de polimerización (Di Stefano, 1995) y menor porcentaje de subunidades galoiladas.

### **2.1.3. EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y ESTABILIDAD DEL COLOR DEL VINO.**

El color del vino tinto y su posterior estabilidad se deben principalmente a la presencia de antocianos y taninos. Estos compuestos se extraen de la uva durante el proceso de elaboración del vino y se irán modificando a lo largo del tiempo. Todas las modificaciones que se dan en el color del vino, y en otras características asociadas a los compuestos fenólicos, dependen de numerosos factores. La estabilidad del color será función, entre otros, del grado de extracción de antocianos y taninos, de las condiciones del medio y de las posteriores modificaciones de estas moléculas durante el envejecimiento.

El vino tinto es un vino de maceración, dándose una extracción fraccionada de la uva (Peynaud, 1984). Los compuestos fenólicos se encuentran localizados en diferentes partes de la uva y presentan distinta solubilidad y capacidad de difusión, en función de la fase acuosa o alcohólica presente en el medio, así como de la mayor o menor disgregación de las paredes celulares del hollejo.

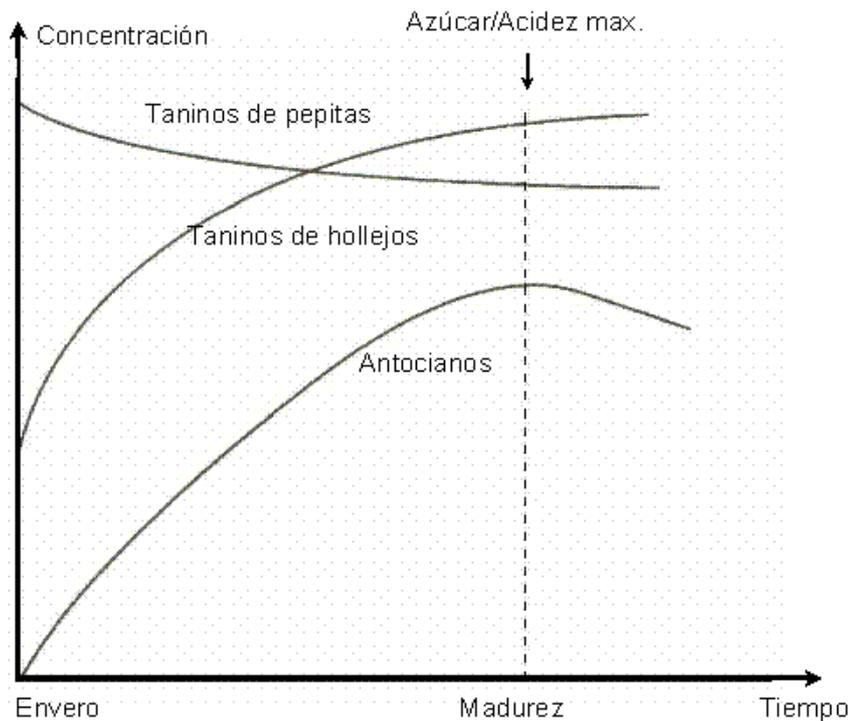
En función de las condiciones del medio como pH, presencia de anhídrido sulfuroso o de cofactores, y de las condiciones de vinificación como tiempo de maceración, remontados y temperatura, el color del vino y su estabilidad cambiarán.

Las modificaciones que se dan durante el envejecimiento como la evolución del color hacia tonos más teja y la pérdida de astringencia, se deben a transformaciones de degradación y estabilización de los

compuestos fenólicos. Las reacciones de estabilización tienen su origen, la mayoría de las veces, en la formación de combinaciones entre antocianos y taninos. Así, el color de los vinos tintos es debido a la presencia, además de los antocianos libres, de combinaciones polifenol-antocianos, más concretamente de tipo tanino-antocianos y de taninos condensados y de fenómenos de copigmentación.

**2.1.3.1. Potencial fenólico de la uva.**

La calidad de un vino está condicionada por la calidad de la uva. Ésta marca un potencial, y a partir de él, lo único que se puede hacer es trasladarlo al vino. La calidad en la uva viene marcada por factores intrínsecos, como son la variedad y el suelo, y por otros culturales que van a condicionar su producción, composición, estado sanitario e integridad (García-Escudero y Zaballa, 1997; Sella *et al*, 1998; Yáñez *et al.*, 1998; Mateus *et al.*, 2002).



**Figura 2.1.6.** Evolución del contenido en antocianos y taninos durante la maduración (Glories, 1999).

El estado de madurez de la uva va a condicionar el vino que se obtendrá y sus características. La concentración de polifenoles tiende a aumentar durante toda la maduración, aunque no linealmente (Figura 2.1.6.). Los antocianos aparecen durante el envero y se acumulan durante la maduración (Glories, 1999), produciéndose al final un descenso en su concentración que suele coincidir con la sobremaduración de la uva. La cantidad de taninos en el hollejo también va a aumentar durante el periodo de madurez, alcanzando un máximo para después mantenerse más o menos constante. En cambio, la concentración de taninos de las semillas desciende desde el envero, al mismo tiempo que aumenta su grado de polimerización (Fernández-López et al., 1992; Sella et al., 1998; Mazza et al., 1999).

Así mismo, se ha constatado que la extracción de los compuestos fenólicos no depende únicamente de la cantidad en la que éstos se encuentren en la uva. Las paredes celulares van a formar una barrera a la difusión de antocianos, taninos y otros polifenoles de la uva al vino (Lecas y Brillouet, 1994; Kennedy et al., 2001). El proceso de maduración implica una solubilización de los polisacáridos de la pared celular del hollejo. La degradación de la pared celular durante la maduración facilitará, de esta manera, la extracción de la materia colorante durante la vinificación (Amrani Joutei y Glories, 1994).

Los análisis clásicos de maduración (peso de 100 granos, grado Baumé, acidez total, pH, ácido tartárico y ácido málico) proporcionan información de la madurez de la pulpa, pero no sobre la de la piel ni de la pepita (Fernández et al., 2003). Para cubrir este vacío surge el concepto de madurez fenólica (Glories y Augustin, 1993; Amrani Joutei y Glories, 1994; Izcara y González-San José, 2001), que va a tener en cuenta el contenido total de compuestos polifenólicos (Lamadon, 1995) y su facilidad de extracción del hollejo y de la pepita de la uva (Saint-Cricq et al., 1998).

Teniendo en cuenta tanto el contenido como la capacidad de difusión de los compuestos fenólicos, se podría adaptar la estrategia de vinificación, en función de los vinos que se pretendan elaborar (Glories, 1999 y 2001). Además, el estudio del potencial fenólico podría permitir anticipar problemas potenciales en la estabilidad y pardeamiento del vino (Mayen et al., 1995).

### **2.1.3.2. Maceración.**

Es en el periodo de maceración de los hollejos con el mosto-vino cuando los compuestos fenólicos de la uva van a difundir al vino. Sólo una parte del total de los fenoles de la uva serán extraídos de las diversas fuentes como las pieles, las semillas y la pulpa (Singleton y Draper, 1964; Kantz y Singleton, 1991; Boulton, 1995; Klenar et al., 2004).

La extracción de los compuestos fenólicos durante la maceración sigue una curva exponencial simple. Los antocianos difunden siguiendo modelo exponencial en dos fases, con un incremento y un posterior descenso (Boulton, 1995). La velocidad de extracción es proporcional al gradiente de concentración entre los sólidos y el mosto-vino, aunque el proceso total es más complejo.

Los antocianos monómeros, cuya disolución no necesita la presencia de etanol, son extraídos en primer lugar, alcanzando un máximo en los primeros días de la fermentación para después decrecer (Bautista-Ortín, 2005). Esta disminución puede ser debida a una degradación de las moléculas, a una adsorción en las paredes de las levaduras (Morata et al., 2003) y partes sólidas de la uva (Bourzteix, 1970) y a una inclusión en cristales de bitartrato potásico. Así mismo, los antocianos pueden polimerizarse con la procianidinas de la uva y/o reaccionar con otros compuestos del vino como el ácido pirúvico, el acetaldehído, etc. Estas polimerizaciones y reacciones van a ser importantes para la estabilidad del vino, puesto que protegerá a los antocianos de degradaciones (Sims y Bates, 1994; Cheynier, 2003; Fulcrand et al., 2006).

La disolución de los taninos de los hollejos empieza conjuntamente a la de antocianos, aunque se desarrolla más lentamente y se va a ver favorecida en el momento de la aparición del etanol (Klenar et al., 2004). Por otro lado, es necesario un tiempo de maceración mayor para la extracción de los taninos de las semillas, debido a la necesidad de una eliminación previa de los lípidos presentes en éstas (Glories y Saucier, 2000). Durante la maceración se observa un aumento en la concentración de taninos hasta un máximo, manteniéndose constante después. Al pH del vino hay una formación y ruptura de enlaces entre flavanoles continua (Cheynier et al., 2000).

Teniendo en cuenta esta variabilidad, se podrá cambiar el tiempo de maceración en función del tipo de vino que se desee obtener. Se emplearán maceraciones cortas para la obtención de vinos jóvenes, con color suficiente y poco tánicos (Gil-Muñoz et al., 1999; Gómez-Plaza et al., 2000a y 2001; Zamora, 2003). El tiempo de maceración se alargará, en la elaboración de vinos con envejecimiento, para obtener la estructura necesaria y poder garantizar la estabilidad del color (Auw et al., 1996). Estos vinos suelen pasar un tiempo de afinamiento en botella, por lo que con el aumento del tiempo de maceración la astringencia no tiene por qué volverse excesiva e incluso puede disminuir después de este periodo (Scudamore-Smith et al., 1990; Sims y Bates, 1994).

### **2.1.3.3. Condiciones del medio.**

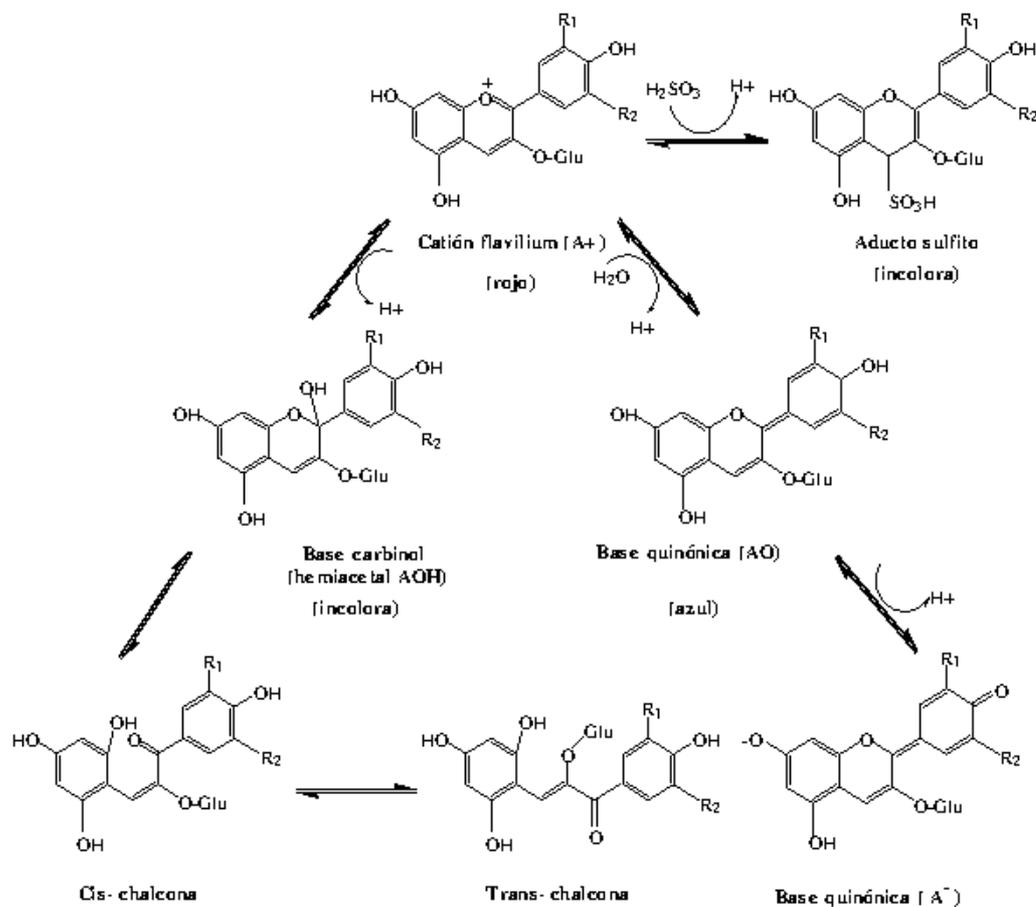
#### **2.1.3.3.1. pH.**

El color de los antocianos en disolución es dependiente del medio en el que se encuentren. Estos equilibrios están regulados por el pH de la solución (Figura 2.1.7). Cuando el pH del medio es bajo, la molécula se encuentra en forma de catión flavilium de color rojo vivo. A medida que el pH se eleva, los antocianos se transforman en una base quinónica (AO) de color azulado, variando el color desde el malva al azul, e incluso amarillo, a valores de pH superiores a 7. Todas estas reacciones son reversibles (Ribéreau Gayon et al., 1998a).

## Introducción

En medio acuoso, y al pH del vino (3-4), los cationes flavilium están también en equilibrio, a través de fenómenos de transferencia de protones y de reacciones de hidratación, con compuestos de adición incoloros (hemiacetal). El hemiacetal, en equilibrio con su isómero abierto (cis-chalcona), es en realidad la forma más abundante de la malvidina-3-glucósido en un medio acuoso a pH entre 2 y 7. Finalmente, cuando las chalconas sufren oxidación, pasan de manera irreversible hacia ácidos fenólicos incoloros, produciéndose una destrucción del color.

En vinos con un pH elevado el color tenderá a ser menos vivo, más apagado, mientras que a pH más ácidos las tonalidades lo harán hacia otras más rojizas.



**Figura 2.1.7.** Cambios en la estructura de los antocianos en un medio acuoso y en función del pH.

#### **2.1.3.3.2. Presencia de anhídrido sulfuroso.**

La habilidad del  $\text{SO}_2$  para extraer antocianos, debido a que ayuda a la degradación de las estructuras de la piel, es conocida desde hace tiempo, y muchos métodos de obtención de antocianos de los orujos utilizan grandes cantidades de éste (Mazza, 1995). Este efecto es más importante en vinos procedentes de vendimias putrefactas, puesto que, además de permitir una mayor solubilización de los compuestos fenólicos, el anhídrido sulfuroso evitará su oxidación debida al enzima lacasa presente en este tipo de vendimias (Ribéreau-Gayon et al., 1998b) .

La presencia de anhídrido sulfuroso en los vinos tintos produce también una decoloración de los antocianos. Al pH del vino, la mayor parte del anhídrido sulfuroso libre se encuentra bajo la forma de anión  $\text{HSO}_3^-$ , que se combina con los antocianos bajo la forma de catión flavilium, produciéndose un complejo incoloro. Transcurrido un cierto tiempo se produce una descombinación de este compuesto, por lo que la pérdida de intensidad de color será temporal.

#### **2.1.3.3.3. Fenómeno de copigmentación.**

La copigmentación es un fenómeno debido a asociaciones moleculares entre pigmentos y otras moléculas orgánicas (normalmente no coloreadas) en solución (Boulton, 2001). En general, esto resulta en un aumento de la absorbancia (efecto hiperacrómico) y, en ciertos casos, en un cambio en la longitud de onda del máximo de absorbancia del pigmento (efecto batocrómico).

Los antocianos pueden unirse de forma no covalente con otros compuestos fenólicos presentes en el medio, los cuales pueden ser otra molécula de antociano (autoasociación o copigmentación intramolecular), u otra molécula diferente (Asen et al., 1972; Haslam, 1980; Chen y Hrazdina, 1981; Liao et al., 1992; Mailen-Aubert et al., 2001; Gómez-Mínguez et al., 2006; Gris et al., 2007) como los ácidos cinámicos, flavanoles y flavonoles y sus glicósidos (copigmentación intermolecular).

Estos compuestos reciben el nombre de cofactores o copigmentos. El resultado que se produce es, como ya se ha comentado, un aumento de la cantidad de color, así como un cambio de tonalidad hacia el color púrpura y azul (Vivar-Quintana et al., 2002).

El incremento en la intensidad y estabilidad del color, resultante de la copigmentación, es debido a un cambio en el equilibrio de la hidratación hacia formas flavilium, que luego son atrapadas por los cofactores, o hacia bases quinónicas en los complejos antociano-copigmento (Figura 2.1.8). Entre los antocianos y los cofactores se forma una estructura en capas, en número variable de dos a diez. Esto es importante en el rango del pH del vino donde predominan las formas hidratadas de los antocianos, pues la inclusión de los cationes flavilium en los complejos de copigmentación desplaza el equilibrio hacia la formación de más cationes flavilium.

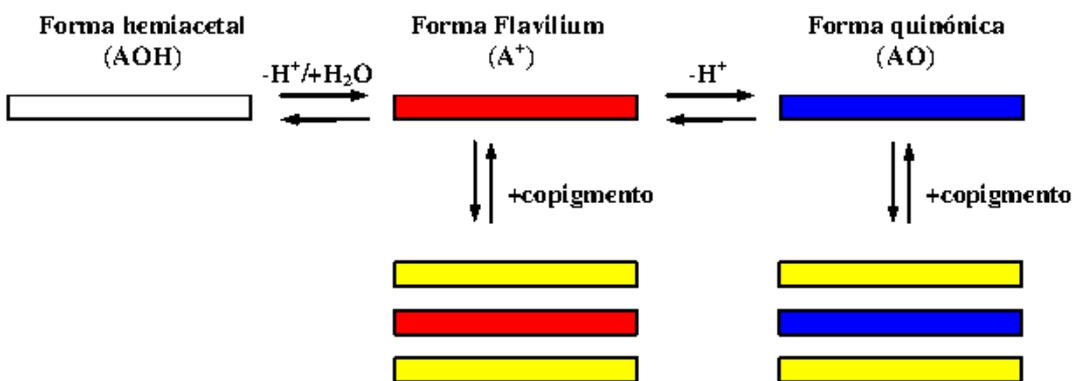


Figura 2.1.8. Principio del proceso de copigmentación.

La copigmentación suele ser un efecto marcado en vinos jóvenes (Hermosín-Gutiérrez et al., 2005; Darías-Martín et al., 2007). Además, influye sobre las reacciones de oxidación, condensación y polimerización de sustancias fenólicas, ya que disminuye la cinética de las reacciones que se producen durante el envejecimiento de los vinos (Boulton, 2001). La cinética de las reacciones de oxidación depende de la concentración de sustancias fenólicas en forma libre, no de su concentración en valor

absoluto. Determinados flavonoides son fuertes copigmentos y rápidamente participan en reacciones de copigmentación, lo que hace que la concentración en forma libre de tales compuestos disminuya y, de este modo, no estén disponibles para reacciones de oxidación y polimerización (Darias-Martín et al., 2001).

#### **2.1.3.4. Evolución del color en el tiempo.**

Durante el proceso de envejecimiento del vino, la concentración de antocianos libres va disminuyendo hasta incluso desaparecer, sin que el color rojo del vino se pierda en la misma proporción. Esta disminución se debe a reacciones de degradación y estabilización. Las reacciones de estabilización tienen, la mayoría de las veces, su origen en la formación de combinaciones entre antocianos y taninos.

Los antocianos libres son inestables y deben estar combinados con taninos u otros compuestos del vino para formar pigmentos estables, que realmente son los responsables del color de los vinos con el tiempo.

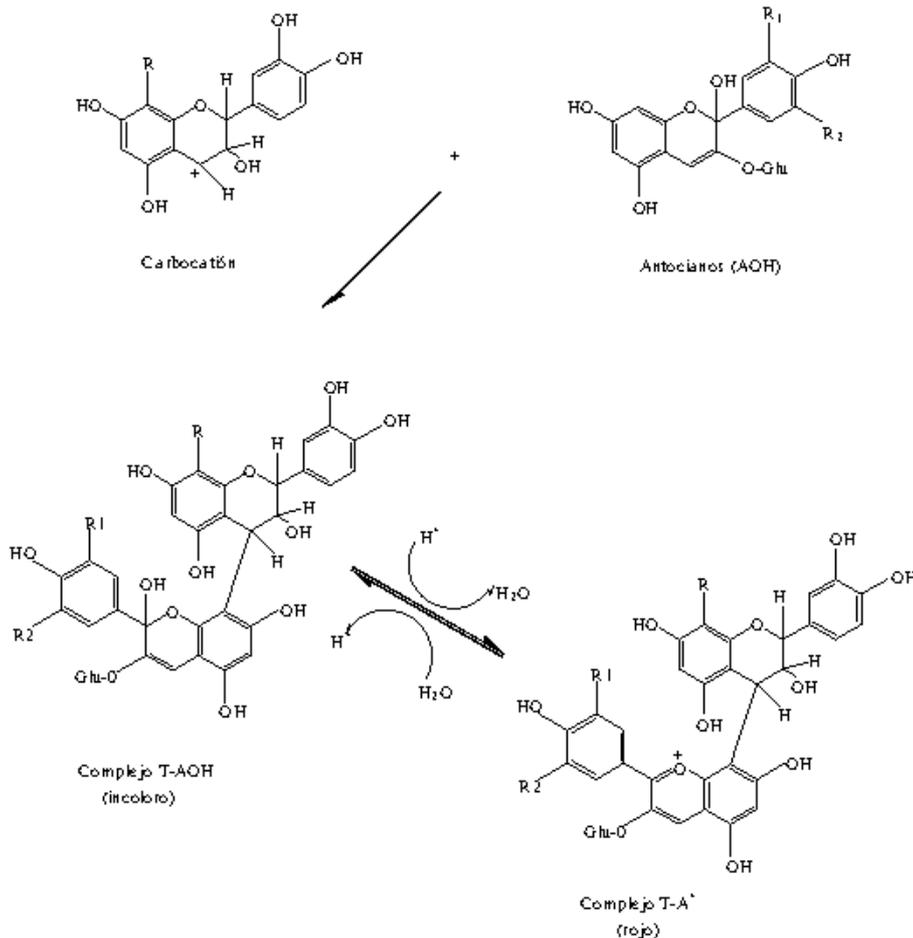
##### **2.1.3.4.1. Reacciones de condensación.**

Estas reacciones están basadas en procesos de adición donde los antocianos y los taninos pueden actuar tanto como agentes electrofílicos, moléculas que presentan una deficiencia de electrones y tienden a unirse con moléculas con exceso de electrones, como nucleofílicos (Zimman y Waterhouse, 2004). Así, las siguientes condensaciones antocianos-taninos se han descrito (Fulcrand et al., 2006):

###### **A. Condensación taninos-antocianos (T-A).**

Las procianidinas, en un medio ácido como el vino, pueden hidrolizarse formando un carbocatión que reacciona con los antocianos (Haslam, 1980) bajo la forma hemiacetálica (AOH), produciendo un complejo incoloro que se colorea seguidamente de rojo anaranjado después de su deshidratación (Figura 2.1.9). Esta condensación se ve favorecida por la ausencia de oxígeno y la temperatura, lo que explica la

evolución de los vinos almacenados en ambientes reductores como depósitos o botellas. Este tipo de reacción depende de la concentración de antocianos en el medio y el color varía con la naturaleza del carbocatión y el grado de polimerización.



**Figura 2.1.9.** Condensación directa de taninos y antocianos de tipo T-A.

### B. Condensación antocianos-taninos (A-T).

Los antocianos bajo su forma catiónica (A<sup>+</sup>) reaccionan con las posiciones negativas C6 ó C8 de los taninos, formando un flaveno incoloro (A-T), el cual, posteriormente, se puede colorear de rojo (A<sup>+</sup>-T) en presencia de oxígeno (Santos-Buelga et al., 1995), estableciéndose un estado de equilibrio entre ambas formas.

Los compuestos de condensación entre antocianos y taninos (T-A<sup>+</sup> y A<sup>+</sup>-T) son de color similar a los antocianos (García-Puente Rivas et al., 2006). Pero los compuestos A<sup>+</sup>-T son resistentes a la decoloración por SO<sub>2</sub>, mientras que los aductos T-A<sup>+</sup> teóricamente serían susceptibles a la decoloración por SO<sub>2</sub> y a la hidratación.

#### C. Polimerización por puentes de etilo.

Los antocianos y los taninos también pueden unirse por medio de una reacción en la que interviene el acetaldehído. Esto da lugar a productos enlazados por puente de etilo, incluyendo taninos (T-etil-T), aductos de taninos-antocianos (T-etil-A) y antocianos entre sí (A-etil-A) (Cheynier, 2003). El tamaño molecular de estos productos es variable. El acetaldehído puede proceder de la oxidación del etanol, aunque también puede tener su origen en las levaduras, las bacterias acéticas y la autooxidación de compuestos fenólicos (Liu y Pilone, 2000).

Los pigmentos del tipo T-etil-A y A-etil-A son de color púrpura y mucho más resistentes a la decoloración por hidratación y SO<sub>2</sub> que los antocianos libres. Atanasova et al. (2002a) han demostrado que la forma más significativa de polimerización entre antocianos en el vino es A<sup>+</sup>-etil-AOH. Esto significa que la conversión de los pigmentos de la uva (70-80% AOH, 20-25% A<sup>+</sup>) a derivados con puentes de etilos (50% AOH, 50% A<sup>+</sup>) no sólo produce un leve cambio de rojo a púrpura (Romero y Bakker, 2000), sino que también aumenta la intensidad de color.

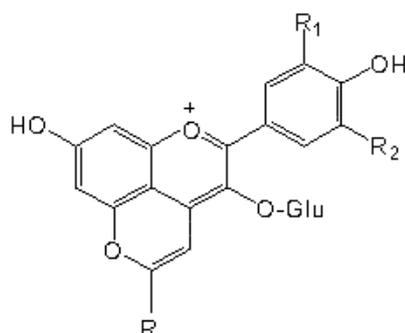
#### **2.1.3.4.2. Formación de nuevos pigmentos derivados de los antocianos.**

En el vino se han identificado pigmentos nuevos derivados de los antocianos y conocidos con el nombre de piranoantocianos (Fulcrand et al., 1996; Fulcrand et al., 1997).

Estos pigmentos se originan por reacción de los antocianos con compuestos de bajo peso molecular, principalmente metabolitos

producidos por las levaduras, como acetaldehído, ácido pirúvico o vinilfenoles, por medio de una reacción de cicloadición (Figura 2.1.10). También pueden incluir especies de más alto peso molecular, en las cuales la unidad de piranoantociano está unida a moléculas de tanino (Francia-Aricha et al., 1997).

Los pigmentos formados absorben a longitudes de onda más bajas que los antocianos, por lo que podrían influir en el cambio de color de rojo malva a rojo anaranjado que sufren los vinos durante el envejecimiento (Alcalde-Eon et al., 2006). Son muy estables y resistentes a las variaciones del pH y sulfuroso.



Piranoantociano  
(R=H, tanino,...)

**Figura 2.1.10.** Estructura de nuevos pigmentos (piranoantociano).

### **2.1.3.4.3. Influencia de las características del vino en la evolución del color.**

Las reacciones que se han descrito tienen lugar en el vino a lo largo de la elaboración y envejecimiento, y condicionan la evolución del color, la astringencia y las características sensoriales. La capacidad de un vino para envejecer depende de numerosos factores ligados a su composición, riqueza polifenólica, proporción entre antocianos y taninos, concentración de polisacáridos y factores que favorecen la formación de piranoantocianos.

*2.1.3.4.3.1. Concentración de antocianos y taninos.*

La concentración de estos compuestos en el vino depende de la variedad y madurez de la uva, pero también está influenciada por las condiciones de maceración y las prácticas de elaboración utilizadas.

Cuando la concentración de antocianos sea muy superior a la de taninos, todas las reacciones anteriormente descritas pueden tener lugar (Ribéreau Gayon et al., 1998a). La polimerización de taninos entre sí no se verá favorecida, debido a la baja concentración de estos compuestos. También se puede producir la combinación entre antocianos y taninos pero sin que todos los antocianos lleguen a combinarse. Por lo tanto, muchos se oxidarán, evolucionando irreversiblemente hacia fenoles incoloros, produciéndose una importante destrucción del color.

La situación ideal de equilibrio se dará cuando se obtenga una concentración balanceada de antocianos y taninos, donde todas las reacciones sean igualmente probables. En este caso, una buena elaboración y una correcta crianza favorecerán las reacciones de combinación y, por tanto, la estabilización del color y una disminución de la astringencia.

Por último, cuando la concentración de antocianos sea inferior a la de taninos, también podrán tener lugar todas las reacciones, pero habrá una que predomine sobre las demás. Todos los antocianos disponibles podrán ser polimerizados, pero los taninos que se encuentran en exceso podrían evolucionar hacia una condensación entre ellos. Entonces, en el vino predominarán tonalidades amarillas y sabor astringente.

*2.1.3.4.3.2. pH del vino.*

A pH bajo se favorece la ruptura de los taninos poliméricos catalizada por ácidos. Este es el paso clave en la formación de polímeros T-A<sup>+</sup> y tanino-piranoantociano.

La protonación del acetaldehído, factor clave en la formación de derivados por puente de etilo, también se ve favorecida por la elevada acidez.

Finalmente, la hidratación de los antocianos depende del pH. Valores elevados de pH incrementan el potencial competitivo de los antocianos frente a los taninos en reacciones de adición nucleofílicas. Sin embargo, en los rangos de pH del vino, la formación de especies T-A<sup>+</sup> y T-etil-A nunca está limitada por la disponibilidad de la forma hidratada (Cheynier, 2003).

### *2.1.3.4.3.3. Presencia de oxígeno*

En los vinos, la oxidación enzimática prevalece en las etapas tempranas de la elaboración, mientras que las oxidaciones químicas comienzan a predominar al final del proceso. Las oxidaciones químicas se deben a compuestos fenólicos y a otros componentes importantes del vino, como el etanol y el ácido tartárico.

El oxígeno soluble, tanto en el mosto como en el vino, juega un papel importante en diversos procesos bioquímicos, tanto durante la fermentación alcohólica como en las reacciones de oxidación y/o polimerización de compuestos polifenólicos que se producen durante el envejecimiento del vino. El acetaldehído procede fundamentalmente de la oxidación del etanol y, aunque también puede proceder del metabolismo de las levaduras, éste puede ser considerado como un marcador de oxidación al igual que los pigmentos que forma. Por otra parte, todos los pasos de cicloadición requieren una etapa de oxidación para recuperar el catión flavilium en las estructuras finales y también es necesario en reacciones directas de especies A<sup>+</sup>-T (Fulcrand et al., 2004).

Por ello, es necesario un cierto aporte de oxígeno, mediante remontados, al inicio de la fermentación alcohólica, asegurando una fermentación regular y completa ya que las levaduras consumen totalmente el oxígeno; tras la fermentación alcohólica y fermentación

maloláctica se realizan varios trasiegos, cuyo objetivo es eliminar y/o evitar la formación de compuestos sulfhídricos y retirar las lías gruesas. Finalmente durante el envejecimiento del vino, si éste se produce en barrica de roble, por un lado se produce la cesión de compuestos fenólicos y aromas propios de la madera al vino, además de una microoxigenación natural (aporte de pequeñas cantidades de oxígeno), al difundirse oxígeno a través del esquivo de la barrica, entre las uniones de las duelas y los poros de la madera. Este oxígeno influye notablemente en la composición fenólica del vino, generando nuevos pigmentos que incrementan y estabilizan el color del vino (Atanasova et al., 2002b; Wang et al., 2003).

Pero el aporte de oxígeno debe ser tomado con precaución. Demasiado puede llevar a la formación de moléculas muy grandes, con alto peso molecular, que sean incapaces de permanecer en disolución, provocando la precipitación de material polimérico y dejando los vinos con una reducida intensidad de color. Además, si hay un exceso de oxígeno, se puede dar la oxidación de un gran número de sustancias. Muchas de estas reacciones oxidativas son irreversibles y disminuyen el desarrollo y persistencia de los compuestos fenólicos en el vino (Cano-López et al., 2006).

#### *2.1.3.4.3.4. Levaduras.*

Las cepas de levaduras pueden influir en la proporción relativa de los piranoantocianos, derivados etilados y de los productos de condensación en el vino. La cantidad de acetaldehído y de ácido pirúvico liberado por metabolismo de estos microorganismos durante el proceso de fermentación depende de la cepa de levadura utilizada (Morata et al., 2004).

Las levaduras también pueden contribuir a la estabilidad del color porque van a liberar polisacáridos, que contribuyen a la estabilización de los polímeros formados, debido a su papel de coloide protector (Dupin et al., 2002; Charpentier et al., 2004).

Así mismo, diferentes cepas de levadura van a presentar distinta capacidad para retener o adsorber compuestos fenólicos sobre su pared celular, lo cual va afectar al color del vino (Vasserot et al., 1997; Morata et al., 2003).

### **2.2. LA PARED CELULAR Y LOS ENZIMAS.**

Las paredes celulares de las células de los hollejos forman una barrera frente a la difusión de los constituyentes deseados de la piel, que son los antocianos, taninos y otros polifenoles (Lecas y Brillouet, 1994; Pellerin y Cabanis, 2000; Vidal et al., 2001). El estudio de la estructura y degradación de la pared celular de la piel de la uva podría constituir un elemento fundamental para el control de las extracciones y maceraciones en vinificación. Además, el reblandecimiento de la baya se acompaña de la aparición de actividades enzimáticas que son las responsables de la degradación de la pared celular, fenómeno que contribuye a facilitar la extracción de la materia colorante en la vinificación (Amrani Joutei y Glories, 1994).

El uso de enzimas pectolíticos exógenos, para mejorar la extracción de color durante la elaboración del vino, es una práctica común desde los años setenta, pero los resultados encontrados por diferentes autores son contradictorios y así, mientras algunas investigaciones muestran aumentos de color en vinificaciones donde se han usado estos enzimas (Felix y Villettaz, 1983; Servili et al., 1992; Zent e Inama, 1992; Bakker et al., 1999), otras no han encontrado ningún beneficio (Capdeboscq et al., 1994; Wightman y Wrolstrad, 1995; Wightman et al., 1997).

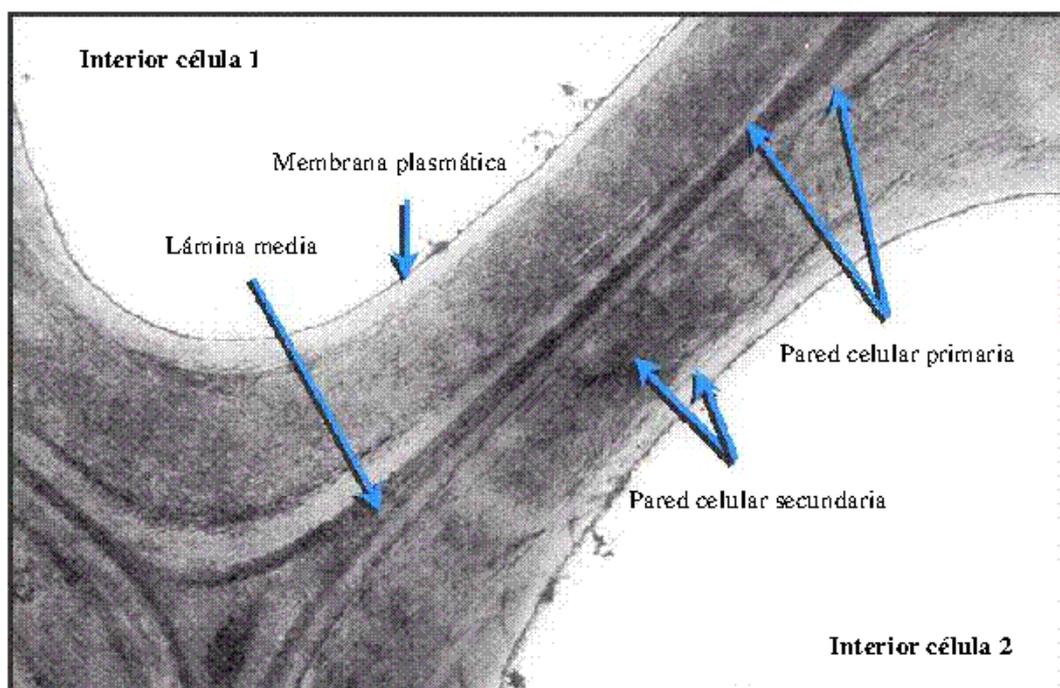
#### **2.2.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR.**

La pared celular es una estructura compuesta por polisacáridos, glicoproteínas y polifenoles, que confiere a las células soporte mecánico y que participa en el crecimiento, la morfología y la resistencia de los tejidos.

Las funciones de las paredes celulares son diversas, proporcionan fuerza mecánica, regulan la porosidad y controlan la adherencia entre las células (McCann et al., 2001; Jarvis et al., 2003) y podrían controlar la velocidad y extensión de la expansión celular. También actúan como reserva de carbohidratos. La función de la pared no es sólo mecánica, sino también biológica sirviendo de protección contra la invasión de patógenos (McNeil et al., 1984). En enología tiene una importancia adicional, ya que suponen la barrera de difusión de los compuestos responsables del color y el aroma de los vinos. Se han observado diferencias varietales que podrían deberse a una composición diferente de la pared celular (Chardonnet et al., 1994).

#### **2.2.1.1. Estructura.**

La pared celular es una estructura que está compuesta de tres partes fundamentales: la lámina media o sustancia intercelular, la pared primaria y la pared secundaria, aunque ésta no siempre aparece.



**Figura 2.2.1.** Micrografía electrónica de transmisión de la pared celular.

Durante la división celular se deposita la primera capa (capa más externa) originando la lámina media, que se comparte entre células adyacentes (Figura 2.2.1). Entre la lámina media y la membrana plasmática, se continúa depositando el material que va a constituir la pared celular. Esta acumulación de material va a dar lugar a la pared celular primaria, que caracteriza a tejidos jóvenes y en crecimiento (Albersheim et al., 1994). Al finalizar el crecimiento celular, aparece la pared celular secundaria, por lignificación de los tejidos.

Las paredes celulares primarias están compuestas principalmente por polisacáridos y proteínas (Varner y Lin, 1989). Los polisacáridos, formados principalmente por pectinas, celulosa y hemicelulosas, son el componente principal, pudiendo representar un 90% de la pared, mientras que las proteínas suponen alrededor del 10% (Zarra y Revilla, 1993), dependiendo del grupo taxonómico y del tipo de tejido esta proporción puede cambiar. Los compuestos fenólicos son otro de los componentes de paredes celulares primarias y también están presentes en las secundarias (Lau et al., 1985). En células especializadas se pueden encontrar otros compuestos como lignina, cutina, suberina, ceras o compuestos inorgánicos (Lau et al., 1985). Estas paredes evolucionan con el transcurso del tiempo para dar lugar a las paredes secundarias.

Las paredes secundarias se forman a partir de las paredes primarias por acumulación progresiva de celulosa, xilanos y, sobre todo, de lignina. El depósito transversal de lignina bloquea la extensión longitudinal de las paredes y, por tanto, del crecimiento de los tejidos. Debido a este depósito, las paredes se espesan adquiriendo una mayor resistencia mecánica.

Durante el proceso de maduración de los frutos, se produce una degradación de los polisacáridos de la lámina media y de la pared primaria (Waldron et al., 1997). La pared celular se debilita y hay un descenso en la adhesión entre las células (Ishimaru y Kobayashi, 2002).

Las modificaciones en las pectinas y otros polisacáridos no celulósicos pueden alterar las propiedades fisicoquímicas de la pared celular.

### **2.2.1.2. Composición.**

#### **2.2.1.2.1. Polisacáridos de la pared celular**

Los polisacáridos de la pared celular se pueden agrupar en dos categorías: celulosa y polisacáridos no celulósicos (pectinas y hemicelulosas). La celulosa se encuentra formando una estructura de microfibrillas, embebidas en una matriz conformada por polisacáridos hemicelulósicos; que a su vez está inmersa en una matriz de pectinas (Figura 2.2.2). También se puede encontrar una red secundaria formada por proteínas (Carpita y Gibeaut, 1993).

##### *2.2.1.2.1.1. Celulosa*

La celulosa es un polímero lineal de D-glucosa unida por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Las cadenas lineales de celulosa se agregan para formar fibrillas macromoleculares de 5-15  $\mu\text{m}$  de diámetro (McCann et al., 1990) con una disposición paralela (Figura 2.2.3), cuya estructura cristalina está soportada por numerosos puentes de hidrógeno intramoleculares.

Las microfibrillas celulósicas confieren la resistencia mecánica necesaria para el mantenimiento celular y la estructura del tejido. Las microfibrillas suelen estar cubiertas por xiloglucanos y glucoarabinanos unidos fuertemente (Carpita y Gibeaut, 1993). Esta disposición permite la existencia de espacios entre las microfibrillas que están ocupados por los polisacáridos de la matriz. La cantidad de celulosa que se encuentra en las paredes celulares de las plantas superiores puede variar (McNeil et al., 1984).

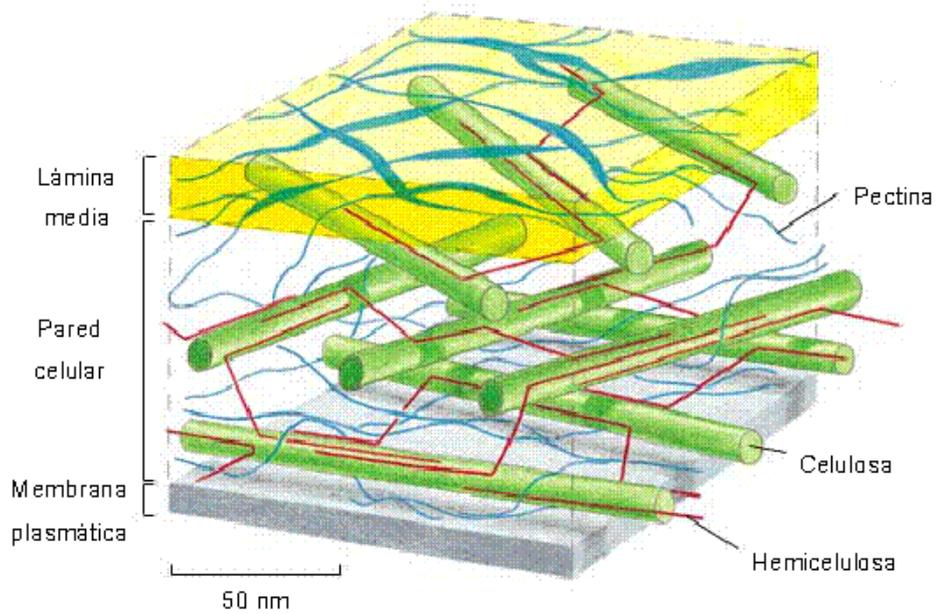


Figura 2.2.2. Estructura de los polisacáridos que conforman la pared celular.

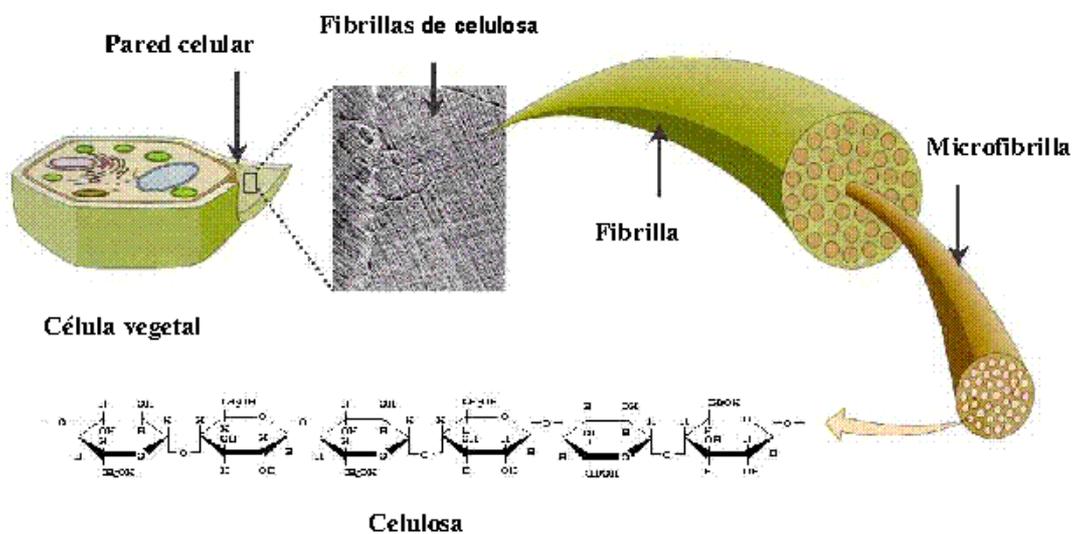


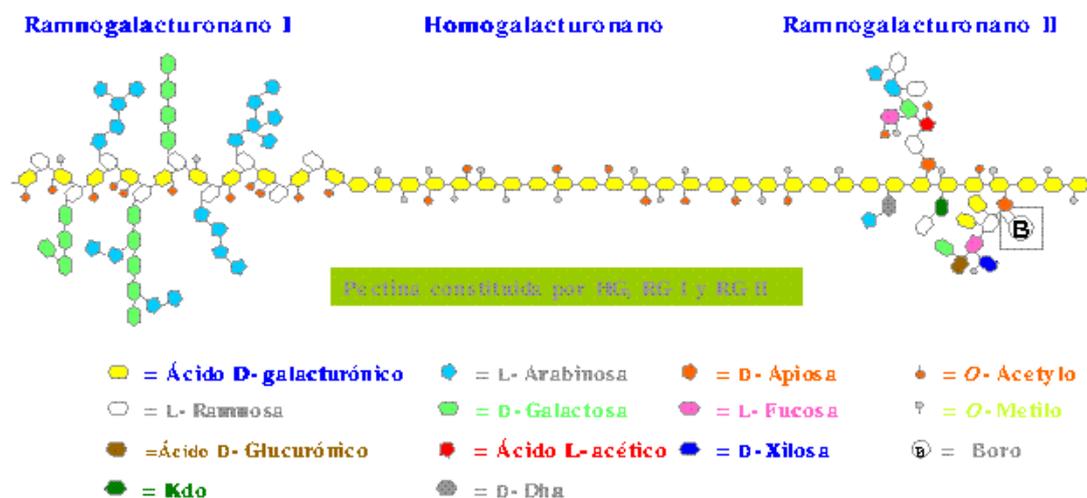
Figura 2.2.3. Localización y estructura de las microfibrillas de celulosa presentes en las paredes celulares.

### 2.2.1.2.1.2. Polisacáridos no celulósicos.

Los principales polisacáridos no celulósicos presentes en las paredes primarias de dicotiledóneas son las pectinas y las hemicelulosas (heteroxilanos, xiloglucanos y glucomananos) (Selvendran, 1985).

#### A. Pectinas.

Las pectinas son una mezcla compleja de polisacáridos compuestos principalmente de poligalacturonano (PG), el cual incluye homogalacturonano y ramnogalacturonano I (Stevenson et al., 1988a; Stevenson et al., 1988b) (Figura 2.2.4). Constituyen alrededor del 35% de las paredes celulares (Grant Reid, 2000) y se encuentran distribuidas de manera desigual (Albersheim et al., 1960; Roldan y Vian, 1981); son las principales macromoléculas (excepto en gramíneas) de la lámina media y junto con las proteínas (Bacic et al., 1988; Carpita y Gibeaut, 1993) actúan como sustancias cementantes (Jarvis, 1998).



**Figura 2.2.4.** Composición y estructura de los polisacáridos pécticos (Kdo: ácido 2-ceto-3-desoxi-D-*mano*-octulosónico; Dha: ácido 3-desoxi-D-heptulosárico).

El homogalacturonano está constituido por cadenas sin ramificar de residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) (GalAp), que pueden estar metilesterificados, formando lo que se conoce como zonas "lisas" de las pectinas.

El ramnogalacturonano I (*RG-I*) es un polímero con un esqueleto base de residuos alternados de D-galactosa unidos en  $\alpha$ -(1→4) y L-ramnosa unidos en  $\alpha$ -(1→2) (Lau et al., 1985). Numerosas cadenas laterales de residuos de azúcares neutros pueden estar unidas a través a la ramnosa en las posiciones C4 y/o C3, confiriendo un aspecto “erizado”. Las cadenas laterales normalmente están constituidas por arabinanos, galactanos y arabinogalactanos. Los arabinanos están constituidos por residuos de L-arabinofuranosido con uniones  $\alpha$ -(1→5), por ramificaciones de residuos  $\alpha$ -L-arabinofuranosido a través de las posiciones C2 o C3 o ambas. Los galactanos están constituidos por un esqueleto base de D-galactosa con uniones  $\beta$ -(1→4). Cuando este esqueleto de galactano está sustituido con cadenas laterales de  $\alpha$ -arabinofuranosido, el galactano es conocido como arabinogalactano I (AG-I). El arabinogalactano II (AG-II) es un polisacárido estructuralmente distinto caracterizado por residuos de D-galactosa con uniones  $\beta$ -(1→3) y (1→6) con sustituciones  $\alpha$ -L-arabinosa. Existe todavía controversia si el AG-II es un componente real de la pared celular primaria o si está asociado al espacio extracelular y la membrana plasmática (Carpita y Gibeaut, 1993).

El ramnogalacturonano II (*RG-II*) es otro tipo de polisacárido péptico encontrado en las paredes celulares primarias. El RG-II tiene un esqueleto base de ramnogalacturonano, pero contiene una compleja estructura de ramificaciones de monosacáridos del esqueleto base (Stevenson et al., 1988b). La proporción de RG-II en las paredes celulares de las plantas es relativamente baja, usualmente alrededor de 4% o menos (O'Neill et al., 1996). El ramnogalacturonano tipo II es uno de los mayores polisacáridos presentes en los vinos.

### B. Hemicelulosas.

Las hemicelulosas son macromoléculas en gran parte neutras, que forman asociaciones no covalentes con la celulosa. Las hemicelulosas pueden constituir alrededor del 30% en peso de las paredes celulares primarias. En las paredes celulares secundarias se pueden encontrar en

mayor proporción y en algunas paredes especializadas pueden suponer casi el 100%, como las de las células de almacenamiento de las semillas (Grant Reid, 2000).

El xiloglucano (XG) es el principal componente hemicelulósico en plantas dicotiledóneas (Pauly et al., 1999), y puede constituir alrededor de 20% de los polisacáridos no celulósicos de las paredes celulares primarias (Dey y Brinson, 1984), aunque este valor puede ser muy variable. El XG contiene un esqueleto base de D-glucosa con uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) que presenta sustituciones de residuos D-xilosa unidos en  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), a los cuales pueden estar unidos otros azúcares neutros tales como galactosa, arabinosa y fucosa (Figura 2.2.5) (Pauly et al., 1999). Los XGs están unidos fuertemente a las microfibrillas de celulosa a través de múltiples puentes de hidrógeno, conectando la cadena principal del XG a la superficie de las microfibrillas de celulosa. Estos entrecruzamientos de microfibrillas de celulosa confieren a la pared resistencia y también limitan la velocidad de elongación de la pared (Albersheim et al., 1994).

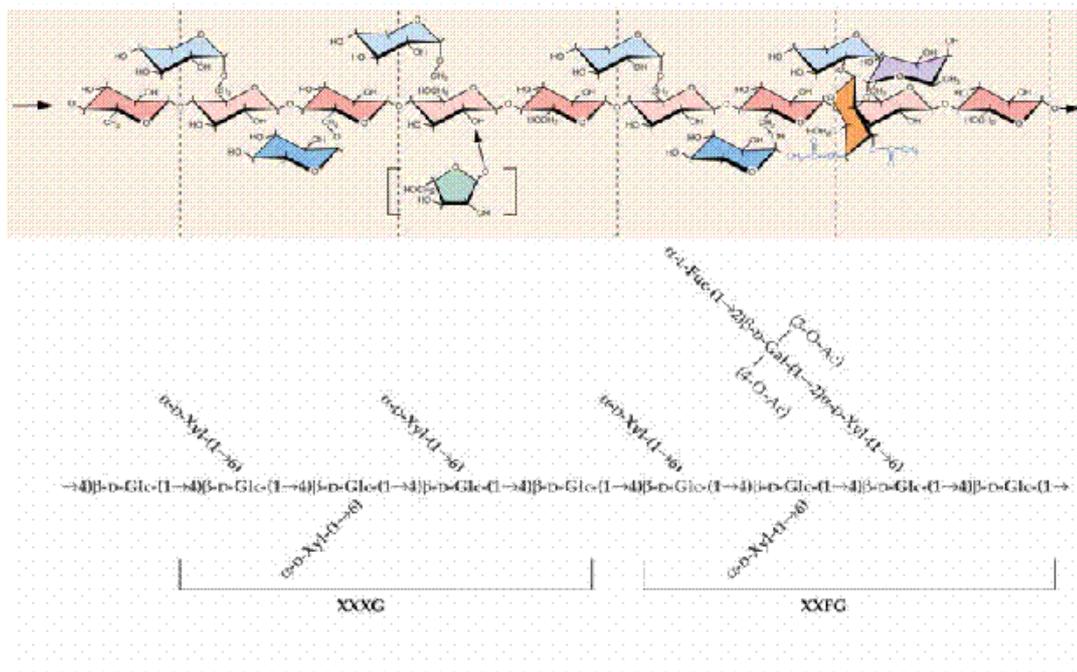


Figura 2.2.5. Estructura de xiloglucanos presentes en las paredes celulares.

Los heteroxilanos constituyen una pequeña proporción de las paredes de dicotiledóneas. Están compuestos de un esqueleto base de D-xilosa con uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), con sustituciones muy variadas o ramificaciones originadas a partir de residuos xilosil unidos en posición C2 o C3. Estas sustituciones y las cadenas laterales están constituidas por combinaciones de residuos de arabinosa, glucurosilo (o su derivado 4-O-metil), xilosa y galactosa (Bacic et al., 1988).

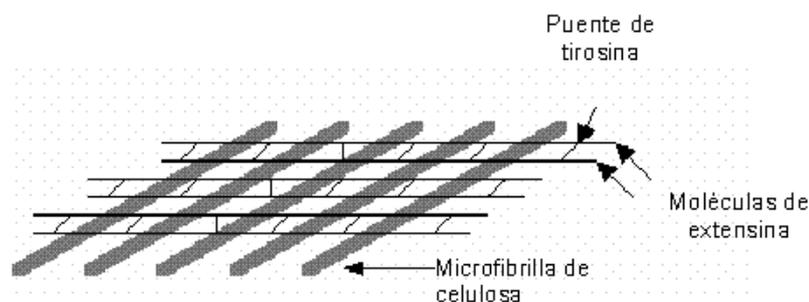
Los mananos están asociados generalmente con las paredes celulares secundarias, espesas y sin lignificar. Son el principal componente de las paredes celulares del endosperma de algunas semillas, pero están presentes en muy pequeñas cantidades en otros tejidos. Los mananos están constituidos por una cadena lineal de D-manosa con uniones en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) de grados de polimerización variables (Bacic et al., 1988). Los galactomananos tienen un esqueleto base  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-manosa que está sustituido generalmente en la posición C6 con residuos individuales de  $\alpha$ -galactosa y que se encuentran principalmente en paredes celulares del endosperma de las leguminosas. Los glucomananos y galactoglucomananos son polisacáridos constituidos por residuos de D-manosa y D-glucosa unidos en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) dispuestos al azar en una sola cadena. En los galactoglucomananos, los residuos de la cadena principal se sustituyen con residuos individuales de  $\alpha$ -D-galactosa en la posición C6. Estos polisacáridos son sólo componentes minoritarios de las paredes celulares de dicotiledóneas (Bacic et al., 1988).

### 2.2.1.2.2. Proteínas.

Las paredes celulares de las plantas pueden contener alrededor del 10% de proteína (Zarra y Revilla, 1993). Las cinco clases de proteínas más abundantes de las paredes celulares son las extensinas, las proteínas ricas en glicina (GRPs), proteínas ricas en prolina (PRPs), las lectinas de las solanáceas y arabinogalactanoproteínas (AGPs) (Cassab y Varner, 1988; Showalter, 1993). Proteínas menos abundantes, tales como las expansinas, también están presentes en las paredes o interactúan con

ellas. Se han encontrado, también, ciertos enzimas dentro de la pared celular como son peroxidasas, fosfatasas, invertasas, malato deshidrogenasas, proteasas y ácido ascórbico oxidasa (Showalter, 1993).

Las *extensinas* son particularmente abundantes en dicotiledóneas (Showalter, 1993). Estas proteínas interactúan con polisacáridos pécticos de la pared celular (Stuart y Varner, 1980; Keller, 1993). La función de las extensinas aún no se conoce muy bien. Se cree que forman una red fibrilar independiente de la red celulósica que puede reforzar considerablemente a la pared celular (Figura 2.2.6) (Carpita y Gibeaut, 1993). También parecen regular la expansión celular y ser importantes en la estructura final de la pared celular, contribuyendo así a la forma final de la célula (Fry, 1982; Carpita y Gibeaut, 1993).



**Figura 2.2.6.** Representación esquemática de la pared celular mostrando las uniones entre las moléculas de extensina y la red celulósica.

Las *proteínas ricas en glicina* se clasifican generalmente como proteínas estructurales de la pared (Keller et al., 1988; Keller et al., 1989; Condit et al., 1990), aunque existen otras localizadas en el citoplasma (Showalter, 1993). Se expresan en respuesta a diversas condiciones de estrés y del desarrollo (Cassab y Varner, 1988; Showalter, 1993).

### 2.2.1.2.3. Compuestos fenólicos

Los componentes fenólicos de la pared celular primaria son principalmente el ácido ferúlico y el ácido *p*-cumárico, los cuales se encuentran generalmente esterificados a la arabinosa y la galactosa de los polisacáridos pécticos. Al parecer tienen como función limitar la extensión de la pared celular y podrían desempeñar un papel importante en la resistencia a patógenos fúngicos (McNeil et al., 1984; Schnitzler et al., 1992).

Existen numerosos compuestos fenólicos simples en las paredes celulares, de los cuales su función es casi desconocida (Parr et al., 1997). Además, tampoco se puede olvidar la presencia de taninos condensados, unidos a la pared celular (Amrani Joutei et al., 1994).

### 2.2.1.2.4. Lignina

La lignina es un polímero complejo de moléculas fenólicas. Es el segundo en abundancia después de la celulosa. Su presencia en las paredes celulares secundarias, debido a su carácter hidrofóbico, desplaza el agua, aumentando tanto la resistencia química como física y la rigidez de las paredes (Azcón-Bieto y Talón, 1993).

Las funciones de la lignina están asociadas con el soporte mecánico de los órganos de las plantas, la conducción de la savia a través de los elementos vasculares lignificados, y mecanismos de defensa (Boudet, 2000).

## 2.2.2. ACCIÓN DE LOS ENZIMAS EN DIFERENTES SUSTRATOS DE LA PARED CELULAR.

Los enzimas son proteínas naturales que poseen actividad catalítica en reacciones bioquímicas específicas. Incrementan la velocidad de la reacción que catalizan y son frecuentemente específicos de un solo sustrato, en una sola dirección de la reacción. La mayoría de los enzimas tienen una temperatura y un pH óptimo de actuación y su acción puede

ser inhibida o potenciada por otros compuestos o cofactores. Estas propiedades hacen de los enzimas efectivos puntos de control de muchas reacciones bioquímicas en procesos tecnológicos. Ya que la degradación de la pared celular facilitará la difusión de los compuestos fenólicos contenidos en el interior de las células del hollejo, es importante conocer aquellas actividades que pueden contribuir a la degradación de esa barrera natural que es la pared celular.

#### **2.2.2.1. Pectinasas.**

Las sustancias pécticas son una mezcla compleja de polisacáridos compuestos principalmente de poligalacturonano con grupos carboxilo metilados (Lanzarini y Pifferi, 1989). Cuando el grado de metilación es superior al 50% se llaman pectinas altamente metoxiladas. La pectina de la lámina media de la pared es más soluble que la pectina de las paredes primaria y secundaria y puede ser degradada más fácilmente por los enzimas.

El grupo de los enzimas pectolíticos se puede clasificar en función del mecanismo de degradación de las sustancias pécticas (Figura 2.2.7); así, la pectínesterasa (PE) cataliza la desesterificación de la pectina y los enzimas despolimerizantes catalizan la escisión del enlace glicosídico  $\alpha$ -(1→4) de la cadena de galacturonano de la molécula de pectina.

Los enzimas despolimerizantes pueden clasificarse, así mismo, en función del mecanismo de rotura de los enlaces glicosídicos. La poligalacturonasa (PG) escinde los enlaces por medio de hidrólisis, mientras que la pectín liasa (PL) y la pectato liasa lo hacen mediante  $\beta$ -eliminación. Además, el prefijo endo- o exo- denota el modo de acción de estos enzimas, al azar (enlaces internos) o terminal.

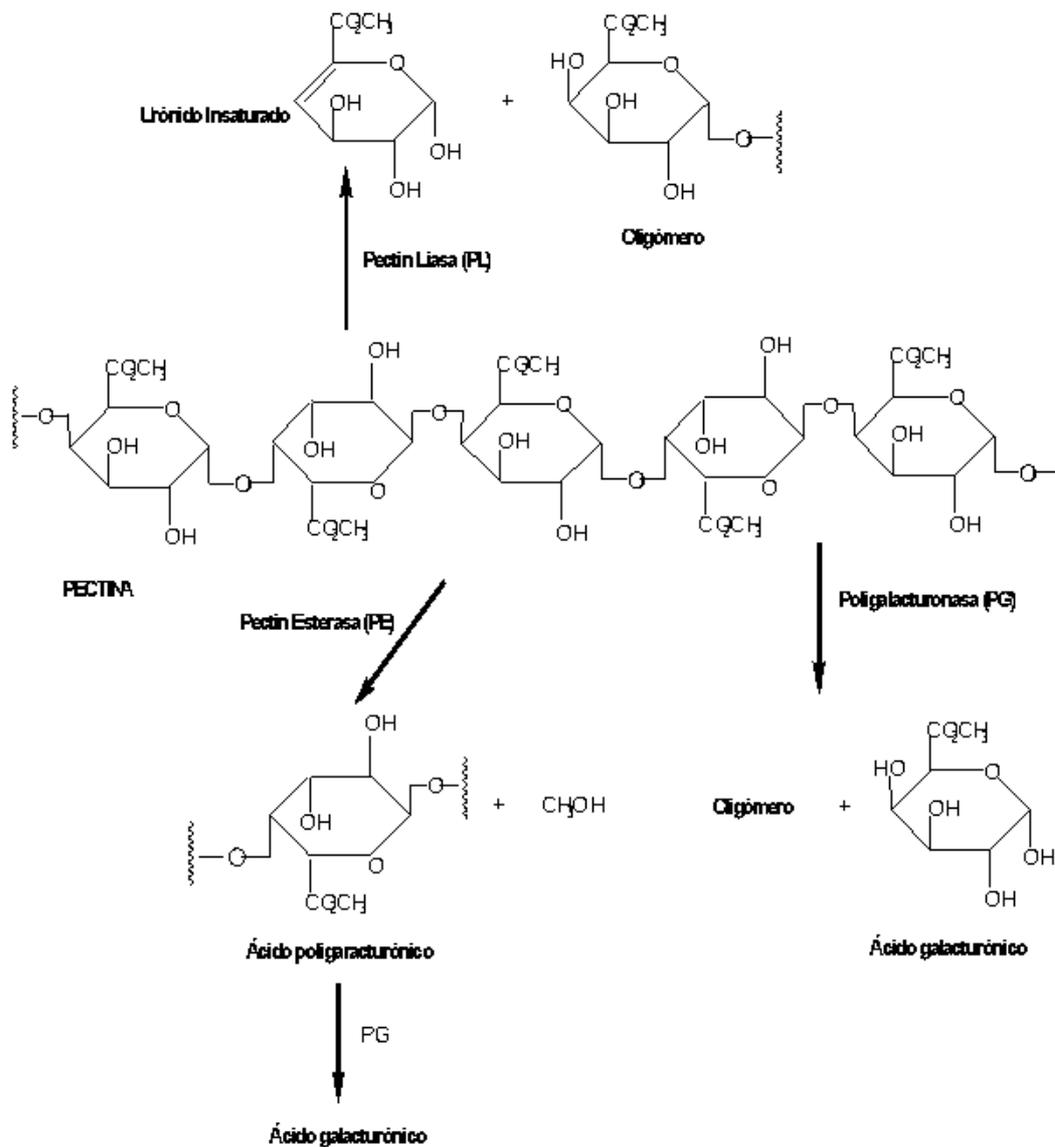


Figura 2.2.7. Sistema de acción de los enzimas pectolíticos

La mayoría de las modificaciones de la pared durante la maduración están asociadas con la degradación de los polisacáridos pécticos (Batisse et al., 1996; Redgwell et al., 1997; Waldron et al., 1997; Manrique y Lajolo, 2004; Viliers et al., 2004; Brummell et al., 2004) pero el momento y la velocidad a la que estos cambios ocurran variarán marcadamente con el tipo de fruto e incluso con el tipo de variedad estudiada (Ali et al., 2004). En el caso de la uva, se ha detectado niveles

bajos de pectinasas durante la maduración de la uva (Nunan et al., 2001; Ortega-Regules, 2006).

#### **2.2.2.1.1. Pectínerasa (EC 3.1.1.11).**

La pectínerasa (PE) o pectín metilesterasa elimina los grupos metilo de los galacturonanos esterificados.

La PE de las plantas trabaja sistemáticamente a lo largo de la cadena, produciendo áreas desesterificadas en la pectina, mientras que la PE de origen fúngico actúa al azar (Parley, 1997). Al principio, la eliminación de los grupos metilo permite la formación de zonas de entrecruzamiento pectina-pectina mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , incrementando así la fuerza del gel péctico (Jarvis, 1984). Pero también, la desesterificación de la pectina incrementará la densidad de carga en el microambiente de la pared celular, disminuirá el pH (Huang et al., 2005) y, por lo tanto, puede influenciar las actividades de otros enzimas asociados a la pared celular (Ricard y Noat, 1986; Chun y Huber, 1998), tales como aquellas que actúan sobre sustratos de tipo carbohidrato, peroxidasas, etc (Moustacas et al., 1991). La eliminación de los grupos metilo incrementa el acceso a los polisacáridos del enzima PG, resultando en la interrupción del gel péctico (Jarvis, 1984; Fischer y Bennett, 1991; Barnavon et al., 2001). La acción de desesterificación de las pectinas permitirá, por tanto, la despolimerización debida a la PG (Abu-Bakr et al., 2003).

La acción de la PE, conjuntamente con la PG, entraña la disgregación de la lámina media (Amrani-Joutei et al., 2003; Lohani et al., 2004). Cabanne y Donéche (2001) observaron un incremento en la actividad PG conforme disminuía el grado de metilación de las pectinas por el aumento en la actividad PE durante la maduración de uvas blancas. La PE está presente en los tejidos de los frutos a lo largo de la maduración (Brownleader et al., 1999). Nunan et al. (2001) detectaron valores bajos en la actividad de la PE en uva durante la maduración, lo que se correspondió con una disminución baja en los niveles de esterificación de las pectinas de la pared celular. Así mismo, Ortega-

Regules (2006) también obtuvo valores bajos de actividad PE, en un estudio de maduración de uva de distintas variedades, observando que los niveles de actividad se mantenían, además, constantes a lo largo del periodo de maduración.

### **2.2.2.1.2. Poligalacturonasas (EC 3.2.1.15).**

Las poligalacturonasas (PG) catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) de las cadenas poliméricas de ácido galacturónico no esterificadas.

La endo-PG actúa al azar a lo largo de la cadena, lo que se traduce en una acusada disminución de la viscosidad del sustrato para un bajo nivel de actividad.

La exo-PG cataliza la ruptura hidrolítica de enlace  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) terminal de la cadena de galacturonano, liberando ácido galacturónico como producto de reacción. A diferencia de la endo-PG, la exo-PG también escinde el ácido digalacturónico. El modelo de acción terminal se manifiesta en un aumento considerable de los grupos reductores, con un decrecimiento lento de la viscosidad del sustrato (Hellín, 2000).

La acción de la PG va a resultar en una debilitación de las estructuras de la pared celular en láminas paralelas, probablemente por el ataque a homogalacturonanos. Parece ser que su acción afecta principalmente a la pared celular primaria, no afectando a la lámina media a no ser que actúe conjuntamente a la PE (Amrani-Joutei et al., 2003).

La PG está implicada en el reblandecimiento de los frutos durante la maduración. El aumento de la solubilidad de las pectinas durante la maduración se puede deber principalmente a la despolimerización de las pectinas por la acción de la poligalacturonasa (Huber, 1983; Lohani et al., 2004). La endo-PG parece tener un mayor impacto en la evolución de la estructura de la pared celular durante la maduración (Fischer y Bennett, 1991). Sin embargo, en tomates mutantes y otras frutas como las fresas,

la actividad PG es muy baja o nula y aún así los frutos se reblandecen (Huber, 1984), pudiendo ser debido a la acción de otros enzimas como la pectato liasa (Bermúdez-Jiménez et al., 2002). Por otro lado, se ha observado que bajos niveles de actividad PG ocasionan un descenso en el contenido total de sustancias pécticas durante la maduración de la uva (Takayanagi et al., 2001). En uva, se han encontrado resultados contradictorios, mientras que algunos autores sí han detectado actividad PG en bayas (Cabane y Donéche, 2001; Deng et al., 2005), Ortega-Regules (2006) no la observó durante todo el periodo de maduración de Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah y Monastrell.

#### **2.2.2.1.3. Pectato Liasas (EC 4.2.2.2) y Pectín Liasas (EC 4.2.2.10).**

La pectato y pectín liasa rompen el enlace glicosídico por medio de un mecanismo de  $\beta$ -eliminación, obteniéndose una molécula de pectina de menor grado de polimerización con un extremo reductor y otra en cuyo extremo no reductor se genera un doble enlace entre los C4 y C5.

La pectato liasa (PAL) cataliza la ruptura de las uniones glicosídicas entre moléculas de ácido galacturónico no metiladas en pectinas de baja metoxilación. Es  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente y puede actuar tanto al azar como en posición terminal (Whitaker, 1990).

La pectín liasa (PL) cataliza la ruptura de los enlaces en sustratos altamente esterificados. Actúa al azar, no habiéndose identificado ninguna PL que pueda escindir el enlace terminal (Ros, 1989).

Estos enzimas van a debilitar las estructuras de la pared celular en láminas paralelas, afectando principalmente a la lámina media (Amrani-Joutei et al., 2003).

La PAL y la PL han sido encontradas en frutos como tomates, fresas y uvas y pueden jugar un papel importante en el ablandamiento de los tejidos durante la maduración (Marín-Rodríguez et al., 2002; Abu-Bakr et al., 2003). Además, se ha observado que estos enzimas no sólo actúan

degradando las paredes celulares, sino que también pueden activar sistemas de defensa de la planta (De Lorenzo et al., 1991).

### **2.2.2.2. Hemicelulasas.**

Las hemicelulosas son macromoléculas que forman asociaciones no covalentes con la celulosa. Dentro de éstas se pueden encontrar los xiloglucanos (XGs), que es el principal componente hemicelulósico en plantas dicotiledóneas (Pauly et al., 1999), los heteroxilanos, los mananos y la calosa. Debido a la heterogeneidad y la complejidad de la estructura química se requiere la actuación de varios enzimas con diversa especificidad y modos de acción para poder degradar las hemicelulosas (Beg et al., 2001).

Existen muchos enzimas implicados en la degradación de las hemicelulosas, como son la arabinasa, xilanasa, galactanasa y glucanasa, dependiendo del sustrato sobre el que actúe.

Se han encontrado tres formas de enzima arabinasa (EC 3.2.1.99): la arabinosidasa A, que degrada los oligómeros de arabinanos a monómeros, la arabinosidasa B, que degrada el arabinano para dar una cadena lineal y la endo-arabinasa, que hidroliza al azar la cadena lineal, rompiéndola en oligómeros para que la arabinasa A pueda actuar sobre ellos (Parley, 1997).

También se pueden ver implicadas en la degradación de la hemicelulosa la endo- y la exo-galactanasa (EC 3.2.1.164 y EC 3.2.1.145). La endo-galactanasa actúa rompiendo uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) (Brillouet et al., 1991; Okemoto et al., 2003), mientras que la exo-galactanasa actúa sobre la cadena de galactano rompiendo uniones de tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (Pellerin y Brillouet, 1994).

La endo-glucanasa (EC 3.2.1.6) corta los enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3 y 4)-D-glucosilo de los XGs. Este enzima puede intervenir en el ablandamiento de algunos frutos durante la maduración (Redgwell et al., 1990). Se ha

observado que el reblandecimiento en las primera etapas de la maduración de frutos, tales como tomate, aguacate, melón y kiwi, se debe principalmente a la despolimerización de los xiloglucanos (McCollum et al., 1989; O'Donoghue y Huber, 1992; Sakurai y Nevins, 1993; Gallego y Zarra, 1997; Sakurai y Nevins, 1997).

#### **2.2.2.3. Celulasas (EC 3.2.1.4).**

La celulosa es abundante en las paredes primaria y secundaria. Su degradación es debida a un complejo enzimático que engloba enzimas con diferentes actividades. Este sistema de enzimas está formado por la glucanasa (endo- y exo-) y la celobiasa ( $\beta$ -glucosidasa).

La celobiasa degrada la celobiosa en dos moléculas de glucosa. Este enzima inhibe la actividad de la endo y la exo-glucanasa.

Las celulasas van a disminuir la cohesión de las fibras de celulosa cerca de la lámina media, lo que originará un descenso en la densidad de las estructuras de esta región de la pared celular (Amrani-Joutei et al., 2003). Así mismo, Carrillo-López et al. (2002) observaron que la degradación de la pared celular primaria estaba correlacionada con el aumento de la actividad celulasa, resultado coincidente con los estudios de Crookes y Grierson (1983) sobre maduración en tomate. La actividad celulasa, además, puede verse favorecida por la presencia de otras actividades enzimáticas, tales como poligalacturonasas y hemicelulasas, ya que se ha descrito un efecto sinérgico entre éstas (James et al., 1999).

#### **2.2.2.4. Otros enzimas.**

##### **2.2.2.4.1. $\alpha$ - y $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.22 y EC 3.2.1.23).**

La  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa van a catalizar la ruptura de enlaces  $\alpha$ - y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) de la galactosa respectivamente.

La  $\alpha$ -galactosidasa es un enzima con acción exo. Los sitios de acción de este enzima podrían ser los ramnogalacturonanos tipo-II (Doco

y Brillouet, 1993; Brownleader et al., 1999), los galactoglucomananos (Fernandes-Bolaños et al., 1995) y los galactomananos (Fry, 1995; Nunan et al., 1998); ya que todos ellos contienen residuos  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-galactosa. El papel de la  $\alpha$ -galactosidasa en el reblandecimiento de la pared celular no está muy claro, aunque se ha demostrado su presencia en la pared celular. Ortega-Regules (2006) observó un aumento en la concentración de la actividad de este enzima durante la maduración de uvas tintas, resultado coincidente con Kang y Lee (2001), detectando únicamente dos actividades enzimáticas más ( $\beta$ -galactosidasa y PE) que permanecieron constantes durante todo el periodo de maduración. Sin embargo, otros autores describen un descenso en los niveles de la  $\alpha$ -galactosidasa a partir del envero (Barnavon et al., 2000; Nunan et al., 2001).

La  $\beta$ -galactosidasa también es un enzima con acción exo-, por lo que elimina residuos de  $\beta$ -galactosa a partir de los polisacáridos de la pared celular, ramnogalacturonanos tipo-I y xiloglucanos (Fry, 1995). Esto se traduce en la pérdida de galactosa de las paredes celulares durante la maduración. Se ha descrito un aumento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa durante la maduración de frutas (John y Dey, 1986; Seymour y Gros, 1996; Ketsa et al., 1998). Algunos autores opinan que este enzima es responsable del reblandecimiento de ciertos frutos en mayor medida que la PG y PE (Lazan et al., 1995; Mohd Ali et al., 1995) y que es el que actúa en las primeras etapas del ablandamiento (Carrington y Pressey, 1996).

La galactosidasa también puede actuar sobre residuos de galactosa en las glicoproteínas extensinas (Fry, 1995).

#### **2.2.2.4.2. Proteasas (EC 3.4).**

Las paredes celulares de las plantas pueden contener alrededor del 10% de proteína (Zarra y Revilla, 1993). La naturaleza de las proteínas de la pared celular es muy variada, así como su función. Exceptuando las proteínas ricas en glicina, las proteínas asociadas a la pared celular de las plantas están glicosiladas y contienen hidroxiprolina.

La mayoría están formando enlaces en las paredes celulares y parecen tener funciones estructurales, aunque también participen en la morfogénesis (Cassab, 1998).

Las proteasas pueden ser inductoras de estrés en las proteínas de la pared celular y pueden ser responsables, en parte, de la integridad de la pared, incrementándose su actividad durante la maduración de algunos frutos como el tomate (Barka et al., 2000; Imam y Snell, 1987).

Matsuda et al. (1985) y Monk et al. (1983) observaron que durante la degradación de la estructura de la pared celular se liberaban varios polipéptidos debido a la acción del enzima degradante lisina o autolisina, mientras que otras proteasas conocidas tales como la pepsina, la papaína y la tripsina no mostraban tener influencia en esta degradación (Imam y Snell, 1987).

Se ha demostrado que la extensina, componente de la pared celular, puede llevar a cabo entrecruzamiento consigo misma catalizado por la peroxidasa en la pared celular (Brownleader y Dey, 1993; Brownleader et al., 1995; Dey et al., 1997). El papel de la extensina y de la extensina peroxidasa en la maduración de los frutos no se ha investigado a fondo (Brownleader et al., 1999). Así mismo, se ha estudiado que la expansina puede inducir la rotura de puentes de hidrogeno entre la celulosa y los xiloglucanos (Brownleader et al., 1999).

### **2.2.3. EL USO DE ENZIMAS COMERCIALES EN ENOLOGÍA.**

Los enzimas son catalizadores biológicos ampliamente utilizados en la industria alimentaria y de bebidas. Desde comienzo de los años 1950, los enzimas de tipo pectinasas han sido empleados en el procesado de frutas para la obtención de zumo. Estos enzimas proporcionan mayor rendimiento en la extracción, también clarifican el zumo, reducen la viscosidad y mejoran la filtración del producto. Los preparados pectolíticos también han sido utilizados en la elaboración de vino desde comienzos de 1970, sobre todo para conseguir un mayor rendimiento del mosto en el

estrujado de la uva y facilitar su clarificación (Ough y Crowell, 1979; Felix y Villettaz, 1983; Capdeboscq et al., 1994). Más recientemente, el uso de enzimas en enología se ha diversificado, empleándose para fines más concretos, como la extracción de color en vinificaciones en tinto y de aromas en blanco (Gil y Vallés, 2001; Pérez-Magariño y González-San José, 2001; Canal-Llaubères y Pouns, 2002; Castro-Vázquez et al., 2002; Clare et al., 2002; Bautista-Ortín et al., 2005; Sacchi et al., 2005; Kelebec et al., 2007).

La adición de pectinasas exógenas suele ser beneficiosa, porque aunque se encuentran de forma natural en los frutos, su actividad natural es menor que la necesaria para hidrolizar toda la pectina del mosto (Felix y Villettaz, 1983). La mayoría de los preparados comerciales enzimáticos que se utilizan en la elaboración del vino, contienen actividad PE y endo-PG y pueden contener también PL y proteasas. Recientemente, las empresas fabricantes de enzimas han modificado los preparados de pectinasas, adicionando pequeñas cantidades de celulasas y hemicelulasas, para conseguir así una mayor ruptura de las células y de la estructura del fruto (Plank y Zent, 1993). Estos sistemas enzimáticos de maceración han mejorado las propiedades para el procesado de la uva (Harbord et al., 1990).

### **2.2.3.1. PRODUCCIÓN DE PREPARADOS ENZIMÁTICOS PARA ENOLOGÍA.**

Las preparaciones enzimáticas son producidas por algunas cepas de microorganismos, generalmente hongos, no modificados genéticamente, y contienen numerosas actividades enzimáticas. Las cepas normalmente utilizadas son *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum*, debido a la facilidad para obtener pectinasas y glucanasas, respectivamente, de estos hongos. Estas especies son reconocidas como G.R.A.S. (generalmente reconocidas como seguras) y su uso está aceptado por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (O.I.V.).

Las preparaciones enzimáticas son material extracelular que se produce generalmente por fermentación, donde las cepas seleccionadas son cultivadas sobre sustratos agrícolas, tales como harina de soja o almidón de patata. El método más comúnmente utilizado es el cultivo en inmersión en el medio (Canal Llaubères, 2002). El resultado de la fermentación es una preparación enzimática que contiene diferentes actividades. Después de la fermentación, las actividades enzimáticas deseadas se recuperan y purifican, aunque estos preparados contendrán también actividades secundarias. El ratio entre la actividad enzimática principal y las llamadas secundarias definirá el valor del preparado para una aplicación en concreto (Canal Llaubères, 1993).

El espectro enzimático de cada preparación va a depender de la cepa, del medio y de las condiciones de cultivo, que son específicas para cada productor, por lo que estas actividades pueden variar ampliamente entre los fabricantes (Neubeek, 1975; Palacios et al., 2003). Para la obtención de preparados que contengan una única actividad enzimática es necesario el uso de microorganismos modificados genéticamente, donde se pueda mejorar o inhibir la expresión de genes de enzimas particulares (Voragen y Van den Broek, 1991; Canal Llaubères, 2003). Estos preparados, usualmente contienen, además de la actividad pectolítica, otras como glicosidasas, proteasas, hemicelulasas y celulasas, que refuerzan la acción de las pectinasas. A la diversidad de actividades enzimáticas presentes en los preparados comerciales se le suma que, en la mayoría de los casos, la medida de esta actividad viene expresada en unidades propias de cada fabricante, lo que puede generar una gran confusión entre los usuarios de estos productos.

#### **2.2.3.2. ENZIMAS PARA LA EXTRACCIÓN DE COLOR.**

La extracción de los compuestos fenólicos va a depender, debido a su localización, de la degradación de la pared celular, como se ha comentado anteriormente. Esto supone que el uso de enzimas pectolíticas que degraden la pared celular de la piel de la uva, podría

favorecer la solubilización de antocianos y taninos. Se ha estudiado, por tanto, el desarrollo de mezclas complejas de enzimas que ayuden a una rotura más completa de los polisacáridos estructurales de la pared celular, para conseguir un aumento en la extracción de color durante la vinificación (Parley, 1997; Gil y Vallés, 2001; Clare et al., 2002). Estas enzimas macerativas podrían incluso modificar la estabilidad, el gusto y la estructura de los vinos tintos, debido a que no sólo los antocianos van a ser extraídos de las pieles, si no también taninos ligados a las paredes celulares, como resultado de la acción de celulasas y hemicelulasas. Estos taninos pueden ayudar a estabilizar el color del vino y a incrementar las sensaciones en boca (Canal-Llaubères y Pouns, 2002).

Desde que se propuso el uso de preparados comerciales enzimáticos para mejorar el color del vino se han llevado a cabo numerosas investigaciones en este campo, que no han sido concluyentes. A pesar de las expectativas iniciales, se han obtenido resultados contradictorios (Pardo et al., 1999; Watson et al., 1999; Delteil, 2000b; Canal-Llaubères y Pouns, 2002; Revilla y González-San José, 2002a y b). Estas contradicciones se han atribuido a la diferente naturaleza y actividades de los preparados comerciales enzimáticos, y a la presencia de algunas actividades secundarias (como la  $\beta$ -glucosidasa o la fenol esterasa) en dichos preparados. Ough et al. (1975) observaron que el uso de pectinasas producía una extracción más rápida de los compuestos fenólicos y que se requería un tiempo de contacto menor (20%) para alcanzar el mismo color que en el vino control. Otros estudios también han mostrado que los enzimas de maceración promueven la extracción del color y mejora la calidad del vino tinto (Ough y Berg, 1974; Ough y Crowell, 1979; Felix y Villettaz, 1983; Zent e Inama, 1992). Sacchi et al. (2005) obtuvo un aumento en la extracción de antocianos, taninos poliméricos y aromas varietales (especialmente norisoprenoides), mejorándose la intensidad de color, la estructura tánica y la calidad sensorial de los vinos tratados enzimáticamente. Pero los resultados que se han encontrado referentes a la utilización de estos preparados

comerciales para la extracción de color de las uvas no siempre han sido totalmente positivos. Así, Álvarez et al. (2005) observaron que el uso de enzimas comerciales de extracción durante la maceración solamente generaba pequeños incrementos en el color y en la concentración de compuestos fenólicos, afectando adversamente a ciertas características sensoriales, como la astringencia y el amargor, que aumentaban. Zimman et al. (2002) encontró que la aplicación de enzimas macerativos incrementaba la cantidad de proantocianidinas en el vino, pero no la intensidad de color. Bautista-Ortín et al. (2005 y 2006) también estudió la aplicación de enzimas en la vinificación de uvas Monastrell obteniendo resultados contradictorios. En la campaña 2002 se mejoraban las características de los vinos al utilizar los enzimas, mientras que en el 2003 no se encontraron diferencias entre el control y los vinos tratados. Haight y Gump (1994) observaron un incremento en el color de los vinos tratados con enzimas, pero sin mostrar diferencias significativas respecto el vino control. Otros autores encontraron que los enzimas de maceración pueden incluso causar una disminución en el contenido de antocianos y en el color del vino (Wightman y Wrolstad, 1995; Wightman et al., 1997). Parte de los resultados negativos han sido atribuidos a la presencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa en los preparados comerciales.

La actividad  $\beta$ -glucosidasa fue identificada en extractos enzimáticos de *Aspergillus* por Huang (1955), quien encontró que tenía un efecto de decoloración sobre los pigmentos extraídos de varios frutos, incluida la uva. La decoloración es debida a la hidrólisis enzimática de la glucosa de los antocianos. La  $\beta$ -glucosidasa ha sido encontrada en los preparados enzimáticos en numerosas ocasiones (McCleary y Harrington, 1988; Martino et al., 1994; Wightman y Wrolstad, 1995; Wightman y Wrolstad, 1996).

El efecto de otra actividad secundaria, la cinamil esterasa (o fenol esterasa), sobre el color del vino tinto ha recibido poca atención, pero podría ser importante. Su presencia es detectada normalmente por una disminución de los ésteres de los ácidos hidroxicinámicos con ácido

tartárico de la uva, acompañado por el incremento de sus respectivos ácidos libres (Wightman et al., 1997). La conversión del ácido caftarico en ácido cafeico en el mosto podría influir en la pérdida de antocianos por oxidación (Sarni et al., 1995), ya que la desesterificación incrementa la actividad de la polifenol oxidasa (Gunata et al., 1987). Un segundo efecto importante de la producción de ácidos hidroxicinámicos libres tales como el p-cumárico y ferúlico, es que son sustratos para la formación de etil y vinil-fenoles, los cuales pueden tener dos efectos contrapuestos. Por un lado pueden perjudicar el aroma de los vinos por ser sustratos para la formación de vinil-fenoles, pero también pueden formar polímeros condensados con la malvidina, contribuyendo de esta manera a estabilizar el color del vino (Fulcrand et al., 2006).

La actividad de los enzimas de maceración es menor en mostos con bajos valores de pH y a bajas temperaturas (Palacios et al., 2003). Así mismo, su actividad se ve afectada durante la vinificación, viéndose inhibidas por el incremento en el contenido de etanol durante la fermentación y por el aumento de los niveles de los compuestos fenólicos. Los enzimas son proteínas y se pueden enlazar y precipitar con taninos extraídos durante el proceso de maceración. Otro factor a tener en cuenta cuando se utilizan estos enzimas es la concentración a la cual se aplican. Muestras de vinos de Bulgaria tratados con dosis de pectinasas del 0,3%, mostraron un 18% más de color que el vino control, mientras que los tratados con un 0,7% mostraron un 60% menos de color que el vino control (Neubeek, 1975). Sin embargo, Revilla y González San-José (2003b) no encontraron grandes diferencias en los parámetros cromáticos de los vinos cuando aplicaban la dosis mínima y máxima fijada por el fabricante de los preparados enzimáticos.

Estas contradicciones mantienen abierto el interés sobre la investigación de los efectos de los enzimas de maceración en distintas condiciones de elaboración, y su papel en la degradación de las células de los hollejos.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**



### **3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.**

El protocolo experimental contempló tanto el estudio de la extracción de los compuestos fenólicos de la uva al vino en diferentes variedades, como el empleo de enzimas macerativos en vinificaciones en tinto para facilitar esta extracción, probándose estas enzimas en distintas situaciones de elaboración para una posible optimización de su uso. Así mismo, se estudió la composición y estructura de las paredes celulares de los orujos al finalizar la maceración de los vinos.

El estudio se realizó durante tres campañas consecutivas: 2003-2004, 2004-2005 y 2005-2006.

#### **3.1.1. CAMPAÑA 2003-2004.**

En esta campaña se llevó a cabo un estudio de la extractabilidad de los compuestos fenólicos de la uva al vino de diferentes variedades de uva.

Las variedades de uva tinta que se estudiaron fueron Monastrell, como variedad predominante en las tres Denominaciones de Origen de la Región de Murcia, en dos localizaciones distintas (Jumilla y Bullas), y Cabernet Sauvignon, Syrah y Merlot (Jumilla), como variedades que se están introduciendo en la región como mejorantes de Monastrell.

Se realizaron microvinificaciones de 100 kg de uva de todas las variedades, por triplicado. La elaboración se condujo de acuerdo a las costumbres de las Denominaciones de Origen de la Región de Murcia, prensándose al finalizar el periodo de maceración. Los vinos se estabilizaron por frío y se embotellaron.

Así mismo, se tomaron muestras de los orujos en el momento del prensado, para su posterior estudio.

En el momento de la vendimia, se determinaron los parámetros de maduración de la uva, tanto los clásicos como los fenólicos, y el perfil antociánico de las pieles de las uvas.

Posteriormente, al final del periodo de maceración de las vinificaciones, 15 días, se tomaron muestras de los vinos elaborados. Se controlaron la intensidad de color y tono, antocianos totales e índice de polifenoles totales, parámetros de copigmentación, taninos totales y perfil antociánico de los vinos. Estos análisis también se realizaron al final de la fermentación alcohólica y de la maloláctica, en el momento del embotellado y durante el periodo de almacenamiento del vino. Así mismo, se determinaron las características sensoriales de los vinos.

A partir de las paredes celulares de los orujos obtenidos tras el prensado de la masa de vinificación, se aislaron los polisacáridos estructurales de la pared celular de la piel de la uva. Cada una de las fracciones se caracterizó, analizándose su composición y estructura mediante determinación del contenido en ácidos urónicos, azúcares neutros, grado de esterificación, proteínas y compuestos fenólicos unidos covalentemente a los polisacáridos. Además, se determinó el perfil antociánico remanente en estos orujos tras la vinificación.

Se realizó también un estudio de la dinámica de extracción de los compuestos fenólicos al vino. Para ello se realizó una vinificación de 1000 kg de uva Monastrell, muestreándose tanto el mosto-vino, como los orujos durante el periodo de maceración. Se tuvo que llevar a cabo una vinificación mayor, en este estudio, para evitar el efecto de dilución que podría suponer el retirar una parte de la masa de vinificación durante la maceración.

Se estudiaron los parámetros cromáticos en el vino durante la maceración, así como la estructura y composición de la pared celular de los orujos en este periodo.

### **3.1.2. CAMPAÑA 2004-2005.**

Durante esta campaña, se estudió el efecto de seis preparados enzimáticos comerciales para la extracción de color en la elaboración de vinos de la variedad Monastrell.

Los preparados enzimáticos para extracción de color en vinificaciones en tinto que se estudiaron fueron: E1: Rapidase Ex Color (DSM, Servian, Francia), E2: Lafase He Grand Cru (Laffort oenologie, Burdeos, Francia), E3: Vinozym Vintage FCE (Novozymes, Dittingen, Switzerland), E4: Vinoflow (Novozymes, Dittingen, Suiza), E5: Endozym Rouge (Pascal Biotech, Paris, Francia) y E6: Endozym 10 ICS (Pascal Biotech, Paris, Francia).

Estos enzimas comerciales se caracterizaron, determinándose la presencia de las siguientes actividades enzimáticas: poligalacturonasa total y endo-poligalacturonasa (PG total y endoPG), celulasa, xilanasas, galactanasas, pectato y pectín liasa, pectín metilesterasa,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y proteasa.

Así mismo, se realizó un experimento de maceración de las pieles de la uva en una solución modelo, con adición de los enzimas a altas concentraciones, monitorizándose cada dos horas el aumento en la intensidad de color de las muestras.

Para el estudio del efecto de estos enzimas en vinificación, se llevaron a cabo, por triplicado, seis vinificaciones con adición de los seis preparados comerciales distintos y una vinificación testigo sin adición de enzima. La dosis de enzima fue de 3 g/hL de vino, adicionándose estos en el momento del encubado de la masa de vinificación.

Los parámetros cromáticos de los vinos se controlaron tanto durante la elaboración, como una vez embotellados, al igual que los análisis sensoriales.

Se aislaron y caracterizaron las paredes celulares de los orujos tras el prensado como se detalla para la campaña anterior.

### **3.1.3. CAMPAÑA 2005-2006.**

En esta campaña se estudió la aplicación de un enzima extractor de color en diferentes situaciones de vinificación.

El preparado enzimático que se utilizó fue Lafase He Grand Cru (Laffort oenologie, Burdeos, Francia), caracterizándose sus actividades enzimáticas de igual modo que la campaña anterior. La dosis de enzima adicionada en la elaboración fue de 3 g/hL de vino.

#### **3.1.3.1. Efecto del tiempo de maceración.**

Se realizaron vinificaciones de 100 kg de uva de la variedad Monastrell, por triplicado, variando el tiempo de maceración (5, 10 y 15 días). Para cada tiempo de maceración hubo dos elaboraciones distintas, una con adición del preparado enzimático para la extracción de color y una elaboración testigo sin adición de enzima.

#### **3.1.3.2. Efecto del grado de madurez de las uvas.**

Se comprobó el efecto del enzima macerativo en uvas de Monastrell con distinto grado de maduración (12, 13,5 y 15 °Be) y en uvas con similar grado de madurez tecnológica pero distinta madurez fenólica (Uva A: 13 °Be e índice de extractabilidad de 44 y Uva B: 13,5 °Be e índice de extractabilidad de 28). Para ello se vinificaron, por triplicado, uvas de la variedad Monastrell con las características descritas, llevándose a cabo una elaboración con adición de enzima y otra testigo sin adición de éste.

En los vinos, se determinaron todos los parámetros cromáticos anteriormente descritos, tanto durante la elaboración, como posteriormente durante el almacenamiento.

Así mismo, también se aislaron y caracterizaron las paredes celulares de los orujos de todas las elaboraciones anteriormente descritas.

### **3.2. MATERIAL VEGETAL.**

Las variedades de uva tinta (*Vitis vinifera* L.) que se estudiaron durante el año 2003 fueron Monastrell, como variedad predominante en las tres Denominaciones de Origen de la Región de Murcia, y Cabernet Sauvignon, Syrah y Merlot como variedades que se están introduciendo en la Región como mejorantes de Monastrell. Estas variedades se encontraban localizadas en una finca experimental de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, en el paraje de la Cañada del Judío, en Jumilla. El sistema de conducción era en espaldera y el riego por goteo.

Así mismo, se estudiaron uvas de la variedad Monastrell cultivadas en distintas condiciones edafoclimáticas y de cultivo. Para ello se eligieron varias parcelas de Monastrell cultivadas en seco y en sistema de vaso, una situada en el término municipal de Jumilla perteneciente a la bodega Casa Castillo, otra en el de Bullas ubicada en la Finca Carrascalejo y la última en Avilés (Lorca).

Durante el año 2004 y 2005, la uva seleccionada para el estudio fue Monastrell situada en la parcela de Jumilla, perteneciente a la bodega Casa Castillo, con conducción en vaso y en seco, debido a sus mejores características cualitativas.

### **3.3. CONTROL DEL GRADO DE MADURACIÓN DE LA UVA.**

Se realizó un control de maduración de la uva en el momento de la vendimia, por triplicado.

La toma de muestras se llevó a cabo a primera hora de la mañana. El muestreo fue aleatorio, eligiéndose unas cincuenta viñas por parcela elemental. De cada planta se cortaron dos grupos de bayas (5-6 granos)

de distintas partes del racimo, así como con diferente orientación dentro de la cepa. Las muestras se trasladaron inmediatamente al laboratorio para su procesado.

### **3.3.1. OBTENCION DEL MOSTO.**

Las muestras, de aproximadamente 300 granos, se prepararon en el laboratorio, eligiendo los granos más representativos de la muestra recogida en la parcela, eliminando los más pequeños, los más grandes, los más maduros y los más verdes. Los granos se contaron y se pesaron con el fin de obtener el peso medio del grano.

El mosto se obtuvo por trituración de la muestra usando una batidora Robot coupe modelo Gt 550 (Robot coupe, Montceau Les Mines, Francia). El proceso dura dos minutos a una velocidad media que asegura la trituración evitando la ruptura de las pepitas. A continuación, la muestra se centrifugó 15 minutos a 4500 rpm con una centrifuga JP Selecta modelo Meditronic-BL (JP Selecta, Barcelona, España), con el fin de obtener un mosto limpio y transparente para la realización de los análisis.

### **3.3.2. MADUREZ TECNOLÓGICA DE LA UVA.**

A partir del mosto centrifugado obtenido directamente a partir del triturado de la uva, se llevaron a cabo análisis de madurez clásicos: grado Brix, pH, acidez total.

#### **3.3.2.1. Grado Brix.**

El grado Brix se obtuvo utilizando un refractómetro digital ATAGO modelo PR-101 (ATAGO, WA, USA), con corrección incorporada de temperatura, ajustando el cero con agua destilada. A partir del grado Brix se calculan por tablas los valores de grado Baumé y azúcares en g/L.

### **3.3.2.2. pH.**

El valor de pH se midió siguiendo el método oficial CEE, reglamento N° 2676/90, con un valorador automático Metrohm modelo 686 (Metrohm, Herisau, Suiza).

### **3.3.2.3. Acidez total.**

La acidez total se determinó por valoración potenciométrica según el método oficial CEE, reglamento N° 2676/90, con un valorador automático Metrohm modelo 686 (Metrohm, Herisau, Suiza). Los resultados se expresan en g/L de ácido tartárico.

### **3.3.3. MADUREZ POLIFENÓLICA.**

La madurez polifenólica se determinó mediante el método de Saint-Cricq (Saint-Cricq et al., 1998), consistente en la extracción de un modo suave reproduciendo las condiciones industriales de maceración (pH 3,6) y en condiciones extremas (pH 1), de los polifenoles que contienen los granos de uva. La diferencia entre ambos resultados indica la extractabilidad de los compuestos fenólicos y, por tanto, refleja la maduración fenólica de la uva.

El procedimiento consiste en pesar dos fracciones de 25 g del triturado de uva en vasos de precipitados de 250 mL. A uno de ellos se le adicionan 25 mL de una disolución a pH 1 (HCl 0,1 N) y al otro, 25 mL de una disolución a pH 3,6, (5 g de ácido tartárico, 4,5 mL de NaOH al 32% y agua destilada hasta un volumen final de 1 L). Se deja macerar a temperatura ambiente durante 4 h agitando cada 15 min. Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 4500 rpm durante 15 min.

En el sobrenadante centrifugado se determinan antocianos totales a las muestras obtenidas a ambos pH y compuestos fenólicos totales (CFT) en el extracto a pH 3,6.

La concentración de antocianos en la disolución a pH 3,6 representa el potencial de antocianos fácilmente extraíbles de la uva durante el proceso de vinificación y los de la disolución a pH 1 representan el potencial total de antocianos de la uva.

Los CFT a pH 3,6 representan la cantidad de compuestos fenólicos de la uva que pueden ser extraídos fácilmente durante el proceso de vinificación.

A partir de estos parámetros se calculan el Índice de madurez celular, también llamado extractabilidad de los antocianos (EA) y el Índice de madurez de las pepitas (Mp).

$$EA (\%) = [(ApH 1 - ApH 3,6)/ApH 1] * 100$$

$$Mp (\%) = [(CFTpH 3,6 - ApH 3,6 * 40 / 1000) / CFTpH 3,6] * 100$$

### 3.3.3.1. Antocianos totales.

El valor de los antocianos totales se midió mediante la adición de 0,5 mL de mosto a 20 mL de HCl 0,1 N, transcurridos 30 min se lee el valor de la absorbancia a 520 nm (Cayla et al., 2002).

$$\text{Antocianos (mg/L)} = A_{520} * 22,76 * \text{dilución}$$

### 3.3.3.2. Compuestos fenólicos totales (CFT).

Los CFT se determinaron a partir de una muestra de mosto diluida 101 veces con agua destilada. El valor de los CFT se obtiene mediante la lectura de la absorbancia a 280 nm.

$$CFT = A_{280} * 101$$

### 3.3.4. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANOS EN EL HOLLEJO DE LA UVA.

En el momento de preparación de la muestra de uva para la determinación de la madurez también se tomó una muestra para la

determinación de los antocianos en el hollejo. La muestra, unos 50 granos de uva, se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

Las uvas congeladas se pelaron con la ayuda de un bisturí, colocando los hollejos sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de humedad. Se pesaron aproximadamente 5 g de hollejos en un tubo con cierre hermético y se añadieron 50 mL de metanol. El tubo se mantuvo en una placa de agitación a 150 rpm, a temperatura ambiente durante 14 h. El extracto obtenido se filtró a través de un filtro de nylon de  $0,45\ \mu\text{m}$  y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La separación de los antocianos se realizó en un cromatógrafo Waters modelo 2690 (Waters, PA, USA) equipado con un detector diodo-array Waters 996. Se empleó una columna C-18 de fase reversa de  $25 \times 0,4\ \text{cm}$ , LiChrospher® 100 RP-18 (Merck, Darmstadt, Alemania) de  $5\ \mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Se inyectaron  $20\ \mu\text{L}$  de muestra y el análisis se llevó a cabo a temperatura ambiente. La separación se desarrolló en gradiente utilizando una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico al 4,5 % con un flujo de  $1,5\ \text{mL/min}$  (Tabla 3.3.1).

La adquisición y procesamiento de la información cromatográfica se llevó a cabo con el sistema Millennium®.

**Tabla 3.3.1.** Condiciones de análisis para la separación de antocianos por HPLC.

Tiempo (min)	% Acetonitrilo	% Ácido fórmico
0	10	90
10	10	90
25	15	85
65	21	79
68	21	79
73	100	0
76	10	90
80	10	90

La identificación de los compuestos se realizó por comparación de sus espectros con los encontrados en la literatura. La identificación se confirmó mediante HPLC-MS, en un cromatógrafo líquido acoplado a un detector de masas LC-MSD-Trap VL-01036 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), equipado con un sistema de ionización por electrospray (ESI). La elución se realizó bajo las mismas condiciones de elución descritas para la cuantificación en HPLC, con un flujo de 1 mL/min. La temperatura del capilar y el voltaje se mantuvieron a 350°C y 4 kV, respectivamente. Los espectros de masas se registran en el intervalo de  $m/z$  100 a  $m/z$  800 y son adquiridos en modo de ionización positivo y negativo.

Los antocianos se cuantificaron a 520 nm como malvidin-3-glucósido, utilizando como patrón externo cloruro de malvidin-3-glucósido (Extrasynthèse, Genay, Francia) (Cacho et al., 1992). Los resultados son expresados en mg de malvidina por peso fresco de hollejo, mg de malvidina por baya y/o mg de malvidina por kg de uva.

### **3.4. VINIFICACIONES.**

En todas las campañas y para los distintos estudios a realizar, se realizaron microvinificaciones de 100 kg de uva, por triplicado. Para el estudio de la dinámica de extracción de antocianos durante la maceración, se realizó una vinificación de 1000 kg de la uva Monastrell.

La uva se vendimió de forma manual en cajas de 20 kg, siendo transportada rápidamente a la bodega experimental de Jumilla. Se controló el peso y se introdujo en la cámara frigorífica durante una noche para que el inicio de la maceración tuviera lugar a baja temperatura.

La elaboración se condujo de acuerdo a las costumbres de las Denominaciones de Origen de la Región de Murcia. La uva se despallilló y estrujó, añadiéndole SO<sub>2</sub> a razón de 8 g por cada 100 kg de uva. La pasta de cada una de las distintas elaboraciones se encubó durante 24 horas en un depósito grande, tras lo cual se procedió a su reparto en depósitos de

100 kg, para intentar así homogeneizar en lo posible la masa de vinificación. En este momento se tomó una muestra de mosto y se procedió a analizar el pH, la acidez total, el grado Baumé y los ácidos málico y tartárico. Dependiendo de los resultados de acidez total y pH obtenidos se procedió a la corrección de acidez con ácido tartárico hasta 5,5 g/L y a la adición del pie de cuba, Fermirouge (Gist-Brocades, Seclin, Francia), en una dosis de 20 g/hL.

La temperatura de fermentación se controló entre 23 y 28°C, realizándose medidas de temperatura y densidad del mosto dos veces al día. Se llevaron a cabo dos removidos diarios del depósito para favorecer la maceración, que tuvo una duración de 15 días, prensándose al finalizar este periodo hasta un rendimiento del 65%.

Finalizada la fermentación alcohólica tiene lugar la fermentación maloláctica, durante la cual se controló la temperatura para que ésta no bajase de los 18°C. Además, se realizaron de 1 a 3 trasiegos, en función de la formación de SH<sub>2</sub> en los depósitos, manteniendo siempre el espacio de cabeza con CO<sub>2</sub> para evitar posibles oxidaciones en el vino.

Concluida la fermentación maloláctica, los vinos se trasegaron, se adicionó SO<sub>2</sub> y a continuación se estabilizaron a -3°C. Tras el proceso de estabilización por frío, los vinos fueron embotellados y conservados en el sótano de la bodega a una temperatura constante de 15°C.

### **3.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS EN EL VINO.**

#### **3.5.1. DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS.**

En el mosto-vino, previamente centrifugado y exento de CO<sub>2</sub>, durante el proceso de elaboración y en el vino terminado se analizaron la intensidad de color, tono, parámetros CIELab, antocianos totales, compuestos fenólicos totales y parámetros de copigmentación. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro UV/visible Shimadzu modelo 1603PC (Shimadzu, Duisburg, Alemania) y los resultados se

refieren a celdas de 1 cm de paso óptico. El pH del vino fue ajustado a pH 3,6 antes de realizar todas las determinaciones, excepto para el análisis del contenido en antocianos totales y en compuestos fenólicos totales.

Los métodos utilizados para la determinación del contenido en antocianos totales y en compuestos fenólicos totales fueron los mismos que los descritos para el mosto (apartado 3.3.3).

### **3.5.1.1. Intensidad de color y tono.**

El valor de la intensidad de color se determinó espectrofotométricamente mediante la suma de las absorbancias a 620 (componente azul), 520 (componente roja) y 420 nm (componente amarilla) del mosto sin diluir utilizando cubetas de 0,2 cm de paso óptico (Glories, 1978).

$$IC = A_{620} + A_{520} + A_{420}$$

El tono se calcula como el cociente entre las absorbancias a 520 y 420 nm (Sudraud, 1958).

$$\text{Tono} = A_{520} / A_{420}$$

### **3.5.1.2. Parámetros CIELab.**

Los parámetros CIELab se obtuvieron espectrofotométricamente mediante la medida de la absorbancia en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 380 y 780 nm, con celdas de 0,2 cm de espesor y referidas a un observador de 10°, e iluminante D65. Para ello el espectrofotómetro estaba conectado a un ordenador con un programa específico de color que realiza el cálculo directo de los parámetros CIELab L\*, a\*, b\*, C\* y H.

### **3.5.1.3. Parámetros de copigmentación.**

El cálculo de los parámetros de copigmentación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Levengood y Boulton (2004). Para la

obtención de estos parámetros es necesaria la determinación de varias medidas espectrofotométricas:

- $A_{280}$  y  $A_{365}$ : La preparación de la muestra es igual para la obtención de estos dos valores. En un vaso de precipitados de 150 mL se añadieron 50 mL de agua a 0,5 mL de muestra de vino. Se agitó y se midió la absorbancia en cubetas de 1 cm de paso óptico a 280 y 365 nm, respectivamente.

En el vino previamente ajustado a pH 3,6 se determinó:

- $A_{acet}$ : Se adicionaron 20  $\mu$ L de acetaldehído al 10% a 2 mL de la muestra de vino, agitándose inmediatamente. Después de 45 min, se midió la absorbancia a 520 nm en celdas de 0,1 cm de espesor. La medida se expresa referida a cubetas de 1 cm de paso óptico.
- $A_{20}$ : En un tubo de 10 mL se mezclaron 200  $\mu$ L de vino y 3,8 mL de vino sintético (24 mL de etanol absoluto, 176 mL de agua destilada y 0,5 g de bitartrato pótasio, ajustando el pH a 3,6). Se agitó y a los 10 min se midió la absorbancia a 520 nm en cubetas de 1 cm de espesor.
- $A_{SO_2}$ : 160  $\mu$ L de  $SO_2$  al 5% se añadieron a 2 mL de muestra. Se agitó y tras 1 min se midió la absorbancia a 520 nm en cubetas de 0,2 cm de paso óptico.

Con los resultados de estas analíticas se obtuvieron los siguientes resultados:

- Color del vino debido a antocianos copigmentados:  $C = A_{acet} - A_{20}$
- Antocianos totales:  $TA = A_{20} - A_{SO_2}$
- Color debido a pigmentos poliméricos:  $Ep P = A_{SO_2}$
- Estimación del contenido en el factor flaconas:  $FC = A_{365}$

- Estimación de fenoles totales (monómeros y taninos):  $TP = A_{280}$
- Fracción de color debido a copigmentación =  $(A_{acet} - A_{SO_2}) / A_{acet}$
- Fracción de color debido a antocianos libres =  $(A_{20} - A_{SO_2}) / A_{acet}$
- Fracción de color debido a pigmentos poliméricos =  $A_{SO_2} / A_{acet}$

### **3.5.1.4. Taninos totales.**

La determinación de taninos se realizó mediante el método descrito por Harbertson et al. (2002). El ensayo se basa en la capacidad de los taninos para precipitar proteínas en una disolución de albúmina de suero bovino (BSA), redisolviendo el precipitado resultante y determinando la cantidad de taninos mediante reacción con cloruro férrico. Este procedimiento produce una muestra coloreada que puede ser cuantificada mediante la lectura de la absorbancia a 510 nm.

La muestra se diluyó con un tampón de etanol al 12% (v/v) (1:1 en el caso de los vinos analizados) y 5 g/L de bitartrato de potasio ajustado a pH 3,3 con HCl. En un tubo de microcentrifuga se colocó 1 mL de tampón de albúmina de suero bovino (BSA) (ácido acético 200 mM, 170 mM de NaCl ajustado a pH 4,9 con NaOH y 1 mg/mL de BSA) y 500  $\mu$ L del extracto diluido, la mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 15 minutos en agitación lenta. Después de la incubación, la muestra se centrifugó en una microcentrifuga Heraeus modelo Biofuge pico (Heraeus Instruments, Osterode, Alemania), 5 min a 13000 rpm para precipitar el complejo tanino-proteína. El precipitado se lavó con 250  $\mu$ L del mismo tampón utilizado para disolver la BSA (ácido acético 200 mM y NaCl 170 mM, ajustado a pH 4,9 con NaOH, sin BSA) y la muestra se volvió a centrifugar durante 1 min a 13000 rpm para precipitar el complejo tanino-proteína de nuevo. La disolución de lavado se eliminó y se añadieron 2 mL de un tampón que contiene trietanolamina (TEA) al 5% (v/v) y dodecilsulfato de sodio (SDS). El tubo se mantuvo a temperatura

ambiente durante 10 min. Posteriormente, el tubo se agitó en un vortex hasta redissolver completamente el precipitado.

Como los vinos presentan una absorbancia base a 510 nm, la muestra se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min después de agitar y se midió la absorbancia base a 510 nm. Después de la lectura, se añadieron 125  $\mu$ L de reactivo de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$  10 mM en HCL 0,01 N) y después de 10 min se determinó nuevamente la absorbancia a 510 nm. La absorbancia debida a los taninos se obtiene restando la absorbancia base de la lectura final a 510 nm.

La adición del reactivo de cloruro férrico y las lecturas de la absorbancia se realizaron en un autoanalizador Sysrea modelo Easy Chem Plus (Analytical Technologies, Roma, Italia) utilizando tampón de TEA como blanco.

### **3.5.2. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ANTOCIANOS POR HPLC.**

Se realiza por inyección directa de la muestra (vino o mosto-vino) previamente filtrada (filtro de nylon de 0,45  $\mu$ m) en un cromatógrafo líquido Waters 2690 (Waters, PA, USA), equipado con un detector diodo-array Waters 996. La columna utilizada fue una Licrochart RP-C18 (Merk, Darmstadt, Alemania), 25 x 0,4 cm de 5  $\mu$ m de tamaño de partícula. El volumen de la muestra inyectada fue de 20  $\mu$ L y el análisis fue llevado a temperatura ambiente. Los disolventes utilizados fueron ácido fórmico al 4,5% y acetonitrilo, con un flujo de 1,5 mL/min.

Las condiciones de gradiente utilizadas y la identificación y cuantificación de los compuestos fueron los descritos en la determinación de los antocianos de los hollejos de la uva (3.3.4).

### **3.5.3. ANÁLISIS SENSORIAL.**

Se llevo a cabo una cata descriptiva de perfil. Los atributos a valorar fueron previamente fijados (Figura 3.5.1) y se le pidió a los catadores que cuantificaran la magnitud de las características del vino

que se pretendía describir. Estas características se dividieron en tres grandes grupos que hacían referencia al color, al aroma y al gusto. El panel de cata para este tipo de pruebas estaba formado por ocho catadores experimentados, miembros de la Estación Enológica de Jumilla.



**UNIVERSIDAD  
DE MURCIA**

DEPTO. DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS,  
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

*Facultad de Veterinaria*

---

FECHA:

CATADOR:

MUESTRA:

Puntuación (de 0 a 10). A mayor sensación mayor puntuación

COLOR:	Puntuación	GUSTO	Puntuación
INTENSIDAD		INTENSIDAD	
TONALIDAD		CALIDAD (ARMONÍA)	
<b>AROMA:</b>		CUERPO	
	Puntuación	EQUILIBRIO	
INTENSIDAD		PERSISTENCIA	
CALIDAD		AMARGOR	
AFRUTADO		ASTRINGENCIA	
VEGETAL		SEQUEDAD	
CONFUSURA		VERDOR	
ESPECIADOS		MADUREZ	
TOSTADOS			

Observaciones:

---

Campus Universitario de Espinardo  
Apartado de correos 4021 • 30071 Murcia

**Figura 3.5.1. Ficha de cata descriptiva**

### **3.6. ANÁLISIS DE LOS ORUJOS PROCEDENTES DE LAS VINIFICACIONES.**

#### **3.6.1. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ANTOCIANOS POR HPLC.**

Los orujos obtenidos tras el prensado de los vinos se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. Se pesaron 5 g de orujo previa eliminación de la semillas presentes en la muestra y se colocaron en un tubo con cierre hermético añadiéndose 50 mL de metanol. El tubo se mantuvo en una placa de agitación a 150 rpm, a temperatura ambiente durante 14 h. El extracto obtenido se filtró a través de un filtro de nylon de  $0,45\ \mu\text{m}$  y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en las mismas condiciones que el descrito anteriormente para los hollejos de las uvas, el mosto-vino y el vino (3.3.4).

#### **3.6.2. AISLAMIENTO DE LAS PAREDES CELULARES.**

El aislamiento de las paredes celulares de los orujos de vinificación se realizó mediante el método modificado descrito por Nunan et al. (1997).

Los orujos obtenidos tras el prensado de los vinos se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. Se pesaron 50 g de orujo previa eliminación de las semillas presentes en la muestra y se trituraron con nitrógeno líquido a  $4^{\circ}\text{C}$ . El polvo obtenido se resuspendió en 200 mL de etanol absoluto ( $4^{\circ}\text{C}$ ). La muestra se filtró secuencialmente a través de mallas de nylon con tamaño de poro de 350, 280 y  $71\ \mu\text{m}$  utilizando etanol al 80% (v/v) a  $4^{\circ}\text{C}$  para lavar. Al material retenido en la malla de  $71\ \mu\text{m}$  se le añadieron 25 mL de fenol saturado con tampón Tris/HCl 500 mM pH 7,5 (Huber, 1991) y se agitó durante 45 min a temperatura ambiente. La suspensión se filtró a través de una capa de Miracloth (lavado en agua MQ durante la noche) y se lavó con etanol al 80% (v/v) y acetona para eliminar el fenol. El material retenido se resuspendió en 40 mL de

cloroformo:metanol (1:1, v/v), se agitó durante 1 h y se filtró en un embudo de placa porosa. Esta operación se realizó por duplicado. El material obtenido se volvió a resuspender en 40 mL de acetona, se agitó durante 1 h y se filtró a través de un embudo de placa porosa.

Las paredes celulares obtenidas se secaron en un horno a 40°C a vacío durante toda la noche y se almacenaron en un desecador al vacío con gel de sílice.

### **3.6.3. ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES DE LAS PAREDES CELULARES.**

#### **3.6.3.1. Determinación de proteína.**

Se pesaron aproximadamente 10 mg de pared celular en un tubo de microcentrífuga y se añadió 1 mL de NaOH 1 N. La muestra se mantuvo 10 min a 100 °C en un baño de aceite. A continuación, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga Heraeus modelo Biofuge pico (Heraeus Instruments, Osterode, Alemania). A 10 µL del sobrenadante se le añadieron 0,79 mL de agua destilada y 0,20 mL de reactivo Bradford (Bio-Rad, Munich, Alemania). Las muestras se agitaron y después de 15 min se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV/visible Termo Spectronic modelo Helios Alpha (Termo Spectronic, Cambridge, Reino Unido). Las muestras son estables durante 2 h.

El ensayo se calibró con una curva estándar de albúmina de suero bovino (250 µg/mL), dando una concentración final en 0,8 mL entre 0 y 46,88 µg/mL (Bradford, 1976).

#### **3.6.3.2. Determinación de compuestos fenólicos.**

Se agregó 1 mL de NaOH 1 N a 10 mg de pared celular en un tubo de microcentrífuga, dejando la muestra 10 min a 100 °C en un baño de aceite. A continuación, se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga Heraeus modelo Biofuge pico (Heraeus Instruments,

Osterode, Alemania). Se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1 N, 910  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 40  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac, Barcelona, España) diluido con agua destilada, 1:2. Las muestras se agitaron y después de 1 h se midió la absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro UV/visible Termo Spectronic modelo Helios Alpha (Termo Spectronic, Cambridge, Reino Unido).

El ensayo se calibró con una curva estándar de ácido gálico (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dando una concentración final en 920  $\mu\text{L}$  entre 0 y 16,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **3.6.3.3. Determinación de azúcares neutros.**

Este método es comúnmente conocido como “método de los acetatos de alditol” (Blakeney et al., 1983). Los polisacáridos se hidrolizan en medio ácido en sus correspondientes azúcares. Los azúcares son entonces reducidos con borohidruro de sodio para formar sus correspondientes alditoles y acetilados con 1-metilimidazol como catalizador, para formar los derivados volátiles de los azúcares. Estos acetatos de alditol pueden ser separados y cuantificados mediante cromatografía de gases.

La determinación de los azúcares se realiza con o sin prehidrólisis de la muestra dependiendo de la fracción que se esté cuantificando, la de los polisacáridos no celulósicos o la de la celulosa y otros polisacáridos. Para hidrolizar los enlaces glicosídicos fuertemente unidos de la celulosa es necesario realizar una prehidrólisis en ácido sulfúrico al 72% a 100°C (llamada “hidrólisis de Saeman”).

#### **3.6.3.3.1. Hidrólisis de Saeman.**

Mediante este método se determinan todos los azúcares presentes, incluyendo los azúcares de la celulosa.

### *3.6.3.3.1.1. Prehidrólisis.*

En un tubo de 10 mL con tapón de rosca y junta de teflón se añadió 1 mL de una disolución de inositol (estándar interno) que contiene 1 mg/mL. Para determinar el factor de respuesta se añadió además a un tubo 1 mL de una disolución patrón (estándar externo) que contenía 1 mg/mL de ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa y se preparó un patrón independiente de fucosa (1 mg/mL) en otro tubo porque la separación con la ramnosa se puede dificultar. Se evaporó el agua con corriente de nitrógeno a 40°C.

Se añadió una cantidad conocida de muestra al tubo (aproximadamente 10 mg), manteniéndose los tubos en un baño de hielo y añadiéndose exactamente 0,45 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% (p/p). Se dejaron en un baño de agua a 30°C durante 1 h.

### *3.6.3.3.1.2. Hidrólisis.*

A los tubos se les añadieron exactamente 4,95 mL de agua destilada, mezclándose en un vortex y calentándose en un baño de aceite a 100°C durante 3 h, se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante la noche. A continuación se procedió a la reducción.

### **3.6.3.3.2. Hidrólisis directa sin prehidrólisis.**

Mediante este método se determinan todos los azúcares presentes excepto los de la celulosa.

En un tubo de 10 mL con tapón de rosca y junta de teflón se añadió 1 mL de una disolución de inositol que contiene 1 mg/mL. Para determinar el factor de respuesta se añadieron además a dos tubos 1 mL de una disolución patrón que contenía 1 mg/mL de ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa. Se preparó un patrón independiente de fucosa (1 mg/mL), porque su separación de la ramnosa puede no ser total.

Se evaporó el agua con corriente de nitrógeno a 40°C. Se añadió una cantidad conocida de muestra al tubo (aproximadamente 10 mg), manteniéndose los tubos en un baño de hielo y adicionándose exactamente 4,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M, se mezcló bien en un vortex y se calentó en un baño de aceite a 100°C durante 3 h. Se enfrió a temperatura ambiente durante la noche. El proceso continuó con la reducción.

#### **3.6.3.3.3. Reducción.**

En un tubo de ensayo de 10 mL se colocó 1 mL del hidrolizado anterior y 0,30 mL de una disolución de NH<sub>3</sub> al 25%, se midió el pH (si era menor de 7, se añadía más disolución de NH<sub>3</sub>) y se adicionaron 0,10 mL de una disolución de NH<sub>3</sub> 3 M, que contenía 150 mg/mL de NaBH<sub>4</sub> (preparado al momento). Los tubos se colocaron en un baño de agua a 30°C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se enfriaron en hielo, añadiéndose 2 volúmenes de 0,10 mL de ácido acético (para eliminar el exceso de NaBH<sub>4</sub>) y se midió el pH (si era mayor de 5 se añadía más ácido acético).

#### **3.6.3.3.4. Acetilación.**

En un tubo de rosca con junta de teflón se colocaron 0,30 mL de muestra y se enfrió en hielo. Se adicionaron 0,45 mL de 1-metilimidazol y 3,0 mL de anhídrido acético. Los tubos se cerraron, mezclándose en un vortex y manteniéndose en un baño de agua a 30°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se enfriaron en hielo y se añadieron 4,5 mL de agua destilada y 3 mL de diclorometano. Se mezcló en un vortex y se centrifugó. Se eliminó la capa superior por aspiración, se añadieron 3 mL de agua destilada y 2 mL de diclorometano, se agitó en un vortex, se centrifugó y se volvió a eliminar la capa superior por aspiración. Esta operación se repitió dos veces con 3 mL de agua destilada. El diclorometano se evaporó con corriente de nitrógeno a 40°C y se añadió 1 mL de acetona, evaporándola hasta sequedad con corriente de nitrógeno

a 40°C, se repitió una vez más. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente.

### **3.6.3.3.5. Cuantificación de los acetatos de alditol.**

El análisis se llevó a cabo mediante cromatografía de gases (GC) en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies, modelo 6890N (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con detector de ionización de llama (FID). La adquisición y procesamiento de la información cromatográfica se realizó con el sistema ChemStation (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La separación de los compuestos se consiguió con una columna capilar de sílice fundida de 30 m x 0,25 mm y 0,2 mm de espesor, SP® 2380 (Supelco, PA, USA) a un flujo constante de 2,0 mL/min, utilizando helio como gas portador. La temperatura del horno fue inicialmente de 211°C, manteniéndose durante 10 min, después se incrementó hasta 250°C a una velocidad de 5 °C/min manteniéndose durante 12 min. La temperatura del inyector fue de 270°C y del detector 275°C. El volumen de inyección fue de 2 µL y la relación de división de flujo de 25:1.

La cuantificación de los acetatos de alditol se realizó determinando el factor de respuesta de los derivados de los azúcares patrones, junto con los valores de las muestras, tomando como valor de referencia el inositol (estándar interno).

### **3.6.3.4. Determinación de ácidos urónicos.**

La determinación de los ácidos urónicos se realizó mediante el método de Scott (1979). Este método se basa en la reacción para formar un compuesto coloreado entre el ácido 5-formil-2-furanoico y el 3,5-dimetilfenol. El ácido 5-formil-2-furanoico se forma a partir de los ácidos urónicos en medio ácido sulfúrico caliente.

En un tubo de ensayo se colocaron 250 µL de muestra proveniente de la hidrólisis de Saeman o de la muestra sin prehidrólisis. A

continuación, se mantuvo el tubo en un baño de agua-hielo y se añadieron 4 mL de ácido sulfúrico concentrado y frío y se agitó. La muestra se mantuvo en un baño a temperatura ambiente durante 1 min y después se traspasó a un baño a 70°C durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se enfrió a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 µL de 3,5-dimetilfenol para formar un compuesto coloreado, esta reacción dura 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia de la muestra se determinó por sustracción de la lectura a 397 nm de la de 450 nm en un espectrofotómetro UV/visible Termo Spectronic modelo Helios Alpha (Termo Spectronic, Cambridge, Reino Unido). La lectura a 397 nm se realiza para corregir la interferencia producida por los azúcares neutros. Para obtener el blanco se sustituyó la muestra por agua.

El ensayo se calibró con una disolución de ácido D-(+)-galacturónico monohidrato de 500 µmoles/L, se prepararon diluciones para obtener concentraciones entre 0 y 500 µmoles/L. 250 µL de cada una de estas disoluciones se sometieron al análisis y se midió su absorbancia frente a un blanco.

#### **3.6.3.5. Determinación del grado de metilación y acetilación de pectinas.**

Después de la saponificación de los grupos ésteres con NaOH en una mezcla de agua-isopropanol, la liberación de ácido acético y metanol se analizan por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El método para determinar el grado de esterificación es el descrito por Voragen et al. (1986).

En un tubo Eppendorf de 2 mL se pesó una cantidad conocida de pared celular, aproximadamente 30 mg. Las muestras se colocaron en un baño de hielo-agua. Se añadieron 2 mL de NaOH 0,4 N en agua-isopropanol (este reactivo debe estar a temperatura ambiente), agitándose los tubos en un vortex durante la adición de la mezcla NaOH-isopropanol para evitar la formación de burbujas en la muestra. Los tubos se cerraron y se mantuvieron en el baño de agua-hielo durante 1 h y, a

temperatura ambiente, durante 2 h más, agitándolos 2 ó 3 veces durante este tiempo. Después, las muestras se centrifugaron durante 5 min a 13000 rpm en una microcentrífuga Heraeus modelo Biofuge pico (Heraeus Instruments, Osterode, Alemania) y se transfirieron rápidamente a viales para HPLC, asegurándose que las muestras estaban completamente claras, para no causar problemas en el cromatógrafo.

El ensayo se calibró preparando dos disoluciones, una que contenía 2000 ppm de ácido acético y otra 2000 ppm de metanol.

El análisis se llevó a cabo mediante HPLC en un cromatógrafo líquido provisto de un automuestreador Kontron modelo 360 (Kontron Instruments, Gosheim, Alemania), una bomba Merck-Hitachi modelo L-6200A (Merck Hitachi, Tokio, Japón) y detector de índice de refracción LaChrom modelo L-7490 (Merck, Darmstadt, Alemania). La adquisición y procesamiento de la información cromatográfica se realizó con el sistema Peak Net® (Dionex corporation, CA, USA). La separación de los compuestos tuvo lugar en una columna ORH-801 provista de una precolumna ORH-801 (Interaction, CA, USA) (5 µm de tamaño de partícula), a 35°C en un horno de temperatura controlada (Jones Chromatography, Wales, Reino Unido) y a un flujo 0,7 mL/min, utilizando ácido sulfúrico 5 mM como eluyente.

### **3.7. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PRESENTES EN LOS PREPARADOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES PARA LA EXTRACCIÓN DE COLOR.**

Se llevó a cabo una caracterización de las actividades enzimáticas presentes en algunos de los principales preparados enzimáticos comerciales para extracción de color en vinificaciones en tinto disponibles en el mercado. Las actividades enzimáticas que se determinaron fueron: poligalacturonasa total y endo-poligalacturonasa (PG total y endoPG), celulasa, xilanasa, galactanasa, pectato y pectin liasa, pectín

metilesterasa,  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y proteasa.

### **3.7.1. ACTIVIDADES POLIGALACTURONASA (PG) Y ENDO-POLIGALACTURONASA (EndoPG).**

La medida de la actividad PG total se basa en la valoración espectrofotométrica de los extremos reductores generados por el enzima al hidrolizar los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) de la cadena poligalacturónica, mediante el método de Nelson (1944).

Este método se fundamenta en la reducción del cobre (II) a cobre (I) y posterior reacción con reactivo arsenomolibdico, para dar lugar a complejos azules de molibdeno, midiéndose espectrofotométricamente el color azul que se desarrolla.

A un tubo que contiene 1 mL de reactivo de cobre, preparado con 25 volúmenes de reactivo A (25 g de carbonato sódico anhidro, 20 g de bicarbonato sódico, 25 g de tartrato potásico y 200 g de sulfato sódico anhidro en un volumen final de 1000 mL de agua destilada) y 1 volumen de reactivo B (sulfato de cobre (II) pentahidratado al 15% en agua con 1 mL de ácido sulfúrico por 1000 mL de disolución), se le añade 1 mL de muestra y se sumerge 20 min en un baño de agua hirviendo. Se deja enfriar y se añade 1 mL de reactivo arsenomolibdico (25 g de molibdato amónico tetrahidratado en 450 mL de agua y se adiciona 21 mL de ácido sulfúrico concentrado, 3 g de arseniato disódico heptahidratado en 25 mL de agua destilada, se mezclan ambas disoluciones y se incuba a 37°C durante 24 horas). El tubo (previamente tarado) se lleva a un peso final de disolución de 25 g, se agita y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro UV/visible Termo Spectronic modelo Helios Alpha (Termo Spectronic, Cambridge, UK) a 520 nm frente a un blanco donde se sustituye la muestra por el tampón acético/acetato.

EL ensayo se calibró preparando una recta patrón de ácido D-(+)-galacturónico monohidratado con concentraciones comprendidas entre 0 y 3000  $\mu\text{moles/L}$ .

Las condiciones para la reacción enzimática fueron las siguientes. El sustrato utilizado fue ácido poligalacturónico (Serva, Heidelberg, Alemania) al 0,5% (p/v), disolviéndose en tampón acético/acetato de sodio 50 mM (pH 3,80). El preparado enzimático comercial se diluyó en el mismo tampón hasta una concentración de 500 ppm. El ratio enzima/sustrato fue de 1/5 (v/v) y la temperatura de reacción 37°C. Se tomaron muestras cada 5 min en un intervalo de 20 min. La reacción se paraba al añadir la muestra al reactivo de cobre de Nelson. Se continuó con el procedimiento descrito para la determinación de azúcares reductores.

Una unidad de actividad PG total se expresa como la actividad necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de grupos reductores (como ácido monogalacturónico) por minuto en las condiciones del ensayo.

La actividad endoPG se determinó viscosimétricamente. Este método se basa en la disminución de la viscosidad del sustrato al actuar la poligalacturonasa e ir despolimerizando la cadena de ácido poligalacturónico (Pharr y Dickinson, 1973). Las condiciones de reacción fueron las mismas que para la actividad PG total, aunque se aumentó la concentración de la disolución del enzima comercial a 1000 ppm. Se midió, periódicamente, el tiempo que tardaba en pasar el medio de reacción a través de dos enrases, en un viscosímetro tipo Otswald-Canon Fenske nº100 (Proton, Barcelona, España). La calibración del viscosímetro se realizó con agua destilada, midiendo el tiempo necesario para atravesar los dos enrases a la temperatura de reacción.

Una unidad de actividad endoPG equivale a la actividad necesaria para aumentar la fluidez en una unidad por minuto en las condiciones del ensayo.

### **3.7.2. ACTIVIDADES CELULASA, XILANASA Y GALACTANASA.**

La determinación de las actividades celulasa, xilanasa y galactanasa se realizó mediante el método de los azúcares reductores de Nelson. Las condiciones de reacción fueron las mismas que las descritas para la actividad PG total, pero utilizando como sustrato carboximetilcelulosa (Serva, Heidelberg, Alemania), xilano (Sigma, MO, USA) al 0,2% (p/v) y arabinogalactano (Sigma, MO, USA), respectivamente. La concentración de la disolución de preparado enzimático comercial fue de 3000 ppm para medir la actividad celulasa, 2000 ppm para la xilanasa y 1000 ppm para la galactanasa.

Una unidad de actividad celulasa, xilanasa o galactanasa se expresa como la actividad necesaria para producir un  $\mu\text{mol}$  de grupos reductores (como ácido monogalacturónico) por minuto en las condiciones descritas.

### **3.7.3. ACTIVIDADES PECTATO Y PECTÍN LIASA.**

Las actividades pectato y pectín liasa se determinaron espectrofotométricamente, midiendo el aumento de la absorbancia a 235 nm debido a los dobles enlaces entre el C-4 y el C-5 formados por la  $\beta$ -eliminación que provocan estas enzimas (Fogarty y Kelly, 1990; Membré y Burlot, 1994). Como sustrato se utilizó 0,5% (p/v) de ácido poligalacturónico (Serva, Heidelberg, Alemania) en tampón acético/acetato sódico 50 mM, pH 3,80, para la determinación de la actividad pectato liasa y pectina de *Citrus* (Serva, Heidelberg, Alemania) en las mismas condiciones para la pectín liasa. La concentración de enzima fue de 2000 ppm para la medida de la actividad pectato liasa y de 500 ppm para la pectín liasa. El aumento de la absorbancia a 235 nm, que se llevó a cabo de manera continua durante dos horas a 25°C frente a un blanco donde se adicionó tampón acético/acetato en vez de enzima, se siguió en un espectrofotómetro UV/visible Termo Spectronic modelo Helios Alpha (Termo Spectronic, Cambridge, UK).

Una unidad de actividad liasa se define como la actividad necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de dobles enlaces ( $\epsilon=4600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por minuto en las condiciones del ensayo.

### 3.7.4. ACTIVIDAD PECTÍN METILESTERASA (PME).

La actividad PME se determinó mediante valoración de los grupos carboxílicos liberados por el enzima en una pectina de alto metoxilo a una concentración de 0,5% (p/v) en agua destilada (Förster, 1988), utilizando un valorador automático 702 SM modelo Trinito (Metrohm, Herisau, Suiza). Se ajustó el pH del sustrato a 4,50, se añadió el enzima y se volvió a ajustar el pH si éste había cambiado. Se fue valorando con 0,01N NaOH durante 5 minutos para mantener el pH constante a 4,50. El ratio enzima/sustrato fue de  $\frac{1}{4}$  (v/v) y la reacción tuvo lugar a 25°C. La concentración del preparado enzimático comercial fue de 500 ppm.

Una unidad de actividad PME se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1  $\mu\text{mol}$  de grupos carboxílicos libres (como mL de 0,01 N NaOH) por minuto en las condiciones descritas.

### 3.7.5. ACTIVIDADES $\alpha$ -GALACTOSIDASA Y $\beta$ -GALACTOSIDASA.

Las actividades  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -galactosidasa se determinan espectrofotométricamente usando como sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -galactósido y p-nitrofenil- $\beta$ -galactósido (Sigma, MO, USA) al 0,12% (p/v) respectivamente (Barnavon et al., 2000), en tampón acético/acetato 50 mM, pH 3,80. El ratio enzima/sustrato fue de 1/2. Las muestras se incubaron a 40°C durante 15 min y la reacción se detuvo por adición de 0,6 mL de carbonato de sodio 1 M. La absorbancia de las disoluciones se midió a 405 nm, utilizando un blanco donde se sustituyó el enzima por tampón en un autoanalizador Systea modelo Easy chem plus (Analytical Technologies, Roma, Italia). La actividad del enzima se determinó restando el valor del blanco al valor de la absorbancia de las muestras.

El ensayo se calibró con una curva estándar de p-nitrofenol, dando una concentración final entre 0 y 150  $\mu$ moles en el volumen de reacción.

La cantidad de p-nitrofenol liberado permite la determinación de las actividades específicas  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -galactosidasa, donde una unidad es equivalente a la cantidad de enzima requerido para liberar 1 nmol de p-nitrofenol por minuto a 40°C.

#### **3.7.6. ACTIVIDAD $\beta$ -GLUCOSIDASA.**

La cuantificación de la actividad  $\beta$ -glucosidasa se determinó espectrofotométricamente midiendo la cantidad de p-nitrofenol liberado por la actuación del enzima (Spagna et al., 2002; Hernández et al., 2003).

El sustrato utilizado fue 0.5% (p/v) p-nitrofenol- $\beta$ -D-glucopiranosido (Sigma, MO, USA) en tampón acético/acetato sódico 50 mM, pH 3,80. La relación enzima/sustrato fue 1/5 (v/v) y la temperatura de reacción 37°C. La concentración de la disolución de preparado enzimático comercial fue de 1000 ppm. Se tomaron muestras cada 15 minutos durante 1 hora. La reacción se detuvo añadiendo 1 mL de carbonato sódico 0,25 M, que permite el desarrollo del color para la lectura espectrofotométrica a 405 nm en un espectrofotómetro UV/visible Termo Spectronic modelo Helios Alpha (Termo Spectronic, Cambridge, UK).

Una unidad de actividad  $\beta$ -glucosidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol ( $\epsilon=18300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) por minuto en las condiciones del ensayo.

#### **3.7.7. ACTIVIDAD PROTEASA.**

La medida de la actividad proteasa se llevó a cabo mediante el método descrito por Adler-Nilssen (1979) de determinación del grado de hidrólisis sufrida por las proteínas. Este método se basa en la medida espectrofotométrica a 340 nm del cromóforo que se forma por reacción entre el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y los grupos amino liberados por la acción del enzima proteolítico.

A 0,25 mL de muestra se le añadieron 2 mL de tampón fosfato de sodio 0,2 M pH 8,20 y 2 mL de TNBS al 0,1%. Seguidamente se incubó la muestra a 50°C durante 1 hora en oscuridad. Se enfriaron los tubos y se añadieron 4 mL de ácido clorhídrico 0,1 N. El incremento en la absorbancia a 340 nm se midió en un espectrofotómetro UV/visible Termo Spectronic modelo Helios Alpha (Termo Spectronic, Cambridge, UK).

El ensayo se calibró preparando una recta patrón de concentraciones de 1000 hasta 5000  $\mu$ M de L-leucina disuelta en tampón acético/acetato 50 mM, pH 3,80.

Las condiciones de reacción fueron las descritas anteriormente para la actividad PG total, utilizando hemoglobina (Sigma, MO, USA) como sustrato. La concentración del enzima comercial fue de 4000 ppm y se tomaron muestras a los 0, 30, 60 y 90 minutos.

Una unidad de actividad proteasa se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1  $\mu$ mol de grupos amino libres por minuto en las condiciones del ensayo.

### **3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

El análisis de la varianza se ha utilizado para determinar si existen diferencias significativas entre las medias. La separación de medias se ha realizado aplicando el test LSD. También se han realizado análisis de correlación que miden la relación lineal entre dos variables.

El manejo de un número tan elevado de datos y variables obliga al uso de técnicas estadísticas multivariantes, cuyo objetivo fundamental consiste en resumir y sintetizar grandes conjuntos de variables, en función de ciertos objetivos, de cara a obtener informaciones válidas que permitan una mejor comprensión del fenómeno objeto de estudio.

Los análisis multivariantes utilizados en este estudio incluyen el análisis multivariable de la varianza, conocido como MANOVA (Multivariate Analysis of Variance) que es la extensión del análisis de la

varianza al caso de más de una variable dependiente y se utiliza para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre varios factores, cada uno de ellos con diversos grupos, en base a un conjunto de variables dependientes. Así mismo, se ha utilizado el Análisis de Componentes Principales que es una técnica de reducción de la información disponible cuando se dispone de muchas observaciones.

Todos los análisis estadísticos han sido realizados utilizando el paquete estadístico Statgraphics 3.0 Plus (StatPoint Inc, Virginia, USA).



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**



#### **4.1. DINÁMICA DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA UVA AL VINO Y CARACTERÍSTICAS DE LAS PAREDES CELULARES DE LOS ORUJOS OBTENIDOS.**

Los compuestos fenólicos, principalmente antocianos, son responsables del color en vinos tintos. En la mayoría de las variedades de *Vitis vinifera*, los monoglucósidos de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina y sus acilados son los antocianos predominantes, aunque las proporciones varían entre variedades.

El perfil de antocianos en vinos terminados es bastante diferente al observado en las pieles de las uvas (García-Beneytez et al., 2002). Este cambio parece tener lugar durante la fermentación y las diferencias encontradas entre uvas y vinos pueden deberse a diferencias en el ratio de extracción de los antocianos, la reacciones de degradación y polimerización y a la distinta capacidad de adsorción en las paredes celulares de las levaduras (Revilla et al., 2001).

Los antocianos se encuentran localizados en la piel de las uvas tintas y se transfieren al mosto durante la maceración. La extracción de estos compuestos es esencialmente un proceso de difusión, estando el ratio y extensión de la extracción influenciados por la concentración y la localización de estos compuestos en la baya y por los métodos de elaboración del vino. La difusión puede verse afectada, así mismo, por la temperatura, el gradiente de concentración entre la piel de la uva y el vino, el equilibrio químico y las reacciones que se dan durante la vinificación.

Los máximos niveles de antocianos en el mosto/vino se obtienen durante los primeros días de maceración, no aumentando en los días posteriores (Nagel y Wulf, 1979; Somers, 1980; Ribereau-Gayon, 1982; Gil-Muñoz et al., 1999; Gómez-Plaza et al., 2001), aunque en las pieles quede un 30-40% de los antocianos iniciales (Singleton y Esau, 1969; Van Balen, 1984).

En esta parte del trabajo se estudió la dinámica de extracción de los antocianos de las pieles de uva durante la vinificación de uva Monastrell y la acumulación de éstos en el vino durante el mismo periodo, para comprobar cual era el mecanismo de transferencia de los antocianos de la uva al vino. Para ello se vinificó uva de la variedad Monastrell en su punto óptimo de madurez y se analizó el contenido en antocianos, tanto en las pieles de la uva como en el vino y los orujos, a lo largo de la vinificación.

#### 4.1.1. EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.

La Tabla 4.1.1. muestra el contenido en antocianos en las pieles de uva Monastrell en el momento de la vendimia y el porcentaje relativo de los diferentes compuestos encontrados. La composición en antocianos está determinada principalmente por factores genéticos. La cantidad puede estar influenciada por las condiciones estacionales, pero no la distribución de los distintos compuestos (Arozarena et al., 2002).

**Tabla 4.1.1.** Contenido en antocianos de la uva Monastrell en el momento de la vendimia.

Antociano	Contenido en Antocianos		
	µg/g de piel	%	mg/kg de baya
Del	858,0 ± 43,2	10,2	102,5 ± 22,6
Cian	528,5 ± 10,7	6,3	63,5 ± 18,3
Pet	1002,9 ± 20,3	11,9	119,6 ± 24,3
Pn	763,8 ± 56,0	9,1	91,6 ± 25,8
Malv	3800,4 ± 272,7	45,2	453,5 ± 84,2
Del acetato	22,2 ± 1,7	0,2	2,4 ± 0,8
Cian acetato	18,8 ± 0,4	0,2	2,2 ± 0,6
Pet acetato	36,3 ± 6,6	0,4	4,3 ± 0,8
MalvAc+DelC	272,7 ± 15,3	3,2	32,3 ± 6,6
Cian cumarato	101,1 ± 1,4	1,2	12,1 ± 3,0
Pet cumarato	152,2 ± 11,6	1,8	18,1 ± 3,5
Pn cumarato	118,1 ± 6,1	1,4	14,2 ± 4,4
Malv cumarato	694,8 ± 64,1	8,2	82,8 ± 13,3

<sup>a</sup>Abreviaturas: Del: Delfinidina-3-monoglucósido; Cian: Cianidina-3-monoglucósido; Pet: Petunidina-3-monoglucósido; Pn: Peonidina-3-monoglucósido; Malv: Malvidina-3-monoglucósido; MalvAc: malvidina acetato; DelC: Delfinidina cumarato.

La suma de los antocianos en las pieles de uva Monastrell en el momento de la vendimia alcanzó los 8369,6 µg/g de piel (999,8 mg/kg de baya), siendo estos resultados similares a los encontrados por Fernández-López et al. (1992).

En cuanto a la distribución de los compuestos, los antocianos monoglucósidos representaron el 83% y los derivados acilados el 17%. Los monoglucósidos trihidroxilados se presentaron en mayor proporción que los dihidroxilados. Se ha establecido que las variedades con un alto contenido en antocianos trihidroxilados (delfinidina, petunidina y malvidina) son variedades muy pigmentadas (Fernández-López et al., 1998) y dan vinos con un color más estable.

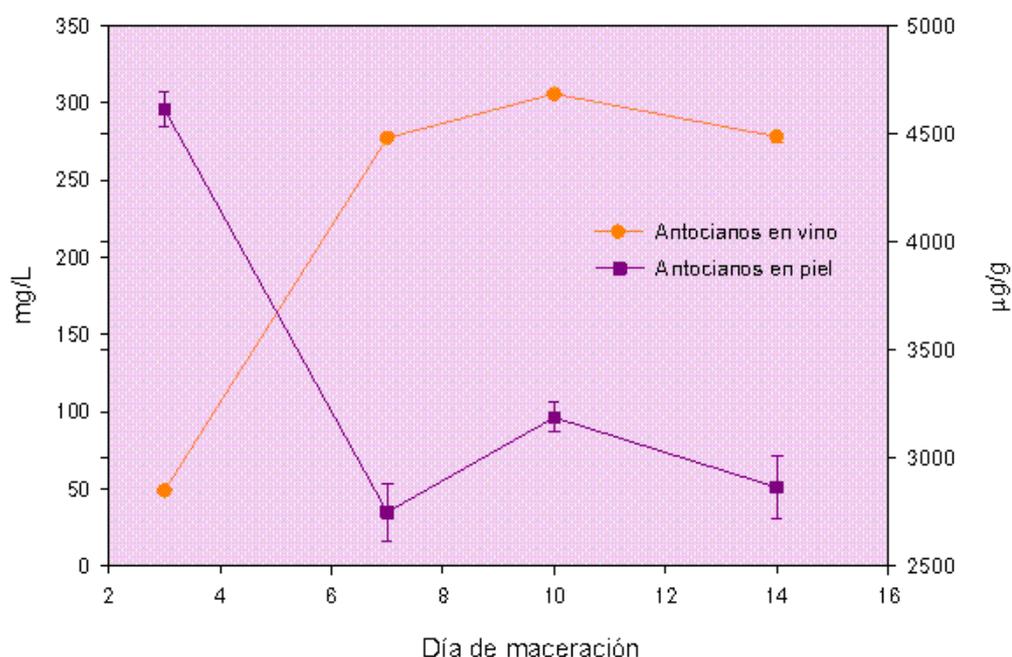
Así mismo, Monastrell es una variedad con una alta proporción de malvidina-3-glucósido si se compara con otras como Tempranillo, Syrah o Cabernet Sauvignon (Revilla et al., 2001; García-Beneytez et al., 2002). Las proporciones encontradas entre los diferentes compuestos son muy similares a las publicadas por Fernández-López et al. (1995), aunque difieren levemente de las de García-Beneytez et al. (2002 y 2003) que observó niveles menores en la proporción de delfinidina-3-glucósido. En vista de estos resultados, hay que tener en cuenta que incluso en distintos clones de la misma variedad se han encontrado diferencias en la proporción de los distintos antocianos (Revilla et al., 2001).

Se detectaron algunos derivados acetilados, aunque Fernández-López et al. (1992) estableció que en Monastrell no estaban presentes, probablemente debido a que en sus estudios éstos fueron hidrolizados por el uso de disolventes ácidos para la extracción de los antocianos (Revilla et al., 1998).

La Tabla 4.1.2. y la Gráfica 4.1.1. muestran la evolución de los antocianos en las pieles de Monastrell durante la maceración. La concentración de antocianos en la piel decrece hasta el día 7, y permanece constante del día 7 al 14. Es importante señalar que el ratio de extracción parece ser similar para todos los compuestos puesto que,

aunque la concentración total disminuye, la distribución relativa de los antocianos en la piel sólo muestra pequeñas diferencias. Después de 14 días de maceración, la concentración en la piel de la uva fue el 34% de la cuantificada en el momento de la vendimia. La distribución, como ya se ha comentado, fue muy similar, exceptuando el caso de la cianidina y la peonidina-3-glucosido, que mostraban porcentajes relativos levemente menores que los encontrados en la piel de la uva antes de la maceración. Debido a que la extracción de los antocianos es claramente incompleta, se ha sugerido que se establece un equilibrio basado en la adsorción-desorción entre la concentración de los antocianos en la uva y en el vino y, cuando este equilibrio se alcanza, no se pueden extraer más antocianos (Boulton, 2001).

**Gráfica 4.1.1.** Evolución del contenido en antocianos totales en el vino y en la piel de la uva (suma de los antocianos separados y cuantificados por cromatografía líquida de alta resolución) durante la maceración.



**Tabla 4.1.2.** Contenido en antocianos en las pieles de las uvas estrujadas durante la maceración ( $\mu\text{g/g} \pm$  desviación estándar).

Día	Del <sup>a</sup>	Cian	Pet	Pn	Malv	Pet acetato	MalvAc+ DelC	Cian cumarato	Pet cumarato	Pn cumarato	Malv cumarato
3	468,5±38,7 (10,2) <sup>b</sup>	292,2±63,2 (6,4)	566,6±13,7 (12,4)	415,4±6,7 (9,8)	2060,7±66,9 (44,9)	18,8±2,0 (0,3)	128,9±13,0 (2,8)	75,8±6,2 (1,6)	78,1±6,3 (1,7)	67,5±1,8 (1,4)	371,3±64,1 (8,1)
7	332,1±27,2 (12,1)	129,2±28,7 (4,7)	383,4 ± 24,3 (13,8)	193,8±29,9 (7,1)	1264,1±29,9 (45,9)	15,3±0,8 (0,4)	71,3±2,2 (2,5)	47,4±2,4 (1,7)	51,3±2,4 (1,8)	34,2±1,9 (1,2)	228,4±6,0 (8,3)
10	383,7±37,4 (12,0)	106,3±18,7 (3,3)	458,1 ± 25,6 (14,4)	182,3±9,4 (5,7)	1526,1±9,4 (47,8)	nd <sup>c</sup>	77,0±1,9 (2,4)	66,8±3,4 (2,1)	63,0±3,4 (1,9)	37,1±3,7 (1,1)	272,9±10,4 (8,5)
14	333,5±24,4 (11,6)	89,7±6,0 (3,1)	404,9 ± 30,5 (14,1)	158,6±15,3 (5,5)	1403,9±15,3 (48,0)	nd	71,9±3,7 (2,5)	58,6±1,5 (2,0)	51,3±1,5 (1,7)	34,4±2,2 (1,2)	266,5±10,6 (8,9)

<sup>a</sup>Abreviaturas: Del: Delfinidina-3-monoglucósido; Cian: Cianidina-3-monoglucósido; Pet: Petunidina-3-monoglucósido; Pn: Peonidina-3-monoglucósido; Malv: Malvidina-3-monoglucósido; MalvAc: malvidina acetato; DelC: Delfinidina cumarato.

<sup>b</sup> En paréntesis aparece el porcentaje de cada antociano en las pieles de uva estrujadas.

<sup>c</sup> nd: no detectado

La evolución de los antocianos en el mosto/vino se muestra en la Tabla 4.1.3. y la Gráfica 4.1.1. El mayor incremento en la concentración de antocianos se observa entre los días 3 y 7 de la maceración. Desde el día 7 al 14 únicamente se dan pequeños cambios, aunque se observa una leve disminución en los antocianos monoméricos del día 10 al 14. Numerosos estudios indican que la máxima pigmentación y color se alcanzan durante la primera mitad en fermentaciones tradicionales y que un mayor tiempo de contacto entre las pieles y el mosto/vino no tiene ningún efecto en el aumento de la concentración de pigmentos (Nagel y Wulf, 1979; Somers, 1980; Ribereau-Gayon, 1982; Van Balen, 1984).

El ratio de derivados acilados fue menor en vinos que en uvas. A día 3 de maceración no se detectaban derivados acilados en el vino, mientras que la malvidina representaba el 74% del total de antocianos. A día 7, ya se detectaban algunos derivados acilados y el porcentaje de malvidina había caído hasta el 60,5%, manteniéndose esta proporción hasta el día 14. Como se puede observar, el perfil de antocianos en el vino, con una mayor proporción de malvidina-3-glucósido y menores cantidades de cianidina y peonidina monoglucósidos y de derivados acilados, difiere del de las uvas.

Aunque García-Beneytez et al. (2002) establecieron que la malvidina-3-glucósido es más fácilmente extraíble durante la vinificación, los datos de la Tabla 4.1.2. muestran que los ratios de extracción de los distintos antocianos fueron aproximadamente iguales. Revilla et al. (2001) también encontraron cantidades relativas mayores de malvidina-3-glucósido en vinos que en las uvas con las que éstos fueron elaborados. Estudiaron el porcentaje de antocianos en cuatro vinos de Tempranillo durante su envejecimiento y el perfil no cambió, aún utilizando diferentes técnicas de vinificación y de almacenamiento, por lo que cualquier cambio en el perfil antociánico parece ser que ocurrió durante la fermentación alcohólica.

**Tabla 4.1.3.** Contenido en antocianos en el mosto/vino durante la maceración (mg/L  $\pm$  desviación estándar).

Día	Del <sup>a</sup>	Clan	Pet	Pn	Malv	MalvAC+ DeIC	Clan cumarato	Pet cumarato	Pn cumarato	Malv cumarato	Color del vino <sup>d</sup>
<b>3</b>	3,2 $\pm$ 1,1 (6,8) <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 0,1 (2,4)	4,3 $\pm$ 0,8 (8,8)	3,8 $\pm$ 0,1 (8,0)	36,1 $\pm$ 0,7 (74,1)	nd <sup>c</sup>	nd	nd	nd	nd	4,9
<b>7</b>	23,2 $\pm$ 0,2 (8,3)	5,4 $\pm$ 0,1 (2,0)	32,2 $\pm$ 0,4 (11,6)	14,2 $\pm$ 0,4 (5,1)	168,1 $\pm$ 1,1 (60,5)	7,3 $\pm$ 0,8 (2,6)	1,8 $\pm$ 0,1 (0,6)	2,8 $\pm$ 0,1 (1,0)	2,8 $\pm$ 0,1 (1,0)	19,6 $\pm$ 0,3 (7,0)	13,2
<b>10</b>	26,3 $\pm$ 0,4 (8,6)	6,3 $\pm$ 0,2 (2,0)	35,9 $\pm$ 0,3 (11,7)	16,8 $\pm$ 0,3 (5,5)	182,2 $\pm$ 1,7 (59,6)	8,4 $\pm$ 0,7 (2,7)	2,0 $\pm$ 0,2 (0,6)	3,3 $\pm$ 0,1 (0,8)	2,9 $\pm$ 0,1 (0,9)	21,3 $\pm$ 0,1 (6,9)	14,8
<b>14</b>	23,5 $\pm$ 0,2 (8,4)	6,1 $\pm$ 0,3 (2,2)	32,7 $\pm$ 0,1 (11,7)	15,3 $\pm$ 0,3 (5,5)	173,2 $\pm$ 2,3 (62,3)	7,1 $\pm$ 0,2 (2,5)	nd	2,3 $\pm$ 0,1 (0,8)	2,0 $\pm$ 0,1 (0,7)	15,7 $\pm$ 0,4 (5,6)	15,2

<sup>a</sup> Abreviaturas: Ver tabla 4.1.2.<sup>b</sup> En paréntesis aparece el porcentaje de cada antociano en el mosto/vino.<sup>c</sup> nd: no detectado.<sup>d</sup> Color del vino calculado como la suma de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm.

Los resultados, por tanto, muestran que el perfil de antocianos en la uva y el vino de Monastrell es diferente, aunque el ratio de extracción no es distinto. Una de las razones podría ser la degradación de antocianos. La oxidación enzimática de los ácidos fenólicos a quinonas, catalizada por la polifenol oxidasa (PPO) comienza cuando las uvas son estrujadas. Los antocianos son sustratos pobres para la PPO pero reaccionan con las *o*-quinonas generadas por la oxidación enzimática de otros fenoles (Cheynier et al., 2000), especialmente los antocianos *o*-difenílicos: delfinidina, cianidina y petunidina (Cheynier et al., 1988), aunque también pueden reaccionar los antocianos no *o*-difenílicos por formación de aductos con *o*-quinonas (Cheyneir et al., 1994). En una solución modelo se observó que la oxidación de los antocianos *o*-difenílicos ocurría de manera más rápida, protegiendo, en parte, a los antocianos no *o*-difenílicos (glucósidos de malvidina y peonidina) de la degradación (Sarni et al., 1995). Además, la degradación enzimática de los antocianos se limita a los primeros días de la fermentación, puesto que las levaduras compiten con la PPO por el oxígeno. Ésta puede ser una de las razones de las diferencias encontradas en los perfiles antociánicos de la uva y el vino. Los resultados podrían indicar que desde el día 7 hasta el final de la maceración la PPO ya no actúa, puesto que el perfil de antocianos del vino permanece sin cambios desde este día.

Además, una razón por la que la proporción de derivados acilados en el vino y en los orujos es menor podría ser que estas moléculas se hidrolizan en medio ácido (García-Beneytez et al., 2002).

Otro fenómeno a tener en cuenta es que algunos de los antocianos liberados por las pieles hayan sido retenidos por las paredes celulares de las levaduras y, por tanto, se pierdan. Morata et al. (2003) observaron que los derivados acilados de todos los antocianos, especialmente los de la peonidina y la malvidina, eran más fuertemente adsorbidos y se encontraban en mayor proporción en las lías. Aunque la concentración de malvidina en vinos es mayor, cuando se calculaba la cantidad de antocianos adsorbidos, con respecto a su concentración en el vino, la

peonidina y la peonidina cumaril-glucósido eran los más adsorbidos. Esto puede explicar las bajas cantidades de peonidina encontradas en los vinos con respecto a su proporción en la uva. La adsorción de antocianos en las lías, además, decrece cuando aumenta la concentración de etanol (Vasserot et al., 1997), lo que puede ser otra de las razones para la estabilización de la distribución de antocianos a partir del día 7 de maceración.

La polimerización es otro mecanismo que se da durante la vinificación y, probablemente, éste sea el motivo por el cual decrece la concentración de antocianos monoméricos del día 10 al 14 de la maceración, sin cambios en el color del vino. No hay datos que soporten la asunción de que los diferentes antocianos tengan distintos ratios de polimerización. El mecanismo propuesto para explicar la polimerización de los antocianos considera que únicamente los anillos A o C (dependiendo de la forma en la que se encuentren los antocianos) toman parte en las reacciones de polimerización (Cheynier et al., 2000). Los antocianos difieren en el patrón de sustitución en el anillo B, por lo que los distintos sustituyentes del anillo B no deberían tener ningún efecto en el ratio de polimerización de unos antocianos u otros (García-Beneytez et al., 2002).

En resumen, los resultados muestran que hay diferencias entre el perfil antociánico de las uvas y el vino y que éstas no son atribuibles a diferentes ratios de extracción de los antocianos. Las diferencias pueden ser debidas a la acción de la PPO durante los primeros días de vinificación, ya que los antocianos *o*-difenólicos se degradan más rápidamente que los no *o*-difenólicos, y además, a la adsorción de ciertos antocianos, en especial peonidina y peonidina cumaril glucósidos, por parte de las paredes celulares de las levaduras. Ambos fenómenos ocurren simultáneamente durante el proceso macerativo y ambos pueden ser responsables de las diferencias encontradas entre los perfiles antociánicos de las uvas y los vinos, que tienen lugar principalmente durante los siete primeros días de maceración.

#### **4.1.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS PAREDES CELULARES DE LOS ORUJOS DURANTE LA MACERACIÓN.**

Las paredes celulares forman una barrera frente a la difusión de los constituyentes deseados de la piel, que son los antocianos, taninos y otros polifenoles (Lecas y Brillouet, 1994; Pellerin y Cabanis, 2000; Vidal et al., 2001). El estudio de la estructura y degradación de la pared celular de la piel de la uva podría constituir un elemento fundamental para el control de las extracciones y maceraciones en vinificación.

En un intento de estudiar esta degradación durante el proceso de maceración, se caracterizaron las muestras del orujo de la uva de Monastrell, utilizada en el apartado anterior.

Este orujo fue prensado, congelado y posteriormente se extrajeron sus paredes celulares. Estas paredes celulares se caracterizaron, analizando su contenido en proteínas y compuestos fenólicos ligados a la pared celular, lignina y su composición en azúcares neutros y ácidos urónicos.

En la tabla 4.1.4. se muestra el contenido en paredes celulares extraído de los orujos de uva Monastrell en el transcurso de la maceración. Se observa un aumento en el rendimiento de la extracción conforme avanza el tiempo de maceración, variando de 19,5 mg de pared celular obtenida por cada gramo de orujo en el momento de encubar la uva hasta 66,1 mg/g de orujo a día 15 de maceración. Conforme aumenta la maceración, múltiples compuestos presentes en el interior de las células de la piel van a ir difundiendo en el mosto-vino, mientras que, las paredes celulares quedarán remantes aumentando proporcionalmente su peso en el orujo. Así mismo, el gran aumento experimentado el último día, puede ser debido en parte, a un mayor efecto del prensado anterior al procesado de la muestra, en este orujo.

Según se muestra en la Tabla 4.1.5., el contenido en proteínas de la pared celular aumenta los últimos días de la maceración. Este aumento en el contenido en proteínas, puede ser debido a una concentración de éstas, ya que al estar fuertemente ligadas a la pared pueden no ser degradadas durante la maceración. Sin embargo, la cantidad de compuestos fenólicos totales y de lignina en las paredes celulares permanece invariable a lo largo de toda la maceración.

**Tabla 4.1.4.** Contenido en pared celular de los orujos de Monastrell durante la maceración.

<b>Días</b>	<i>Rendimiento (mg pared celular/g orujo)</i>
<b>0</b>	19,5a <sup>1</sup>
<b>7</b>	30,9b
<b>10</b>	36,0b
<b>12</b>	35,8b
<b>15</b>	66,1c

<sup>1</sup> Letras distintas indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 4.1.5.** Contenido en proteínas, compuestos fenólicos totales y lignina en pared celular de los orujos de Monastrell durante la maceración.

<b>Días</b>	<b>Proteínas (mg/g pared celular)</b>	<b>Compuestos fenólicos totales (mg/g pared celular)</b>	<i>Lignina (mg/g pared celular)</i>
<b>0</b>	30,0a <sup>1</sup>	64,9a	276,7a
<b>7</b>	30,9a	60,6a	300,0a
<b>10</b>	32,5a	67,3a	293,3a
<b>12</b>	40,8b	64,1a	263,3a
<b>15</b>	38,9b	66,8a	290,0a

<sup>1</sup> Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 4.1.6. se detalla la evolución del contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos en las paredes celulares a lo largo de la maceración. Se observa que no todos los azúcares se comportan de manera similar. Se produce un descenso en el contenido en arabinosa, galactosa y ácidos urónicos, los tres azúcares más relacionados con la composición de las pectinas, en los primeros días de la maceración, hasta el día 7, para a partir de ese momento permanecer constante. El contenido total en azúcares sigue la misma tendencia. Sin embargo, la cantidad de manosa y glucosa no celulósica va a ir aumentando durante todo el periodo estudiado, presentando los máximos valores a día 15 de maceración. Este aumento puede ser debido a que las hemicelulosas se acumulan, debido a que no se degradan, mientras que sí lo hacen las pectinas. El resto de compuestos analizado permanece constante, no registrando ningún cambio en el transcurso de la maceración.

Ortega-Regules (2006) determinó las actividades enzimáticas presentes en pieles de uvas de Monastrell en el momento de la vendimia, detectando actividad  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa, pectín metilesterasa (en niveles muy bajos) y ausencia de actividad poligalacturonasa y celulasa. Este perfil enzimático parece coincidir con los resultados obtenidos.

Las actividades  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa pueden actuar sobre sustratos tales como los galactomananos presentes en la pared celular (Nunan et al., 1998) o el ramnogalacturonano II que se ha detectado en vino y podría ser un componente de la pared celular (Doco y Brillouet, 1993), por lo que su acción se vería reflejada en una pérdida de galactosa y arabinosa.

Ortega-Regules (2006) también detectó una disminución de los ácidos urónicos durante la maduración de la uva, aunque no se detectara actividad poligalacturonasa.

**Tabla 4.1.6.** Contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos (mg/g de pared celular) en la pared celular del orujo de Monastrell durante la maceración.

Días	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	Cell-Glu	UA	GM	GA	Total azúcares
0	7,4a	3,3a	26,5b	15,1a	13,2a	26,1b	23,6a	104,8a	235,1c	26,0a	8,1a	455,3b
7	0,0a	0,0a	22,3a	14,5a	21,9b	22,9a	44,3bc	101,4a	166,1b	28,1a	9,9a	393,3a
10	0,0a	0,0a	21,6a	14,3a	22,3b	22,6a	41,0b	105,8a	153,7ab	27,7a	9,4a	381,4a
12	0,0a	0,0a	21,6a	14,0a	24,5c	21,6a	42,2bc	97,8a	136,7a	29,5a	11,3a	358,3a
15	0,0a	0,0a	21,0a	13,8a	24,9c	20,5a	44,9c	89,2a	151,8ab	25,7a	9,5a	366,1a

<sup>1</sup>Abreviaturas: Cell-Glu: Glucosa celulósica; UA: Ácidos urónicos; GM: Grado de metilación; GA: Grado de Acetilación.

<sup>2</sup>Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

El bajo nivel de actividad pectín metilesterasa concuerda con la no disminución del grado de esterificación de las pectinas. Es posible que los enzimas no puedan atacar las pectinas de alto grado de esterificación y la degradación se deba únicamente a las poco esterificadas. En estudios realizados con diversas frutas (uva, aguacate, kiwi, pera y papaya), se detectaron tendencias distintas en la evolución de la pectín metilesterasa durante la maduración, indicando que este enzima puede no ser vital para el reblandecimiento del fruto (Award y Young, 1979; Ahmed y Labavitch, 1980; Wegrzyn y MacRae, 1992 y Lazan et al., 2004). Estos bajos niveles de actividad pectín metilesterasa en uva, coinciden con los obtenidos con Barnavon et al. (2001) y Nunan et al. (2001).

Los mínimos cambios detectados en el contenido en glucosa-celulósica, también se corresponde con la ausencia de actividad celulasa (Nunan et al., 2001; Ortega-Regules, 2006).

Estos resultados parecen indicar que la mayor degradación de la pared celular de las pieles de la uva se va a dar en los primeros estadios de la maceración, lo que coincide con la máxima extracción de antocianos encontrada esos días.

#### **4.2. DIFERENCIAS EN LA EXTRACTABILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE DISTINTAS VARIEDADES DE UVA, CARACTERÍSTICAS DE LOS VINOS Y DE LAS PAREDES CELULARES DE LOS ORUJOS OBTENIDOS.**

Se ha constatado que uvas altamente coloreadas no siempre dan lugar a vinos muy coloreados, lo que puede deberse a la facilidad con que los compuestos fenólicos sean extraídos de las pieles de la uva al vino. Como ya se ha comentado anteriormente, las paredes celulares de la piel de la uva suponen una barrera a la difusión de estos compuestos. La extracción de los antocianos requiere de una degradación de la lámina media de las paredes celulares de la piel y una degradación de las estructuras de estas paredes para permitir que los compuestos fenólicos presentes en las vacuolas celulares puedan ser extraídos (Amrani-Joutei y Glories, 1995).

Saint-Criq et al. (1998) propusieron un análisis de extractabilidad fenólica para evaluar la facilidad de extracción de los compuestos fenólicos al vino. Este análisis consiste en macerar uvas durante cuatro horas a dos valores diferentes de pH (3,2 y 1,0) y asume que a pH 1,0 se da una completa desorganización de la membrana vacuolar que facilita la liberación de los compuestos fenólicos. Cuando el pH de la solución macerativa es de 3,2, la degradación tiene lugar en condiciones similares a las que ocurren durante la maceración (Glories y Saucier, 2000). La extractabilidad se considera óptima cuando la diferencia entre estos dos resultados es pequeña y, por tanto, el índice de extractabilidad es bajo.

Según González-Neves et al. (2004), el conocimiento de la extractabilidad de los pigmentos de la uva va a permitir guiar la fermentación en vinos tintos y va a ayudar a predecir el color del vino resultante.

Se ha medido el contenido en antocianos de las pieles de cuatro variedades de uva (Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot y Monastrell, ésta

última en dos localizaciones diferentes) y la extractabilidad de los antocianos y taninos. Así mismo, se analizaron las características cromáticas de los vinos obtenidos con estas uvas y el perfil antociánico de los orujos al final de la maceración, para constatar qué antocianos eran transferidos de las pieles de la uva al vino. Se quería evaluar si el índice de extractabilidad puede ayudar a clarificar por qué uvas muy coloreadas no siempre dan lugar a vinos altamente coloreados, y si la determinación del potencial fenólico de la uva podía ser útil para fijar las condiciones de vinificación en tinto en función del vino que se deseara obtener.

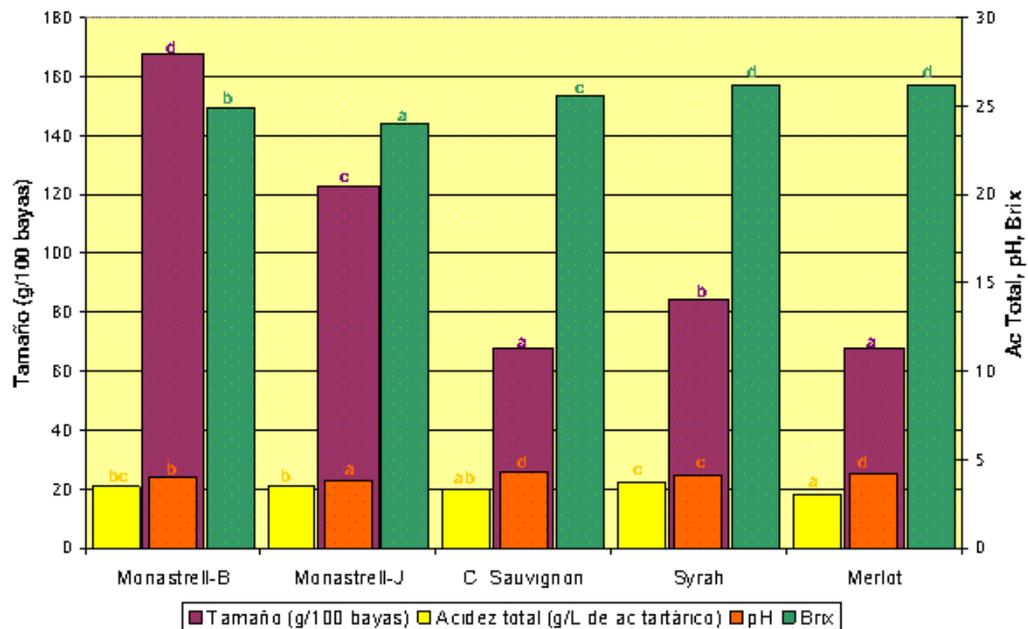
### **4.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA UVA A LA ENTRADA EN BODEGA.**

Los datos de los análisis físico-químicos realizados a las uvas en el momento de la vendimia se muestran en la Gráfica 4.2.1. Se observa que el peso de la baya fue significativamente mayor para la uva de la variedad Monastrell y particularmente en la Monastrell del área de Bullas (Monastrell-B), que alcanzó un peso de 167 g/100 bayas. Las uvas más pequeñas fueron las de Cabernet Sauvignon, Merlot y Syrah. El tamaño de baya es una característica de fundamental importancia en la calidad del vino. Los antocianos se sintetizan en la piel de la uva y un gran tamaño de baya resulta en un pequeño ratio piel/pulpa, que lleva a que estos compuestos se diluyan. Así, es importante considerar el tamaño de la uva cuando se expresen resultados de concentración de antocianos.

La concentración de antocianos, expresadas como  $\mu\text{g/g}$  de piel o  $\text{mg/kg}$  de bayas (teniendo así en cuenta el efecto del tamaño de la uva), y el porcentaje de cada antociano se muestran en la Tabla 4.2.1. Cuando los resultados se expresan como  $\mu\text{g/g}$  de piel, los mayores valores se observaron en las uvas de la variedad Monastrell del área de Jumilla (Monastrell-J) y Syrah. Incluso, cuando el contenido en antocianos se expresa como  $\text{mg/kg}$  de bayas, Monastrell-J y Syrah siguen alcanzando los niveles más altos, aunque en este caso las diferencias con el resto de variedades fueron menores. Las uvas de la variedad Monastrell, en ambas localizaciones, fueron las que presentaron una proporción en

antocianos acilados menor, resultados coincidentes con García-Beneytez et al. (2002). La composición antociánica de un cultivar está vinculada a su herencia genética y desde un punto de vista cuantitativo, es bastante independiente de las condiciones estacionales o del área de producción (Fernández-López et al., 1998). Se detectaron pequeñas diferencias entre las uvas de Monastrell en las dos localizaciones, pero se ha visto que incluso entre diferentes clones de la misma variedad se pueden presentar ligeras diferencias en la composición cualitativa en antocianos y que las condiciones de cultivo y localización, en algunos casos, pueden tener cierta influencia (Arozarena et al., 2002).

**Gráfica 4.2.1.** Características físico-químicas de las uvas de Monastrell Bullas y Jumilla, Cabernet Sauvignon, Syrah y Merlot en vendimia.



Diferentes letras en el mismo color indican diferencias significativas según LSD ( $p < 0.05$ )

## Diferencias en extractabilidad

**Tabla 4.2.1.** Concentración de antocianos en las uvas en el momento de la vendimia, expresada como µg/g de piel y mg/kg de peso fresco de bayas (± desviación estándar).

Antociano <sup>a</sup>	Monastrell-B			Monastrell-I			C. Sauvignon			Syrah			Merlot		
	Piel (µg/g)	Bayas (mg/kg)	%	Piel (µg/g)	Bayas (mg/kg)	%	Piel (µg/g)	Bayas (mg/kg)	%	Piel (µg/g)	Bayas (mg/kg)	%	Piel (µg/g)	Bayas (mg/kg)	%
Del	43,16±50,3	58,5±2,2	7,5	842,7±40,6	114,7±2,8	10,3	203,7±39,1	32,1±7,4	4,2	216,9±9,3	27,0±1,3	2,9	146,5±4,1	21,4±1,7	3,6
C an	498,5±93,2	67,6±1,6	8,7	524,6±28,1	71,6±6,4	6,4	24,4±5,7	2,6±2,3	0,5	24,6±1,5	3,1±0,2	0,3	27,6±3,4	4,0±0,7	0,7
Pet	578,2±93,7	78,6±7,6	10,1	995,2±84,4	135,9±9,9	12,2	185,0±38,8	29,2±7,2	3,8	338,0±23,1	42,1±1,7	4,6	195,4±6,7	28,5±1,8	4,8
Pn	645,7±31,6	87,8±4,3	11,2	747,4±18,2	101,9±9,5	9,1	150,9±30,2	23,8±5,8	3,1	247,9±29,9	30,7±2,0	3,3	237,0±23,5	34,6±4,0	5,9
Malv	2279,6±199,1	310,6±31,5	39,7	3628,2±273,4	493,6±16,0	44,2	1873,0±256,9	295,3±59,5	30,8	2511,2±219,8	311,6±14,5	31,8	1943,3±6,2	225,4±13,4	38,3
Del acetato	nd <sup>b</sup>	nd	0	21,2±0,9	2,0±1,7	0,3	57,9±8,7	9,1±1,8	1,2	53,1±5,9	6,6±0,6	0,7	41,0±2,9	6,0±0,7	1,0
C an acetato	nd	nd	0	nd	nd	0	nd	nd	0	29,1±0,5	3,6±0,2	0,4	nd	nd	0
Pet acetato	nd	nd	0	nd	nd	0	68,8±10,1	10,8±2,1	1,4	99,9±10,8	12,4±0,9	1,4	63,1±4,1	9,2±0,4	1,6
Pn acetato	nd	nd	0	nd	nd	0	88,9±31,2	13,9±4,8	1,8	148,6±29,2	18,3±3,8	2,0	93,4±19,4	13,5±2,1	2,3
MalvAc + DelC	241,6±20,7	32,9±3,4	4,2	264,2±32,9	35,9±3,0	3,2	1419,2±147,8	223,4±34,3	29,4	1651,0±123,5	205,0±9,2	22,2	865,3±33,9	126,2±3,9	21,5
C an cumarato	98,5±1,5	13,4±1,2	1,7	102,0±3,4	13,9±0,4	1,2	52,6±21,7	8,4±3,9	1,1	93,8±13,7	11,6±1,4	1,3	94,0±3,2	13,7±0,3	2,3
Pet cumarato	152,1±9,1	20,7±2,1	2,6	165,4±9,7	22,5±0,4	2,0	31,6±5,9	5,0±1,2	0,7	182,7±14,8	22,7±0,7	2,5	55,6±2,3	8,1±0,2	1,4
Pn cumarato	112,7±9,1	15,3±0,5	1,9	122,1±5,5	16,7±1,5	1,5	65,0±11,9	10,2±2,3	1,3	199,3±10,5	24,7±0,3	2,7	99,7±6,9	14,6±1,4	2,5
Malv cumarato	688,3±33,1	91,1±8,6	11,6	719,9±39,9	97,4±2,0	8,7	552,0±93,3	86,9±12,3	11,5	1571,7±98,6	195,2±4,8	21,2	513,4±1,7	75,0±4,2	12,7
<b>Total</b>	<b>5706,5±258,3</b>	<b>776,5±58,9</b>	<b>100</b>	<b>8132,5±337,0</b>	<b>1108,0±13,4</b>	<b>100</b>	<b>4772,2±241,6</b>	<b>750,7±140,2</b>	<b>100</b>	<b>7367,8±164,2</b>	<b>914,9±28,8</b>	<b>100</b>	<b>3875,3±148,5</b>	<b>580,2±27,2</b>	<b>100</b>

<sup>a</sup>Abreviaturas: Del: Delfinidina-3-monoglucósido; C an: Cianidina-3-monoglucósido; Pet: Petunidina-3-monoglucósido; Pn: Peonidina-3-monoglucósido; Malv: Malvidina-3-monoglucósido; MalvAc: Malvidina acetato; DelC: Delfinidina cumarato.

<sup>b</sup>nd: no detectado.

Las uvas de la variedad Cabernet Sauvignon y Syrah presentaron los mayores porcentajes de derivados acilados. Syrah, además, contiene un alto porcentaje de antocianos cumarato, coincidiendo con los resultados obtenidos por Darne (1988) y Fernández-López et al. (1995). La presencia de antocianos acilados puede ser importante para el color del vino, puesto que éstos participan en los procesos de copigmentación intramolecular, incrementando el color del vino.

En la Tabla 4.2.2. se muestran los resultados del análisis de extractabilidad. Las mayores concentraciones de antocianos extraídos a pH 1,0 fueron encontradas en las uvas de Monastrell-J y Syrah, mientras que Merlot presentaba el valor más bajo. Aunque los resultados de estos análisis espectrofotométricos no coinciden con los obtenidos por HPLC (debido a los distintos procedimientos de extracción), las diferencias entre variedades en la concentración en antocianos fue similar. En cuanto a los resultados obtenidos con la solución macerativa a pH 3,6, Syrah y Cabernet Sauvignon alcanzaron los contenidos en antocianos más altos, superando en este caso a Monastrell-J, siendo Monastrell-B la variedad que presentaba la concentración de antocianos extraídos menor.

**Tabla 4.2.2.** Valores de los parámetros del ensayo de extractabilidad de las uvas en vendimia.

	<b>ApH1<sup>1</sup></b> <b>(mg/L)</b>	<b>ApH3,6</b> <b>(mg/L)</b>	<b>EA</b> <b>(%)</b>	<b>CFTpH3,6</b>	<b>Mp</b> <b>(%)</b>
<b>Monastrell-B</b>	556,2b <sup>2</sup>	266,9a	52b	24,1b	55,8b
<b>Monastrell-J</b>	652,3d	304,6b	53b	28,1a	56,5b
<b>C. Sauvignon</b>	524,4ab	358,8c	32a	35,3c	57,4c
<b>Syrah</b>	669,2d	455,0d	32a	34,4c	47,0a
<b>Merlot</b>	481,0a	329,0b	31a	40,7d	67,6d

<sup>1</sup>Abreviaturas: ApH1: Antocianos extraídos a pH 1; ApH3,6: Antocianos extraídos a pH 3,6; EA: Índice de extractabilidad; CFTpH3,6: Contenido de fenoles totales en la solución a pH 3,6 (como absorbancia a 280 nm); Mp: Índice de madurez de la pepita.

<sup>2</sup>Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según LSD ( $p < 0,05$ )

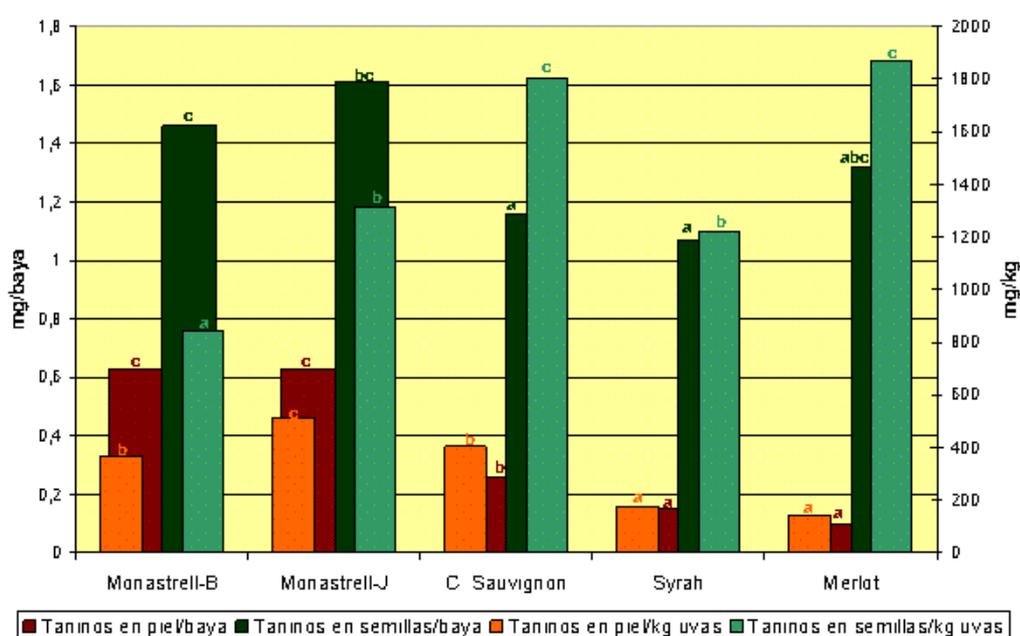
Los valores de antocianos obtenidos a pH 1,0 y 3,6 llevan a un valor relativamente alto del índice de extractabilidad para las uvas de Monastrell en ambas localizaciones, y bajo (aunque similar entre ellas) para las variedades Syrah, Cabernet Sauvignon y, sobre todo, Merlot. Estos resultados indican, según Saint-Criq et al. (1998), que los antocianos de las pieles de Monastrell son más difíciles de extraer que los del resto de variedades estudiadas.

Dos factores podrían ser responsables del alto índice de extractabilidad obtenido para las uvas de la variedad Monastrell. El primero es que las paredes celulares de su piel estén genéticamente caracterizadas por una estructura más rígida que pueda dificultar la extracción. El segundo es que la uva Monastrell presentaba un valor más bajo de °Brix que Merlot, Cabernet Sauvignon y Syrah, como se detalla en la Gráfica 4.2.1. Algunos autores mantienen que el valor del índice de extractabilidad disminuye a lo largo de la maduración (Saint-Criq et al. 1998; Glories, 1999), aunque en otros estudios se ha constatado que la uva de la variedad Monastrell mantiene un alto índice de extractabilidad durante todo el proceso de maduración. Bautista-Ortín et al. (2004a) no encontraron cambios significativos en el índice de extractabilidad de Monastrell durante la maduración, aunque el °Brix aumentara de 24,4 a 26,2. En la misma dirección, González-Neves et al. (2002) observaron que no había una relación predeterminada entre la madurez tecnológica y la madurez fenólica.

El índice de madurez de la pepita (Mp) representa el porcentaje de taninos de la semilla que contribuyen al contenido total de taninos del vino. Se ha observado que este valor decrece durante la maduración de la uva y que valores excesivamente altos indican que los taninos de la semilla podrán difundir en el vino fácilmente, especialmente con tiempos de contacto de la masa de vinificación prolongados durante la elaboración (Ribéreau-Gayon et al., 1998b). Los resultados muestran que los mayores valores fueron alcanzados por las uvas de la variedad Merlot.

Se determinó el contenido en taninos en las pieles y las semillas mediante un ensayo por precipitación proteica, donde los datos obtenidos (Gráfica 4.2.2.) se expresan como contenido por baya o concentración (mg/kg). Monastrell-J y Cabernet Sauvignon presentaron el mayor contenido de taninos en la piel, mientras que no se hallaron grandes diferencias en la concentración de taninos en las semillas, si se expresaban los datos en mg/baya. Cuando los resultados se expresaron en mg/kg, Cabernet Sauvignon y Merlot alcanzaron mayores niveles de taninos en la semilla, siendo estas variedades las que también mostraron un valor más alto del Mp.

**Gráfica 4.1.2.** Concentración de taninos (equivalentes de catequina) en las pieles y semillas de la uva en vendimia.



Diferentes letras en el mismo color indican diferencias significativas según LSD ( $p < 0,05$ )

#### 4.2.2. CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DE LOS VINOS.

Las uvas estudiadas fueron vinificadas y se midieron sus parámetros cromáticos. Las condiciones de elaboración fueron exactamente las mismas para todas las variedades, en contraste con el trabajo de González-Neves et al. (2004), en el que se decidió la duración de la maceración en función de los resultados del ensayo de

## Diferencias en extractabilidad

extractabilidad. En nuestro caso, se quería estudiar si las características de la uva, incluyendo los índices de extractabilidad, se podían correlacionar con las características cromáticas de los vinos, cuando se utilizaban las mismas condiciones de vinificación.

El contenido en antocianos monoméricos de los vinos al final de la maceración se detalla en la Tabla 4.2.3.

**Tabla 4.2.3.** Concentración de antocianos en los vinos al final de la maceración ( $\pm$  desviación estándar).

Antociano <sup>a</sup>	<u>Monastrell-B</u>		<u>Monastrell-J</u>		<u>C. Sauvignon</u>		<u>Syrah</u>		<u>Merlot</u>	
	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%
<b>Del</b>	14.1 $\pm$ 0.6	5.4	25.7 $\pm$ 0.8	7.1	8.7 $\pm$ 0.3	2.4	7.3 $\pm$ 0.3	2.1	5.0 $\pm$ 0.3	2.2
<b>Cian</b>	4.6 $\pm$ 0.4	1.7	5.9 $\pm$ 0.3	1.6	nd	0	1.9 $\pm$ 0.1	0.5	nd	0
<b>Pet</b>	26.1 $\pm$ 1.0	9.9	41.2 $\pm$ 1.4	11.3	13.2 $\pm$ 0.6	3.7	16.6 $\pm$ 0.9	4.7	10.4 $\pm$ 0.4	4.6
<b>Pn</b>	16.8 $\pm$ 0.6	6.4	18.6 $\pm$ 0.8	5.1	4.0 $\pm$ 0.1	1.1	6.2 $\pm$ 0.7	1.7	5.2 $\pm$ 0.3	2.3
<b>Malv</b>	151.7 $\pm$ 5.5	57.5	209.8 $\pm$ 4.4	57.9	183.2 $\pm$ 5.2	51.4	184.8 $\pm$ 9.0	52.4	124.5 $\pm$ 1.9	54.9
<b>Del acetato</b>	1.9 $\pm$ 0.1	0.7	2.0 $\pm$ 0.3	0.6	2.7 $\pm$ 0.7	0.8	2.2 $\pm$ 0.4	0.6	1.7 $\pm$ 0.1	0.8
<b>Cian acetato</b>	nd <sup>b</sup>	0	nd	0	nd	0	nd	0	nd	0
<b>Pet acetato</b>	nd	0	1.8 $\pm$ 0.1	0.5	4.6 $\pm$ 0.2	1.3	4.7 $\pm$ 0.4	1.3	3.2 $\pm$ 0.3	1.4
<b>Pn acetato</b>	nd	0	nd	0	4.1 $\pm$ 0.9	1.1	5.6 $\pm$ 1.1	1.6	3.9 $\pm$ 0.3	1.7
<b>MalvAc + DelC</b>	10.8 $\pm$ 0.5	4.1	13.4 $\pm$ 0.5	3.7	95.4 $\pm$ 3.4	26.8	81.6 $\pm$ 2.9	23.2	40.9 $\pm$ 0.9	18.1
<b>Cian cumarato</b>	3.8 $\pm$ 0.2	1.4	3.4 $\pm$ 0.3	0.9	1.8 $\pm$ 0.1	0.5	nd	0	2.0 $\pm$ 0.1	0.9
<b>Pet cumarato</b>	3.9 $\pm$ 0.2	1.5	5.5 $\pm$ 0.3	1.5	1.4 $\pm$ 0.1	0.4	3.1 $\pm$ 0.4	0.9	1.9 $\pm$ 0.3	0.8
<b>Pn cumarato</b>	4.9 $\pm$ 0.1	0.4	3.8 $\pm$ 0.3	1.0	2.6 $\pm$ 0.1	0.5	5.5 $\pm$ 0.5	1.6	3.7 $\pm$ 0.2	1.6
<b>Malv cumarato</b>	23.8 $\pm$ 0.7	9.0	29.9 $\pm$ 0.9	8.2	32.2 $\pm$ 0.4	9.0	31.2 $\pm$ 1.8	8.8	22.7 $\pm$ 0.7	10.0
<b>Total</b>	<b>262,5<math>\pm</math>2,5</b>	<b>100</b>	<b>361,0<math>\pm</math>8,7</b>	<b>100</b>	<b>353,9<math>\pm</math>9,5</b>	<b>100</b>	<b>350,7<math>\pm</math>16,4</b>	<b>100</b>	<b>225,1<math>\pm</math>5,6</b>	<b>100</b>

<sup>a</sup>Abreviaturas: Del: Delfinidina-3-monoglucósido; Cian: Cianidina-3-monoglucósido; Pet: Petunidina-3-monoglucósido; Pn: Peonidina-3-monoglucósido; Malv: Malvidina-3-monoglucósido; MalvAc: Malvidina acetato; DelC: Delfinidina cumarato.

<sup>b</sup>nd: no detectado.

Monastrell-J, Syrah y Cabernet Sauvignon presentaron valores similares, aunque se encontraran concentraciones diferentes en las pieles de las uvas de estas variedades. En los vinos de Monastrell, además, la proporción de antocianos no acilados fue mayor que en los vinos del resto

de variedades. Se ha constatado que el perfil antociánico de los vinos sólo refleja parcialmente el perfil de las uvas frescas (García-Beneytez et al., 2002), conteniendo los vinos, generalmente, una proporción mayor de malvidina-3-glucósido que las uvas, como ya se observó en el apartado 4.1. La composición en monoglucósidos por sí sola no va a permitir conclusiones claras sobre las características cromáticas de los vinos pero, puesto que parte de los antocianos serán extraídos y polimerizados, contribuirá al color del vino.

Las características espectrofotométricas de los vinos se muestran en la Tabla 4.2.4. Como sucedía en las uvas, Cabernet Sauvignon, Syrah y Merlot presentan el mayor contenido en fenoles totales (CFT) en el vino, indicando que se habían extraído más compuestos fenólicos. La intensidad de color alcanzó los valores más altos en los vinos de Syrah y Cabernet Sauvignon, seguidos por el de Monastrell-J. Las uvas de Monastrell-B, con una concentración de antocianos mayor que las de Merlot, condujeron a un vino con una intensidad de color similar al vino elaborado con Merlot, pero con un contenido en fenoles totales menor. Puesto que los porcentajes de copigmentación fueron muy similares en los vinos de Monastrell-J, Cabernet Sauvignon y Syrah, así como la concentración de antocianos monoglucósidos (como se observa en la Tabla 4.2.3.), las diferencias en la intensidad de color pueden ser debidas a los antocianos poliméricos, lo que se confirma al estudiar los valores de  $A^{520}$ .

Los vinos de Merlot y Cabernet Sauvignon alcanzaron las concentraciones de taninos más altas. En las características cromáticas del vino elaborado con Merlot se observa un valor alto del tono y del porcentaje de amarillo, con una concentración relativamente baja de antocianos y alta de taninos, lo que podría representar un desequilibrio en ratio antocianos/taninos.

Cuando los vinos evolucionan, el color decrece ligeramente, probablemente debido a la adsorción de los pigmentos en las lías de las

levaduras y a fenómenos de coprecipitación. Al final de la fermentación maloláctica no se encontraron diferencias significativas en el color entre Monastrell-J, Cabernet Sauvignon y Syrah, que eran los vinos con mayor intensidad colorante.

**Tabla 4.2.4.** Características cromáticas de los vinos al final de la maceración (15 días) y al final de la fermentación alcohólica y fermentación maloláctica.

	CFT <sup>1</sup>	Tan (mg/L)	IC	Tono	A (%)	H (%)	Az (%)	A <sup>acet</sup>	A <sup>20</sup>	A <sup>SO2</sup>	CA (%)	FA (%)	PA (%)
<b>15 días maceración</b>													
<b>Monastrell-B</b>	50,1a <sup>2</sup>	342,9a	13,6a	0,44b	28,2b	67,9e	6,9a	8,4a	5,4a	1,2a	35a	50c	15b
<b>Monastrell-J</b>	55,4b	540,0b	19,8b	0,37a	25,2a	63,9d	7,8b	10,9b	6,7c	1,2a	39ab	50c	11a
<b>C.Sauvignon</b>	84,7d	848,8e	21,4c	0,46b	28,2b	61,2c	10,5c	14,8c	8,2d	2,4c	42b	42a	17c
<b>Syrah</b>	86,6d	522,9c	22,0c	0,50c	29,2c	57,9b	12,8e	15,5d	9,2e	2,4c	41b	44ab	16b
<b>Merlot</b>	74,1c	756,8d	13,6a	0,55d	31,6d	57,4a	11,0d	8,9a	5,8b	1,7b	34a	47bc	18d
<b>Fin Fermentación Alcohólica</b>													
<b>Monastrell-B</b>	48,2a	286,9a	13,6a	0,40a	28,9b	62,7d	8,4b	4,6a	3,4a	1,1a	32b	51b	17b
<b>Monastrell-J</b>	54,3b	520,3c	18,3b	0,40a	26,6a	66,0e	7,3a	8,1b	5,4b	1,2b	34c	51b	15a
<b>C.Sauvignon</b>	85,5d	880,8e	19,1c	0,50b	29,9c	59,2c	10,9c	15,7d	10,4d	3,3d	34c	45a	21d
<b>Syrah</b>	76,8c	415,5b	20,1d	0,60c	31,5d	55,1b	13,4e	17,1e	10,9e	3,4e	36d	44a	20c
<b>Merlot</b>	75,3c	832,8d	13,3a	0,71d	34,1e	53,9a	12,0d	8,6c	6,6c	2,2c	23a	51b	26e
<b>Fin Fermentación Maloláctica</b>													
<b>Monastrell-B</b>	45,1a	341,1a	12,9a	0,61a	33,3b	55,5c	11,2a	6,6a	5,6a	2,4a	15b	49b	35b
<b>Monastrell-J</b>	49,7b	489,8b	17,9b	0,61a	30,6a	55,1c	14,3c	7,1a	6,7b	3,5c	6a	45ab	49b
<b>C.Sauvignon</b>	82,1d	757,1c	17,3b	0,62a	32,9b	54,0b	13,1b	10,6c	8,2c	3,5c	23c	44ab	33ab
<b>Syrah</b>	75,3c	308,8a	18,2b	0,65b	33,8b	51,3a	14,9c	12,1d	8,4c	3,5c	30d	40a	29a
<b>Merlot</b>	72,5d	825,1d	13,8a	0,68b	34,8c	50,9a	14,3c	8,2b	6,6b	3,1b	19bc	43ab	38c

<sup>1</sup>Abreviaturas: CFT: Compuestos fenólicos totales (como absorbancia a 280 nm); Tan: Taninos totales; IC: Intensidad de color; %A, %R, %Az: Porcentajes de color amarillo, rojo y azul; A<sup>acet</sup>: Absorbancia a 520 nm después de adicionar acetaldehído; A<sup>20</sup>: Absorbancia a 520 nm después de diluir 20 veces; A<sup>SO2</sup>: Absorbancia a 520 nm después de adicionar SO<sub>2</sub>; CA: Color debido a copigmentación; FA: Color debido a antocianos libres; PA: Color debido a pigmentos poliméricos.

<sup>2</sup>Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas según LSD (p<0.05).

**Tabla 4.2.5.** Concentración de antocianos y porcentaje de los compuestos individuales en los orujos de la uva después de la maceración ( $\pm$  desviación estándar).

Antociano <sup>a</sup>	Monastrell-B		Monastrell-L		C. Sauvignon		Syrah		Merlot	
	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%
Del	14,1 $\pm$ 0,6	5,4	25,7 $\pm$ 0,8	7,1	8,7 $\pm$ 0,3	2,4	7,3 $\pm$ 0,3	2,1	5,0 $\pm$ 0,3	2,2
Cian	4,6 $\pm$ 0,4	1,7	5,9 $\pm$ 0,3	1,6	nd	0	1,9 $\pm$ 0,1	0,5	nd	0
Pet	26,1 $\pm$ 1,0	9,9	41,2 $\pm$ 1,4	11,3	13,2 $\pm$ 0,6	3,7	16,6 $\pm$ 0,9	4,7	10,4 $\pm$ 0,4	4,6
Pn	16,8 $\pm$ 0,6	6,4	18,6 $\pm$ 0,8	5,1	4,0 $\pm$ 0,1	1,1	6,2 $\pm$ 0,7	1,7	5,2 $\pm$ 0,3	2,3
Malv	151,7 $\pm$ 5,5	57,5	209,8 $\pm$ 4,4	57,9	183,2 $\pm$ 5,2	51,4	184,8 $\pm$ 9,0	52,4	124,5 $\pm$ 1,9	54,9
Del acetato	1,9 $\pm$ 0,1	0,7	2,0 $\pm$ 0,3	0,6	2,7 $\pm$ 0,7	0,8	2,2 $\pm$ 0,4	0,6	1,7 $\pm$ 0,1	0,8
Cian acetato	nd <sup>b</sup>	0	nd	0	nd	0	nd	0	nd	0
Pet acetato	nd	0	1,8 $\pm$ 0,1	0,5	4,6 $\pm$ 0,2	1,3	4,7 $\pm$ 0,4	1,3	3,2 $\pm$ 0,3	1,4
Pn acetato	nd	0	nd	0	4,1 $\pm$ 0,9	1,1	5,6 $\pm$ 1,1	1,6	3,9 $\pm$ 0,3	1,7
MalvAc+DelC	10,8 $\pm$ 0,5	4,1	13,4 $\pm$ 0,5	3,7	95,4 $\pm$ 3,4	26,8	81,6 $\pm$ 2,9	23,2	40,9 $\pm$ 0,9	18,1
Cian cumarato	3,8 $\pm$ 0,2	1,4	3,4 $\pm$ 0,3	0,9	1,8 $\pm$ 0,1	0,5	nd	0	2,0 $\pm$ 0,1	0,9
Pet cumarato	3,9 $\pm$ 0,2	1,5	5,5 $\pm$ 0,3	1,5	1,4 $\pm$ 0,1	0,4	3,1 $\pm$ 0,4	0,9	1,9 $\pm$ 0,3	0,8
Pn cumarato	4,9 $\pm$ 0,1	0,4	3,8 $\pm$ 0,3	1,0	2,6 $\pm$ 0,1	0,5	5,5 $\pm$ 0,5	1,6	3,7 $\pm$ 0,2	1,6
Malv cumarato	23,8 $\pm$ 0,7	9,0	29,9 $\pm$ 0,9	8,2	32,2 $\pm$ 0,4	9,0	31,2 $\pm$ 1,8	8,8	22,7 $\pm$ 0,7	10,0
<b>Total</b>	<b>262,5<math>\pm</math>2,5</b>	<b>100</b>	<b>361,0<math>\pm</math>8,7</b>	<b>100</b>	<b>353,9<math>\pm</math>9,5</b>	<b>100</b>	<b>350,7<math>\pm</math>16,4</b>	<b>100</b>	<b>225,1<math>\pm</math>5,6</b>	<b>100</b>

<sup>a</sup>Abreviaturas: Del: Delfinidina-3-monoglucósido; Cian: Cianidina-3-monoglucósido; Pet: Petunidina-3-monoglucósido; Pn: Peonidina-3-monoglucósido; Malv: Malvidina-3-monoglucósido; MalvAc: Malvidina acetato; DelC: Delfinidina cumarato.

<sup>b</sup>nd: no detectado.

El estudio de los antocianos remanentes en los orujos de la uva después de la maceración también podría ayudar a confirmar la eficacia del uso del índice de extractabilidad como herramienta para medir la facilidad de extracción de los antocianos en las uvas. La Tabla 4.2.5. muestra los resultados obtenidos. En los orujos de la variedad Monastrell se encuentran las mayores concentraciones de antocianos. El hecho de este mayor porcentaje de antocianos remanentes con respecto a los niveles originales en las uvas y de un perfil antociánico muy similar para las muestras de las dos localizaciones, se puede relacionar con valores altos y similares del índice de extractabilidad. En el resto de variedades, el porcentaje de los antocianos que permanecen en los orujos fue menor del 12% de la concentración inicial en las uvas, y la malvidina-3-glucósido fue el único monoglucósido no acilado que se detectó. Se detectaron altas concentraciones, aunque menores que en las uvas, de acetatos de malvidina en los orujos de Cabernet Sauvignon, Syrah y Merlot, así como de cumaratos de malvidina.

Se hizo un estudio de correlación entre las características cromáticas de las uvas y los vinos, cuyos resultados se exponen en la Tabla 4.2.6. Las correlaciones entre los antocianos de la uva medidos por HPLC y las características cromáticas de los vinos estuvieron en el mismo rango que las encontradas para los antocianos extraídos con la solución a pH 1,0 (ApH1), no encontrándose coeficientes de correlación altos con ninguno de los parámetros medidos en el vino. Por el contrario, se observó una alta correlación entre los antocianos obtenidos con la solución a pH 3,6 (ApH3,6) y algunas de las características cromáticas de los vinos, siendo mayores a 0,85 con  $A^{\text{acet}}$ ,  $A^{20}$  y  $A^{\text{SO}_2}$  (medidas directamente relacionadas con el contenido en antocianos del vino).

El índice de extractabilidad y el de madurez de la pepita mostraron los mayores coeficientes de correlación con el contenido en fenoles totales del vino (-0,92) y con la concentración de taninos en el vino (0,69), respectivamente. El contenido en polifenoles totales de la solución a pH 3,6 (CFTpH3,6) estaba altamente correlacionado con CFT y los taninos

en el vino. El contenido en taninos de la piel no se correlacionaba con ningún parámetro del vino, mientras que los taninos de la semilla sí lo hacían, en un alto grado, con los taninos del vino. Un estudio publicado por Harbertson et al. (2002) no revelaba ninguna relación clara entre la concentración de taninos en las uvas en el momento de la vendimia y la posterior en el vino, pero sus vinos se elaboraron comercialmente, sin estandarizar las prácticas enológicas. En este trabajo, las vinificaciones fueron idénticas para todas las variedades y, en estas condiciones, los taninos de las semillas tenían una alta correlación con los de los vinos.

**Tabla 4.2.6.** Correlaciones entre las variables de la uva y el vino (ver tablas 4.2.2. y 4.2.4. para abreviaturas).

	IC	A <sup>acet</sup>	A <sup>20</sup>	A <sup>602</sup>	CFT	Taninos totales (mg/L)
<b>Ant uva<sup>a</sup> (mg/kg)</b>	0,62*	0,03	-0,08	-0,25	-0,39	-0,48
<b>ApH1<sup>b</sup></b>	0,64*	0,25	0,14	-0,01	-0,24	-0,60*
<b>ApH3,6<sup>b</sup></b>	0,69**	0,86**	0,87**	0,85**	0,68**	0,10
<b>EA<sup>b</sup></b>	-0,22	-0,67**	-0,77**	-0,88**	-0,92**	-0,63*
<b>Mp<sup>b</sup></b>	-0,64**	-0,53*	-0,53*	-0,23	0,11	0,69**
<b>CFTpH3,6<sup>b</sup></b>	0,04	0,34	0,34	0,63*	0,81**	0,77**
<b>Taninos en piel (mg/kg)</b>	0,21	-0,25	-0,25	-0,45	-0,44	-0,11
<b>Taninos en semilla (mg/kg)</b>	0,05	0,15	0,15	0,43	0,71**	0,90**

<sup>a</sup> Suma de los antocianos de la uva identificados y cuantificados por HPLC.

<sup>b</sup> Parámetros calculados según Saint-Criq et al. (1998).

\*,\*\* indican una correlación significativa a un nivel de confianza del 95 y 99%, respectivamente.

En vista de los resultados obtenidos, se observa que aunque las uvas de Monastrell presentaran los mayores contenidos en antocianos, sus índices de extractabilidad fueron altos, indicando una mayor dificultad para su extracción. Efectivamente, la concentración de antocianos y la intensidad de color de sus vinos no se correlacionaron con el total de antocianos medidos en las uvas, pero sí con los que se podían extraer a pH 3,6. Por ello, los resultados muestran que el índice de extractabilidad

indica la facilidad y extensión de la transferencia de antocianos de las pieles de la uva al vino y que la medida de los antocianos y compuestos fenólicos extraídos a pH 3,6 y de los taninos presentes en las semillas pueden ser empleados como herramienta en la predicción de las características cromáticas de los vinos.

Además, considerando el potencial fenólico de las uvas en el momento de la vendimia se podría planear la vinificación (duración, frecuencia e intensidad de los bazuqueos, control de temperatura y uso de enzimas) en función del vino que se desee obtener.

Los altos valores del índice de extractabilidad en Monastrell indican que esta variedad requiere largos tiempos de maceración para que sea posible la difusión de los antocianos y taninos. Serán necesarios bazuqueos frecuentes que permitan la extracción de taninos que favorezcan la polimerización antocianos-taninos.

Las uvas de la variedad Merlot no alcanzan una alta concentración de antocianos, aunque presentan un índice de extractabilidad bajo y un alto contenido en taninos de las semillas. Basándose en este perfil, Merlot necesitará maceraciones cortas, ya que los antocianos son fácilmente extraíbles y así no permitirá un exceso de taninos que incremente el porcentaje de color amarillo y la astringencia en estos vinos.

La elaboración de uva de la variedad Syrah se podría ver favorecida con bazuqueos frecuentes que aumenten la concentración de taninos en el vino, especialmente en los destinados a envejecimiento.

Por último, la variedad Cabernet Sauvignon presenta un bajo valor del índice de extractabilidad y un alto contenido tánico, por lo que podría dar buenos resultados con maceraciones cortas (para vinos jóvenes) y con maceraciones largas (para vinos que se envejezcan).

### 4.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS PAREDES CELULARES DE LOS ORUJOS.

Tras el prensado de los vinos estudiados, se tomaron muestras del orujo resultante. Este orujo fue prensado, congelado y posteriormente se extrajeron sus paredes celulares. Estas paredes celulares se caracterizaron, analizando su contenido en proteínas y compuestos fenólicos ligados a la pared celular, lignina y su composición en azúcares neutros y ácidos urónicos.

Se tomaron muestras de orujo de las distintas variedades, para intentar dilucidar si, el estado de las paredes celulares podría ayudar a una mejor comprensión de las diferencias en la extractabilidad de los compuestos fenólicos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

En la Tabla 4.2.7. se puede observar el rendimiento obtenido al extraer las paredes celulares de los orujos de las distintas variedades.

**Tabla 4.2.7.** Contenido en pared celular de los orujos de las distintas variedades al final de la maceración ( $\pm$  desviación estándar).

	<i>Rendimiento (mg pared celular / g orujo)</i>
<b>Merlot</b>	30,7a <sup>1</sup>
<b>Syrah</b>	48,9c
<b>C. Sauvignon</b>	48,7c
<b>Monastrell-J</b>	48,8c
<b>Monastrell-B</b>	40,2b

<sup>1</sup> Letras distintas indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

Merlot es la variedad donde menor rendimiento se obtiene, seguida de Monastrell proveniente de Bullas. El resto de variedades rindieron lo mismo, no encontrándose diferencias significativas entre ellas. Debido al procedimiento de extracción de las paredes celulares, este resultado puede dar una idea de la cantidad de pared que había en el orujo, pero

## Diferencias en extractabilidad

hay que considerar las diferencias con precaución, ya que este método, debido al proceso de tamizado, se considera un método semicuantitativo, en lo que a rendimiento se refiere (Nunan et al., 1998).

En los orujos de las distintas variedades no se encuentran grandes diferencias en el contenido en proteínas asociadas a la pared celular (Tabla 4.2.8.) Merlot es la variedad con menor cantidad de proteína por gramo de pared y Monastrell-B la de mayor. En el resto de orujos el contenido es intermedio y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. En el contenido en compuestos fenólicos totales y lignina, Cabernet Sauvignon fue la variedad con una concentración más alta en estos compuestos, mientras que Syrah presentó los más bajos.

**Tabla 4.2.8.** Contenido en proteínas, compuestos fenólicos totales y lignina en pared celular de los orujos de las distintas variedades al final de la maceración ( $\pm$  desviación estándar).

	Proteína (mg/g pared celular)	Compuestos fenólicos totales (mg/g pared celular)	Lignina (mg/g pared celular)
<b>Merlot</b>	18,4a <sup>1</sup>	42,5ab	340,0ab
<b>Syrah</b>	21,5ab	39,3a	303,3a
<b>C. Sauvignon</b>	25,7bc	55,4c	433,3b
<b>Monastrell-J</b>	24,9bc	47,6bc	296,7a
<b>Monastrell-B</b>	29,7c	45,1ab	246,7a

<sup>1</sup> Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

Ortega-Regules (2006) analizó la composición de las paredes celulares de estas uvas a la entrada en bodega, en un estudio previo. Los perfiles de composición encontrados en los orujos no concuerdan con los obtenidos en las uvas, aunque hay que tener en cuenta que el procedimiento de extracción de las paredes celulares en ese estudio fue diferente al que se siguió en el de los orujos. En la uva a entrada en bodega, Ortega-Regules (2006) encontró que Syrah fue la variedad donde se encontraron los contenidos más altos de proteínas, mientras que

Monastrell presentaba los más bajos. Las mayores cantidades de compuestos fenólicos se alcanzaron en Merlot y Syrah y las más bajas en Monastrell-B y Cabernet Sauvignon. Parece, comparando estos resultados con los obtenidos en los orujos tras la maceración de las pieles, que podría haber una menor degradación de la pared celular de Monastrell durante la vinificación. Esta suposición concordaría con la diferente difusión de compuestos fenólicos encontrada durante la elaboración de los vinos.

En la Tabla 4.2.9. se muestra la composición en azúcares neutros y ácidos urónicos de las distintas variedades al final de la maceración. Se ha observado que las paredes celulares primarias de las bayas de uva tienen un sistema común de polisacáridos estructurales con una distribución que varía entre cultivares. Estudios previos han demostrado que estas paredes celulares están principalmente constituidas por celulosa y polisacáridos pécticos (Vidal et al., 2001). Los resultados que se han obtenido confirman estas observaciones. Se observa que, los menores contenidos en azúcares totales se encontraron en la variedad Syrah, así como en todos los azúcares neutros. Merlot y Cabernet Sauvignon presentaron valores intermedios y la variedad Monastrell, en ambas localizaciones, mostró las mayores concentraciones en azúcares totales, xilosa, galactosa, celulosa y en el contenido en ácidos urónicos. En un estudio realizado por Nunan et al. (1997), se observó que altos contenidos en celulosa, hemicelulosa y proteínas se correlacionaban con uvas de una variedad considerada como de textura firme. Así mismo, Batisse et al. (1996) y Rosli y Civello (2004) obtuvieron resultados similares en otros frutos, cantidades elevadas de celulosa, hemicelulosa, galactosa y ácidos urónicos se encontraron en los frutos que presentaban la textura más firme.

## Diferencias en extractabilidad

**Tabla 4.2.9.** Contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos (mg/g de pared celular) en la pared celular del orujo de las distintas variedades al final de la maceración.

	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	Cell-Glu <sup>1</sup>	UA	GM	GA	Total azúcares
<b>Merlot</b>	0,0a <sup>2</sup>	2,3a	23,2d	12,0c	20,4a	14,4c	35,8b	70,8a	191,1b	27,2a	7,0a	369,8c
<b>Syrah</b>	0,0a	0,0a	14,3a	8,8a	20,9a	10,8a	15,6a	70,9a	144,3a	24,4a	6,3a	285,6a
<b>C.Sauvignon</b>	0,0a	0,0a	18,7b	9,5b	24,0b	12,1b	17,5a	76,7a	180,1b	27,5a	7,5a	338,6b
<b>Monastrell-J</b>	0,0a	0,0a	20,7c	12,4c	27,7c	15,7d	15,5a	119,1b	192,3b	29,1a	8,0a	403,2d
<b>Monastrell-B</b>	0,0a	0,0a	19,2b	12,2c	30,7d	15,6d	18,4a	127,3c	174,9b	27,5a	7,9a	398,3cd

<sup>1</sup>Abreviaturas: Cell-Glu: Glucosa celulósica; UA: Ácidos urónicos; GM: Grado de metilación; GA: Grado de Acetilación.

<sup>2</sup>Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

Estos resultados parecen indicar que el contenido y/o la estructura de la pared celular de Monastrell es más compleja que la del resto de variedades, lo que podría, en parte, suponer una mayor dificultad a la extracción de los compuestos fenólicos al vino (Lecas y Brillouet, 1994; Kennedy et al., 2001). Ortega-Regules (2006) realizó un estudio de las paredes celulares de la piel de la uva de distintas variedades a entrada en bodega durante dos años consecutivos y, con ligeras variaciones anuales, también observó que las paredes celulares de la piel de uva de Monastrell parecían ser más complejas que las de Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon.

Al comparar los orujos de las distintas variedades, se observó que las variedades que presentaban menor contenido total en azúcares neutros fueron aquellas cuyas uvas mostraban menores índices de extractabilidad. Para comprobar esa observación, se llevó a cabo un estudio de correlación entre los datos de extractabilidad de las uvas de las distintas variedades a la entrada en bodega y los datos de caracterización de sus orujos tras la maceración (Tabla 4.2.10.).

Los resultados indican que hay una relación entre la composición de la pared celular del orujo y la extractabilidad de los compuestos fenólicos. Se observa que altas cantidades de azúcares totales, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y celulosa en los orujos, después de la maceración, correlacionan negativamente con la cantidad de antocianos que pueden ser fácilmente extraíbles en la uva (medidos en el momento de entrada a bodega), no correlacionando con la cantidad de antocianos totales en las uvas. El mismo comportamiento se observa para el índice de extractabilidad, que cuanto mayor es, más cantidad de azúcares totales quedan remanentes en la pared celular de los orujos. Estos resultados concuerdan notablemente con las correlaciones obtenidas, en uvas recién vendimiadas, por Ortega-Regules et al. (2006), que encontraron que se podía prever con una fiabilidad del 78% la facilidad de extracción de los antocianos en función de la composición de la pared celular de la piel de uva en distintas variedades. Aquellas

## Diferencias en extractabilidad

variedades con un mayor contenido en paredes celulares y con estas paredes más ricas en pectinas y azúcares totales presentan más dificultad para la extracción de sus antocianos (Ortega-Regules et al., 2006), lo cual, además, se pone de manifiesto en el estudio de los orujos, ya que estos muestran así mismo, mayores cantidades de los azúcares relacionados con las pectinas y azúcares totales, es decir las paredes celulares se han degradado menos.

Los resultados parecen indicar que, la diferente extractabilidad de los compuestos fenólicos que presentan distintas variedades, va a estar ligada a las características que presenten las paredes celulares de las pieles de las uvas.

**Tabla 4.2.10.** Coeficientes de correlación de Pearson entre la composición de la pared celular de los orujos de las distintas variedades y los datos de extractabilidad de las uvas a entrada en bodega (significación estadística).

	Ant pH1 <sup>a</sup>	Ant pH3.6	CFT pH3.6	EA	Mp
<b>Proteína</b>	0,09 (0,74)	-0,44 (0,10)	-0,72 (0,00)	0,56 (0,03)	-0,24 (0,39)
<b>Ara</b>	-0,64 (0,01)	-0,70 (0,00)	0,18 (0,52)	0,98 (0,00)	0,91 (0,00)
<b>Xyl</b>	-0,25 (0,37)	-0,87 (0,00)	-0,36 (0,19)	0,68 (0,01)	0,53 (0,04)
<b>Man</b>	0,14 (0,62)	-0,74 (0,00)	-0,93 (0,00)	0,90 (0,00)	-0,14 (0,62)
<b>Gal</b>	-0,20 (0,48)	-0,91 (0,00)	-0,49 (0,06)	0,77 (0,00)	0,45 (0,09)
<b>Glu</b>	-0,73 (0,00)	-0,17 (0,53)	0,64 (0,00)	-0,39 (0,15)	0,80 (0,00)
<b>Cell-Glu</b>	0,24 (0,39)	-0,76 (0,00)	-0,92 (0,00)	0,98 (0,00)	-0,13 (0,66)
<b>Total azúcares</b>	-0,25 (0,36)	-0,93 (0,00)	-0,48 (0,07)	0,74 (0,00)	0,49 (0,06)

<sup>a</sup>Abreviaturas: ApH1: Antocianos extraídos a pH 1; ApH3,6: Antocianos extraídos a pH 3,6; CFTpH3,6: Índice de fenoles totales en la solución a pH 3,6; EA: Índice de extractabilidad; Mp: Índice de madurez de la pepita. Cell-Glu: Glucosa celulósica.

#### **4.3. CARACTERIZACIÓN DE DIFERENTES ENZIMAS COMERCIALES. EFECTO EN LA VINIFICACIÓN Y EN LAS PAREDES CELULARES DE LOS ORUJOS OBTENIDOS.**

La difusión de los compuestos fenólicos de la uvas durante la vinificación debe ser lo más completa posible, para asegurar una buena intensidad de color y posterior estabilidad durante el envejecimiento. Como se ha visto anteriormente, los compuestos fenólicos de uva de la variedad Monastrell presentan mayor dificultad de extracción que los de otras variedades. Una vía para intentar extraer una mayor cantidad de estos compuestos es la aplicación de enzimas exógenos pectolíticos (Ayestarán *et al*, 2004), si bien los resultados encontrados por diferentes autores sobre el uso de enzimas para mejorar el color, son contradictorios (Pardo *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 1999; Delteil, 2000b; Canal-Llaubères y Pouns, 2002; Revilla y González-San José, 2002a y b, 2003a y b). Así, mientras algunas investigaciones muestran aumentos de color en vinificaciones donde se han aplicado estos enzimas, otras no han encontrado ningún beneficio. Esto puede ser debido a una gran heterogeneidad entre los diferentes preparados comerciales.

La distinta naturaleza de las pectinasas presentes en estas preparaciones y su nivel de actividad condicionan la eficacia de los productos. En la mayoría de los casos, la actividad enzimática de las preparaciones comerciales viene expresada en unidades propias de cada fabricante. Generalmente se trata de nomenclaturas globales que no hacen distinción entre las distintas pectinasas (Palacios *et al.*, 2003). Las preparaciones pectolíticas comerciales utilizadas en la elaboración de vinos tintos usualmente están compuestas por mezclas de poligalacturonasa, pectín metilesterasa y pectín liasa, conteniendo también ciertas actividades residuales, como celulasas, hemicelulasas y glucosidasas.

El objetivo de esta parte del trabajo fue la caracterización y cuantificación de las actividades enzimáticas de seis preparaciones

enzimáticas comerciales (E1 a E6), y el estudio de su efecto en las características cromáticas de pieles de uva y vinos de la variedad Monastrell y en los orujos al final de la maceración, con el objeto de alcanzar un mejor conocimiento de la relación entre el mecanismo de acción de los enzimas y su implicación en la difusión de los compuestos fenólicos de la uva al vino.

#### **4.3.1. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA.**

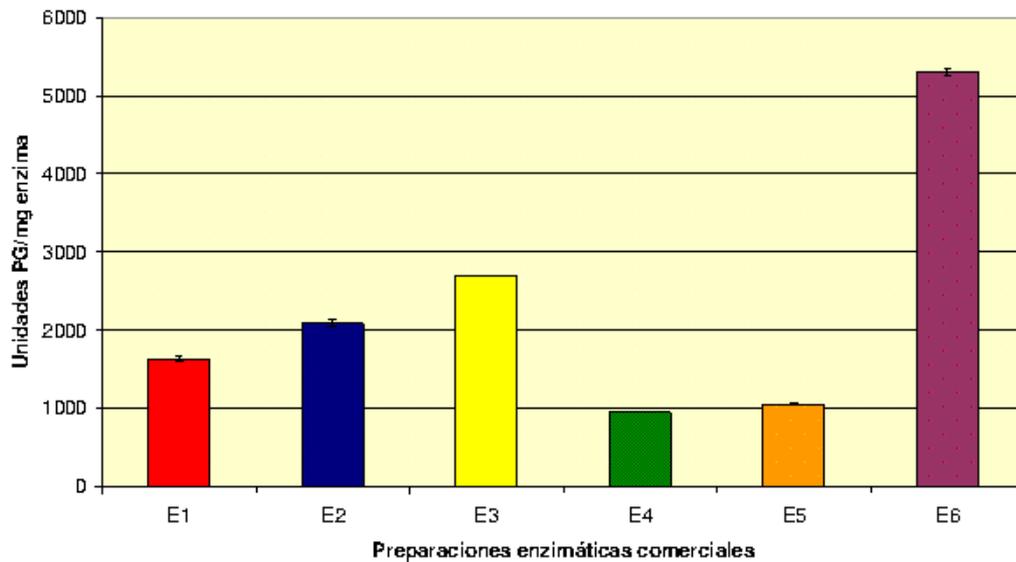
Durante la campaña 2004-2005 se llevó a cabo una caracterización de las actividades enzimáticas presentes en seis de los principales preparados enzimáticos para extracción de color en vinificaciones en tinto que se pueden encontrar en el mercado. Estos preparados enzimáticos fueron: E1: Rapidase Ex Color (DSM, Servian, Francia), E2: Lafase He Grand Cru (Laffort Oenologie, Burdeos, Francia), E3: Vinozym Vintage FCE (Novozymes, Dittingen, Suiza), E4: Vinoflow (Novozymes, Dittingen, Suiza), E5: Endozym Rouge (Pascal Biotech, Paris, Francia) y E6: Endozym 10 ICS (Pascal Biotech, Paris, Francia).

Las actividades enzimáticas que se determinaron fueron: poligalacturonasa total y endo-poligalacturonasa (PG total y endoPG), celulasa, xilanasas, galactanasas, pectato y pectín liasa, pectín metilesterasa,  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasas,  $\beta$ -glucosidasas y proteasa.

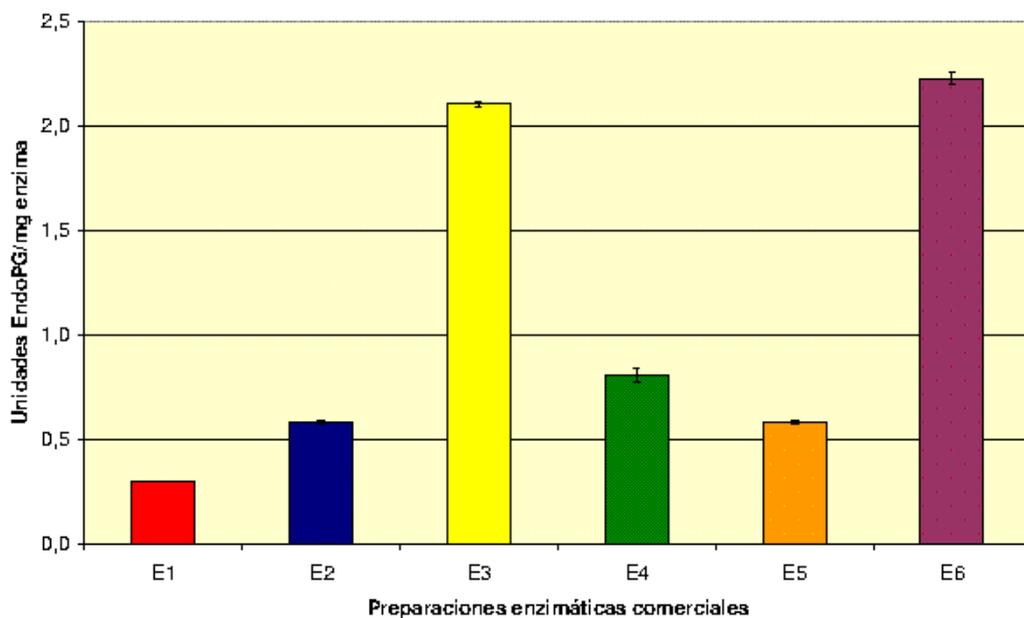
Las Gráficas 4.3.1. a 4.3.7. muestran las principales actividades enzimáticas medidas en las diferentes preparaciones comerciales. La pectina, uno de los principales componentes de la pared celular, es un heteropolisacárido compuesto de cadenas de galacturonato unidas por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) con un alto porcentaje de metil esterificación. La degradación de la pectina requiere la acción combinada de varios enzimas que se pueden clasificar en dos grupos principales: metil esteriferasas, que eliminan los grupos metoxilo de la pectina y las despolimerasas (hidrolasas y liasas), que rompen los enlaces entre las unidades del galacturonato. La PG cataliza la hidrólisis de las uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) del ácido péctico. Su acción puede ser endo (hidrolizando los

enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)) o exo (causando una rotura secuencial de estos enlaces desde el extremo no reductor de la cadena de ácido péctico). En las Gráficas 4.3.1. y 4.3.2. se observa que las preparaciones enzimáticas E3 y E6 muestran la mayor actividad poligalacturonasa (total y endo), mientras que estas actividades fueron bajas en los enzimas comerciales E1, E2 E4 y E5.

**Gráfica 4.3.1.** Actividad poligalacturonasa total (PG) presente en los preparados enzimáticos.

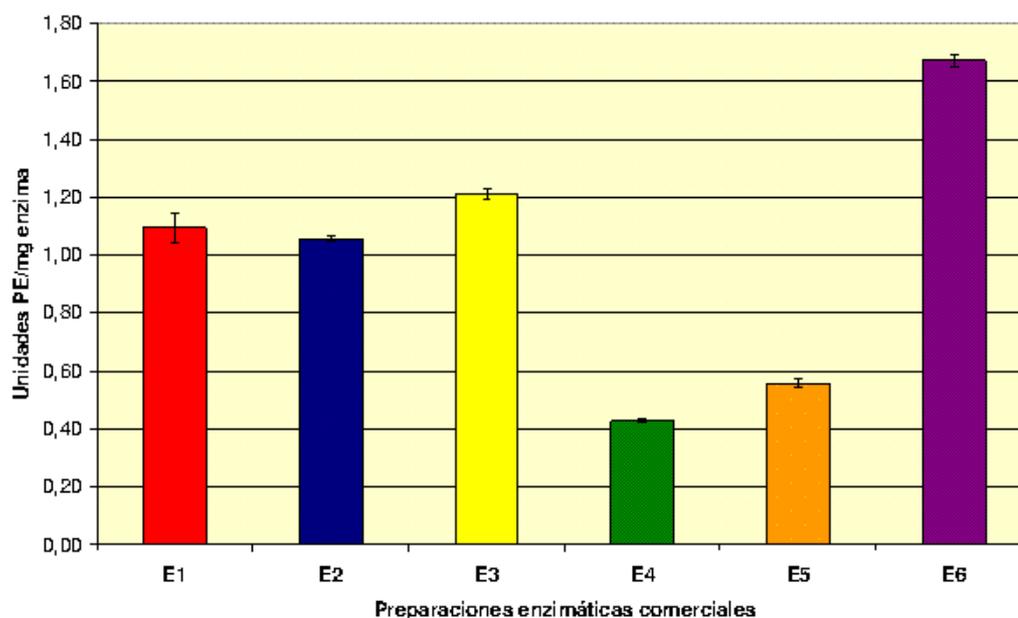


**Gráfica 4.3.2.** Actividad endo-poligalacturonasa (Endo-PG) presente en los preparados enzimáticos.



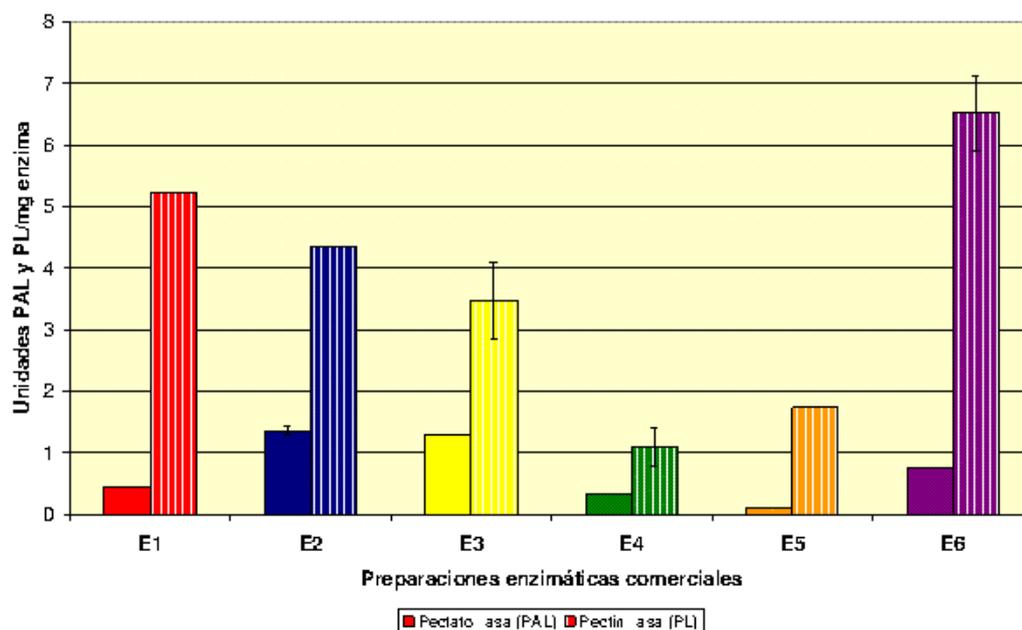
La pectín metilesterasa (PME) cataliza la escisión de los grupos metilo. La acción de este enzima es necesaria para la actuación de ciertas despolimerasas, pero no debe ser muy alta para evitar una excesiva producción de metanol en el vino. El nivel más alto de este enzima se encontró en la preparación E6, mientras los enzimas comerciales E4 y E5 presentaban los más bajos (Gráfica 4.3.3.).

**Gráfica 4.3.3.** Actividad pectín metilesterasa (PME) presente en los preparados enzimáticos.



Las liasas rompen los enlaces glicosídicos mediante un mecanismo de  $\beta$ -eliminación, produciendo un aumento en productos insaturados. La diferencia entre estos enzimas es que mientras las pectín liasas muestran especificidad por los sustratos metil esterificados (pectina), las pectato liasas actúan únicamente sobre poligalacturonato no esterificado (pectato). El preparado comercial E5 muestra valores de actividad pectato liasa menores que el resto (Gráfica 4.3.4.), mientras que los preparados E2 y E3 son los que presentan los valores más altos. El enzima comercial E4 es el que contiene la menor actividad pectín liasa, los preparados E1, E2 y E3 presentan valores intermedios, siendo la preparación enzimática E6 la que alcanza una actividad pectín liasa mayor.

**Gráfica 4.3.4.** Actividades pectato y pectín liasa (PAL y PL) presentes en los preparados enzimáticos.

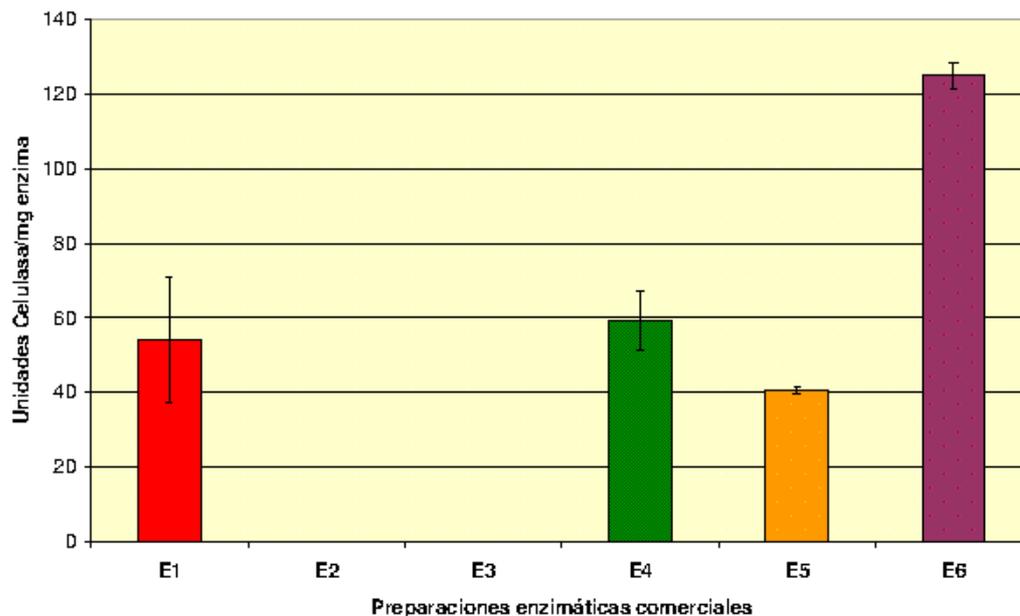


Las celulasas degradan la celulosa de la pared celular de la piel de la uva a glucosa. Se supone que son efectivas para incrementar el color (Gump y Haight, 1995) y para liberar los taninos ligados a las paredes celulares (Amrani Joutei et al., 2003). En la gráfica 4.3.5. se observa que no todos los preparados comerciales enzimáticos estudiados mostraron actividad celulasa. Esta actividad no se detectó en los enzimas E2 y E3, siendo en el preparado E6 donde mayor nivel de actividad se encontró.

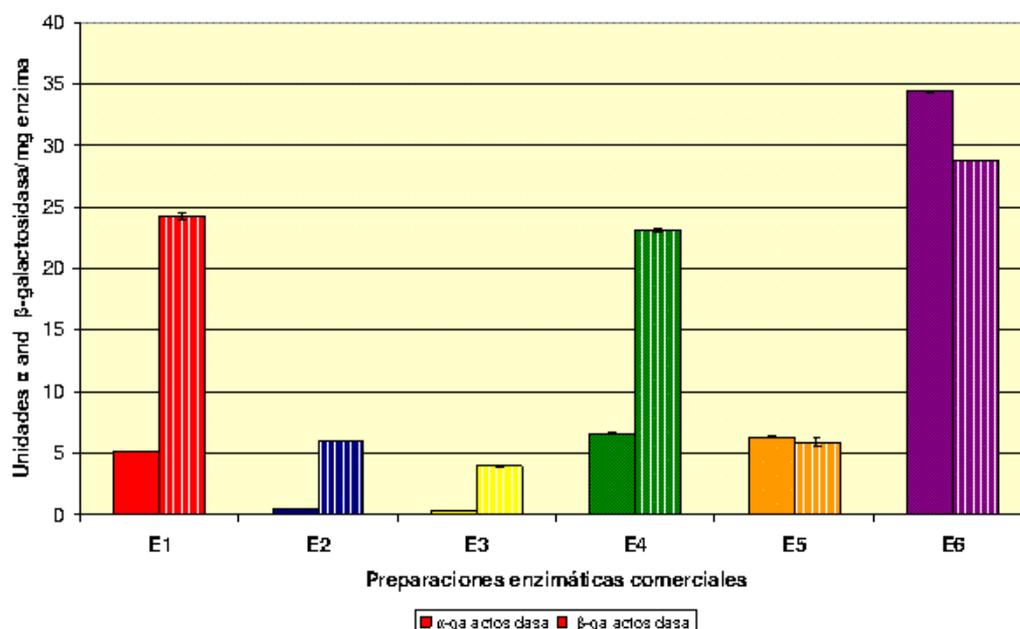
La galactanasa y la xilanasa son enzimas que catalizan la ruptura de moléculas de hemicelulosas. Estas actividades enzimáticas no se detectaron en los preparados comerciales analizados.

Las proteasas catalizan la degradación de las proteínas de la membrana celular y de las que forman parte de la estructura de la pared celular, por lo que podrían ayudar a la extracción de compuestos fenólicos. Esta actividad tampoco fue detectada en las muestras estudiadas.

Gráfica 4.3.5. Actividad celulasa presente en los preparados enzimáticos.



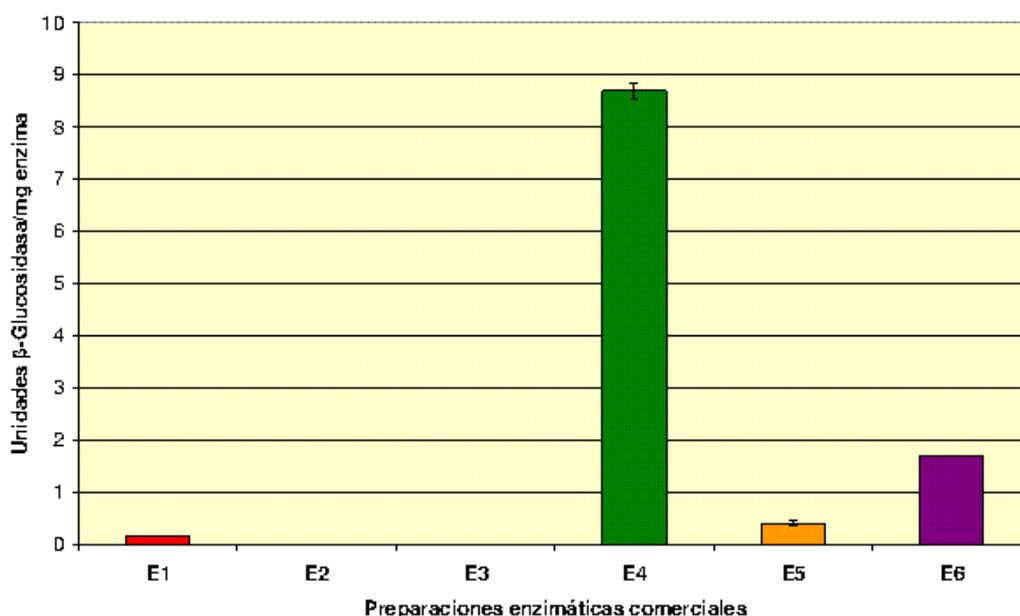
Gráfica 4.3.6. Actividades  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa presentes en los preparados enzimáticos.



La  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa catalizan la ruptura de enlaces  $\alpha$ - y  $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 4) de la galactosa, respectivamente. Algunos autores opinan que este enzima es responsable del reblandecimiento de ciertos frutos (Lazan et al., 1995; Mohd Ali et al., 1995) y se ha observado un aumento en estas actividades durante la maduración de la uva (Ortega-Regules, 2006). En general, en los preparados enzimáticos se detectó mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa que  $\alpha$ -galactosidasa, excepto en la preparación E6. Como se observa en la Gráfica 4.3.6., el preparado E6 alcanzó los mayores valores para las dos actividades, seguido, con niveles muy similares entre ellos, de los E1 y E4, para la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Esta situación se repitió con los valores de la actividad  $\alpha$ -galactosidasa, en los enzimas comerciales E1, E4 y E5.

La actividad  $\beta$ -glucosidasa también fue estudiada, puesto que puede ser perjudicial para el color del vino. Este enzima degrada los antocianos, por lo que podría contribuir al descenso del color en vinos tintos. Esta actividad residual únicamente no se encontró en dos de las preparaciones enzimáticas, E2 y E3 y fue especialmente alta en el preparado E4 (Gráfica 4.3.7.).

**Gráfica 4.3.7.** Actividad  $\beta$ -glucosidasa presente en los preparados enzimáticos.

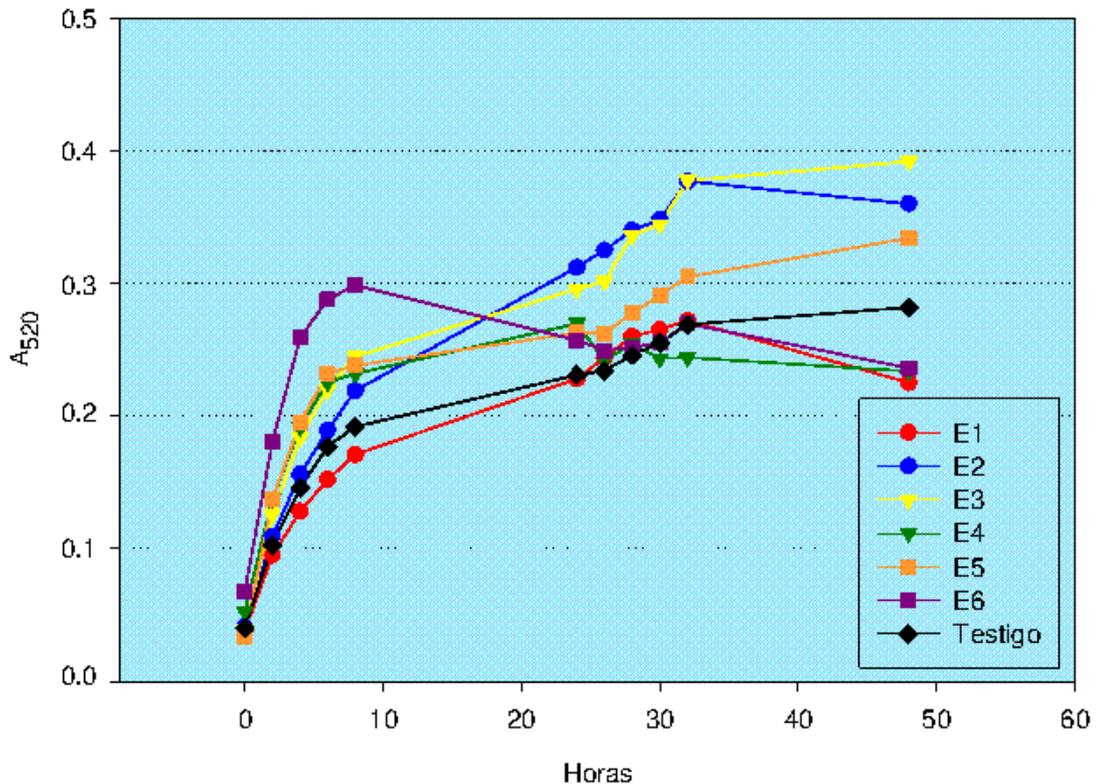


#### 4.3.2. CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DE LOS VINOS.

Para el ensayo sobre la influencia de los preparados enzimáticos en las pieles de uva, se introdujeron 0,5 g de pieles de Monastrell en 20 mL de una solución modelo a pH 3,6 y se añadieron 5000 mg/L del preparado enzimático. Cada ensayo tuvo una duración de 2 días, midiéndose la absorbancia a 520 nm de la solución a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30 y 48 horas.

La Gráfica 4.3.8. muestra la evolución de la absorbancia a 520 nm ( $A_{520}$ ) en la solución modelo donde se maceraron las pieles de Monastrell en presencia de los diferentes enzimas comerciales. Excepto la solución que contenía el enzima E1, todos los ensayos mostraron más color que la solución testigo durante las primeras 10 horas de maceración, siendo, así mismo, en este periodo donde mayores incrementos en  $A_{520}$  se detectaron. Los mayores valores de  $A_{520}$  en estas primeras 10 horas se encontraron en la solución que contenía el preparado comercial E6 (un enzima con alta actividad poligalacturonasa, celulasa y pectín liasa). Según Gump y Haight (1995), las celulasas, tanto purificadas como formando parte de una mezcla con pectinasas, pueden ser una herramienta efectiva para el incremento del color. Guerrand et al. (2003) también mostraron que cuando una preparación enzimática tenía un nivel más alto de actividad celulasa y hemicelulasa, la extracción era más rápida. En esta solución (E6) se observó después un descenso en la  $A_{520}$ . Esto puede ser debido a la presencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa en este enzima comercial. La  $A_{520}$  del resto de las muestras continuó aumentando, aunque más lentamente que durante las primeras horas. Transcurridas 30 horas de maceración, los ensayos E1 y E4 también mostraron un descenso en  $A_{520}$ . Al final del experimento las soluciones maceradas con los enzimas E2, E3 y E5 (bajas en actividad  $\beta$ -glucosidasa y celulasa) alcanzaron valores más altos que la solución control. La dosis de enzima utilizada en este ensayo fue muy alta, y por tanto el rol de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, cuando estaba presente, podría ser muy significativo.

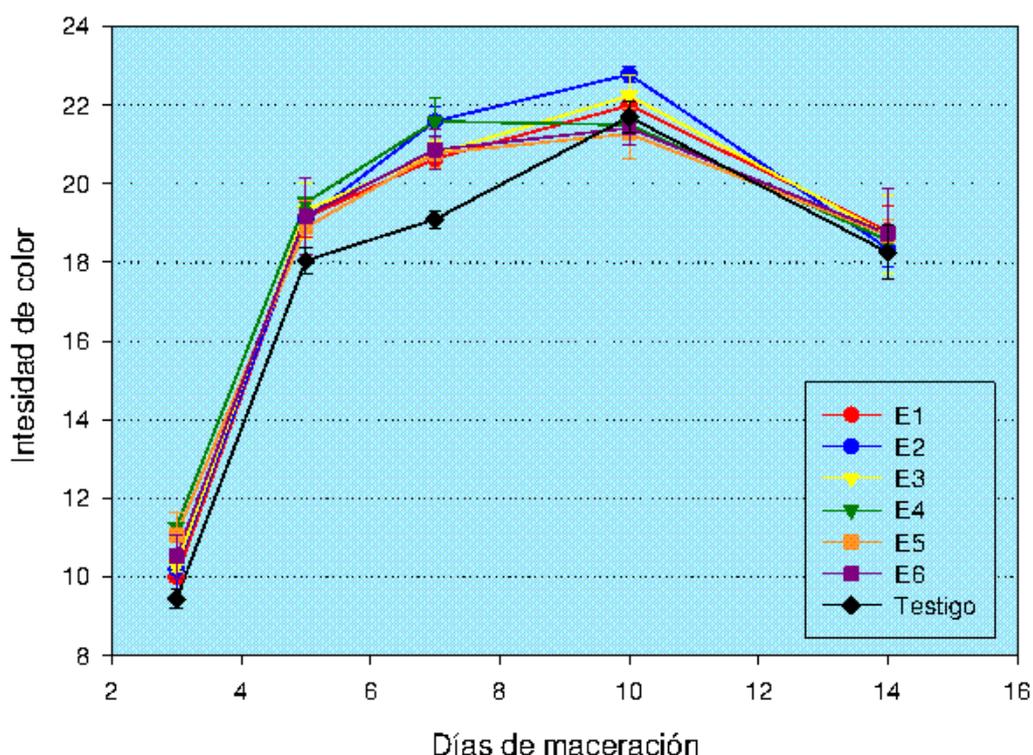
**Gráfica 4.3.8.** Evolución de la Absorbancia a 520 nm ( $A_{520}$ ) de las soluciones con pieles maceradas.



El efecto de los seis enzimas comerciales también se probó en vinificaciones con uvas de la variedad Monastrell. En la Gráfica 4.3.9. se observan diferencias en la intensidad de color entre el vino testigo y los vinos tratados con enzimas, durante el periodo de maceración hasta el día 10. En el día 3, los vinos con E4 y E5 mostraron un 20% más de color que el vino control. Parley (1997) describió que las mayores diferencias entre vinos elaborados con enzimas y su control, se detectaban en las etapas más tempranas de la maceración, disminuyendo éstas cuando aumentaba el tiempo de contacto con las pieles, puesto que la actividad de los enzimas se inhibía con el incremento de etanol y con la liberación de altos niveles de fenoles durante la fermentación. Por otro lado, los enzimas pueden modificar el estado físico de la piel de la uva y así, facilitar la extracción de estos fenoles durante la fase alcohólica. A día 7, los vinos tratados con E2 y E4 tenían una intensidad de color un 13%

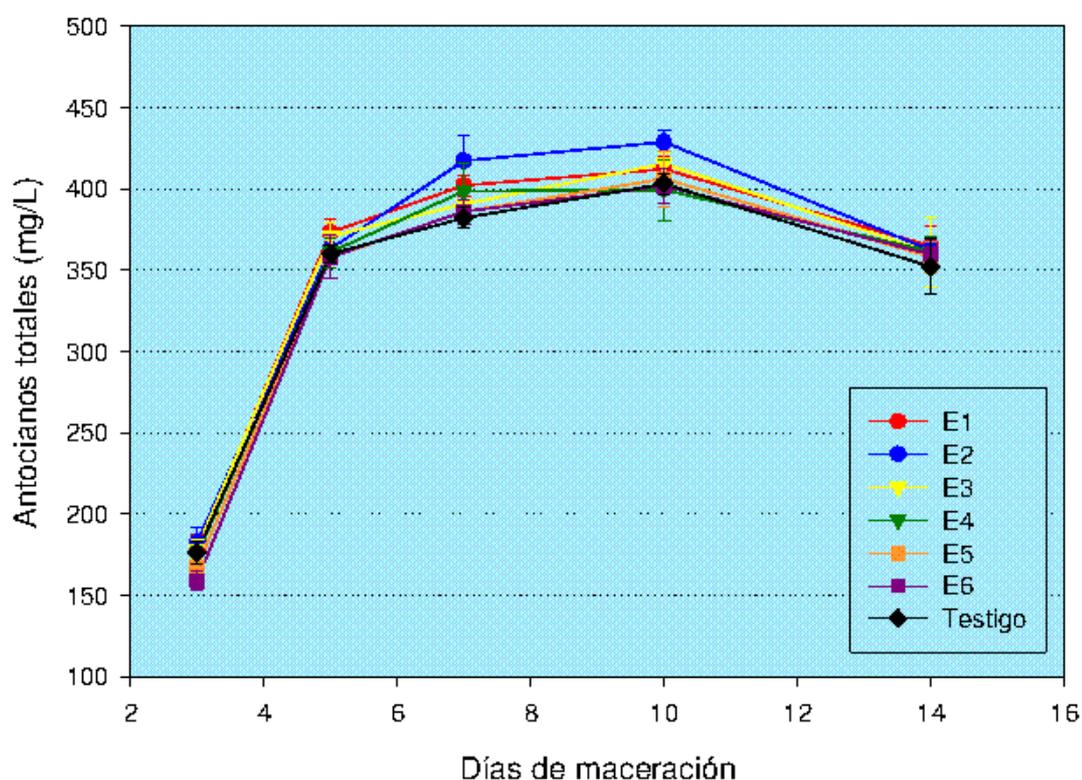
mayor que el vino control, pero estas diferencias decrecieron hasta el día 10. Estos resultados son muy similares a los de Clare et al. (2002), que encontraron una intensidad de color mayor en un 22% en vinos elaborados con enzimas a día 3 y que esta diferencia se reducía a un 7,5% a día 6. Desde el día 10 al 14, la intensidad de color disminuyó en todos los vinos estudiados y, en el momento del prensado, ya no se observaron diferencias entre los vinos con enzima y el testigo. Parece que los enzimas aceleran la extracción del color pero, si la maceración es lo suficientemente larga, el vino testigo puede alcanzar valores similares de intensidad de color. Por ello, las preparaciones enzimáticas podrían ser de mayor utilidad en maceraciones cortas.

**Gráfica 4.3.9.** Evolución de la intensidad de color en las diferentes vinificaciones durante la maceración.



La suma de todos los antocianos detectados mediante HPLC (monoglucósidos, derivados acilados, vitisina A y B) tampoco mostró diferencias al final de la maceración, siendo, además, su evolución muy similar a la de la intensidad de color de los vinos (Gráfica 4.3.10.). A día 3 y 6, el vino elaborado con el preparado E2 (un enzima con alta actividad pectín y pectato liasa, media actividad poligalacturonasa y pectín metil esterasa y sin actividad celulasa) alcanzaba la concentración antociánica más alta.

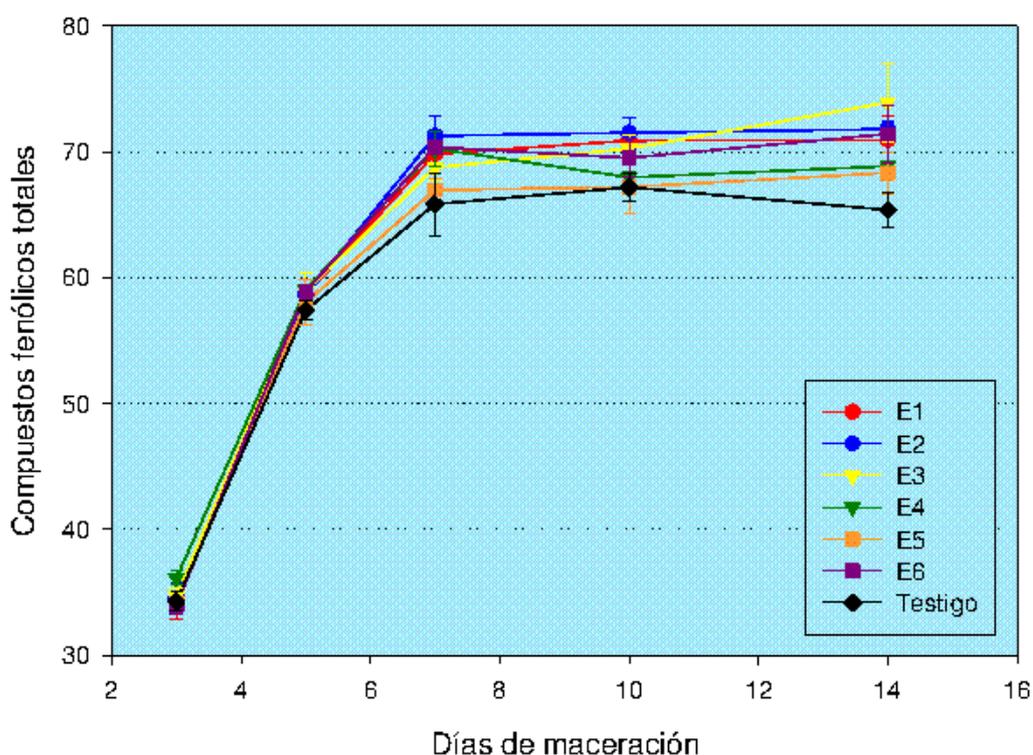
**Gráfica 4.3.10.** Evolución del contenido en antocianos (suma de los compuestos identificados mediante HPLC) en las diferentes vinificaciones durante la maceración.



En la Gráfica 4.3.11. se muestra la evolución del contenido en fenoles total (CFT), medido como densidad óptica a 280 nm. Al contrario que con la intensidad de color, sólo se observan diferencias a partir del día 5, que se fueron incrementando hasta el día 15, cuando el control presentó el menor valor de CFT y los vinos elaborados con E1, E2, E3 y E6 los niveles más altos. Los vinos tratados con E4 y E5 (enzimas con

baja actividad pectín y pectato liasa y poligalacturonasa) mostraron los valores más bajos de CFT entre los vinos enzimados.

**Gráfica 4.3.11.** Evolución del contenido en compuestos fenólicos totales (medido como absorbancia a 280 nm) en las diferentes vinificaciones durante la maceración.



Al final de la fermentación alcohólica (Tabla 4.3.1.), el vino testigo y los vinos elaborados con enzimas mostraban valores similares de intensidad de color, parámetros CIELab,  $A^{SO_2}$  y  $A^{acet}$ . Sin embargo, sí se observaron diferencias, excepto para el vino E5, entre el contenido en compuestos fenólicos totales del testigo y los vinos tratados con enzimas, que alcanzaron valores más altos. Las actividades pectín y pectato liasa y poligalacturonasa parecen ser importantes en la extracción de compuestos fenólicos, mientras que la actividad pectín metilesterasa, muy alta en el E5, no. La concentración de taninos también fue mayor en todos los vinos elaborados con enzimas, pero no se encontraron diferencias significativas entre los distintos enzimas estudiados. Así mismo, el

porcentaje de color rojo fue mayor en los vinos tratados con preparados enzimáticos.

**Tabla 4.3.1.** Características cromáticas de los vinos al final de fermentación alcohólica.

	Testigo	E1	E2	E3	E4	E5	E6
<b>CFT<sup>1</sup></b>	65,3a <sup>2</sup>	70,9bcd	71,8cd	73,9d	68,8bc	68,3ab	71,4bcd
<b>Taninos (mg/L)</b>	680,8a	996,5b	1078,7b	1026,7b	1023,2b	988,0b	1101,8b
<b>IC</b>	18,2a	18,8a	18,3a	18,7a	18,6a	18,7a	18,7a
<b>%A</b>	30,3c	30,1b	30,0ab	29,9ab	30,1b	29,8a	29,8a
<b>%AZ</b>	9,8c	9,7b	9,8c	9,7b	9,7b	9,6a	9,7b
<b>%R</b>	59,9a	60,2b	60,2b	60,4bc	60,2b	60,6c	60,5c
<b>L*</b>	7,6a	7,7a	8,1a	7,9a	8,0a	7,9a	7,9a
<b>C*</b>	39,7a	40,1a	41,0a	40,7a	40,8a	40,6a	40,5a
<b>H*</b>	19,1a	19,3a	19,9a	19,6a	19,8a	19,6a	19,5a
<b>A<sub>502</sub></b>	1,8a	1,9a	1,9a	1,9a	1,8a	1,8a	1,8a
<b>A<sub>acet</sub></b>	11,7a	12,1a	11,6a	11,7a	11,6a	11,4a	11,4a

<sup>1</sup> CFT: compuestos fenólicos totales (como absorbancia a 280 nm); IC: intensidad de color; %A, %R, %Az: porcentajes de color amarillo, rojo y azul; L\*, C\* y H\*: parámetros CIELab; A<sub>502</sub>: absorbancia a 520 nm después de adicionar SO<sub>2</sub>; A<sub>acet</sub>: absorbancia del vino a 520 nm después de adicionar acetaldehído.

<sup>2</sup>Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas según LSD (p<0.05)

Después de 12 meses de almacenamiento (Tabla 4.3.2.) el vino control mostraba los valores más bajos de CFT y contenido en taninos; siendo los vinos elaborados con E2, E3 y E6 los de mayor concentración tánica. La intensidad de color fue superior en los vinos tratados con enzimas, exceptuando al E5, con un porcentaje de color azul, color rojo y compuestos poliméricos significativamente alto. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Delteil (2000b) con vinos de Monastrell. Algunos tratamientos con enzimas también produjeron vinos más coloreados durante el almacenamiento (Wightman et al., 1997) y con mayor contenido en antocianos poliméricos (Watson et al., 1999), mediante la promoción de un aumento en la formación de pigmentos poliméricos estables. Zimman et al. (2002) observó que el enzima utilizado en su estudio promovía un incremento en el contenido en taninos, pero que no se incrementaba el color del vino a largo plazo, aunque los taninos pudieran favorecer la formación de compuestos poliméricos coloreados.

Se aplicó un análisis de componentes principales utilizando como variables los valores de las características cromáticas de los vinos al final de la fermentación alcohólica y después de doce meses de almacenamiento. El análisis confirmó los resultados previos. Los dos primeros componentes principales explicaban el 94,1% del total de la varianza. El primer componente, que separa los vinos de acuerdo a su tiempo de almacenamiento, explicaba el 74,9% de la varianza y el segundo componente el 19,2%. La Gráfica 4.3.12. muestra la distribución de los vinos en el plano definido por esos dos componentes. Los vinos analizados al final de la fermentación alcohólica se separaban claramente de aquéllos con doce meses de almacenamiento, mostrando estos últimos el mayor contenido en compuestos poliméricos ( $A^{SO_2}$ ), y los mayores porcentajes de color amarillo y azul. Sólo el vino control se separaba de los vinos elaborados con enzimas, en los dos casos (al final de la fermentación alcohólica y tras doce meses de guarda),

encontrándose diferencias muy pequeñas entre los vinos tratados con distintos preparados enzimáticos comerciales.

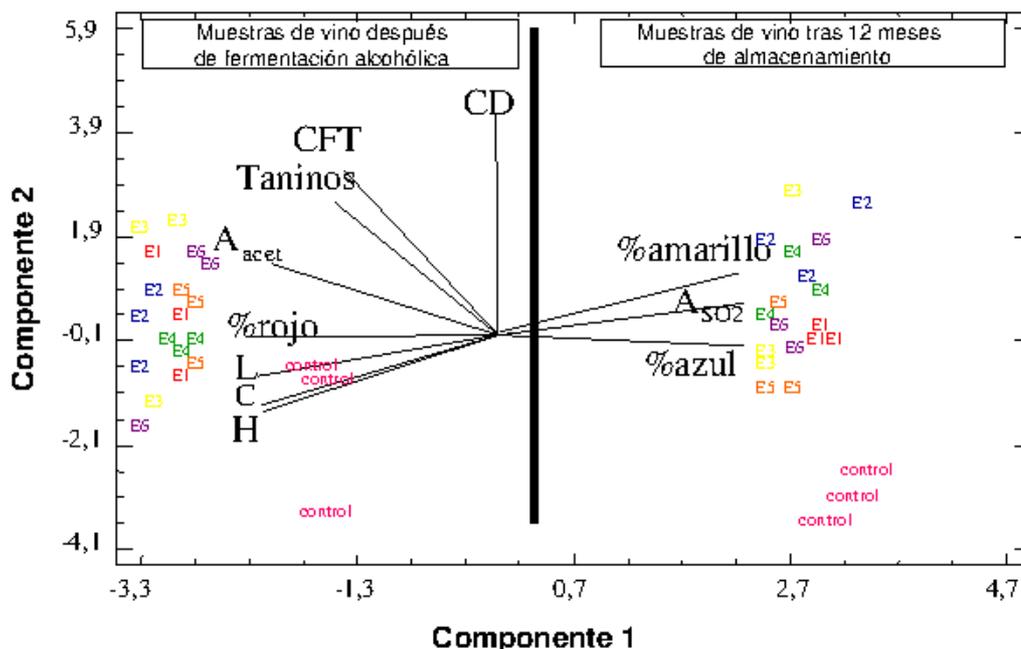
**Tabla 4.3.2.** Características cromáticas de los vinos tras 12 meses de almacenamiento.

	Testigo	E1	E2	E3	E4	E5	E6
<b>CFT<sup>1</sup></b>	61,1a <sup>2</sup>	65,1b	69,0c	67,8c	68,0c	64,9b	67,2bc
<b>Taninos (mg/L)</b>	593,8a	764,8b	861,1cd	864,0cd	844,5c	820,8c	908,8d
<b>IC</b>	17,3a	18,5b	19,3b	18,9b	18,8b	18,2ab	18,8b
<b>%A</b>	37,5c	37,5c	36,9ab	36,7ab	37,1ab	37,1ab	36,7a
<b>%AZ</b>	11,9a	12,2ab	12,6b	12,5b	12,4b	12,4b	12,6b
<b>%R</b>	50,1a	50,2ab	50,4ab	50,7b	50,5ab	50,5ab	50,6b
<b>L*</b>	5,6b	4,7a	4,1a	4,5a	4,5a	4,8ab	4,3a
<b>C*</b>	34,4b	31,4ab	28,5a	30,2a	30,5a	31,7ab	29,6a
<b>H*</b>	16,2b	15,1a	14,5a	14,8a	14,9a	15,2a	14,7a
<b>A<sub>520</sub></b>	4,9a	5,3b	5,7b	5,4b	5,5b	5,4b	5,6b
<b>A<sub>520</sub><sup>acet</sup></b>	8,9a	9,5ab	10,1b	9,9b	9,8b	9,5ab	9,7b

<sup>1</sup> CFT: compuestos fenólicos totales (como absorbancia a 280 nm); IC: intensidad de color; %A, %R, %Az: porcentajes de color amarillo, rojo y azul; L\*, C\* y H\*: parámetros CIELab; A<sup>SO<sub>2</sub></sup>: absorbancia a 520 nm después de adicionar SO<sub>2</sub>; A<sup>acet</sup>: absorbancia del vino a 520 nm después de adicionar acetaldehído.

<sup>2</sup>Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas según LSD (p<0.05)

**Gráfica 4.3.12.** Distribución de los vinos en un sistema de coordenadas bidimensional definido por dos componentes principales.



Abreviaturas: IC: intensidad de color; DO280: fenoles totales;  $A_{520}$ : absorbancia del vino a 520 nm tras adicionar acetaldehído;  $A_{SO_2}$ : absorbancia a 520 nm tras adicionar  $SO_2$ ;  $L^*$ ,  $C^*$  y  $H^*$ : parámetros CIELab.

En resumen, se encontraron diferencias en el tipo de actividades enzimáticas presentes en las preparaciones comerciales, así como en su concentración. Incluso se detectó la presencia de  $\beta$ -glucosidasa, actividad indeseable. Cuando los enzimas eran utilizados a una concentración muy alta, parece ser que la presencia de esta actividad fue en detrimento de la extracción de color, pero a las dosis recomendadas por los fabricantes, el nivel de actividad  $\beta$ -glucosidasa no pareció tener influencia en el color del vino. También se encontraron diferencias entre las características cromáticas de los vinos elaborados con enzima y el vino control, mostrando los primeros al final de la maceración y de la fermentación alcohólica un mayor contenido en compuestos fenólicos totales y en taninos y, después de doce meses de almacenamiento incluso una intensidad de color mayor. Aunque las diferencias entre los vinos tratados con los preparados enzimáticos comerciales y el vino control fueron grandes, los vinos enzimados sólo mostraron pequeñas diferencias entre

ellos, aunque las características de los enzimas comerciales difirieran mucho las unas de las otras. Por último, todos los enzimas incrementaron el contenido en compuestos fenólicos totales, probablemente al facilitar la liberación de taninos procedentes de la piel.

#### 4.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA PARED CELULAR DE LOS ORUJOS.

Los sustratos de estos preparados comerciales, que se utilizan en la vinificación, son las paredes celulares de la piel de la uva y el objetivo es facilitar su degradación. Para comprobar su efecto, tras el prensado de los vinos estudiados, se tomaron muestras del orujo resultante. Este orujo fue prensado, congelado y posteriormente se extrajeron sus paredes celulares. Estas paredes celulares se caracterizaron, analizando su contenido en proteínas y compuestos fenólicos ligados a la pared celular, lignina y su composición en azúcares neutros y ácidos urónicos.

En la Tabla 4.3.3. se muestra el contenido en material de la pared celular extraído de los orujos resultantes de las diferentes elaboraciones. Se observa que no hay diferencias en la cantidad de pared celular que se aisló de los distintos orujos, por lo que parece ser que el uso de enzimas no tuvo influencia en la mayor o menor degradación de pared celular de los orujos.

**Tabla 4.3.3.** Contenido en pared celular de los orujos tras la maceración.

	Rendimiento (mg pared celular/g orujo)
MCCT	15,0a <sup>1</sup>
MCCE1	15,0a
MCCE2	15,9a
MCCE3	14,7a
MCCE4	18,5a
MCCE5	12,2a
MCCE6	14,6a

<sup>1</sup> Letras distintas indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 4.3.4. se muestra la composición en proteínas totales, compuestos fenólicos totales y lignina de la pared celular de los orujos (en mg/g de pared celular).

**Tabla 4.3.4.** Contenido en proteínas, compuestos fenólicos totales y lignina en pared celular de los orujos tras la maceración.

	Proteínas (mg/g pared celular)	Compuestos fenólicos totales (mg/g pared celular)	Lignina (mg/g pared celular)
<b>MCCT</b>	14,0a <sup>1</sup>	69,2a	223,3a
<b>MCCE1</b>	25,4b	74,2a	306,7d
<b>MCCE2</b>	18,7ab	84,2a	260,0bc
<b>MCCE3</b>	21,8ab	64,1a	276,7c
<b>MCCE4</b>	24,0b	66,1a	246,7ab
<b>MCCE5</b>	13,0a	79,9a	250,0b
<b>MCCE6</b>	24,4b	87,8a	283,3cd

<sup>1</sup> Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

No se observa ningún tipo de influencia de la aplicación de enzimas macerativos en la composición en compuestos fenólicos totales de la pared celular. Este resultado parece lógico, puesto que, los preparados enzimáticos son fundamentalmente mezclas de enzimas pécticos que deben degradar los polisacáridos y no los compuestos fenólicos que se encuentran asociados a ellos. Por lo tanto, parece que los taninos ligados a la pared celular no se van a ver afectados por el uso de enzimas, mientras que taninos que se encuentran en las vacuolas sí se van a liberar en el vino en mayor medida, según se ha observado en el vino. El contenido en proteínas tampoco parece que se vaya a ver muy afectado por el uso del enzima, coincidiendo con la no presencia de actividad proteasa encontrada en los preparados enzimáticos estudiados. El contenido en lignina, sin embargo, aumenta al aplicar el enzima extractor. Esto se puede deber a que se de una concentración de este compuesto al solubilizarse otros componentes de la pared celular.

**Tabla 4.3.5.** Contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos (mg/g de pared celular) en la pared celular del orujo tras la maceración.

	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	Cell-Glu <sup>1</sup>	UA	GM	GA	Total azúcares
<b>MCCT</b>	1,5a <sup>2</sup>	0,0a	15,9bc	11,5ab	26,5a	17,2a	68,3a	55,2a	160,1bc	25,7a	9,6b	356,2a
<b>MCCE1</b>	0,0a	0,0a	15,8bc	15,4bc	30,4bc	17,8a	70,3ab	93,8c	182,1c	19,7a	7,2a	425,5b
<b>MCCE2</b>	1,0a	0,0a	14,8bc	16,1bc	32,7cd	18,1a	72,7bc	94,7c	138,6ab	21,8a	10,8b	388,7ab
<b>MCCE3</b>	1,1a	0,7a	14,5bc	14,9bc	33,9d	19,0a	74,0bc	95,4c	130,5ab	24,3a	13,1c	383,9ab
<b>MCCE4</b>	5,6a	1,5a	18,5c	17,3c	34,5d	19,3a	75,9c	72,8ab	132,7ab	24,9a	11,0b	378,1ab
<b>MCCE5</b>	1,0a	0,0a	9,9a	8,0a	29,2ab	16,2a	74,2bc	63,3a	136,8ab	19,1a	9,6b	338,5a
<b>MCCE6</b>	1,0	0,6a	13,0ab	14,1bc	32,4cd	16,8a	74,2bc	84,3bc	112,0a	27,4a	13,1c	348,4a

<sup>1</sup> Abreviaturas: Cell-Glu: Glucosa celulósica; UA: Ácidos urónicos; GM: Grado de metilación; GA: Grado de Acetilación.

<sup>2</sup> Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según test LSD (p<0,05).

En la Tabla 4.3.5. se detalla la evolución del contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos a lo largo de la maceración. No todos los azúcares se van a ver influidos por la aplicación de los enzimas macerativos. Únicamente se encuentran diferencias, estadísticamente significativas, en el contenido en celulosa, glucosa, manosa y xilosa. La concentración de todos estos compuestos aumentaba al adicionar cada uno de los preparados enzimáticos comerciales para la extracción de color. El aumento en el contenido en manosa y glucosa, componentes de las hemicelulosas, puede indicar que estos compuestos no están siendo atacados, por lo que al permanecer constantes mientras otros componentes sufren una degradación, su concentración aumentaría. Así mismo, coincide con los análisis realizados en los preparados comerciales enzimáticos, en los que no se detectaban actividades hemicelulásicas (galactanasa y xilanasas). El aumento en la concentración en glucosa celulósica puede tener una explicación similar.

Se observan ciertas diferencias entre la composición de la pared celular de la piel de los orujos en los que se ha utilizado un enzima y el testigo, pero no son tan claras como se podía haber esperado. Es posible que la maceración sea lo suficientemente larga para conseguir que los enzimas propios de la uva y las condiciones de fermentación, sean capaces de degradar esta pared suficientemente y por eso la adición de enzimas no sea muy efectiva.

#### **4.4. EFECTOS DE ENZIMAS COMERCIALES EN LA VINIFICACIÓN EN FUNCIÓN DEL ESTADO DE MADURACIÓN DE LA UVA Y DE LA TÉCNICA DE ELABORACIÓN.**

En el apartado anterior se ha mostrado que algunos preparados enzimáticos comerciales pueden ser útiles para mejorar la extracción de color en la vinificación en tinto de uvas de la variedad Monastrell. Se plantea entonces la necesidad de estudiar en qué condiciones de elaboración podrían ser estos enzimas más efectivos. Para ello se han llevado a cabo varias experiencias. Se comprobó la eficacia de la aplicación de un preparado enzimático comercial para la extracción de color en vinos elaborados con distinto tiempo de maceración, en uvas con diferente grado de maduración y en uvas con igual grado de maduración pero diferente madurez fenólica.

El preparado comercial que se eligió fue Lafase He Grand Cru (Laffort Œnologie, Burdeos, Francia), que en la experiencia anterior fue el denominado E2. Se determinaron las actividades enzimáticas presentes en este preparado, que fue adquirido de nuevo para esta campaña. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.6.1.

Se observa que las actividades enzimáticas presentes en el preparado comercial seleccionado variaron de un año a otro, bajando, en esta segunda campaña, la actividad poligalacturonasa total, pectín liasa y pectín metilesterasa. La actividad endo-poligalacturonasa no varió y tampoco se detectó actividad celulasa, xilanasas, proteasa y galactanasa. Sin embargo, las actividades pectato liasa,  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucosidasa aumentaron. El espectro enzimático de cada preparación depende de la cepa, del medio y de las condiciones de cultivo, por lo que cualquier cambio, en el método y/o en las condiciones de obtención del preparado enzimático, puede hacer variar ampliamente las actividades presentes en éste (Canal-Llaubères, 2003; Palacios et al., 2003). La variabilidad que se ha detectado en la eficiencia de un mismo preparado

enzimático para la extracción de color en años distintos (Bautista-Ortín et al., 2005) puede ser debido, en parte, a este motivo.

**Tabla 4.6.1.** Actividades enzimáticas determinadas en el preparado enzimático comercial.

Actividad	Valor
PG Total <sup>a</sup>	646,1
PG endo	0,547
Celulasa	nd
Pectato Liasa	2,174
Pectin Liasa	2,029
$\beta$ -glucosidasa	0,647
Pectín esterasa	0,73
$\alpha$ -galactosidasa	0,906
$\beta$ -galactosidasa	8,887
Xilanas a	nd
Proteasa	nd
Galactanasa	nd

<sup>a</sup>PG total: microMol extremos reductores (ac galacturonico)/mg prep enzimatico y min a pH 3,80 y 37°C; Celulasa, xilanas a y galactanasa: Igual PG; Pectato y Pectin Liasa: microMoles dobles enlaces/mg enzima y min pH 3,8 y 25°C; b-glucosidasa: microMoles p-nitrofenol/mg enzima y min; Pectin Esterasa: 1 uPE=mL NaOH 0.01N necesarios para mantener el pH 4,5 y 25°C / mg de enzima y min; a y b-galactosidasa: nMoles p-nitrofenol/mg enzima y min; Proteasa:  $\mu$ mol de grupos amino libres/ mg prep enzimatico y min a pH 3,80 y 37°C.

#### **4.4.1. EFECTO EN LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DE VINOS ELABORADOS CON DISTINTO TIEMPO DE MACERACIÓN Y EN LAS PAREDES CELULARES DE LOS ORUJOS OBTENIDOS.**

Como ya se ha comentado, el color del vino tinto se obtiene mediante maceración de los hollejos de las uvas en el mosto, siendo esta maceración una extracción fraccionada de los componentes de la uva. Los antocianos y taninos presentan distinta solubilidad y capacidad de difusión, por lo que la disolución de los compuestos fenólicos en el mosto varía en función del tiempo. Teniendo en cuenta esta variabilidad se podría modificar el tiempo de maceración en función del tipo de vino que se desee obtener, puesto que el tiempo de extracción va a influir en la cantidad y estabilidad del color, en la astringencia y la estructura tánica, en el aroma y en la capacidad del vino para envejecer (Zoecklein, 1991).

En este apartado, se ha aplicado el preparado comercial de enzimas pectolíticos para la extracción de color en vinos elaborados con diferentes tiempos de maceración. El objetivo era observar si el uso de enzimas podría ayudar a reducir el tiempo de maceración, así como comprobar la eficacia de estos preparados en la extracción de compuestos fenólicos y en el aumento de color, en función del tiempo de contacto de la masa de vinificación con el mosto/vino.

Para ello se llevaron a cabo vinificaciones de uva Monastrell con un tiempo de maceración variable (5, 10 y 15 días), con adición de un preparado enzimático comercial, comparándolo con un vino elaborado sin enzima. Se controló la cinética de difusión de los compuestos fenólicos y del color durante el periodo de elaboración y posterior almacenamiento.

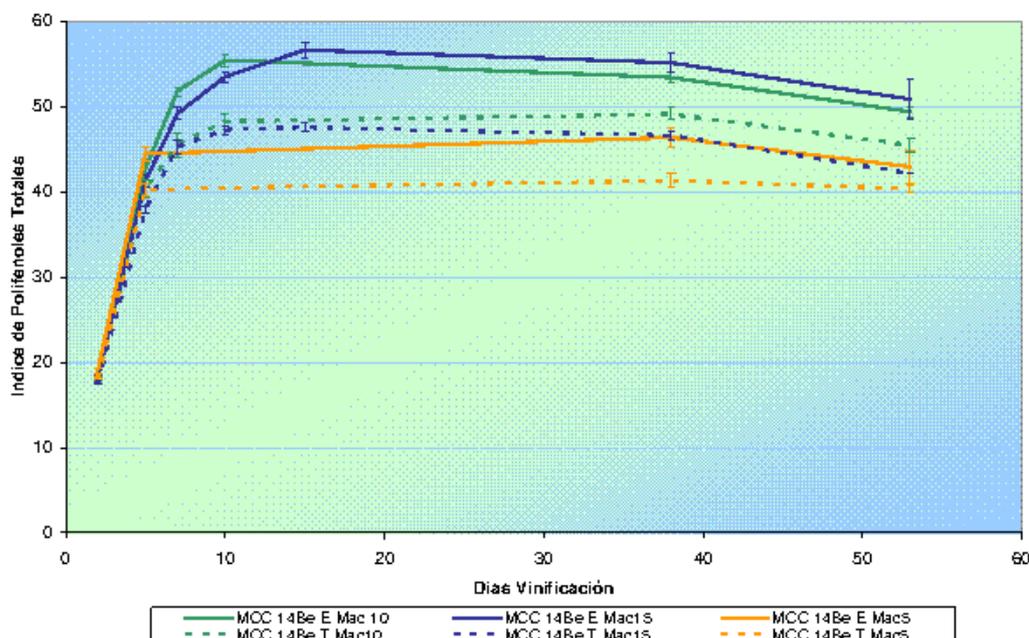
##### **4.4.1.1. Características cromáticas de los vinos.**

En las Gráficas 4.4.1.1. a 4.4.1.5. se muestra la evolución de los compuestos fenólicos totales, antocianos totales y poliméricos, taninos

totales e intensidad del color durante la maceración y hasta fin de fermentación maloláctica.

La concentración de compuestos fenólicos totales aumenta hasta el final de la maceración en todos los vinos, manteniéndose estable hasta final de fermentación maloláctica (Gráfica 4.4.1.1.). Los vinos elaborados con adición del preparado enzimático extractor de color obtienen una mayor carga polifenólica que sus respectivos testigos. Revilla y González-San José (2003a) también observaron la actuación de los enzimas sobre otros compuestos fenólicos distintos de los antocianos. Las mayores diferencias en la extracción de compuestos fenólicos entre los vinos elaborados con enzimas y sus respectivos testigos, se dan entre los días 7 y 15 de maceración. Se observa un aumento en la extracción de estos compuestos conforme se alarga el tiempo de maceración (Yokotsuka et al., 2000; Gambuti et al., 2004). Los vinos con una maceración de 5 días presentan un contenido menor en compuestos fenólicos totales que los vinos macerados 10 y 15 días.

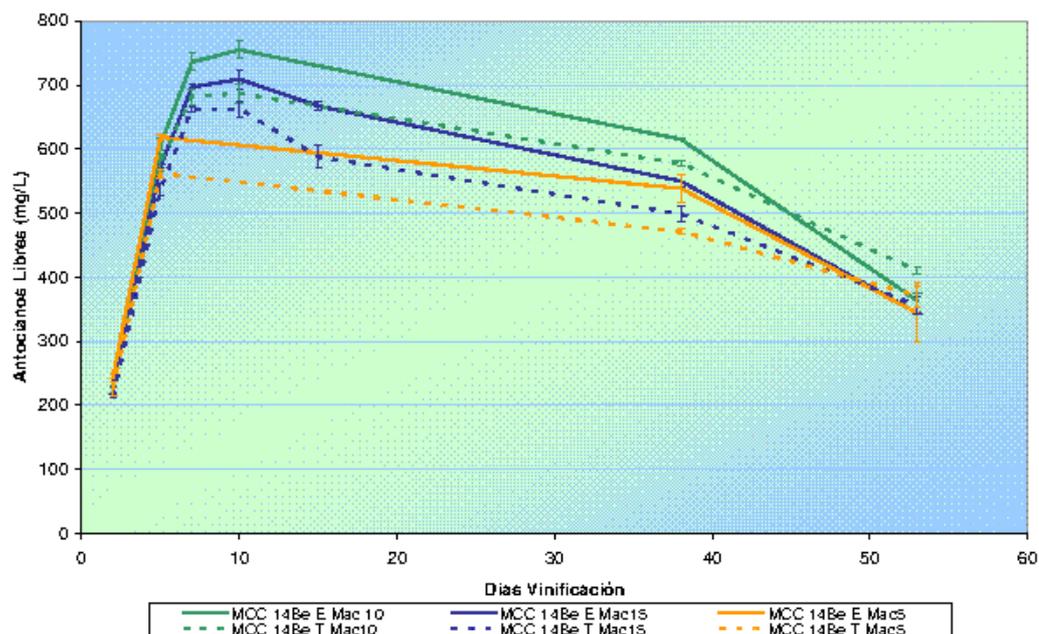
**Gráfica 4.4.1.1.** Evolución del contenido en compuestos fenólicos totales durante la vinificación.



A fin de fermentación alcohólica (día 38), al aumentar el tiempo de maceración de 5 a 10 días, la concentración en compuestos fenólicos se vio incrementada un 15 y un 18%, si se comparaban las dos vinificaciones testigo (Mac5 T frente a Mac10 T) y las dos con adición de enzima (Mac5 E frente a Mac10 E) respectivamente. Sin embargo, al aumentar el tiempo de maceración de 10 a 15 días, las diferencias encontradas en el contenido en compuestos fenólicos totales fueron mucho menores, alrededor del 4% comparando las dos elaboraciones con adición de enzima (Mac10 E frente a Mac15 E). Entre las vinificaciones testigo (Mac10 T frente a Mac15 T) no se encontraron estas diferencias al aumentar el tiempo de maceración, incluso se dio una pequeña disminución en el contenido en compuestos fenólicos totales. Resultados similares fueron observados por Spranger et al. (2004). A fin de fermentación maloláctica esta tendencia se mantenía estable.

En la Gráfica 4.4.1.2. se observa que los antocianos libres aumentan en el transcurso de la maceración hasta el día 10, descendiendo a partir de este momento hasta el final de la fermentación alcohólica, pudiendo este descenso ser debido en parte a reacciones de polimerización y oxidación y en parte a la fijación sobre las levaduras (Vasserot et al., 1997) y partes sólidas de la uva (Bourzteix et al., 1970). Varios estudios muestran un máximo en la extracción de antocianos y color durante la primera mitad de maceraciones tradicionales, una disminución una vez alcanzado ese máximo y que un mayor tiempo de maceración no tiene efecto sobre el incremento en la concentración de estos pigmentos (Van Balen, 1984; Bautista-Ortín et al., 2005; Budić-Leto et al.; 2006). La aplicación del enzima va a suponer un aumento, con respecto a su correspondiente vino control, de alrededor del 6-8% en el contenido de antocianos totales durante toda la maceración, manteniéndose esta diferencia estable en el tiempo.

**Gráfica 4.4.1.2.** Evolución del contenido en antocianos libres durante la vinificación.

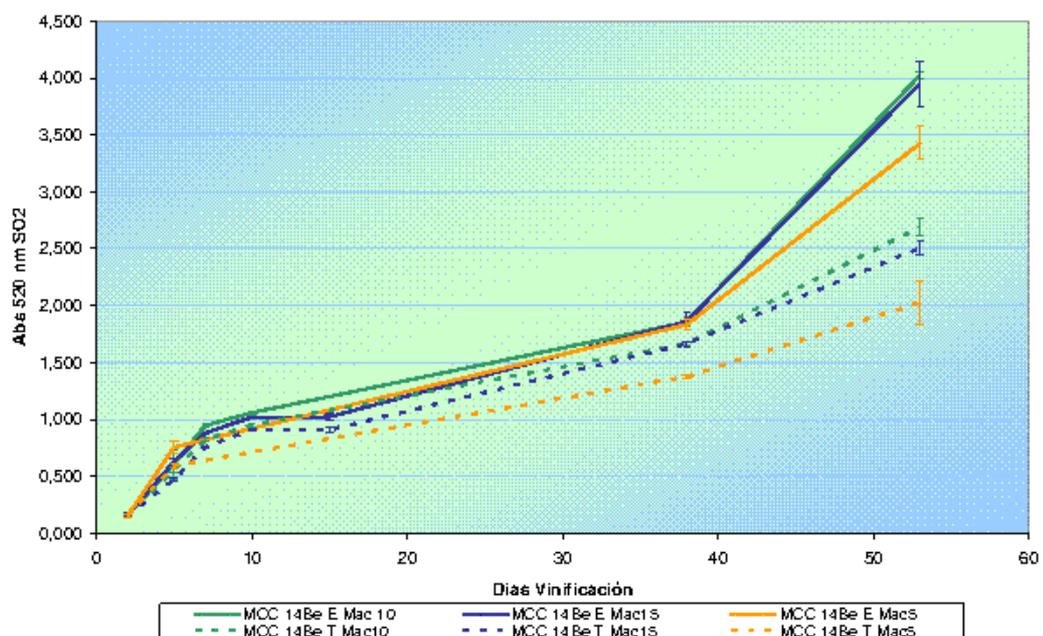


A fin de fermentación alcohólica, los vinos con 10 días de maceración son los que presentan mayores valores de antocianos totales, tanto para el vino testigo como para el que se elaboró con enzima. El vino con mayor tiempo de maceración (15 días) es el que sufre un descenso más acusado en los valores de antocianos libres, un fenómeno similar al observado por Bautista-Ortín et al. (2004b). A fin de fermentación maloláctica, el contenido en antocianos libres ha seguido descendiendo, siendo este descenso mucho más acusado en los vinos elaborados con enzima, que eran los de mayor contenido antociánico. Es posible que esta mayor pérdida sea debida a una no estabilización por parte de otros compuestos (Revilla y González-San José, 2001) y/o a una posible mayor polimerización de estos compuestos (Wightman et al., 1997; Parley et al., 2001; Sacchi et al., 2005). Esta última hipótesis se ve apoyada por la mayor presencia en los vinos de antocianos poliméricos resistentes a la decoloración por sulfuroso (Gráfica 4.4.1.3.).

Como se puede observar en la Gráfica 4.4.1.3., el contenido en antocianos poliméricos aumenta a lo largo de la maceración, siendo a

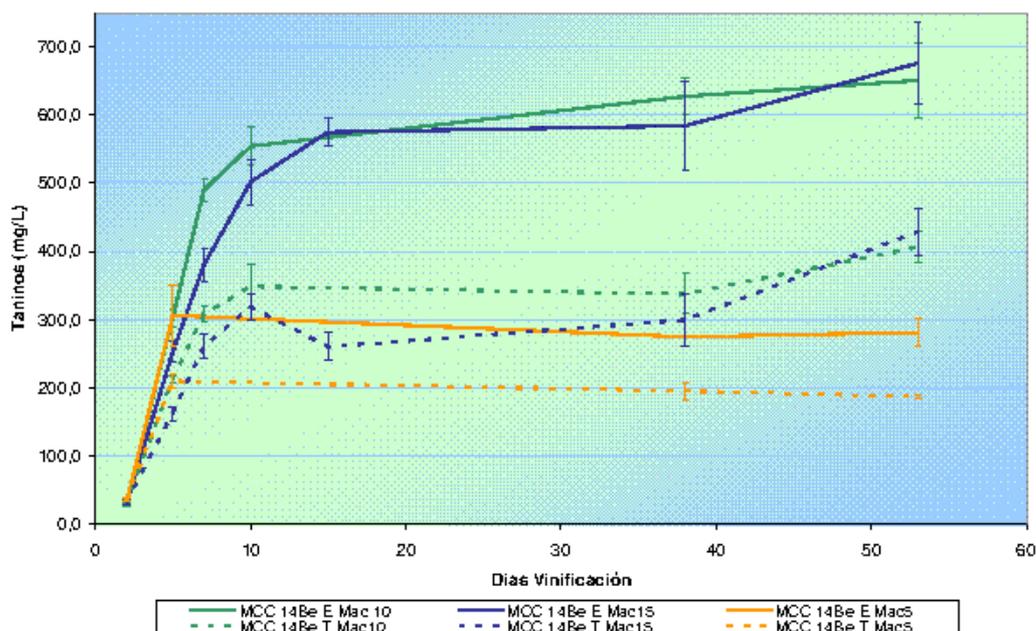
partir de fin de fermentación alcohólica y hasta fin de fermentación maloláctica el periodo donde éstos experimentan el mayor incremento. Durante la maceración no se producen grandes diferencias entre los vinos elaborados con enzimas y sus respectivos testigos, pero a fin de fermentación maloláctica se observa una mayor polimerización en los vinos enzimados, probablemente por el mayor contenido en compuestos fenólicos de estos vinos.

**Gráfica 4.4.1.3.** Evolución de la absorbancia debida a antocianos poliméricos durante la vinificación.



La Gráfica 4.4.1.4. muestra que la concentración en taninos aumenta a lo largo de toda la maceración, manteniéndose estable o experimentando un ligero incremento a partir de fin de fermentación alcohólica. La extracción de taninos es mucho más acusada en los vinos elaborados con enzimas. A fin de fermentación maloláctica el contenido en taninos era un 50% superior en éstos que en los testigos, independientemente del tiempo de maceración empleado, lo que podría indicar una posible mayor estabilidad de los vinos elaborados con enzima a lo largo del tiempo (Pardo et al, 1999; Palacios et al., 2003).

**Gráfica 4.4.1.4.** Evolución del contenido en taninos totales durante la vinificación.

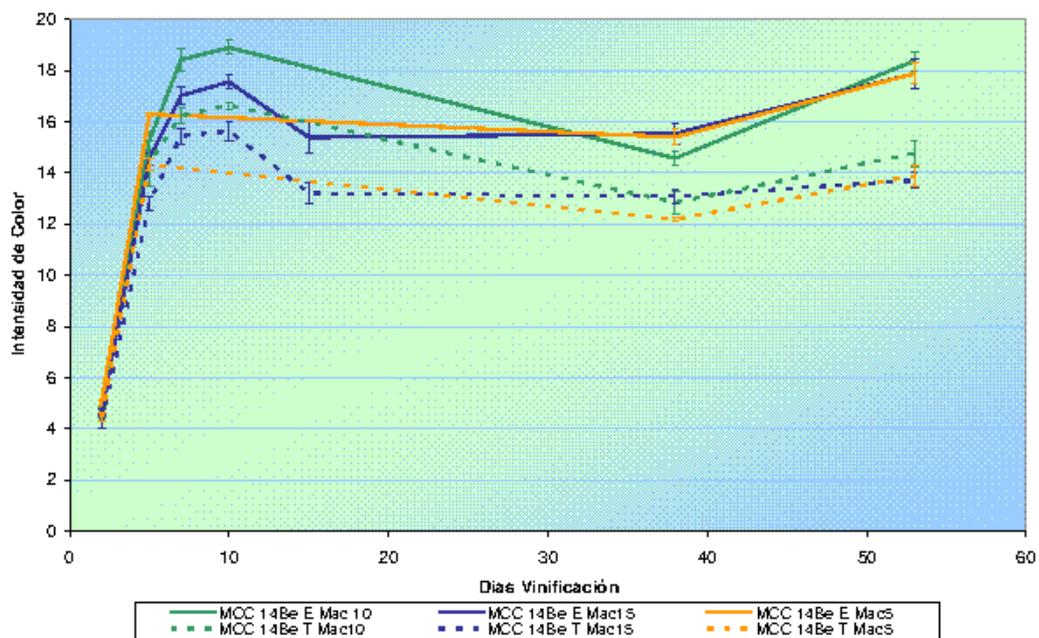


En cuanto al tiempo de maceración, con maceraciones de 10 y 15 días se obtienen contenidos similares en taninos, aunque ligeramente superiores para la maceración más larga. Los vinos elaborados con 5 días de maceración presentan una concentración muy inferior en taninos. Esto es debido a que la disolución de los taninos de los hollejos se va a ver favorecida por la aparición del etanol. Además, es necesario un tiempo de maceración mayor para la extracción de los taninos de las semillas, puesto que se precisa la eliminación previa de los lípidos presentes en éstas para que los taninos puedan difundir (Glories y Saucier, 2000). Vrhovsek et al. (2002) y Kebelec et al. (2006) obtuvieron resultados similares en vinificaciones de distintas variedades elaboradas con diferente tiempo de maceración, comprobando que a mayor tiempo de contacto de las pieles y semillas con el mosto-vino, mayor contenido en taninos totales se alcanzaba.

En la Gráfica 4.4.1.5. se muestra la evolución de la intensidad de color durante la maceración. La máxima intensidad de color es alcanzada a los diez días de maceración, coincidiendo con la máxima extracción de antocianos. Después se observa un ligero descenso hasta fin de fermentación alcohólica, más acusado en los vinos en los que la

maceración duró 15 días. Los vinos elaborados con adición del preparado enzimático extractor de color obtienen una mayor intensidad de color que sus respectivos testigos en todos los casos, resultado coincidente con los obtenidos por Kelebec et al. (2007). Las diferencias en la intensidad de color entre vinos elaborados con enzimas y sin ellos van aumentando conforme transcurre la maceración, siendo máxima el último día de maceración, para cada uno de los casos estudiados.

**Gráfica 4.4.1.5.** Evolución de la intensidad de color durante la vinificación.



En función del tiempo de maceración, a fin de fermentación alcohólica y maloláctica, si se comparan los vinos elaborados con enzima entre si (Mac5 E frente a Mac10 E y frente a Mac15 E), éstos presentan una intensidad de color bastante similar, aunque los macerados durante más tiempo alcanzan una mayor cantidad de compuestos fenólicos totales y taninos, por lo que, en principio, podrán soportar mejor un periodo de crianza. Zamora (2003) obtuvo resultados similares e indica que, es posible que el efecto esperado de un aumento en la extracción de color, cuando se adiciona un enzima macerativo, no sea acusado dependiendo del tiempo de maceración utilizado en la vinificación. En el caso de la comparación de los vinos testigo, aumentando el tiempo de maceración

se consigue un incremento en la intensidad de color de un 5% y un 7% en los vinos macerados 10 y 15 días con respecto al de 5 días, a fin de fermentación alcohólica.

Ough et al. (1975) establecieron que se requiere un 20% menos de tiempo de contacto de la masa de vinificación para alcanzar el mismo color en un vino elaborado con pectinasas que en el control. En la Tabla 4.4.1.1. se han recogido las diferencias en los distintos parámetros para vinos elaborados con o sin enzimas.

**Tabla 4.4.1.1.** Diferencias en el contenido en compuestos fenólicos totales, antocianos totales y taninos en los vinos durante la maceración.

Tiempo de maceración	Día de maceración			
	5	7	10	15
	Enzima-Testigo	Enzima-Testigo	Enzima-Testigo	Enzima-Testigo
<b>CFT</b>				
<b>15</b>	41-37	49-45	53-47	56-47
<b>10</b>	42-40	51-45	55-48	
<b>5</b>	44-40			
<b>Antocianos totales (mg/L)</b>				
<b>15</b>	572-537	696-662	708-662	666-587
<b>10</b>	607-579	735-681	754-686	
<b>5</b>	617-562			
<b>Taninos (mg/L)</b>				
<b>15</b>	252-162	381-260	502-318	575-260
<b>10</b>	303-213	490-307	554-348	
<b>5</b>	306-209			

Se observa que la concentración de compuestos fenólicos totales en los vinos elaborados con el enzima a día 7 de maceración, ya es superior a la obtenida en los vinos testigo a 10 y 15 días de maceración. En cuanto a los antocianos totales, los vinos elaborados con enzima superan, a día 7 de maceración, el contenido en antocianos totales de los vinos testigo, a día 10 de maceración, día en el cual los vinos tenían la mayor carga antociánica de todo el proceso de elaboración. La extracción de taninos también se va a ver acelerada con la aplicación de preparados enzimáticos. A día 7 de maceración, el contenido en vinos enzimados es mucho mayor que a día 10 y 15 en los vinos testigo. La misma tendencia se observa en la Gráfica 4.4.1.5. A día 10 de maceración la intensidad de

color de los vinos testigo era inferior a la que presentaban los vinos elaborados con enzima a día 7 de maceración.

En vista de estos resultados, el uso de enzimas macerativos parece ser una buena herramienta para acortar el tiempo de permanencia de la masa de vinificación en los depósitos. En este estudio se muestra que, la aplicación del preparado enzimático consigue un adelanto en la extracción de los compuestos fenólicos de alrededor de tres días, en comparación con los vinos elaborados sin adición de enzima.

Después de elaborados, los vinos se mantuvieron 3 meses en depósitos de acero inoxidable (0 meses en botella) bajo atmósfera inerte. Después fueron embotellados y almacenados durante un periodo de 6 meses (6 meses en botella).

En la Tabla 4.4.1.2. se muestra un análisis multifactorial de la varianza en función de la aplicación del enzima y del tiempo de maceración, a fin de fermentación alcohólica y tras el embotellado.

A fin de fermentación alcohólica se observan diferencias en todos los parámetros cromáticos estudiados en función de la aplicación del enzima. Los vinos elaborados con enzima tenían valores más altos en compuestos fenólicos totales, antocianos (totales y poliméricos), taninos, absorbancia a 420, 520 y 620 nm, una mayor intensidad de color y un menor tono, mientras que los vinos donde no se aplicó el enzima fueron más oscuros (valor de L menor), probablemente debido a una mayor presencia de coloides (Revilla y González-San José, 2001 y 2003b). Sin embargo, conforme avanzó el tiempo de almacenamiento estas diferencias disminuyeron y, tras 6 meses en botella, sólo se encontraron diferencias en el contenido en compuestos fenólicos totales, antocianos poliméricos, taninos totales y el tono. Estas diferencias fueron, en todo caso, positivas para los vinos elaborados con enzima e indican que estos vinos podrían mantener un color más estable y con mayores tonalidades violáceas en un almacenamiento más prolongado. A una conclusión similar llegaron Revilla y González-San José (2003b) en un estudio en el

que observaron que vinos elaborados con enzimas mostraban una evolución del tono menor que sus testigos, menores pérdidas de color rojo y que las características cromáticas se mantenían más estables a lo largo del tiempo.

En cuanto a los datos obtenidos en función del tiempo de maceración, los resultados no fueron tan claros. A fin de fermentación alcohólica, el vino que se maceró durante 5 días presentaba los valores más bajos en todos los parámetros en los que se hallaron diferencias, mientras que los vinos macerados durante 10 y 15 días no presentaban apenas características distintas entre ellos. Varios autores (Delteil, 2000c; Bautista-Ortín et al., 2004b; Kelebec et al., 2006) han descrito que, en función de la variedad y del estado de la uva, extender la duración de la maceración puede no aportar una mayor extracción de color y de compuestos fenólicos. En el momento del embotellado, el vino macerado 10 días presentó mejores índices cromáticos con un mayor contenido en antocianos poliméricos y taninos, mayores absorbancias debidas al color rojo y azul y, por tanto, mayor intensidad de color y un tono más bajo. Según Gómez-Plaza et al. (2000b), un tiempo de maceración de 10 días es adecuado en vinificaciones de Monastrell, tanto para vinos que vayan a ser envejecidos en barricas como para vinos que se vayan a embotellar jóvenes. Sin embargo, tras 6 meses en botella todos los vinos eran similares, mostrando diferencias únicamente en el contenido en taninos totales y el tono. Budić-Leto et al. (2003) obtuvo resultados similares en vinos elaborados con distinto tiempo de maceración. Observaron que el contenido en antocianos totales era similar en todos los vinos a los 6 meses de elaboración, independientemente del tiempo de contacto de la masa de vinificación con el mosto-vino, mientras que el contenido en proantocianidinas era mayor conforme aumentaba el tiempo de maceración. Bautista-Ortín et al. (2004b) encontraron que, después de un tiempo de almacenamiento, las características cromáticas de vinos de la variedad Monastrell macerados distintos tiempos tendían a volverse similares.

Tabla 4.4.1.2. Evolución de las características cromáticas de los vinos durante el almacenamiento.

Efectos	CFT <sup>1</sup>	Antocianos totales (mg/L)	A <sup>502</sup>	A <sup>acet</sup>	A <sup>20</sup>	Tan (mg/L)	IC	Tono	A <sup>620</sup>	A <sup>520</sup>	A <sup>420</sup>	L	a	b
<b>Fin Fermentación Alcohólica</b>														
<b>Técnica</b>														
<b>Testigo</b>	45,6a <sup>2</sup>	515,6a	1,57a	8,14a	5,62a	278,0a	12,7a	0,54b	1,29a	7,44a	3,98a	9,1a	39,8a	22,0b
<b>Enzima</b>	52,2b	573,6b	1,85b	9,62b	6,60b	495,4b	15,4b	0,52a	1,66b	9,08b	4,70b	12,8b	44,6b	15,6a
<b>Tiempo</b>														
<b>5 días</b>	43,8a	504,5a	1,60a	8,60a	5,85a	235,3a	13,8a	0,53a	1,44a	8,08a	4,26a	11,1a	42,3a	19,0a
<b>10 días</b>	52,1b	605,3c	1,76b	9,00b	6,27b	482,5b	14,1ab	0,53a	1,47a	8,29ab	4,36ab	10,1a	42,3a	18,9a
<b>15 días</b>	50,8b	524,0b	1,76b	9,03b	6,20b	442,3b	14,3b	0,53a	1,50a	8,40b	4,41b	10,8a	42,0a	18,5a
<b>0 meses botella</b>														
<b>Técnica</b>														
<b>Testigo</b>	36,3a	227,2a	4,07a	7,40a	6,98a	347,6a	13,1a	0,60b	2,15a	6,89a	4,15a	6,3a	35,0a	10,8a
<b>Enzima</b>	38,4b	216,4a	4,44b	7,49a	7,06a	543,8b	13,5a	0,59a	2,25b	7,09a	4,18a	6,1a	30,7a	10,4a
<b>Tiempo</b>														
<b>5 días</b>	35,3a	226,0a	3,94a	7,33ab	6,80a	308,7a	12,8a	0,60b	2,03a	6,74a	4,03a	7,0c	36,8c	12,1c
<b>10 días</b>	38,4b	231,7a	4,59c	7,90b	7,46b	470,1b	14,3b	0,59a	2,39c	7,49b	4,41b	5,4a	32,9a	9,3a
<b>15 días</b>	38,3b	207,6a	4,24b	7,10a	6,81a	558,4c	13,0a	0,60b	2,19b	6,75a	4,05a	6,1b	34,8b	10,4b
<b>6 meses botella</b>														
<b>Técnica</b>														
<b>Testigo</b>	32,2a	149,1a	3,80a	5,03a	4,72a	282,8a	9,7a	0,66b	1,59a	4,93a	3,23a	10,1a	40,9a	16,7a
<b>Enzima</b>	35,4b	155,0a	4,22b	5,35a	5,06a	405,9b	10,4a	0,64a	1,71a	5,27a	3,37a	9,4a	40,3a	15,7a
<b>Tiempo</b>														
<b>5 días</b>	32,7a	164,0a	3,89a	5,34a	4,99a	259,9a	10,2a	0,65ab	1,62a	5,22a	3,38a	9,8a	40,3a	16,1a
<b>10 días</b>	34,5a	153,0a	4,26a	5,38a	5,09a	364,7b	10,4a	0,64a	1,74a	5,29a	3,38a	9,2a	40,0a	15,4a
<b>15 días</b>	34,3a	140,0a	3,85a	4,86a	4,60a	408,4c	9,5a	0,66b	1,60a	4,79a	3,13a	10,4a	41,4a	17,2a

<sup>1</sup>Abreviaturas: CFT: Compuestos fenólicos totales; A<sup>502</sup>: Absorbancia a 520 nm después de adicionar SO<sub>2</sub>; A<sup>acet</sup>: Absorbancia a 520 nm después de adicionar acetaldéhidro; A<sup>20</sup>: Absorbancia a 520 nm después de diluir 20 veces; Tan: Taninos totales; IC: Intensidad de color; A<sup>620</sup>, A<sup>520</sup> y A<sup>420</sup>: Absorbancia a 620, 520 y 420 nm; L, a y b: Parámetros CIELab.

<sup>2</sup>Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas según LSD (p<0,05).

Tabla 4.4.1.3. Evolución del perfil antocianínico de los vinos durante el almacenamiento.

	Del <sup>a</sup>	Cian	Pet	Pn	Malv	Vit A	Vit B	Malv etil cat	Pn acetato	Malv acetato + Del cu marato	Pet cumarato	Pn cumarato	Malv cumarato	Malv cu marato + Poliméricos	Poliméricos
<b>Fin de Fermentación Alcohólica</b>															
<b>Mac5 T</b>	15,0±0,5	1,9±0,0	26,7±0,4	8,2±0,5	157,9±1,5	2,3±0,0	nd	2,6±0,2	1,1±0,1	7,4±0,3	2,5±0,1	2,1±0,2	4,4±0,1	30,5±0,2	nd
<b>Mac5 E</b>	18,7±0,1	2,1±0,2	32,9±0,9	9,7±0,2	173,2±2,5	3,0±0,1	nd	3,1±0,8	1,1±0,0	8,7±0,2	2,8±0,2	2,3±0,2	5,3±0,5	40,2±0,2	nd
<b>Mac10 T</b>	20,4±0,3	3,7±0,2	33,5±0,4	14,9±0,5	183,5±0,5	3,0±0,2	nd	2,6±0,2	3,2±3,7	5,3±4,0	3,3±0,2	1,7±0,2	4,1±0,1	31,8±1,8	nd
<b>Mac10 E</b>	24,3±0,3	3,9±0,3	37,9±0,5	15,7±1,2	191,3±2,6	3,2±0,1	nd	3,6±0,5	0,9±0,1	8,1±0,5	3,7±0,1	2,0±0,9	5,0±0,2	39,4±1,9	nd
<b>Mac15 T</b>	16,5±0,7	3,2±0,2	27,3±0,6	12,1±0,5	154,4±4,0	2,5±0,1	1,0±0,0	2,8±0,1	0,9±0,1	5,6±0,3	0,8±0,0	3,2±0,1	3,2±0,2	28,5±0,3	nd
<b>Mac15 E</b>	19,9±0,1	3,6±0,3	31,9±1,5	12,9±1,1	164,7±3,3	2,7±0,1	1,1±0,0	3,8±0,3	0,9±0,1	7,5±0,5	0,9±0,1	4,1±0,3	6,6±0,7	35,6±0,4	nd
<b>0 meses en botella</b>															
<b>Mac5 T</b>	1,9±0,9	2,8±1,9	0,8±0,0	1,1±0,4	17,0±1,5	2,2±0,7	2,2±0,2	3,4±0,6	nd	1,4±0,4	0,8±0,1	0,8±0,1	2,7±0,8	nd	52,3±10,4
<b>Mac5 E</b>	1,6±0,9	2,0±1,6	0,8±0,0	0,9±0,3	11,3±1,1	2,1±0,3	2,0±0,2	3,0±0,5	nd	1,3±0,4	nd	nd	3,1±0,2	nd	60,5±2,9
<b>Mac10 T</b>	1,6±0,3	0,9±0,1	1,9±0,6	1,0±0,2	7,8±3,2	1,8±0,0	2,0±0,1	2,9±0,3	nd	0,8±0,1	nd	1,0±0,1	1,2±0,2	nd	66,0±3,5
<b>Mac10 E</b>	1,2±0,2	0,8±0,0	1,3±0,3	0,8±0,1	4,1±1,4	2,1±0,0	1,7±0,2	3,6±0,4	nd	0,8±0,1	nd	nd	nd	nd	69,8±2,9
<b>Mac15 T</b>	1,3±0,1	0,8±0,1	1,5±0,2	0,9±0,1	6,2±1,0	1,7±0,1	1,7±0,1	3,6±0,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	58,1±3,2
<b>Mac15 E</b>	0,9±0,1	0,7±0,1	1,0±0,1	0,7±0,1	2,8±0,8	1,9±0,1	1,4±0,2	3,6±0,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	60,7±1,3
<b>6 meses en botella</b>															
<b>Mac5 T</b>	1,0±0,2	nd	1,7±1,0	nd	7,8±2,6	1,6±0,7	0,8±0,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	31,4±3,6
<b>Mac5 E</b>	1,7±0,2	nd	nd	nd	3,8±2,3	1,5±0,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	36,2±4,6
<b>Mac10 T</b>	nd	nd	nd	nd	1,6±0,6	1,3±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	38,8±0,5
<b>Mac10 E</b>	nd	nd	nd	nd	1,3±0,3	1,3±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	39,0±5,6
<b>Mac15 T</b>	nd	nd	nd	nd	1,4±0,2	1,2±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	35,3±1,8
<b>Mac15 E</b>	nd	nd	nd	nd	1,2±0,3	1,3±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	31,6±2,4

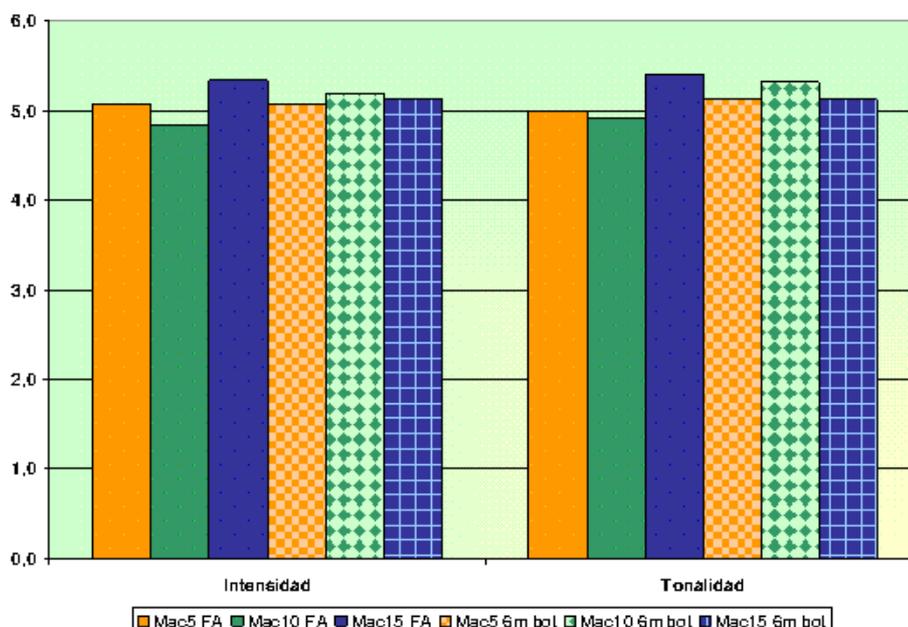
<sup>a</sup>Abreviaturas: Del: Delphinidina-3-monoglucósido; Cian: Cianidina-3-monoglucósido; Pet: Petunidina-3-monoglucósido; Pn: Peonidina-3-monoglucósido; Malv: Malvidina-3-monoglucósido; Vit A y B: Vitisina A y B; Malv etil cat: Malvidina etil catequina.  
<sup>b</sup>nd: no detectado.

La Tabla 4.4.1.3. muestra la composición antociánica de los distintos vinos estudiados. En general, según se puede observar en la tabla, con la aplicación del enzima extractor de color se consiguió una mayor difusión de antocianos, independientemente del tiempo de maceración utilizado. Después de 6 meses en botella, únicamente se detectaban antocianos poliméricos, vitisina A y malvidina-3-glucósido, en todas la elaboraciones. La vinificación obtenida tras 10 días de maceración fue la que mayor concentración de antocianos alcanzó en los tres muestreos realizados, coincidiendo con los datos obtenidos espectrofotométricamente.

Los vinos fueron evaluados por un grupo de catadores expertos cuando terminó la fermentación alcohólica y tras 6 meses de permanencia en botella. La intensidad de cada uno de los atributos se valoró de 1 a 10, con mayor puntuación a mayor sensación. Para facilitar la comprensión de los resultados, las puntuaciones de los vinos testigo se han normalizado a un valor de 5 y se muestran las puntuaciones relativas de los vinos elaborados con enzima, en comparación con sus respectivos testigos.

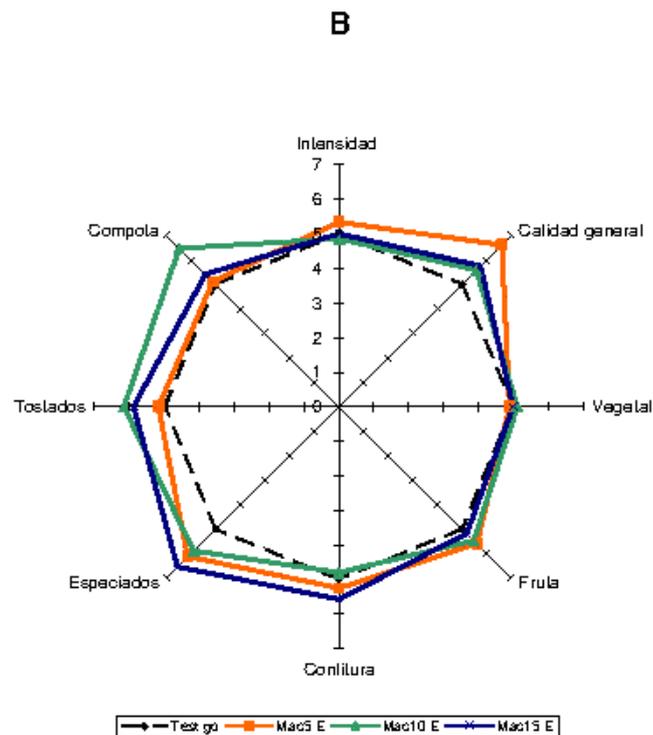
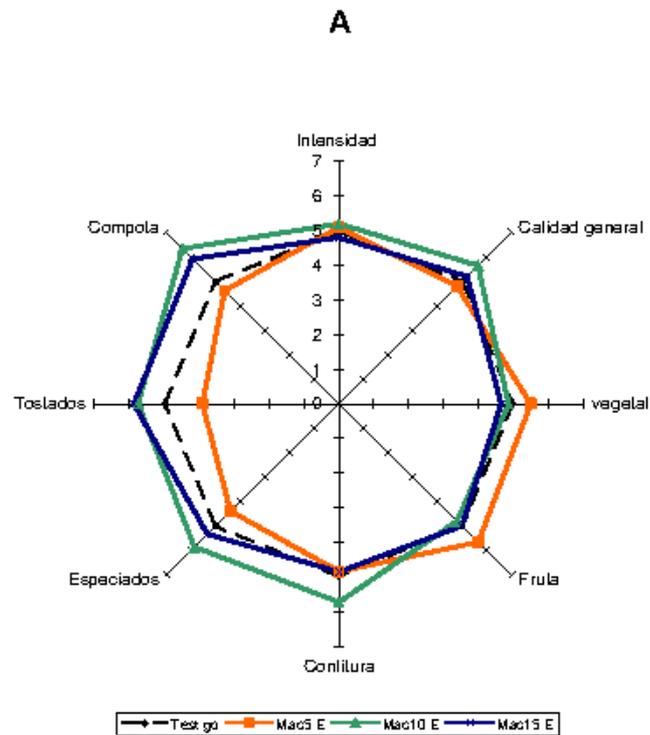
En la Gráfica 4.4.1.6. se muestra la valoración en intensidad de color y tonalidad. Las diferencias no fueron significativas, aunque se observa que a final de la fermentación alcohólica el vino macerado 15 días y elaborado con enzima obtenía una puntuación ligeramente superior que su testigo, al contrario de lo que ocurría con el vino macerado 10 días. Tras 6 meses en botella, todos los vinos se puntuaban igual que su testigo, excepto el vino con 10 días de maceración, que era mejor valorado en cuanto a la tonalidad que presentaba.

**Gráfica 4.4.1.6.** Evaluación sensorial de la fase visual de los vinos elaborados con enzima con respecto a sus testigos a fin de fermentación alcohólica y tras 6 meses en botella.

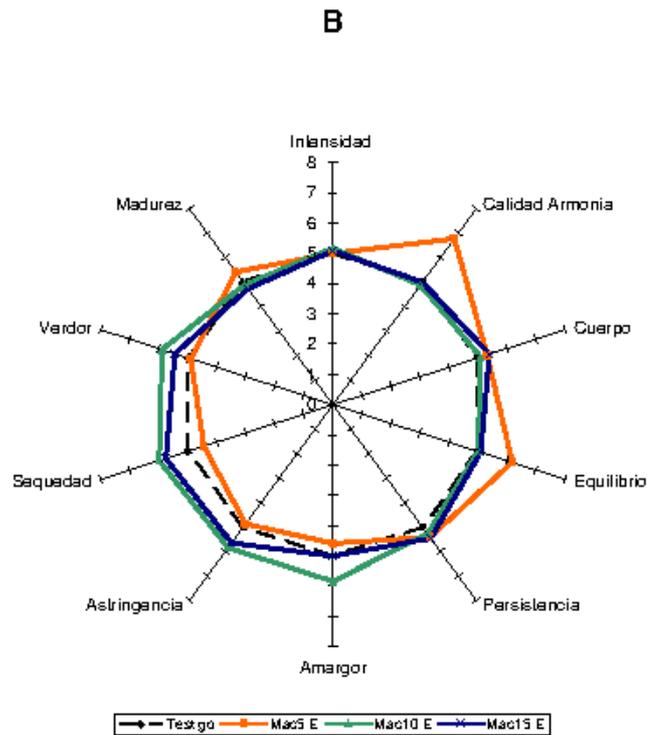
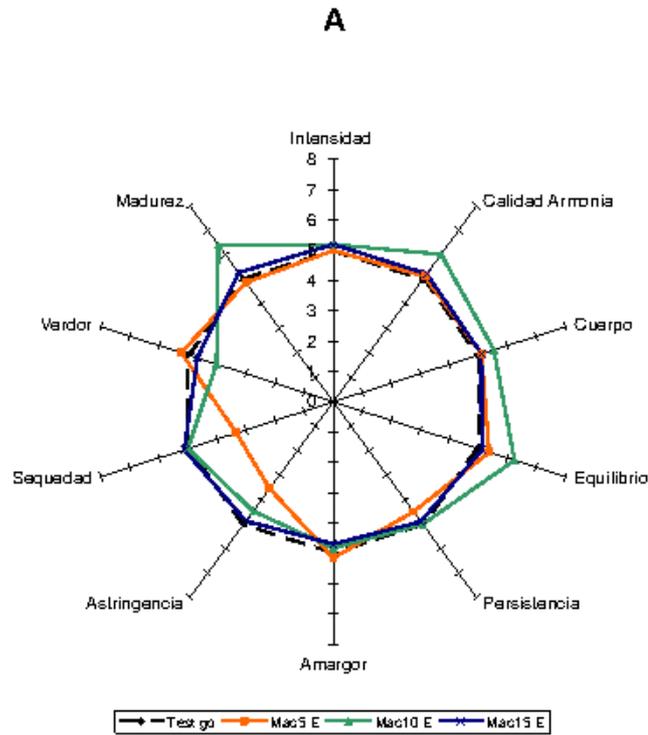


En cuanto al aroma, a fin de fermentación alcohólica los vinos presentaron una intensidad similar a sus testigos (Gráfica 4.4.1.7.). El vino con 5 días de maceración mostró una mayor sensación vegetal y también de fruta e inferior en tostados y especiados. El vino con 10 días de maceración fue el mejor valorado con respecto a su testigo en relación a la calidad que presentaban sus aromas, con una intensidad mayor en la sensación de aromas especiados, tostados, a confitura y a compota. El vino macerado durante 15 días presentó un perfil aromático muy similar a su testigo, aunque se detectó mayor intensidad en tostados y compota. Tras 6 meses en botella, todos los vinos elaborados con enzima fueron mejor valorados, por su calidad, que sus respectivos testigos, debiéndose en parte a que los aromas especiados y tostados eran más intensos, sobre todo en los vinos de maceraciones más largas, 10 y 15 días. Delteil (2000b) obtuvo resultados similares en un análisis sensorial de vinos de la variedad Monastrell elaborados con enzimas extractores de color. Éstos resultaban mejor valorados que los vinos testigo, gracias a presentar más caracteres especiados (en concreto pimienta) y a confitura.

**Gráfica 4.4.1.7.** Evaluación sensorial de la fase aromática de los vinos elaborados con enzima con respecto a sus testigos a fin de fermentación alcohólica (A) y tras 6 meses en botella (B).



**Gráfica 4.4.1.8.** Evaluación sensorial de la fase gustativa de los vinos elaborados con enzima con respecto a sus testigos a fin de fermentación alcohólica (A) y tras 6 meses en botella (B).



Según se observa en la Gráfica 4.4.1.8., a final de la fermentación alcohólica los vinos mostraron perfiles en boca similares a sus testigos, sobre todo el vino macerado durante 15 días. Las mayores diferencias se encontraron en el vino con 10 días de maceración, que fue el mejor valorado, debido a una mayor puntuación en el cuerpo y equilibrio, en la calidad y en una mayor valoración de madurez en la sensación tánica. El vino de 5 días de maceración, aunque fue valorado en general igual que el testigo, mostró menor sequedad y astringencia en boca que su testigo elaborado sin enzima. Tras 6 meses en botella la situación cambió. Ahora, el vino elaborado con enzima y 5 días de maceración era el mejor valorado con respecto a su control. Este vino se presentó más equilibrado y un poco menos secante, lo que hizo que los catadores lo considerasen más armónico que su testigo. El perfil de los vinos macerados 10 y 15 días fue casi idéntico, aunque el vino con enzima y 10 días de maceración le pareció a los catadores ligeramente más amargo. Esta sensación de amargor se debe en parte al mayor contenido en taninos de estos vinos. Estos vinos deberán ser envejecidos más tiempo para que se suavice la astringencia, pero precisamente el mayor contenido en taninos va asegurar que puedan soportar ese mayor envejecimiento.

En las condiciones de este ensayo, los resultados muestran una extracción similar de compuestos fenólicos en los vinos elaborados con enzima con una maceración tres días menor que la necesaria para los vinos testigo. Desde este punto de vista, si no es necesaria una mayor extracción de color, el uso de preparados comerciales enzimáticos podría ser útil para acortar los tiempos de permanencia de la masa de vinificación en los depósitos de maceración. Además, con el paso del tiempo, los vinos no mostraron diferencias en función del tiempo de maceración, mientras que si se elaboraban con enzimas macerativos para la extracción de color, mantenían mejores características cromáticas durante mayor tiempo.

#### **4.4.1.2. Caracterización de las paredes celulares de los orujos.**

Los orujos de las distintas elaboraciones con diferente tiempo de maceración, se recogieron una vez prensados y se congelaron hasta la extracción de sus paredes celulares. Estas paredes celulares se caracterizaron, analizando su contenido en proteínas y compuestos fenólicos ligados a la pared celular, lignina y su composición en azúcares neutros y ácidos urónicos.

En la tabla 4.4.1.4. se muestra el contenido en material de la pared celular extraído de los orujos resultantes de las diferentes vinificaciones.

**Tabla 4.4.1.4.** Contenido en pared celular de los orujos tras la maceración.

	<b>Rendimiento (mg pared celular / g orujo)</b>
<b>Mac 5 T</b>	32,0a <sup>1</sup>
<b>Mac 5 E</b>	41,2b
<b>Mac 10 T</b>	31,6a
<b>Mac 10 E</b>	49,1bc
<b>Mac 15 T</b>	29,7a
<b>Mac 15 E</b>	50,4c

<sup>1</sup> Letras distintas indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

Si se comparan los resultados obtenidos para los orujos de las vinificaciones donde se utilizaron enzimas extractores de color, con sus respectivos testigos, se observa un aumento en la cantidad de pared celular, independientemente del tiempo de maceración empleado. Esto podría indicar que los enzimas han conseguido una mayor disgregación de las paredes celulares, lo que daría como resultado que otro tipo de componentes del interior de las células hayan pasado en mayor medida al vino. Proporcionalmente, al extraerse más cantidad de sustancias del interior de las células, la materia seca que queda en orujo estaría formada en mayor porcentaje por material de la pared celular. Se observa un rendimiento similar en los tres orujos procedentes de elaboraciones

testigo, mientras que en los de las elaboraciones con enzima, conforme aumenta el tiempo que los orujos han sido macerados aumenta la cantidad de pared celular obtenida, lo que podría indicar una mayor extracción de compuestos conforme transcurre la maceración y que los enzimas podrían actuar durante todo el proceso de maceración.

En la tabla 4.4.1.5. se muestra la composición en proteínas totales, compuestos fenólicos totales y lignina de la pared celular de los orujos (en mg/g de orujo).

**Tabla 4.4.2.5.** Contenido en proteínas, compuestos fenólicos totales y lignina en pared celular de los orujos tras la maceración.

	Proteína (mg/g pared celular)	Compuestos fenólicos totales (mg/g pared celular)	Lignina (mg/g pared celular)
<b>Mac 5 T</b>	19,3a <sup>1</sup>	76,0a	223,3a
<b>Mac 5 E</b>	27,5a	62,6a	270,0ab
<b>Mac 10 T</b>	21,9ab	61,1a	233,3bc
<b>Mac 10 E</b>	24,0ab	67,5a	283,3bc
<b>Mac 15 T</b>	23,0b	74,2a	276,7bc
<b>Mac 15 E</b>	27,3c	72,4a	286,7c

<sup>1</sup> Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

El contenido en proteínas aumenta con el tiempo de maceración. Sólo en los orujos de 15 días de maceración hay diferencias entre los hollejos procedentes de la vinificación testigo y los de la vinificación con enzima. La cantidad de lignina va aumentando también cuanto más tiempo fueron maceradas las pieles, pero sin diferencias entre los testigos y sus respectivos orujos con enzima. El aumento observado en la concentración en lignina, al aumentar el tiempo de maceración, podría ser debido a que la lignina no se degrada, quizás en parte por su carácter hidrofóbico (Azcón-Bieto y Talón, 1993) que hará que no se solubilice en el mosto-vino, quedando en la pared celular, mientras que como sí

disminuye el contenido en azúcares totales (Tabla 4.4.1.6.) dará lugar a una concentración de la lignina en la pared celular.

En cuanto al contenido en proteína, la explicación podría ser similar a la dada para el comportamiento de la lignina, lo que se ve respaldado, además por el hecho de no haber encontrado actividad proteasa en el preparado enzimático. Los enzimas degradarían los polisacáridos, pasando parte de éstos al vino, por lo que los compuestos que no se degradan se encontrarían en mayor cantidad en la pared celular.

El contenido en compuestos fenólicos totales no varía, ni en función de la aplicación del enzima ni en función del tiempo de maceración.

En la Tabla 4.4.1.6. se muestra la composición en azúcares neutros, ácidos urónicos y el grado metilación y acetilación de las paredes celulares aisladas de los orujos. Se observa que al aplicar el enzima extractor de color disminuye el contenido en arabinosa, galactosa, ácidos urónicos y el contenido total de azúcares en la pared celular, en todas las muestras independientemente del tiempo de maceración. La disminución en estos compuestos podría deberse a una mayor acción del enzima en las pectinas, lo que coincide con las actividades enzimáticas encontradas en el enzima comercial aplicado. Además, la degradación de la pared celular ha sido asociada principalmente a la degradación de los polisacáridos pécticos. Numerosos autores (Gross y Sams, 1984; Redgwell et al., 1997; Barnavon et al., 2000; Nunan et al., 2001; Manrique y Lajolo, 2004; Rosli y Civello, 2004) han descrito disminuciones en el contenido en arabinosa, galactosa y ácidos urónicos en distintas frutas durante la maduración, asociándolo al reblandecimiento del fruto por degradación de la pared celular.

**Tabla 4.4.1.6.** Contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos (mg/g de pared celular) en la pared celular del orujo tras la maceración.

	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	Cell-Glu <sup>1</sup>	UA	GM	GA	Total azúcares
<b>Mac 5 T</b>	0,0a <sup>2</sup>	0,0a	28,6c	15,1d	22,6a	26,9c	35,3a	96,8b	236,1d	33,2a	7,03a	461,4d
<b>Mac 5 E</b>	0,0a	0,0a	20,3b	14,5c	26,2b	22,8b	45,0b	89,5a	137,0b	46,9ab	11,62bc	355,2ab
<b>Mac 10 T</b>	2,2a	0,0a	29,4c	13,3b	28,4c	25,1b	54,6cd	92,68ab	188,4c	53,3bc	8,71ab	433,1cd
<b>Mac 10 E</b>	0,0a	0,0a	19,8b	14,7cd	33,4e	23,6bc	53,0c	116,6c	115,8ab	65,3c	14,80cd	376,8b
<b>Mac 15 T</b>	0,0a	0,0a	27,4c	12,6a	27,3bc	23,7bc	45,4b	92,7ab	189,2c	35,5a	7,69ab	418,3c
<b>Mac 15 E</b>	0,0a	0,0a	16,7a	13,6b	31,7d	21,0a	58,8d	97,1b	83,8a	62,5bc	18,63d	322,8a

<sup>1</sup> Abreviaturas: Cell-Glu: Glucosa celulósica; UA: Ácidos urónicos; GM: Grado de metilación; GA: Grado de Acetilación.

<sup>2</sup> Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

Sin embargo, el contenido en manosa, glucosa y el grado de acetilación aumentan. El aumento en el contenido en glucosa y, en ocasiones xilosa, coincide, así mismo, con el perfil de actividad enzimática del enzima aplicado, donde se observa que éste no posee actividad celulasa ni xilanasas, por lo que las hemicelulosas quedarían remanentes en la pared celular y aumentaría su concentración al diluirse otros componentes de la pared celular. Así mismo, en un estudio sobre degradación de la pared celular de la uva Monastrell durante la maduración, Ortega-Regules (2006) observó que el contenido en xilosa y glucosa se mantenía constante durante el periodo de maduración, lo que indicaría que los azúcares hemicelulósicos pueden no estar implicados en el proceso de degradación y solubilización de la pared celular, en la misma medida que los polisacáridos pécticos. Nunan et al. (1998) y Manrique y Lajolo (2004) también encontraron que los niveles de hemicelulosa permanecían constantes durante la maduración de la uva y que en papaya se daba una síntesis y degradación simultánea de azúcares hemicelulósicos.

Los resultados obtenidos parecen indicar que el enzima extractor de color, va a tener influencia sobre la estructura de la pared celular de las pieles de las uvas. El enzima va a ayudar a la liberación de compuestos contenidos en el interior de las células por la degradación de la pared y parece que su efecto se asemeja a las transformaciones que va a sufrir esta pared durante el proceso de maduración de la uva. Los efectos principales están claramente relacionados con la fracción péctica de la pared celular donde se parece producir la mayor degradación, efecto que va aumentando conforme aumenta el tiempo de maceración.

#### **4.4.2. EFECTO EN LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DE VINOS ELABORADOS CON UVAS CON DISTINTO GRADO DE MADURACIÓN Y EN LAS PAREDES CELULARES DE LOS ORUJOS OBTENIDOS.**

Los fenómenos fisiológicos que van a caracterizar la maduración son, entre otros, el aumento en el contenido en azúcares mientras que disminuyen los ácidos, la acumulación de antocianos y taninos en la piel de la baya y la degradación de la estructura de la pared celular de la uva. Un déficit de madurez dará lugar, por tanto, a una acumulación insuficiente de pigmentos y a una mayor dificultad en su extracción. Desde este punto de vista, la utilización de enzimas que puedan degradar la pared celular podría ser más útil en vendimias menos maduras donde la extracción de los pigmentos puede resultar más dificultosa.

Para la realización de esta experiencia se llevaron a cabo vinificaciones de uva Monastrell con diferente grado de madurez (12, 13,5 y 15 °Be), con adición de un enzima comercial para la extracción de color y sin adición del preparado enzimático. Se controló la cinética de difusión de los compuestos fenólicos y del color durante el periodo de elaboración y posterior almacenamiento. El objetivo fue comprobar si la efectividad del uso de enzimas extractores de color se potencia cuando las condiciones son más adversas para la extracción de color.

##### **4.4.2.1. Características de la uva a la entrada en bodega.**

Durante la maduración de la uva, se realizó un control para controlar el estado de ésta y conocer en que momento se debía vendimiar.

La Tabla 4.4.2.1. muestra los valores de concentración de antocianos en las disoluciones a pH 1 y 3,6 (totales y extraíbles), expresados en mg/L de mosto, el índice de madurez celular (EA), el índice de madurez de las pepitas (Mp), el tamaño de la baya (expresado como peso de 100 bayas) y el grado Baumé de las uvas en el momento de su entrada en bodega para ser elaboradas.

**Tabla 4.4.2.1.** Madurez fenólica de la uva en el momento de la vendimia ( $\pm$  desviación estandar).

Muestra	Peso 100 bayas (g)	Antocianos extraíbles (mg/L)	Antocianos totales (mg/L)	EA <sup>a</sup>	Mp	Be
<b>M 12Be</b>	188,53 $\pm$ 3,81	442,43 $\pm$ 21,41	578,13 $\pm$ 21,41	23,50 $\pm$ 1,60	57,97 $\pm$ 2,60	12,2 $\pm$ 0,06
<b>M 13,5Be</b>	111,37 $\pm$ 3,67	590,21 $\pm$ 9,62	837,70 $\pm$ 12,81	27,97 $\pm$ 1,11	57,96 $\pm$ 0,54	13,4 $\pm$ 0,10
<b>M 15Be</b>	123,73 $\pm$ 3,03	709,87 $\pm$ 5,19	1074,11 $\pm$ 13,75	33,91 $\pm$ 0,86	56,57 $\pm$ 0,86	15,0 $\pm$ 0,03

<sup>a</sup>Abreviaturas: EA: índice de extractabilidad; Mp: índice de madurez de la pepita; Be: grado Baumé.

La extracción de los antocianos se va a deber, principalmente, a la cantidad de estos compuestos que se haya sintetizado en las células de la piel de la uva y a la degradación de las paredes celulares durante la maduración, que parece ser característico de la cepa (Vivas de Gaulejac et al., 2001).

En la tabla 4.4.2.1. se observa que el contenido en antocianos totales aumenta conforme aumenta la maduración de la uva, siendo la uva vendimiada con 15 °Be la que presenta una mayor concentración de estos compuestos. Se observa así mismo, que el valor máximo para los antocianos extraíbles se alcanza en el mismo momento y que también va aumentando conforme aumenta el grado de madurez de la uva. Sin embargo, el índice de madurez celular aumenta durante la maduración coincidiendo con los resultados obtenidos por González-Neves et al. (2002) y mostrando un comportamiento contrario al esperado. Ribéreau-Gayon et al. (1998b) y Zamora (2002) observaron una disminución constante del índice de madurez celular y el índice de madurez de las pepitas durante la maduración de la uva. Diversos estudios han mostrado que los valores del índice de madurez celular son muy variables y no sólo en función del grado de madurez sino también en función de la cepa y el terreno (Saint-Cricq et al., 1998; González et al., 2001; Mateos et al., 2001; Fernández et al., 2003).

El índice de madurez de la pepita disminuye a lo largo de la maduración de la uva, aunque esta disminución apenas es perceptible encontrando una diferencia de alrededor al 1% entre la uva de 12 °Be y la

uva con  $^{15}\text{Be}$ . El índice de madurez de las semillas estima la contribución de los taninos de las semillas en el contenido fenólico del vino, alcanzando valores entre el 60-0% (Ribéreau Gayon et al., 1998b). Valores altos, como los obtenidos en este estudio, indicarían una alta contribución de los taninos de las semillas en el vino lo que podría afectar negativamente a las propiedades organolépticas del vino.

Algunos autores han criticado este tipo de índices de extractabilidad, indicando que la solución a pH 1,0 realmente tiene un valor de pH superior, al ser el mosto un medio tamponado, y probablemente no todos los antocianos son extraídos (Hermosín et al., 2002). Además, la suposición de la existencia de una relación entre la biosíntesis de antocianos y el metabolismo de taninos (en el cual está basado el índice de madurez de las semillas) es contradictorio con las observaciones de Downey et al. (2003) y Roby y Matthews (2004), que sugieren que estos mecanismos son independientes.

La tabla 4.4.2.2. muestra los resultados del análisis de antocianos en el hollejo expresados en  $\mu\text{g/g}$  de piel.

Fernández-López et al. (1998) demostraron que la pigmentación en la uva Monastrell se desarrolla rápidamente y en la segunda semana después del envero el color de la uva es prácticamente azul oscuro, aunque hay que tener en cuenta que la acumulación y distribución de los antocianos en el hollejo puede variar de un año a otro en función de las condiciones climáticas (Vivas de Gaulejac et al., 2001; Mateus et al., 2002).

El análisis de los antocianos en el hollejo refleja que la síntesis de éstos es continua durante toda la maduración. La malvidina-3-glucósido es el antociano encontrado en mayor proporción, resultado coincidente con los obtenidos por otros autores como Fernández-López et al. (1992) y García-Beneytez et al. (2002) y su contenido va a aumentar durante la maduración, así como el del resto de antocianos monoglucósidos y de sus derivados acilados.

**Tabla 4.4.2.2.** Perfil antocianico (HPLC) en el hollejo a la entrada en bodega.

Antociano <sup>a</sup>	M 12Be		M 13,5 Be		M 15Be	
	µg/g piel	%	µg/g piel	%	µg/g piel	%
Del	572,8±24,5	9,3	1001,8±79,6	12,5	1098,7±91,6	10,6
Cian	323,9±123,6	5,3	568,1±58,7	7,1	1067,5±115,4	10,3
Pet	616,6±128,6	10,0	1079,5±91,4	13,4	1232,4±84,6	11,9
Pn	735,8±176,0	12,0	764,1±92,3	9,5	1496,1±175,7	14,4
Malv	2951,2±426,5	48,1	3667,2±315,2	45,6	4303,4±320,3	41,4
Pn acetato	14,5±4,8	0,2	13,4±1,6	0,2	22,0±3,0	0,2
MalvAc +DelC	164,6±26,8	2,7	210,7±53,2	2,6	251,3±53,6	2,4
Pet cumarato	62,1±3,2	1,0	69,1±5,0	0,9	100,6±10,8	1,0
Pn cumarato	71,4±14,9	1,9	57,1±10,2	8,4	112,9±12,8	7,4
Malv cumarato	601,9±108,5	11,7	559,7±82,6	0,7	649,7±92,1	1,1
<b>Total</b>	<b>6138,4±315,3</b>	<b>100</b>	<b>8040,2±737,0</b>	<b>100</b>	<b>10392,9±894,9</b>	<b>100</b>

<sup>a</sup>Abreviaturas: Del: Delfinidina-3-monoglucósido; Cian: Cianidina-3-monoglucósido; Pet: Petunidina-3-monoglucósido; Pn: Peonidina-3-monoglucósido; Malv: Malvidina-3-monoglucósido; MalvAc: Malvidina acetato; DelC: Delfinidina cumarato.

<sup>nd</sup>: no detectado.

González-San José et al. (1990), para la variedad Tempranillo, obtuvieron una acumulación progresiva de los antocianos monoglucósidos durante la maduración, mientras que para sus correspondientes formas aciladas observaron que en general tenían lugar tres fases bien diferenciadas: primero una de acumulación, después una fase de caída en su concentración y por último una fase de rápida acumulación hasta que es alcanzada la madurez fisiológica. Resultado similar al que se muestra en la tabla 4.4.2.2., aunque la tercera fase de acumulación se dio una vez sobrepasada la madurez fisiológica de la uva.

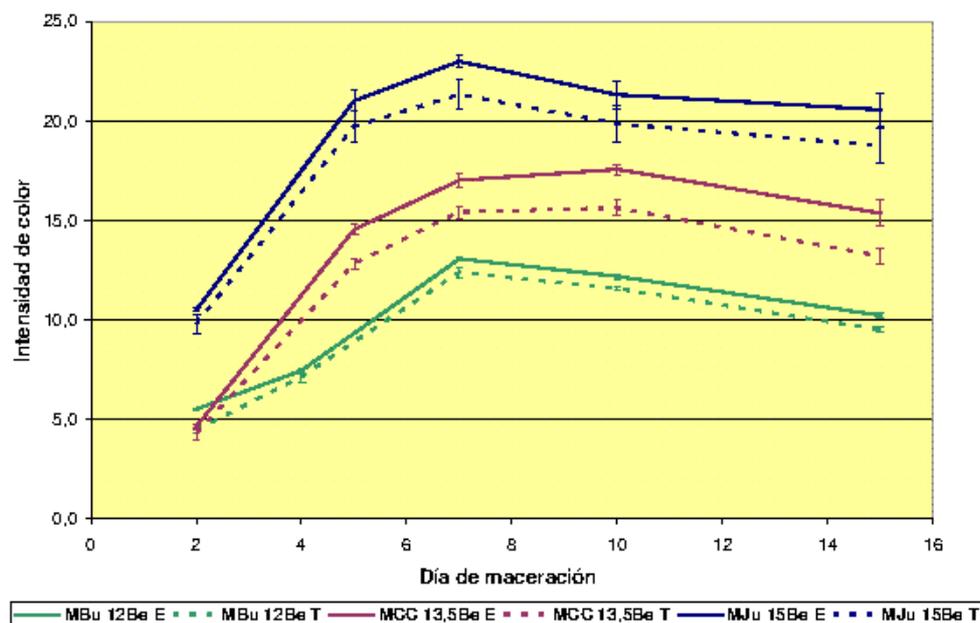
#### **4.4.2.2. Características cromáticas de los vinos.**

Durante la elaboración de los vinos se tomaron muestras regularmente y se analizaron sus características cromáticas. Los resultados obtenidos se exponen a continuación.

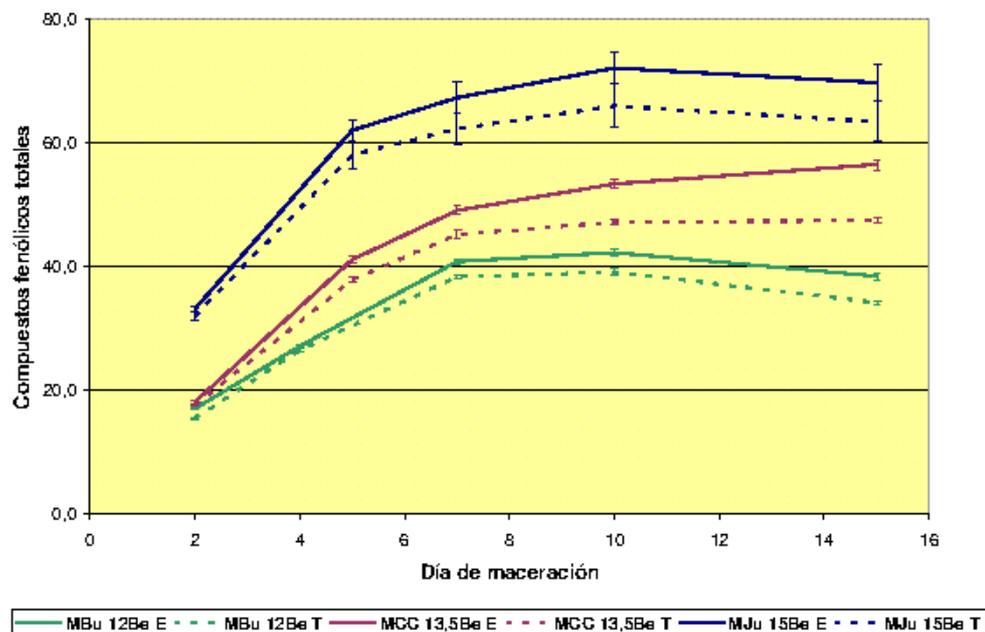
En la Gráfica 4.4.2.1. se muestra la evolución de la intensidad de color durante la maceración. Se observa un aumento del color en todos los vinos hasta el día 7, para a partir de ahí mantenerse constante o disminuir un poco. Durante toda la maceración, los vinos elaborados con enzima presentaron una intensidad de color superior a su testigo. La intensidad de color más favorecida por el uso de enzimas, al final del periodo de maceración, se observa en el vino elaborado con uvas con 13,5 °Be que presentaban un color un 15% superior a su testigo.

En uvas poco y muy maduras (12 y 15 °Be) el uso de enzimas no parece promover un gran aumento en la intensidad de color, sólo un 7% y 9% respectivamente, resultado similar al obtenido por Clare et al. (2002), donde el uso de enzimas macerativos supuso un aumento del 7,5% en la intensidad de color de los vinos al final de la fermentación alcohólica.

**Gráfica 4.4.2.1.** Evolución de la intensidad de color durante la vinificación.



**Gráfica 4.4.2.2.** Evolución del contenido en compuestos fenólicos totales durante la vinificación.

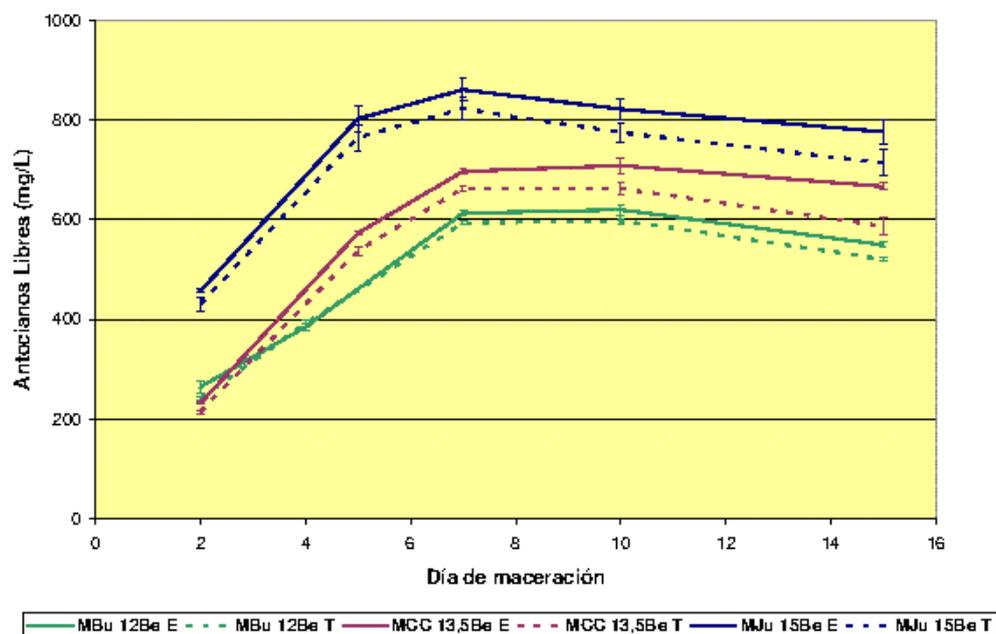


La concentración de compuestos fenólicos totales aumenta hasta el final de la maceración en todos los vinos (Gráfica 4.4.2.2.). Los vinos elaborados con adición del preparado enzimático extractor de color obtienen una mayor carga polifenólica que sus respectivos testigos, resultado como los obtenidos por Daudt y Polenta (1999) en vinos de la variedad Cabernet Sauvignon y Ayestarán et al. (2004) en vinos elaborados con Tempranillo. Las diferencias en la extracción de compuestos fenólicos entre vinos elaborados con enzimas y sin ellos aumentan conforme transcurre la maceración y son menores para los vinos elaborados con uvas poco y muy maduras. Al final de maceración estas diferencias estaban alrededor del 10% para los vinos de 12 y 15 °Be, mientras que rozaban el 20% en el vino de 13,5 °Be.

En cuanto al grado de madurez, cuanto más madura estaba la uva mayor cantidad de compuestos fenólicos totales se extrajo, independientemente de la utilización del preparado enzimático.

Hasta el final del periodo de maceración se observan muy pocas diferencias en el contenido en antocianos totales de los vinos elaborados con las uvas de 12 °Be (Gráfica 4.4.2.3.) independientemente del uso o no de enzima extractor de color. En los vinos de 13,5 °Be las diferencias son algo mayores, siendo al final del periodo de maceración, el vino donde el uso del enzima se mostró más efectivo. Los vinos elaborados con uvas de 15 °Be son los de mayor contenido en antocianos desde el día 3 de maceración, aunque no se obtienen diferencias acusadas en función de la aplicación de enzima. Guerrand et al. (2003) observaron que el contenido en antocianos totales en un vino de Tempranillo elaborado con uvas con mayor grado de madurez era superior al que se alcanzaba en vinos elaborados con uvas menos maduras pero adicionando un preparado enzimático macerativo para la extracción de color. Al final de maceración, se observan diferencias mínimas en el contenido de antocianos totales del 5% (vino elaborado con la uva de 12º) y máximas del 9% (vino procedente de las uvas de 13,5 °Be), cuando se comparaba el vino al que se aplicaba el preparado enzimático para la extracción de color con su testigo.

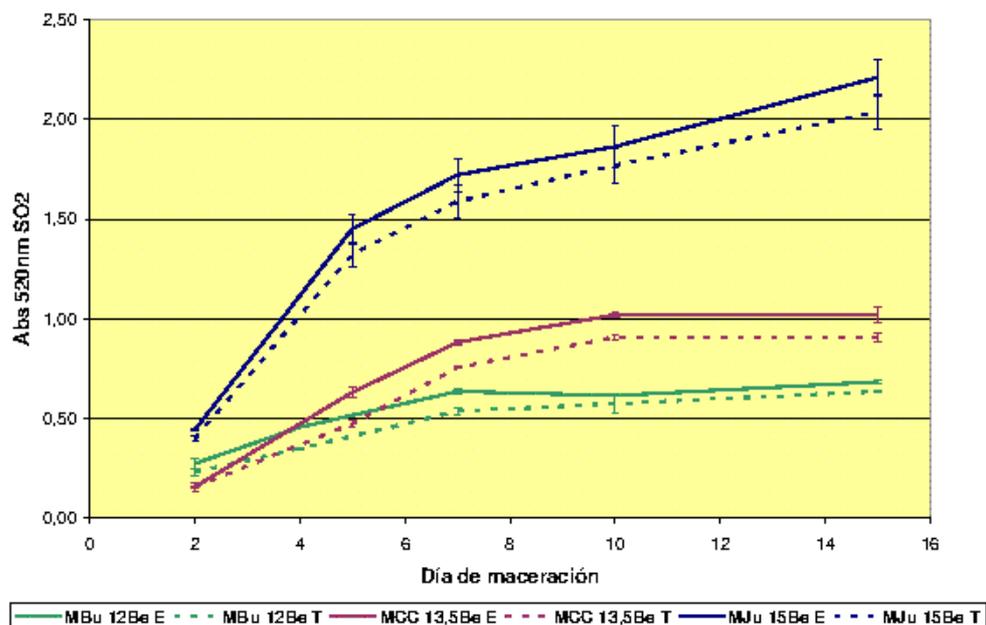
**Gráfica 4.4.2.3.** Evolución del contenido en antocianos totales durante la vinificación.



En la Gráfica 4.4.2.4. se observa la evolución de la formación de antocianos poliméricos (expresada como absorbancia a 520 nm después de adicionar SO<sub>2</sub>) durante la maceración. En todos los vinos elaborados con enzima se da una formación mayor de estos compuestos que en los vinos sin adición de enzima, aunque las diferencias no son muy grandes, alrededor de un 8% para los vinos de 12 y 15 °Be y de un 15% para el de 13,5 °Be. A día 5 de maceración es cuando se encuentran las mayores diferencias, cercanas al 30% para todos los vinos excepto para el de 15 °Be, donde no se llega al 10%.

En cuanto al grado de madurez de la uva, se obtiene una formación mayor de antocianos poliméricos a mayor grado de madurez, debido, en parte, a la mayor disponibilidad de antocianos totales (Gráfica 4.4.2.3.) y de compuestos fenólicos totales (Gráfica 4.4.2.2.).

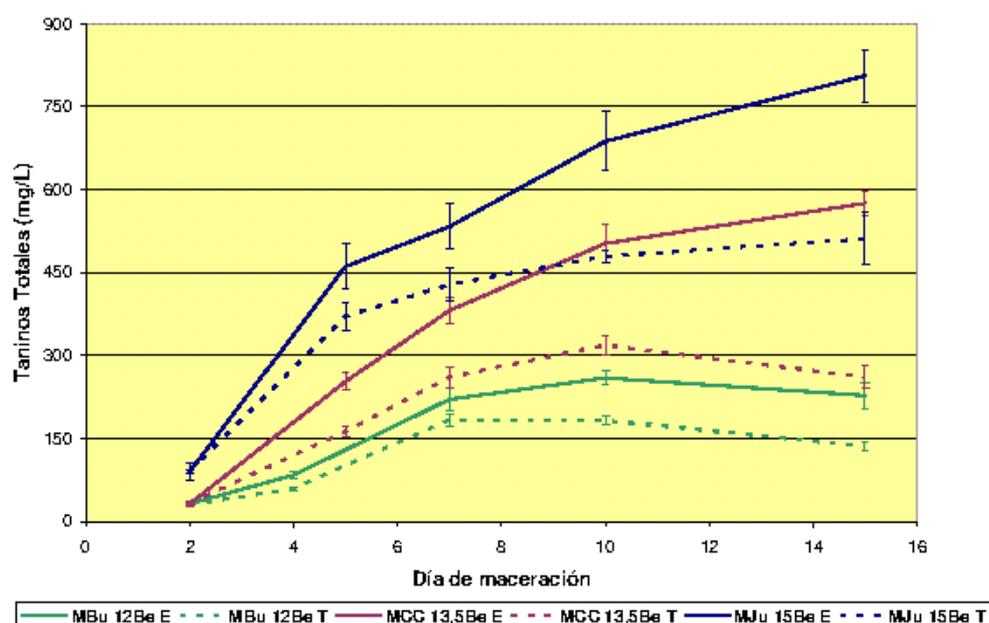
**Gráfica 4.4.2.4.** Evolución del contenido en antocianos poliméricos (como absorbancia a 520nm después de adicionar SO<sub>2</sub>) durante la vinificación.



La concentración en taninos aumenta a lo largo de toda la maceración, según se muestra en la Gráfica 4.4.4.5., siendo ésta mucho más acusada en los vinos elaborados con enzimas. Watson et al. (2000), Parley (2001) y Guerrand y Gervais (2002) obtuvieron resultados similares en ensayos con enzimas macerativos en otras variedades de uva distintas de Monastrell como Pinot Noir y Cabernet Sauvignon. Al final del periodo de maceración, el contenido en taninos era del 58-68% superior en los vinos tratados con el enzima que en sus respectivos testigos, exceptuando el vino de 13,5 °Be donde la extracción superó en un 120% a la del control. Incluso se observa que, a partir del día 10 de maceración, en este vino la aplicación del enzima supuso que se lograra extraer una cantidad de taninos totales superior a la del vino testigo de 15°Be. Este mayor contenido en taninos podría facilitar una mayor estabilidad de los vinos elaborados con enzima a lo largo del tiempo.

En cuanto a la influencia del grado de madurez de la uva, conforme éste aumentaba, así mismo, aumentaba el contenido en taninos a lo largo de toda la maceración, posiblemente debido a una mayor degradación de la pared celular de la piel de uva que puede permitir una mayor difusión de taninos de la piel en el mosto-vino.

**Gráfica 4.4.2.5.** Evolución del contenido en taninos totales durante la vinificación.



En general, en vista de los resultados obtenidos, se observa que la aplicación del enzima tuvo un resultado más satisfactorio en la elaboración del vino con uva de 13,5 °Be. En este vino fue donde porcentualmente se consiguieron las mayores diferencias en la extracción de los compuestos fenólicos entre el vino elaborado con enzima y su testigo. Posiblemente se deba a que en la vinificación con uva de 12 °Be, que se encuentra en un estado más inmaduro, la aplicación del enzima, aunque consiga degradar parte de las paredes celulares, no llegue a superar la degradación natural de éstas debida al proceso natural de maduración de las bayas. Así mismo, en la elaboración del vino con uva de 15 °Be, el efecto del enzima también fue menor. Esta uva estaba sobremadura, por lo que su piel presentaba un alto grado de degradación natural debido a los procesos de maduración, así el efecto del enzima sería menor, puesto que las paredes celulares de la piel de la uva estarían lo suficientemente degradadas para permitir una extracción fácil de los compuestos fenólicos.

Después de elaborados, los vinos se mantuvieron 3 meses en depósitos de acero inoxidable (0 meses en botella) bajo atmósfera inerte, fueron embotellados y almacenados durante un periodo de 6 meses (6 meses en botella) y se controló la evolución de los parámetros cromáticos durante ese periodo.

Se realizó un análisis multifactorial de la varianza para observar la influencia, de la aplicación del preparado enzimático y del grado de madurez de la uva, en la evolución de los parámetros cromáticos de las distintas vinificaciones, desde el momento del final de la fermentación alcohólica hasta después de un almacenamiento de 6 meses en botella.

En la tabla 4.4.2.3. se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.4.2.3. Evolución de las características cromáticas de los vinos durante el almacenamiento.

Efectos	CFT <sup>1</sup>	Antocianos totales (mg/L)	A <sup>520</sup>	A <sup>acet</sup>	A <sup>20</sup>	Tan (mg/L)	IC	Tono	A <sup>620</sup>	A <sup>520</sup>	A <sup>420</sup>	L	a	b
<b>Fin Fermentación Alcohólica</b>														
<b>Técnica</b>														
<b>Testigo</b>	48,8a <sup>2</sup>	532,6a	1,85a	9,26a	6,48a	331,1a	14,4a	0,54b	1,47a	8,39a	4,51a	11,2b	42,3b	19,2b
<b>Enzima</b>	56,0b	577,6b	2,08b	10,40b	7,20b	520,7b	16,6b	0,52a	1,77b	9,73b	5,06b	8,4a	38,4a	14,5a
<b>°Be</b>														
<b>12</b>	35,6a	413,7a	1,88a	7,53a	5,87a	170,3a	12,2a	0,52a	1,34a	7,11a	3,68a	12,1c	43,3c	20,7c
<b>13,5</b>	50,8b	524,0b	1,76a	9,03b	6,21a	442,3b	14,3b	0,53b	1,50b	8,40b	4,47b	10,8b	42,0b	18,5b
<b>15</b>	70,7c	727,7c	2,24b	12,93c	8,45b	665,2c	19,9c	0,54c	2,01c	11,68c	6,26c	6,6a	35,8a	11,4a
<b>0 meses botella</b>														
<b>Técnica</b>														
<b>Testigo</b>	40,2a	258,1a	3,99a	7,64a	6,74a	425,5a	12,4a	0,64b	1,82a	6,44a	4,19a	8,1b	38,0a	13,8b
<b>Enzima</b>	44,1b	261,4a	4,59b	8,18b	7,52b	634,8b	13,8b	0,61a	2,04b	7,25b	4,51b	7,1a	36,4a	12,1a
<b>°Be</b>														
<b>12</b>	26,5a	158,5a	3,42a	5,46a	5,10a	183,9a	9,7a	0,60a	1,62a	5,05a	3,01a	9,7c	40,3b	16,0c
<b>13,5</b>	38,3b	207,6b	4,24b	7,10b	6,81b	558,4b	13,0b	0,60a	2,19c	6,75b	4,05b	6,1a	34,8a	10,4a
<b>15</b>	61,8c	413,1c	5,21c	11,18c	9,48c	848,3c	16,7c	0,69b	1,98bc	8,73c	6,00c	7,2b	36,5a	12,4b
<b>6 meses botella</b>														
<b>Técnica</b>														
<b>Testigo</b>	40,4a	204,2a	3,90a	5,82a	5,24a	346,6a	10,8a	0,69b	1,51a	5,49a	3,81a	10,8a	40,8a	16,7a
<b>Enzima</b>	44,6a	204,3a	4,73b	6,45a	5,96b	503,6b	12,0b	0,66a	1,71a	6,20b	4,11b	9,4a	39,3a	15,3a
<b>°Be</b>														
<b>12</b>	26,4a	132,7a	3,22a	4,20a	3,93a	174,4a	8,0a	0,65a	1,33a	4,04a	2,62a	12,7c	42,7a	18,8b
<b>13,5</b>	34,3b	140,0a	3,88b	4,86a	4,60a	408,4b	9,5b	0,66a	1,60b	4,79b	3,13b	10,4b	41,4a	17,2b
<b>15</b>	66,8c	340,0b	5,86c	9,35b	8,26b	692,5c	16,7c	0,71b	1,90c	8,70c	6,12c	7,0a	36,1a	12,0a

<sup>1</sup> Abreviaturas: CFT: Compuestos fenólicos totales; A<sup>520</sup>: Absorbancia a 520 nm después de adicionar SO<sub>2</sub>; A<sup>acet</sup>: Absorbancia a 520 nm después de adicionar acetaldéhidro; A<sup>20</sup>: Absorbancia a 520 nm después de diluir 20 veces; Tan: Taninos totales; IC: Intensidad de color; A<sup>620</sup>, 520 y 420: Absorbancia a 620, 520 y 420 nm; L, a y b: Parámetros CIELab.

<sup>2</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas según LSD (p<0,05).

A fin de fermentación alcohólica, se obtienen diferencias en todos los parámetros cromáticos estudiados en función de la aplicación del enzima. Los vinos elaborados con enzima alcanzaron valores más altos en compuestos fenólicos totales, antocianos (tanto totales como poliméricos), taninos, absorbancia debida al color amarillo, rojo y azul, una mayor intensidad de color y un menor tono. Estos resultados indican que al finalizar la fermentación alcohólica, la aplicación del preparado enzimático comercial había sido eficaz, logrando una mayor extracción de compuestos (Zimman et al., 2002; Sacchi et al., 2005; Bautista-Ortín et al., 2005 y 2006).

Conforme avanzó el tiempo de almacenamiento estas diferencias se mantuvieron constantes. En el momento del embotellado, los vinos elaborados con el preparado enzimático comercial seguían presentando mejores características cromáticas que los vinos control. Únicamente no se encontraron diferencias significativas en el contenido en antocianos totales y en el parámetro  $a^*$ .

Tras 6 meses en botella, las diferencias encontradas disminuyeron pero los vinos elaborados con enzima seguían alcanzando mejores valores en el contenido en compuestos fenólicos totales, taninos totales, antocianos poliméricos, intensidad de color, tono y absorbancia debida al color rojo y amarillo. El mayor contenido en taninos y antocianos poliméricos y el menor tono que presentaban los vinos elaborados con el enzima indican que estos vinos estaban soportando mejor el almacenamiento que los vinos control y manteniendo un color más estable.

En cuanto a los resultados obtenidos en función del grado de maduración de la uva, el vino elaborado con la uva con 12 °Be fue el que alcanzó valores más bajos en todos los parámetros cromáticos, resultado coherente puesto que, debido a una menor madurez en esta uva, además de encontrar un contenido menor en compuestos fenólicos, éstos serán más difícilmente extraíbles. El caso contrario lo presenta, así mismo, el

vino obtenido con la uva con 15 °Be. Coincidiendo con estos resultados, Sims y Bates (1994) y Pérez-Magariño y González-San José (2004) observaron que vinos de uvas vendimiadas unas dos semanas después de alcanzar la madurez tecnológica, tenían mayor intensidad de color y mayor contenido de antocianos y de polifenoles totales que los procedentes de uvas en ese momento de madurez. Glories (1999) estudiando la relación entre los antocianos de la uva y los del vino en la variedad Cabernet Sauvignon, obtuvo vinos más coloreados al utilizar uvas sobremaduras, donde la concentración de antocianos había empezado a decaer. Conforme avanzó el periodo de almacenamiento y tras 6 meses en botella, las diferencias se hacen menores, entre el vino elaborado con uvas de 12 y 13,5 °Be, mientras que el vino elaborado con uva con 15 °Be, presentaba valores más altos de los parámetros cromáticos pero también signos de una mayor evolución del color.

La evolución del perfil antociánico de los vinos se muestra en la Tabla 4.4.2.4. A los 6 meses en botella, la concentración de antocianos había descendido mucho, siendo los vinos elaborados con uva de 15 °Be los únicos que todavía conservaban una parte de los antocianos monoméricos, en el resto únicamente se detectaban antocianos poliméricos, vitisina A y una pequeña porción de malvidina. Se observa que los vinos elaborados con enzima alcanzaron valores más altos que sus respectivos vinos control, aunque las diferencias no fueron muy grandes. Los vinos de 12 y 13,5 °Be alcanzaron contenidos parecidos en antocianos, más similares conforme avanzaba el almacenamiento. El vino de 15 °Be fue el que mayor contenido en antocianos alcanzó, coincidiendo con los valores registrados espectrofotométricamente.

Tabla 4.4.2.4. Evolución del perfil antocianínico de los vinos durante el almacenamiento.

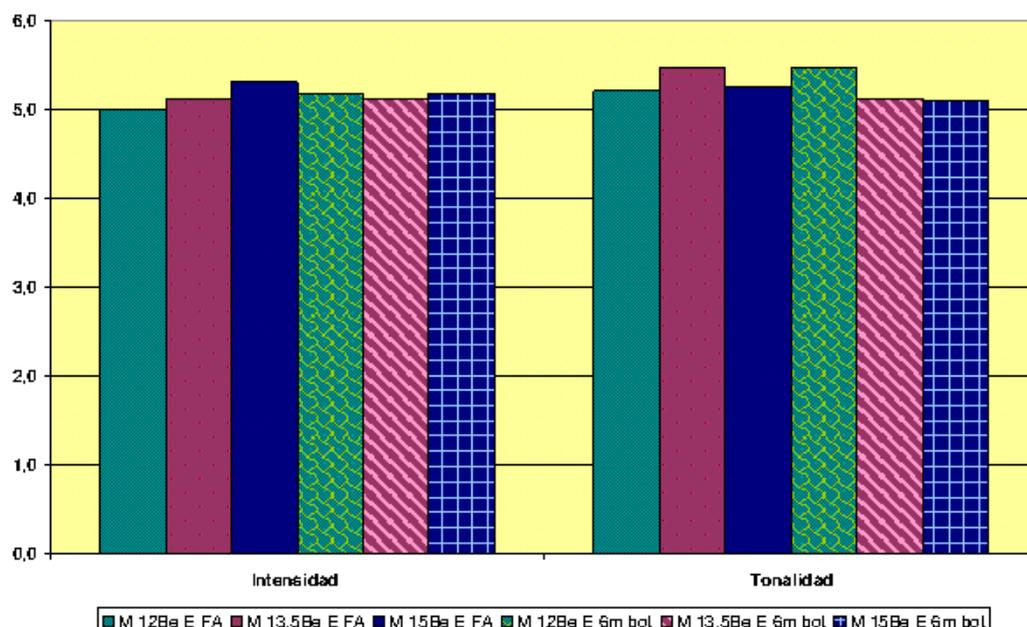
	De <sup>a</sup>	Cian	Pet	Ph	Malv	Vit A	Vit B	Malv etil est	Ph acetato	Malv acetato + Del cumarato	Pet cumarato	Ph cumarato	Malv cumarato	Malv cumarato + Poliméricos	Poliméricos	
<b>Fin de Fermentación Alcohólica</b>																
M12Be T	10,8±0,5	2,2±0,0	18,7±0,4	9,3±0,3	127,1±4,0	1,9±0,0	1,9±0,2	3,6±0,2	1,0±0,0	5,8±0,2	2,3±0,3	1,6±0,1	15,6±0,7	nd	12,8±0,5	
M12Be E	11,9±0,8	2,2±0,2	19,8±1,3	8,9±0,7	124,3±8,4	1,9±0,1	2,4±0,5	4,0±0,7	0,9±0,0	6,0±0,6	2,1±0,2	1,6±0,1	18,1±0,5	nd	15,9±3,4	
W13,5Be T	16,5±0,7	3,2±0,2	27,3±0,6	12,1±0,5	154,4±4,0	2,5±0,1	1,0±0,0	2,8±0,1	0,9±0,1	5,6±0,3	0,8±0,0	3,2±0,1	3,2±0,2	28,5±0,3	nd	
W13,5Be E	19,9±0,1	3,6±0,3	31,9±1,5	12,9±1,1	164,7±3,3	2,7±0,1	1,1±0,0	3,8±0,3	0,9±0,1	7,5±0,5	0,9±0,1	4,1±0,3	6,6±0,7	35,6±0,4	nd	
M15Be T	22,0±0,3	5,6±0,4	39,3±0,6	25,1±0,3	193,4±4,7	3,2±0,1	0,9±0,1	4,1±0,4	1,6±0,1	7,8±0,2	1,0±0,1	4,2±0,3	4,1±0,1	34,8±1,6	32,8±1,6	
M15Be E	24,8±0,7	6,3±0,3	42,8±1,2	26,9±1,1	203,6±6,9	3,3±0,1	1,0±0,2	4,2±0,5	1,6±0,1	8,8±0,4	0,9±0,0	4,6±0,3	4,6±0,2	40,1±1,7	37,5±1,7	
<b>0 meses en botella</b>																
M12Be T	1,0±0,2	nd	1,2±0,6	0,7±0,2	7,1±7,3	1,3±0,0	1,2±0,0	1,9±0,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	45,4±8,1	
M12Be E	0,8±0,1	0,7±0,0	0,9±0,2	0,7±0,1	2,9±1,1	1,3±0,0	1,2±0,2	2,2±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	52,0±3,2	
W13,5Be T	1,3±0,1	0,8±0,1	1,5±0,2	0,9±0,1	6,2±1,0	1,7±0,1	1,7±0,1	3,6±0,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	58,1±3,2	
W13,5Be E	0,9±0,1	0,7±0,1	1,0±0,1	0,7±0,1	2,8±0,8	1,9±0,1	1,4±0,2	3,6±0,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	60,7±1,3	
M15Be T	3,3±0,7	1,3±0,1	6,1±0,8	7,0±1,3	58,2±9,2	4,2±0,2	0,9±0,2	3,5±1,2	nd	2,4±0,3	1,4±0,2	1,1±0,1	3,5±0,2	nd	36,3±2,8	
M15Be E	3,1±0,3	1,4±0,0	5,1±0,5	5,1±0,6	42,5±6,5	4,5±0,3	1,1±0,1	4,6±0,3	nd	2,2±0,3	1,0±0,2	1,0±0,2	nd	58,9±1,9	nd	
<b>6 meses en botella</b>																
M12Be T	nd	nd	nd	nd	5,0±5,9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	102,9±4,7	
M12Be E	nd	nd	nd	nd	1,7±1,1	1,0±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	35,8±8,1	
W13,5Be T	nd	nd	nd	nd	1,4±0,2	1,2±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	35,3±1,8	
W13,5Be E	nd	nd	nd	nd	1,2±0,3	1,3±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	31,6±2,4	
M15Be T	3,2±0,1	1,4±0,1	4,8±0,3	2,6±0,2	31,4±5,0	2,4±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,4±0,4	nd	29,3±1,4	
M15Be E	3,1±0,1	1,5±0,1	3,4±0,2	2,0±0,3	19,9±2,9	3,4±0,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	41,1±6,2	

<sup>a</sup>Abreviaturas: Del: Delifidina-3-monoglucósido; Cian: Cianidina-3-monoglucósido; Pet: Petunidina-3-monoglucósido; Ph: Peonidina-3-monoglucósido; Malv: Malvidina-3-monoglucósido; Vit A y B: Vitisina A y B; Malv etil est: Malvidina etil catequina.  
<sup>b</sup>nd: no detectado.

Los vinos fueron evaluados, por un panel de catadores expertos, al término de la fermentación alcohólica y tras 6 meses de permanencia en botella. La intensidad de cada uno de los atributos se valoró de 1 a 10, otorgando mayor puntuación a mayor sensación. Se llevó a cabo una normalización de las puntuaciones de los vinos testigo a un valor de 5 y en las gráficas se muestran las puntuaciones relativas de los vinos elaborados con enzima en función de esta normalización.

En la Gráfica 4.4.2.6. se muestra la valoración en intensidad de color y tonalidad, las diferencias no fueron significativas, aunque el vino de 15 °Be fue un poco mejor valorado en cuanto a la intensidad de color con respecto a su testigo y el de 13,5 °Be en cuanto a la tonalidad. Tras 6 meses en botella, todos los vinos se puntuaban igual que su testigo, excepto el vino elaborado con uva con 12 °Be que era valorado un poco mejor que su testigo con respecto a la tonalidad.

**Gráfica 4.4.2.6.** Evaluación sensorial de la fase visual de los vinos elaborados con enzima con respecto a sus testigos a fin de fermentación alcohólica y tras 6 meses en botella.



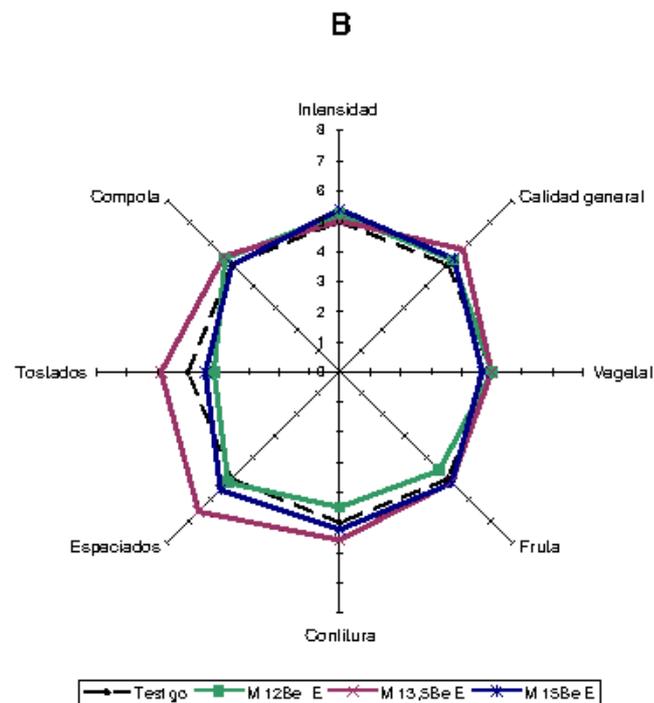
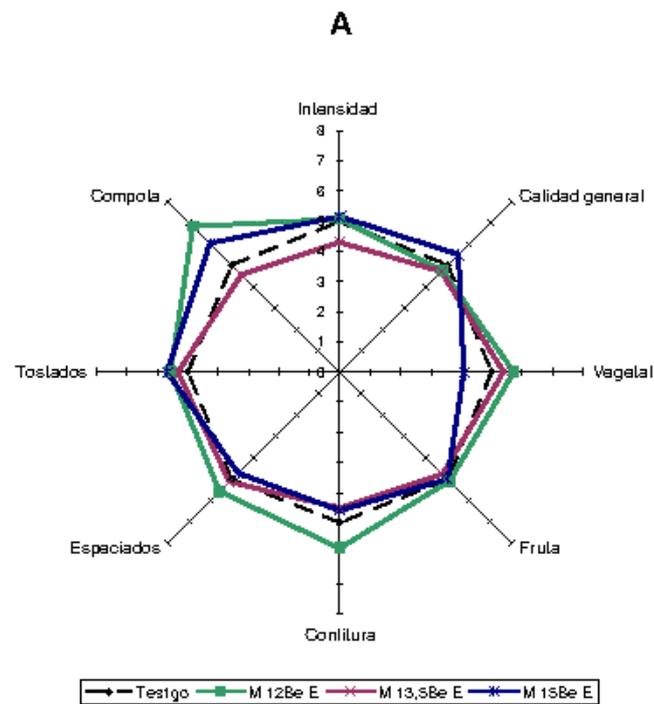
En cuanto al aroma, a fin de fermentación alcohólica los vinos presentaron una intensidad similar a sus testigos, exceptuando al vino elaborado con uva de 13,5 °Be que fue peor valorado que su testigo

(Gráfica 4.4.2.7.). Todos los vinos, excepto el de 15 °Be, mostraron una sensación vegetal mayor que sus testigos, sin embargo tras 6 meses en botella todos perdieron ese carácter vegetal, no encontrándose diferencias con sus respectivos vinos testigo. En el resto de parámetros valorados, los vinos mostraron un perfil muy similar a su vino control aunque el vino de 12 y el de 15 °Be mostraron más aromas a compota que su testigo. Tras 6 meses en botella, el vino procedente de la uva de 13,5 °Be fue el mejor valorado con respecto a su testigo, mostrando un perfil con mayor intensidad a aromas especiados y tostados.

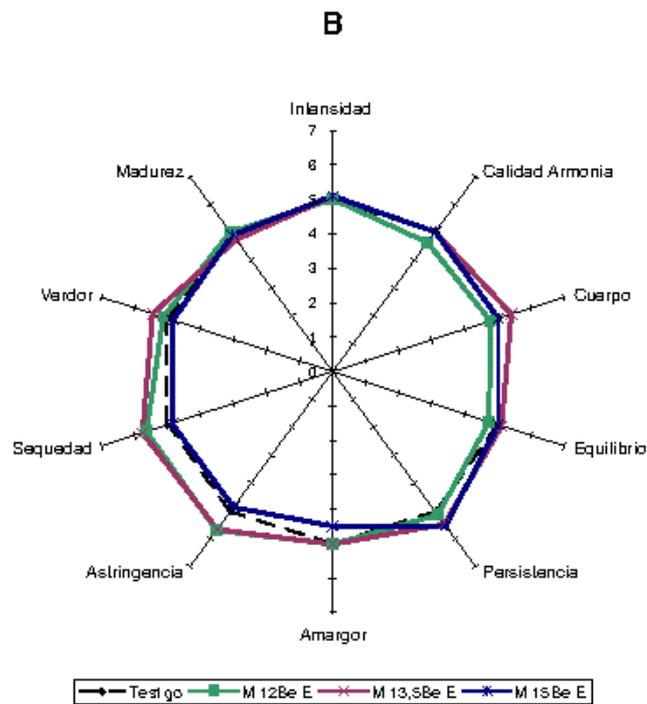
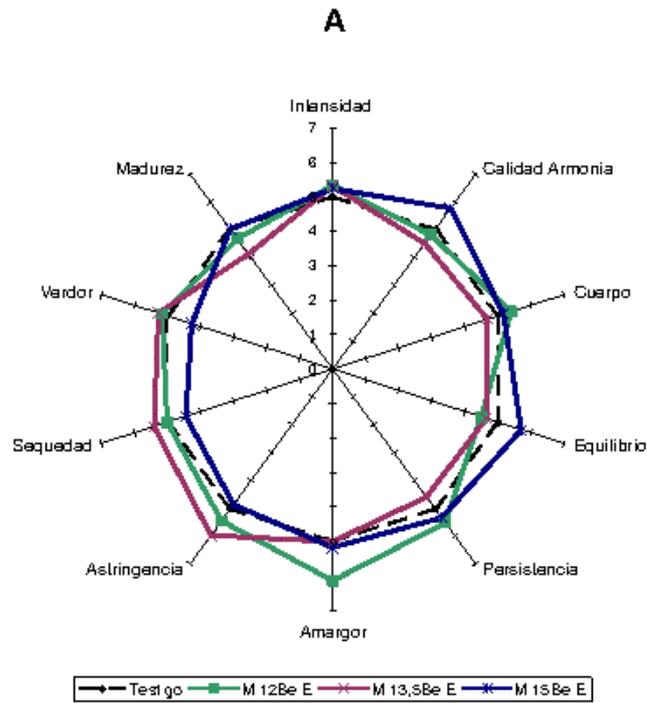
Según se observa en la Gráfica 4.4.2.8., a final de la fermentación alcohólica, en boca los vinos mostraron una intensidad similar a sus testigos. Excepto el vino elaborado con la uva más madura, el resto fue peor valorado cuando se forzaba la extracción con el enzima de maceración, detectándose en los vinos mayor astringencia, sequedad y verdor. Sin embargo, el vino procedente de la uva con 15 °Be fue mejor valorado que su testigo, percibiéndose menos secante y astringente y más equilibrado en conjunto. Tras 6 meses en botella, todos los vinos elaborados con enzima eran calificados de manera similar a sus testigos, aunque eran valorados como ligeramente más secantes y astringentes.

La aplicación de un preparado enzimático comercial para la extracción de color parece efectiva a la hora de conseguir una mayor extracción de compuestos fenólicos, siendo útil su utilización en uvas con distinto grado de madurez. En uvas poco o muy maduras, el efecto del enzima va a ser menor que en uvas con un grado de maduración adecuado para la vinificación. Las características cromáticas de los vinos elaborados con enzima se van a mantener más estables en el tiempo. Las características sensoriales de los vinos no se van a ver muy afectadas por el uso del enzima, aunque parece que en los que se aplicó éste, el aroma se ve ligeramente mejorado. En boca, los vinos elaborados con enzima se valoraron como más duros, cuando la uva no estaba sobremadura, pero con un periodo de afinamiento en botella, estas sensaciones remitieron.

**Gráfica 4.4.2.7.** Evaluación sensorial de la fase aromática de los vinos elaborados con enzima con respecto a sus testigos a fin de fermentación alcohólica (A) y tras 6 meses en botella (B).



**Gráfica 4.4.2.8.** Evaluación sensorial de la fase gustativa de los vinos elaborados con enzima con respecto a sus testigos a fin de fermentación alcohólica (A) y tras 6 meses en botella (B).



#### **4.4.2.3. Caracterización de las paredes celulares de los orujos.**

Los orujos de estas distintas elaboraciones realizadas con uvas con diferente grado de maduración y con aplicación del enzima macerativo o no, se recogieron una vez prensados y se congelaron hasta la extracción de sus paredes celulares. Estas paredes celulares se caracterizaron, analizando su contenido en proteínas y compuestos fenólicos ligados a la pared celular, lignina y su composición en azúcares neutros y ácidos urónicos.

En la tabla 4.4.2.5. se muestra el rendimiento en pared celular que se obtuvo de los orujos resultantes de las distintas elaboraciones.

**Tabla 4.4.2.5.** Contenido en pared celular de los orujos tras la maceración.

	<b>Rendimiento (mg pared celular / g orujo)</b>
<b>12Be T</b>	33,8ab <sup>1</sup>
<b>12Be E</b>	40,2b
<b>13,5Be T</b>	29,7a
<b>13,5Be E</b>	50,4c
<b>15Be T</b>	39,9b
<b>15Be E</b>	55,0c

<sup>1</sup> Letras distintas indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

De forma similar a lo mostrado en el apartado anterior (4.4.1.), se observa que en los orujos procedentes de vinificaciones donde se aplicó el enzima macerativo el rendimiento es mayor comparándolo con el orujo de la misma elaboración sin adicionar el preparado enzimático. Y tal como se ha comentado previamente, esto puede ser debido a que la acción del enzima consiga una mayor transferencia de compuestos celulares al mosto-vino con lo que se daría un aumento en el contenido en paredes celulares por gramo de orujo.

**Tabla 4.4.2.6.** Contenido en proteínas, compuestos fenólicos totales y lignina en pared celular de los orujos tras la maceración.

	<b>Proteína (mg/g pared celular)</b>	<b>Compuestos fenólicos totales (mg/g pared celular)</b>	<b>Lignina (mg/g pared celular)</b>
<b>12Be T</b>	21,4a <sup>1</sup>	65,9a	200,0a
<b>12Be E</b>	22,2a	74,7a	260,0ab
<b>13,5Be T</b>	23,0ab	74,2a	276,7bc
<b>13,5Be E</b>	27,3ab	72,4a	286,7bc
<b>15Be T</b>	28,3b	89,0a	320,0bc
<b>15Be E</b>	41,1c	77,5a	336,7c

<sup>1</sup> Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 4.4.2.6., se observa que la aplicación del enzima no tuvo ninguna influencia en el contenido en proteínas, lignina y compuestos fenólicos de las paredes celulares de los orujos. El comportamiento teniendo en cuenta el grado de maduración de las uvas indica una mayor degradación de las paredes celulares en uvas con mayor madurez, aumentando el contenido en proteínas y en lignina. El aumento del contenido en proteína, cuando aumentaba el grado de maduración de la uva, se corresponde con los resultados obtenidos por otros autores. Huang et al. (2005) describieron un incremento en el contenido en proteínas unidas covalentemente a la pared celular durante la maduración y Nunan et al. (1998) observaron un aumento en el contenido en proteína del 8 al 12%, cuando la maduración de las uvas avanzaba. Así mismo, la acumulación de lignina en las paredes celulares está relacionada con los procesos de maduración de los frutos (Waldron y Selvendran, 1990; Estrada et al., 1999)

**Tabla 4.4.2.6.** Contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos (mg/g de pared celular) en la pared celular del orujo de Monastrell durante la maceración.

	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	Cell-Glu <sup>1</sup>	UA	GM	GA	Total azúcares
<b>12Be T</b>	0,0a <sup>2</sup>	2,8a	23,2bc	14,6a	31,5c	22,7a	69,0d	80,8a	183,4d	39,1a	8,8ab	427,9b
<b>12Be E</b>	0,0a	0,0a	17,3ab	17,3a	34,1d	22,1a	66,1cd	95,6a	131,2bc	44,4ab	12,9bc	383,7b
<b>13,5Be T</b>	0,0a	0,0a	27,4c	12,6a	27,3a	23,7a	45,4b	92,7a	189,2d	35,5a	7,7a	418,3b
<b>13,5Be E</b>	0,0a	0,0a	16,7ab	13,6a	31,7c	21,0a	58,8c	97,1a	83,8a	62,5c	18,6d	322,8a
<b>15Be T</b>	0,0a	0,0a	26,2c	14,1a	29,4b	22,0a	31,0a	97,1a	165,4cd	40,6a	8,9ab	385,1b
<b>15Be E</b>	0,0a	0,0a	10,6a	9,0a	29,4b	22,4a	34,9a	95,2a	93,0ab	56,0bc	15,1cd	284,5a

<sup>1</sup>Abreviaturas: Cell-Glu: Glucosa celulósica; UA: Ácidos urónicos; GM: Grado de metilación; GA: Grado de Acetilación.

<sup>2</sup>Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas.

En cuanto a la composición en azúcares de la pared celular de los orujos, que puede ser consultada en la Tabla 4.4.2.7., de nuevo (como en el apartado 4.4.1.) se observa un descenso en el contenido en arabinosa, galactosa, ácidos urónicos y contenido total en azúcares y un aumento en el de manosa, glucosa y el grado de metilación y acetilación en función de la aplicación del enzima. En los orujos procedentes de las elaboraciones con uvas de 12 °Be, no se observa un efecto del enzima en el contenido total en azúcares, lo que puede justificar las menores diferencias cromáticas que se encontraron en el vino elaborado con estas uvas y el enzima macerativo. En función del grado de maduración únicamente se da un descenso en el contenido en glucosa, aunque la maduración de la uva va acompañada de un reblandecimiento del fruto, debido a la degradación de los polisacáridos de la lámina media y de la pared primaria (Waldron et al., 1997; Wakabayashi, 2000). La estructura de la pared celular se debilita y desciende el nivel de adhesión de las células (Ishimaru y Kobayashi, 2002). La despolimerización de los polisacáridos pécticos durante la maduración de diversas frutas ha sido observada en numerosos estudios (Huber, 1981; Batisse et al., 1996; Nunan et al., 1998; Ali et al., 2004). El contenido en glucosa celulósica, sin embargo, permanece invariable, al comparar los orujos procedentes de uvas con distinto grado de maduración, coincidiendo con los resultados encontrados por Nunan et al. (1998 y 2001) y Manganaris et al. (2005) en uva y melocotón respectivamente.

#### **4.4.3. EFECTO EN LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DE VINOS ELABORADOS CON UVAS CON DISTINTO ÍNDICE DE EXTRACTABILIDAD Y EN LAS PAREDES CELULARES DE LOS ORUJOS OBTENIDOS.**

En el apartado anterior se mostraba el efecto de la aplicación de preparados enzimáticos en la extracción de color en uvas de la variedad Monastrell con distinto grado de madurez tecnológica. Pero, como se ha comentado anteriormente, la sola observación de la evolución de la concentración de compuestos fenólicos en la piel de la baya, a veces, no sirve como medida del potencial de esa baya para dar vinos muy coloreados, puesto que, en muchos casos, el máximo contenido en la uva no coincide con el momento en que éstos son más fácilmente extraíbles. Ortega-Regules (2006) observó que el índice de extractabilidad se correlacionaba tanto con el contenido total de pared celular de la piel de la uva como con su composición. Puesto que los enzimas van a degradar la pared celular, se pensó que era posible que éstos fueran más efectivos con vendimias con alto índice de extractabilidad (uvas que van a mostrar mayor dificultad para la extracción de sus antocianos).

Durante el seguimiento de la maduración de la uva en la campaña 2004-2005 y después de alcanzar la uva 13 °Be, hubo una parada en la maduración y dos semanas después, el grado apenas había variado, pero, curiosamente, había subido bastante su madurez fenólica (bajado el índice de extractabilidad). Con estas uvas de similar °Be y distinta madurez fenólica se comprobó el efecto del enzima durante la elaboración.

El objetivo, por tanto, de esta parte del trabajo, fue comprobar la efectividad de la aplicación de enzimas de maceración en uvas con diferente madurez fenólica, que podría indicar diferencias en la estructura de la pared celular de las uvas.

**4.4.3.1. Características de la uva a la entrada en bodega.**

La madurez fenólica (índice de extractabilidad e índice de madurez de la pepita) en el momento de la vendimia, se muestra en la Tabla 4.4.3.1. El contenido en azúcares ( $^{\circ}\text{Be}$ ) es muy similar para ambas muestras. Así mismo, no se encuentran grandes diferencias en el índice de madurez de la pepita (Mp). Sin embargo, la uva de la muestra A presenta un índice de extractabilidad mayor que la uva B, por lo que la extractabilidad de los compuestos fenólicos será menor (Saint-Cricq et al., 1998).

**Tabla 4.4.3.1.** Madurez fenólica de la uva en el momento de la vendimia ( $\pm$  desviación estándar).

	<b>Peso 100 bayas (g)</b>	<b>EA<sup>a</sup></b>	<b>Mp</b>	<b>Be</b>
<b>Uva A</b>	116,60 $\pm$ 3,49	44,44 $\pm$ 1,19	63,78 $\pm$ 1,09	13,0 $\pm$ 0,0
<b>Uva B</b>	111,37 $\pm$ 3,67	27,97 $\pm$ 1,11	57,96 $\pm$ 0,54	13,4 $\pm$ 0,1

<sup>a</sup>Abreviaturas: EA: índice de extractabilidad; Mp: índice de madurez de la pepita; Be: grado Beaumé.

En la Tabla 4.4.3.2. se puede ver el perfil antociánico que presentaba la uva en el momento de su entrada en bodega para ser elaborada. La uva B, que es la que presentaba una mayor facilidad para la extracción de los antocianos es la que mayor contenido presenta en cada uno de los antocianos, tanto en el contenido por gramo de piel como por baya. El porcentaje en el que se presenta cada antociano es similar en ambas uvas. Aunque la composición de antocianos en la uva de una variedad determinada puede variar, cualitativamente está muy relacionada con su herencia genética (Fernández-López et al., 1998).

**Tabla 4.4.3.2.** Perfil antociánico (HPLC) del hollejo de la uva a la entrada en bodega.

Antociano <sup>a</sup>	Uva A			Uva B		
	Piel (µg/g)	%	Baya (mg/kg)	Piel (µg/g)	%	Baya (mg/kg)
Del	851,0±76,1	12,4	116,2±10,4	1001,8±79,6	12,5	127,9±10,2
Cian	447,6±25,3	6,5	61,1±3,4	568,1±58,7	7,1	72,5±7,5
Pet	949,6±106,1	13,8	129,7±14,5	1079,5±91,4	13,4	137,8±11,7
Pn	524,6±61,7	7,6	71,6±8,4	764,1±92,3	9,5	97,5±11,8
Malv	3288,3±321,6	47,8	449,0±43,9	3667,2±315,2	45,6	468,0±40,2
Pn acetato	nd <sup>b</sup>	0	nd	13,4±1,6	0,2	1,7±0,2
MalvAc+DelC	150,0±18,4	2,2	20,5±2,5	210,7±53,2	2,6	26,9±6,8
Pet cumarato	60,2±6,6	0,9	8,2±0,9	69,1±5,0	0,9	8,8±0,6
Pn cumarato	44,4±6,2	9,9	6,1±0,8	57,1±10,2	8,4	7,3±1,3
Malv cumarato	555,8±69,2	0,6	75,9±9,5	559,7±82,6	0,7	71,4±10,5
<b>Total</b>	<b>6882,8±684,4</b>	<b>100</b>	<b>939,8±93,4</b>	<b>8040,2±737,0</b>	<b>100</b>	<b>1026,1±94,1</b>

<sup>a</sup>Abreviaturas: Del: Delfinidina-3-monoglucósido; Cian: Cianidina-3-monoglucósido; Pet: Petunidina-3-monoglucósido; Pn: Peonidina-3-monoglucósido; Malv: Malvidina-3-monoglucósido; MalvAc: Malvidina acetato; DelC: Delfinidina cumarato.

<sup>b</sup>nd: no detectado.

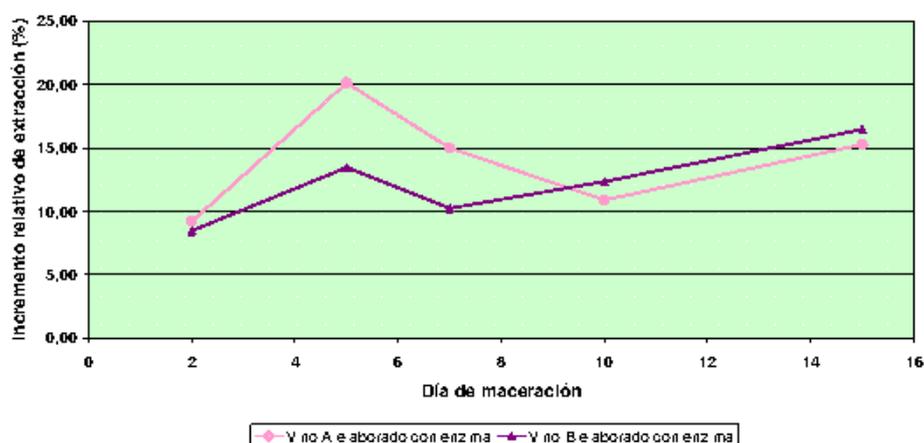
#### **4.4.3.2. Características cromáticas de los vinos.**

A continuación, en las Gráficas 4.4.3.1 a 4.4.3.5. se muestra la evolución de distintos parámetros cromáticos de los vinos durante su elaboración. Para una mejor comprensión de los resultados, se presentan los resultados en porcentajes relativos de extracción. Se ha normalizado a un 100% de extracción los valores alcanzados por el vino testigo de cada una de las elaboraciones.

En la Gráfica 4.4.3.1. se muestra la evolución de la intensidad de color de los vinos elaborados con el enzima macerativo respecto a su vino control. Al final de la maceración, ambos vinos habían alcanzado una intensidad de color un 15% superior a su testigo, independientemente del tipo de uva utilizada en la elaboración (Servilli et al., 1992). A día 5 de maceración, el incremento en la intensidad de color en comparación con

el control fue superior para el vino elaborado con la uva A, la de mayor índice de extractabilidad.

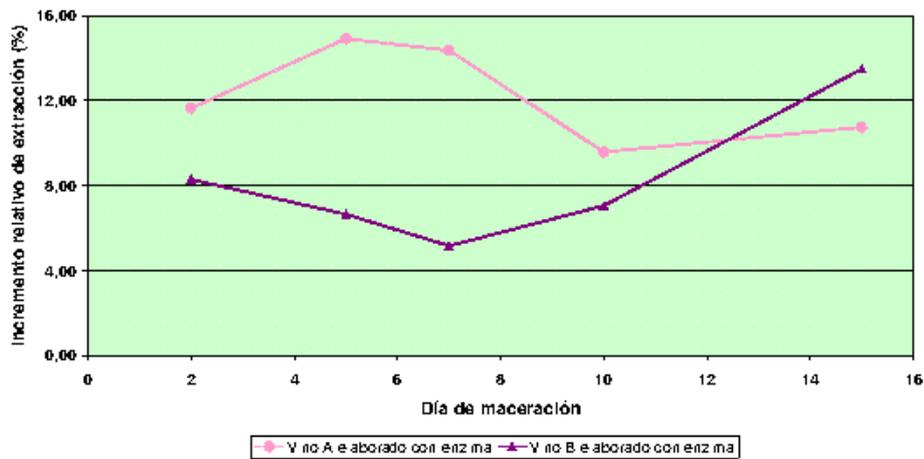
**Gráfica 4.4.3.1.** Evolución de la intensidad de color relativa durante la maceración.



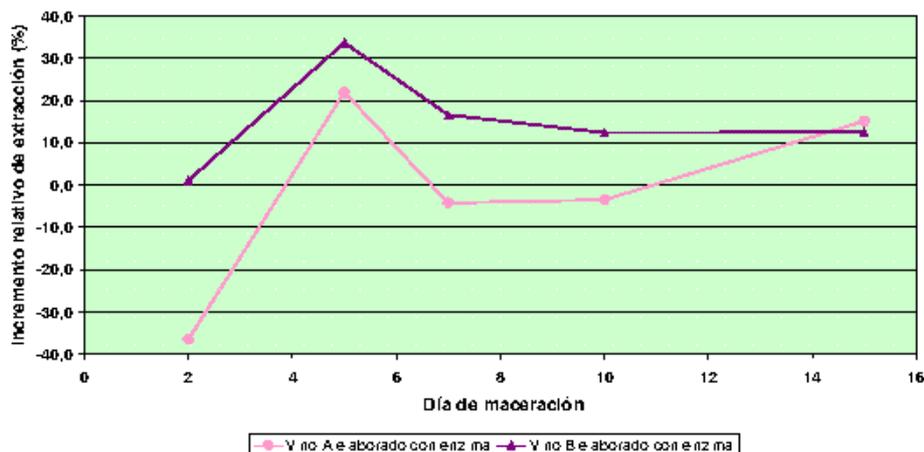
En las Gráficas 4.4.3.2 a 4.4.3.4. se puede observar la evolución de la difusión de los antocianos y los compuestos fenólicos totales. Al final de la maceración, en los vinos elaborados con enzima la difusión de antocianos totales y poliméricos había sido alrededor de un 12-15% superior que en los vinos testigo. También la extracción de compuestos fenólicos totales fue superior en casi un 20%. En ambos casos, hasta el día 10 de maceración, la aplicación del enzima fue más efectiva, para la extracción de antocianos y compuestos fenólicos totales, en la uva A, la de mayor índice de extractabilidad, puesto que se conseguía un mayor porcentaje de extracción de estos compuestos con respecto a su testigo que en la vinificación de la uva B, aunque no ocurrió lo mismo para los antocianos poliméricos. Este comportamiento puede indicar que los enzimas macerativos podrían ser más efectivos para este tipo de uvas en elaboraciones llevadas a cabo con maceraciones cortas. Zinnai et al. (2003) observaron que el enzima extractor de color que aplicaron en vinificaciones de uva Sangiovese durante dos años consecutivos,

únicamente era efectivo cuando la uva presentaba una baja extractabilidad de compuestos fenólicos.

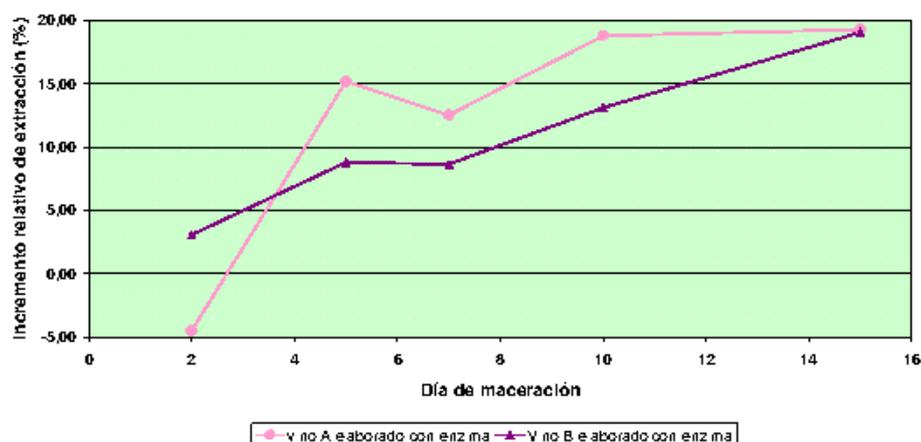
**Gráfica 4.4.3.2.** Evolución de la extracción relativa de antocianos totales durante la maceración.



**Gráfica 4.4.3.3.** Evolución de la extracción relativa de antocianos poliméricos (expresada como absorbancia a 520 nm después de adicionar SO<sub>2</sub>) durante la maceración.

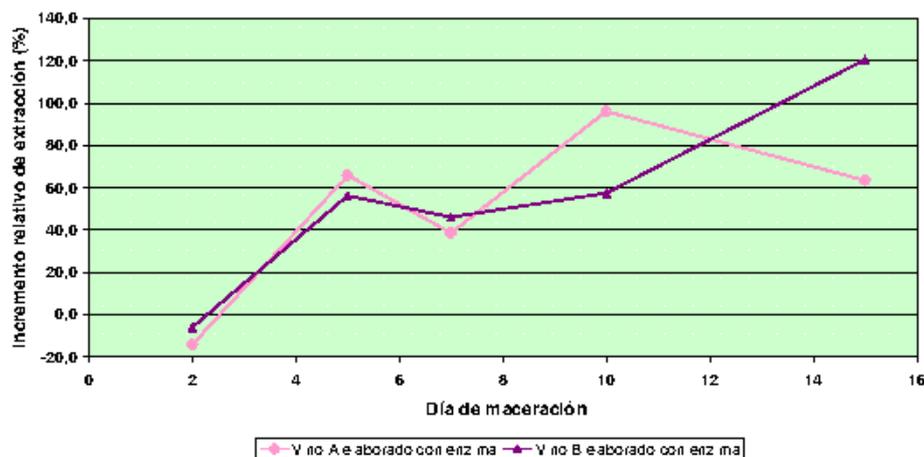


**Gráfica 4.4.3.4.** Evolución de la extracción relativa de compuestos fenólicos totales durante la maceración.



En vista de los resultados obtenidos, el uso de preparados enzimáticos comerciales para la extracción de color también puede ser útil para mejorar la difusión de los taninos. En la Gráfica 4.4.3.5. se muestra que los vinos elaborados con enzimas obtuvieron valores en el contenido en taninos alrededor de un 100% superiores a sus respectivos vinos control. Estos taninos, probablemente, procedían de la piel de la uva y no de la pepita, puesto que el etanol no está presente en las primeras fases del proceso de elaboración (Oszmanski et al., 1986).

**Gráfica 4.4.3.5.** Evolución de la extracción relativa de taninos durante la maceración.



Los resultados muestran que el uso de preparados enzimáticos macerativos puede mejorar la extracción de los compuestos fenólicos y, por tanto, la intensidad de color de los vinos resultantes, independientemente del tipo de uva utilizada en el proceso de vinificación (Zent e Inama, 1992). También se observa que al principio de la elaboración, el uso del enzima fue más efectivo en las uvas con un índice de extractabilidad más alto (mayor dificultad de extracción de los compuestos fenólicos, muestra de uva A), resultado coincidente con los obtenidos por Zamora (2003). Hasta el día 5 de maceración, en el vino elaborado con la uva A se observó un mayor porcentaje de extracción de antocianos y compuestos fenólicos, junto con un mayor aumento en la intensidad de color. A partir del día 7, los incrementos en los parámetros analizados se volvieron similares para los vinos elaborados con ambas uvas, A y B.

Después de elaborados, los vinos se mantuvieron 3 meses en depósitos de acero inoxidable (0 meses en botella) bajo atmósfera inerte, fueron embotellados y almacenados durante un periodo de 6 meses (6 meses en botella) y se controló la evolución de los parámetros cromáticos durante ese periodo. En la tabla 4.4.3.3. se muestra esta evolución en función del tratamiento enológico aplicado (utilización de enzima o no) y del índice de extractabilidad de la uva (Vino A y Vino B). Para ello, se ha realizado un análisis multifactorial de la varianza, a final de fermentación alcohólica y durante el periodo de almacenamiento.

A fin de fermentación alcohólica se observan diferencias en todos los parámetros cromáticos estudiados en función de la aplicación del enzima. Los vinos elaborados con enzima tenían valores más altos en compuestos fenólicos totales, antocianos (tanto totales como poliméricos), taninos, absorbancia debida al color amarillo, rojo y azul, una mayor intensidad de color y un menor tono, coincidiendo con los resultados obtenidos por Revilla y González-San José (2003b), Guadalupe et al. (2007) y Kelebec et al. (2007).

Sin embargo, conforme avanzó el tiempo de almacenamiento, estas diferencias disminuyeron. Tras 0 y 6 meses en botella, únicamente se encontraron diferencias en el contenido en taninos totales y el tono y en la concentración de taninos totales, respectivamente.

En función del índice de extractabilidad, a fin de fermentación alcohólica, el vino con mayor madurez fenólica alcanzó valores más positivos en casi todos los parámetros. Se habían extraído más compuestos fenólicos totales y más antocianos (Amrani Joutei y Glories, 1994; Mayen et al., 1995; Saint-Cricq et al., 1998), lo que podía indicar una mayor estabilidad del color a lo largo del tiempo.

Así mismo, se observa que el vino A, presentaba un mayor contenido en taninos totales. Este resultado concuerda con el índice de madurez de la pepita que presentaba la uva A y que era superior al de la uva B. Este índice de madurez da información sobre la contribución de los taninos de las semillas en el vino, siendo esta mayor a mayor valor del índice (Saint-Cricq et al., 1998).

A tiempo 0 en botella, el vino B (vino elaborado con uva con menor índice de extractabilidad), mantenía una mayor intensidad de color y un menor tono, pero a los 6 meses del embotellado estos valores ya eran similares.

El perfil antociánico de todos los vinos fue muy similar, al igual que ocurría con las uvas, para cada punto estudiado, como se muestra en la Tabla 4.4.3.4. Se observa que en el momento del embotellado, los antocianos habían caído drásticamente, habiendo incluso desaparecido todos los antocianos acilados. Tras 6 meses en botella, únicamente quedaban en los vinos malvidina-3-glucósido, vitisina A y antocianos poliméricos.

Tabla 4.4.3.3. Evolución de las características aromáticas durante el almacenamiento.

Efectos	CFT <sup>1</sup>	Antocianos totales (mg/L)	A <sup>502</sup>	A <sup>acet</sup>	A <sup>20</sup>	Tan (mg/L)	IC	Tono	A <sup>620</sup>	A <sup>520</sup>	A <sup>420</sup>	L	a	b
<b>Fin Fermentación Alcohólica</b>														
<b>Técnica</b>														
<b>Testigo</b>	45,4a <sup>2</sup>	445,4a	1,88a	8,03a	5,853a	349,7a	12,9a	0,55b	1,40a	7,43a	4,05a	11,6b	43,1b	13,1a
<b>Enzima</b>	54,6b	495,8b	2,46b	9,75b	7,603b	651,7b	16,0b	0,52a	1,93b	9,24b	4,83b	7,6a	37,5a	19,9b
<b>I.Extractabilidad</b>														
<b>Vino uva A</b>	49,2a	417,3a	2,58b	8,75a	7,250b	559,2b	14,6a	0,54b	1,83b	8,27a	4,47a	8,4a	38,5a	14,5a
<b>Vino uva B</b>	50,8b	524,0b	1,76a	9,03a	6,207a	442,3a	14,3a	0,53a	1,50a	8,40a	4,41a	10,8b	42,0b	18,5b
<b>0 meses botella</b>														
<b>Técnica</b>														
<b>Testigo</b>	36,6a	207,6a	3,72a	6,74a	6,317a	424,0a	12,0a	0,62b	1,99a	6,20a	3,83a	7,0a	36,4a	12,0a
<b>Enzima</b>	38,9a	188,3a	4,16a	6,67a	6,353a	713,1b	12,2a	0,60a	2,10a	6,35a	3,80a	7,2a	36,6a	12,0a
<b>I.Extractabilidad</b>														
<b>Vino uva A</b>	37,2a	188,3a	3,64a	6,31a	5,857a	578,7a	11,3a	0,62b	1,90a	5,80a	3,57a	8,1b	38,2b	13,5b
<b>Vino uva B</b>	38,3a	207,6a	4,24b	7,10a	6,813a	558,4a	13,0b	0,60a	2,19b	6,75b	4,05a	6,1a	34,8a	10,4a
<b>6 meses botella</b>														
<b>Técnica</b>														
<b>Testigo</b>	35,7a	161,3a	3,71a	5,17a	4,810a	359,6a	10,0a	0,66a	1,62a	5,01a	3,32a	9,6a	40,2a	16,1a
<b>Enzima</b>	36,2a	138,4a	3,91a	4,80a	4,543a	526,8b	9,4a	0,66a	1,59a	4,73a	3,07a	11,3a	41,9a	16,7a
<b>I.Extractabilidad</b>														
<b>Vino uva A</b>	37,7a	159,7a	3,74a	5,11a	4,750a	478,0a	9,8a	0,66a	1,61a	4,95a	3,26a	10,5a	40,7a	15,6a
<b>Vino uva B</b>	34,3a	140,0a	3,88a	4,86a	4,603a	408,4a	9,5a	0,66a	1,60a	4,79a	3,13a	10,4a	41,4a	17,2a

<sup>1</sup>Abreviaturas: CFT: Compuestos fenólicos totales; A<sup>502</sup>: Absorbancia a 520 nm después de adicionar SO<sub>2</sub>; A<sup>acet</sup>: Absorbancia a 520 nm después de adicionar acetaldéhidro; A<sup>20</sup>: Absorbancia a 520 nm después de diluir 20 veces; Tan: Taninos totales; IC: Intensidad de color; A<sup>620</sup>, A<sup>520</sup> y A<sup>420</sup>: Absorbancia a 620, 520 y 420 nm; L, a y b: Parámetros CIELab.

<sup>2</sup>Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas según LSD (p<0,05).

Tabla 4.4.3.4. Evolución del perfil antocianínico de los vinos durante el almacenamiento.

	Del <sup>a</sup>	Cian	Pet	Pn	Malv	Vit A	Vit B	Malv etil cat	Pn Ac	Malv Ac+ Del C	Pet C	Pn C	Malv C	MalvC+ Polimericos	Polimericos
<b>Fin de Fermentación Alcohólica</b>															
Vino A T	11,3±1,2	2,1±0,3	19,1±1,9	6,4±1,0	102,6±10,4	2,9±0,1	1,0±0,2	3,2±0,3	0,9±0,0	4,0±0,4	1,4±1,1	0,8±0,0	28,2±1,2	24,0±1,2	nd
Vino A E	13,5±0,4	2,0±0,1	19,8±0,6	5,7±0,2	93,2±1,1	2,7±0,1	2,0±0,6	4,4±0,3	1,0±0,1	3,5±0,3	1,9±0,2	0,9±0,0	42,0±5,1	39,7±5,1	nd
Vino B T	16,5±0,7	3,2±0,2	27,3±0,6	12,1±0,5	154,4±4,0	2,5±0,1	1,0±0,0	2,8±0,1	0,9±0,1	5,6±0,3	0,8±0,0	3,2±0,1	3,2±0,2	28,5±0,3	nd
Vino B E	19,9±0,1	3,6±0,3	31,9±1,5	12,9±1,1	164,7±3,3	2,7±0,1	1,1±0,0	3,8±0,3	0,9±0,1	7,5±0,5	0,9±0,1	4,1±0,3	6,6±0,7	35,6±0,4	nd
<b>0 meses en botella</b>															
Vino A T	1,3±0,3	0,7±0,0	1,9±0,8	1,0±0,2	10,4±6,7	2,5±0,4	1,1±0,0	2,7±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	40,7±2,4
Vino A E	0,9±0,2	0,7±0,0	0,9±0,2	0,7±0,1	2,5±1,6	1,9±0,3	1,0±0,2	2,7±0,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	52,9±11,5
Vino B T	1,3±0,1	0,8±0,1	1,5±0,2	0,9±0,1	6,2±1,0	1,7±0,1	1,7±0,1	3,6±0,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	58,1±3,2
Vino B E	0,9±0,1	0,7±0,1	1,0±0,1	0,7±0,1	2,8±0,8	1,9±0,1	1,4±0,2	3,6±0,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	60,7±1,3
<b>6 meses en botella</b>															
Vino A T	nd <sup>b</sup>	nd	1,7±0,8	nd	7,0±5,1	2,2±0,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	27,3±3,6
Vino A E	nd	nd	nd	nd	1,5±0,6	1,3±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	29,8±9,1
Vino B T	nd	nd	nd	nd	1,4±0,2	1,2±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	35,3±1,8
Vino B E	nd	nd	nd	nd	1,2±0,3	1,3±0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	31,6±2,4

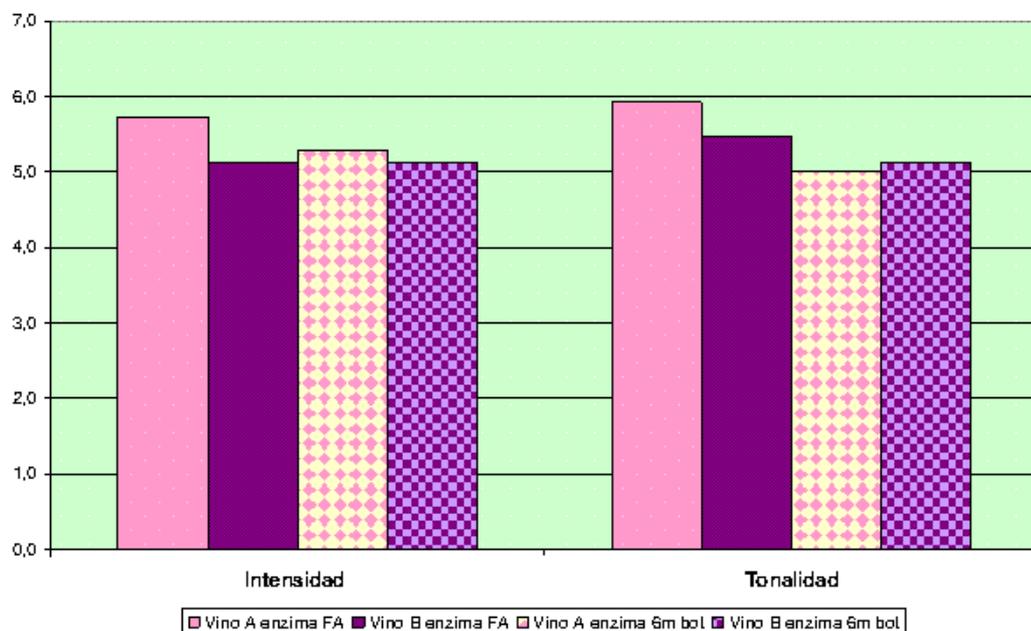
<sup>a</sup>Abreviaturas: Del: Delifidina-3-monoglucósido; Cian: Cianidina-3-monoglucósido; Pet: Petunidina-3-monoglucósido; Pn: Peonidina-3-monoglucósido; Malv: Malvidina-3-monoglucósido; Vit A y B: Vitisina A y B; Malv etil cat: Malvidina etil catequina; Ac: acetato; C: cumarato.

<sup>b</sup>nd: no detectado.

Los vinos fueron evaluados por un grupo de catadores expertos cuando terminó la fermentación alcohólica y tras 6 meses de permanencia en botella. Se puntuó en función de la intensidad, dando un valor de 1 a la ausencia del atributo y de 10 cuando el atributo era máximo. Se muestran las puntuaciones relativas de los vinos elaborados con enzima, en comparación con sus respectivos testigos.

En la Gráfica 4.4.3.6. se muestra la valoración en intensidad de color y tono. Las diferencias no fueron significativas, aunque se observa que, a final de la fermentación alcohólica, el vino elaborado con la uva con mayor índice de extractabilidad y con enzima era mejor valorado que su testigo, para los dos atributos. En el vino con mayor madurez fenólica no se observaron diferencias con respecto al control. Tras 6 meses en botella, todos los vinos se puntuaban igual que su testigo.

**Gráfica 4.4.3.6.** Evaluación sensorial de la fase visual de los vinos elaborados con enzima con respecto a sus testigos a fin de fermentación alcohólica (A) y tras 6 meses en botella (B).

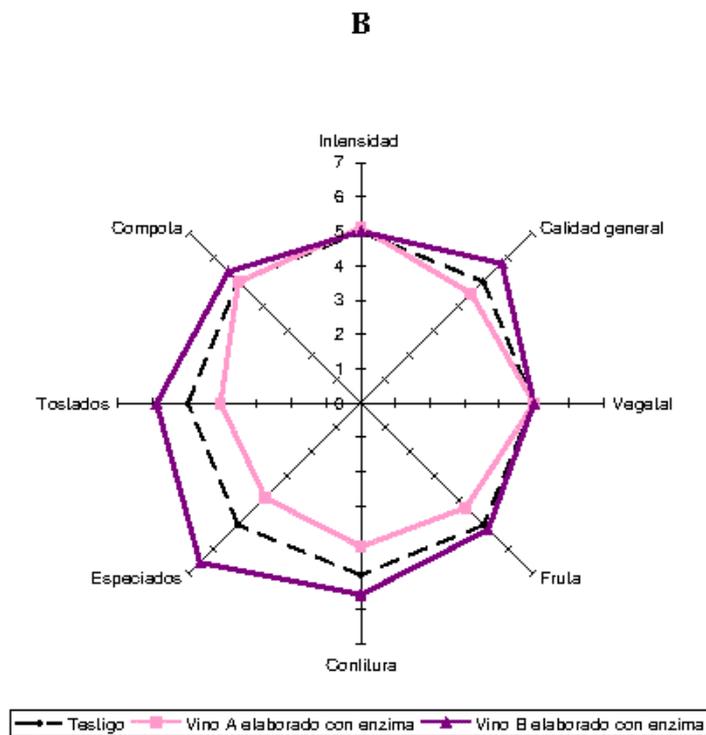
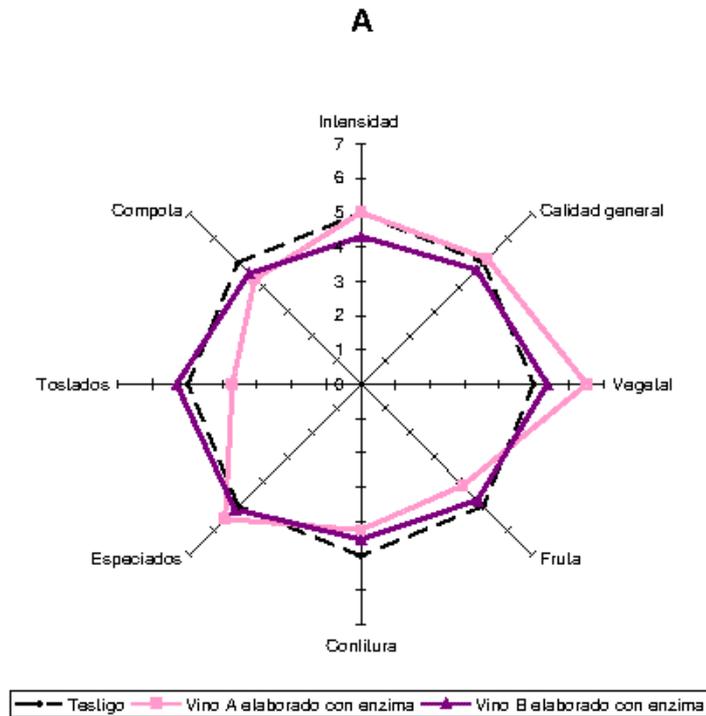


A fin de fermentación alcohólica los vinos presentaron una intensidad aromática similar a sus testigos (Gráfica 4.4.3.7.). El vino A mostró una mayor sensación vegetal que el testigo. El vino B fue valorado igual que su control. Sin embargo, tras 6 meses en botella, este vino fue mejor puntuado, debiéndose en parte a que los aromas especiados y tostados eran más intensos. El vino elaborado con enzima y menor madurez fenólica (Vino A) había perdido el carácter vegetal, pero su testigo seguía siendo valorado ligeramente mejor.

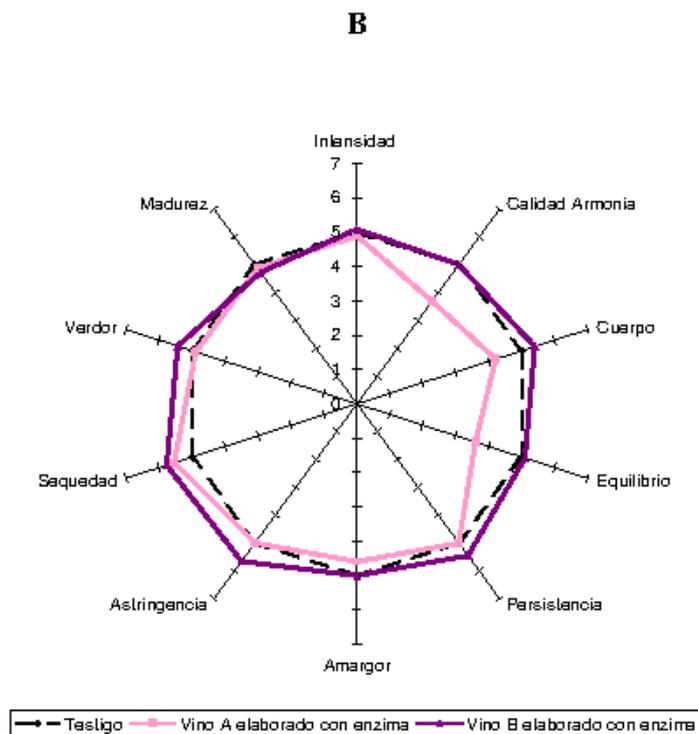
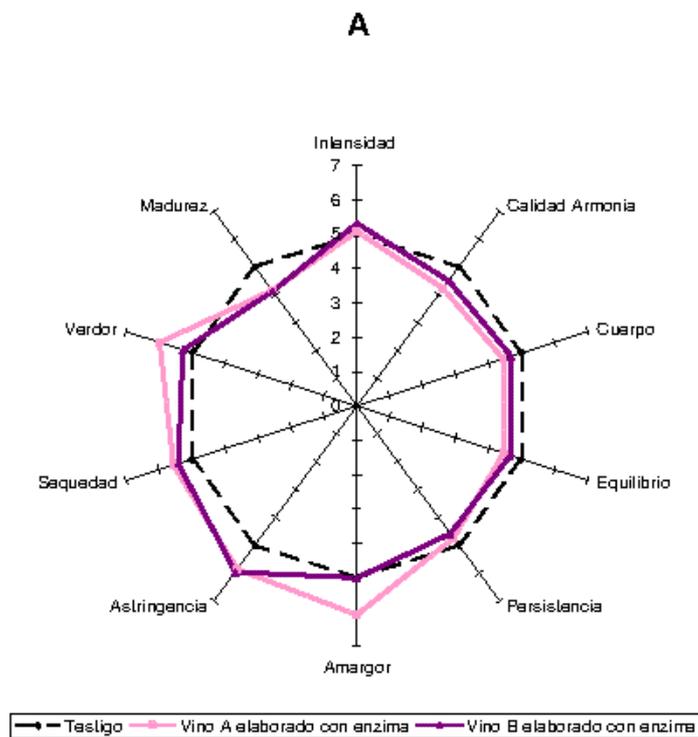
Según se observa en la Gráfica 4.4.3.8., a final de la fermentación alcohólica, los vinos elaborados con el enzima mostraron perfiles similares en boca que sus testigos. Las mayores diferencias se encontraron en los atributos de astringencia y verdor y el vino A también resultó más amargo. Tras 6 meses en botella, el vino B elaborado con el enzima seguía resultando más astringente y secante en boca, mientras que el vino A se penalizó porque no resultaba equilibrado.

Se puede concluir, en vista de los resultados obtenidos, que el uso de enzimas macerativas para la extracción de color, podría ser de utilidad cuando se elaboran vinos procedentes de uvas con baja madurez fenólica y, por lo tanto, con poca facilidad para la extracción de compuestos fenólicos, especialmente si se van a emplear tiempos cortos de maceración, puesto que se facilitará la difusión de antocianos sin promover una excesiva extracción de taninos agresivos procedentes de las semillas.

**Gráfica 4.4.3.7.** Evaluación sensorial de la fase aromática de los vinos elaborados con enzima con respecto a sus testigos a fin de fermentación alcohólica (A) y tras 6 meses en botella (B).



**Gráfica 4.4.3.8.** Evaluación sensorial de la fase gustativa de los vinos elaborados con enzima con respecto a sus testigos a fin de fermentación alcohólica (A) y tras 6 meses en botella (B).



#### **4.4.3.3. Caracterización de las paredes celulares de los orujos.**

Los orujos de las distintas elaboraciones realizadas con uvas con distinto grado de madurez fenólica y con aplicación del enzima macerativo o no, se recogieron una vez prensados y se congelaron hasta la extracción de sus paredes celulares. Estas paredes celulares se caracterizaron, analizando su contenido en proteínas y compuestos fenólicos ligados a la pared celular, lignina y su composición en azúcares neutros y ácidos urónicos.

La aplicación del enzima macerativo va a suponer un aumento en el rendimiento en la extracción de pared celular en el orujo, como se muestra en la Tabla 4.4.3.5., posiblemente debido a que el enzima macerativo consigue una extracción mayor de otros compuestos de la célula en el vino con lo que se daría, porcentualmente, una mayor concentración de las paredes celulares en el orujo.

**Tabla 4.4.3.5.** Contenido en pared celular de los orujos tras la maceración.

	Rendimiento (mg pared celular / g orujo)
Uva A T	34,7a <sup>1</sup>
Uva A E	56,7c
Uva B T	29,7a
Uva B E	50,4b

<sup>1</sup>Letras distintas indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 4.4.3.6. se muestra el contenido en proteínas, compuestos fenólicos y lignina de las paredes celulares extraídas de los orujos después de la elaboración. No se observan diferencias significativas en la concentración de ninguno de estos compuestos, ni en función de la aplicación del enzima extractor ni del índice de extractabilidad de la uva. Posiblemente estos contenidos similares puedan ser debidos a que la uva presentaba un grado Brix similar. Ortega-Regules (2006) observó que la composición de la pared celular de la piel de la uva está relacionada con la madurez tecnológica de ésta.

**Tabla 4.4.3.6.** Contenido en proteínas, compuestos fenólicos totales y lignina en pared celular de los orujos tras la maceración.

	Proteína (mg/g pared celular)	Compuestos fenólicos totales (mg/g pared celular)	Lignina (mg/g pared celular)
<b>Uva A T</b>	21,2a <sup>1</sup>	61,6a	220,0a
<b>Uva A E</b>	26,5a	80,8b	326,7b
<b>Uva B T</b>	23,0a	74,2ab	276,7ab
<b>Uva B E</b>	27,3a	72,4ab	286,7ab

<sup>1</sup>Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 4.4.3.7. se muestra la composición en azúcares de las paredes celulares aisladas de los orujos. Se observa que al aplicar el enzima extractor de color disminuye el contenido en arabinosa, galactosa, ácidos urónicos y el contenido total de azúcares en la pared celular, mientras que aumenta el contenido en manosa, glucosa y el grado de metilación y acetilación. Resultados similares a los observados y discutidos en los puntos anteriores.

En vista de los resultados obtenidos, se observa que la aplicación de enzimas macerativos para la extracción de color va a conseguir una mayor disgregación en las paredes celulares de la piel de la uva, cambiando la composición de los orujos tras la maceración. En función del índice de extractabilidad no se observan diferencias significativas en las paredes celulares de las pieles, teniendo un efecto similar la aplicación del preparado enzimático en los dos orujos estudiados.

**Tabla 4.4.3.7.** Contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos (mg/g de pared celular) en la pared celular de los orujos tras la maceración.

	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	Cell-Glu <sup>1</sup>	UA	GM	GA	Total azúcares
<b>Uva A T</b>	0,0a <sup>2</sup>	0,0a	23,1c	14,2a	29,9ab	23,1bc	47,5a	92,3a	152,0b	44,4a	9,8a	382,1b
<b>Uva A E</b>	0,0a	0,0a	13,6a	14,1a	30,1ab	20,6a	58,9b	84,0a	93,4a	49,6ab	14,4b	314,7a
<b>Uva B T</b>	0,0a	0,0a	27,4d	12,6a	27,3a	23,7c	45,4a	92,7a	189,2b	35,5a	7,7a	418,3b
<b>Uva B E</b>	0,0a	0,0a	16,7b	13,6a	31,7b	21,0b	58,8b	97,1a	83,8a	62,5b	18,6b	322,8a

<sup>1</sup>Abreviaturas: Cell-Glu: Glucosa celulósica; UA: Ácidos urónicos; GM: Grado de metilación; GA: Grado de Acetilación.

<sup>2</sup>Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según test LSD ( $p < 0,05$ ).



## **5. CONCLUSIONES.**



1. En el estudio de la dinámica de extracción de los antocianos de la uva Monastrell al vino durante la maceración se encontró que el ratio de extracción es similar para todos los distintos antocianos puesto que, aunque la concentración total disminuye en las pieles conforme avanza la maceración, la distribución relativa de estos compuestos en la piel sólo muestra pequeñas diferencias. La extracción de los antocianos en la uva es claramente incompleta, probablemente porque se establece un equilibrio basado en la adsorción-desorción entre la concentración de los antocianos en la uva y en el vino.
2. Existen diferencias entre el perfil antociánico de las uvas y el vino y, puesto que éstas no son atribuibles a diferentes ratios de extracción de los antocianos, procesos como la acción de oxidasas o la adsorción de determinados antocianos en las levaduras serán responsables de las diferencias.
3. El estudio de los cambios de composición en las paredes celulares de las pieles durante la maceración indica que la mayor degradación de la pared celular se va a dar en los primeros estadios de la maceración, lo que coincide con la máxima extracción de antocianos encontrados esos primeros días.
4. El estudio de los parámetros relacionados con la madurez fenólica de la uva, principalmente antocianos y polifenoles extraíbles a pH 3,6, junto con el contenido en taninos de las semillas pueden ser útiles para predecir algunos de los parámetros cromáticos más importantes en el vino y planear el proceso de elaboración de acuerdo con las características de la uva en el momento de la vendimia y el tipo de vino que se desea obtener. Así mismo, las características de los orujos después de la maceración también guardan relación con las características de madurez celular de la uva antes de la elaboración. Los orujos con una composición que sugiere una menor degradación de las paredes celulares provienen de aquellas uvas que inicialmente mostraron una mayor dificultad en extraer sus antocianos.

5. La aplicación de diferentes enzimas comerciales, con distintos niveles de actividades enzimáticas, no originó grandes diferencias en las características cromáticas de los vinos obtenidos, aunque todos ellos fueron diferentes del vino testigo elaborado sin enzima. Tampoco se encontraron grandes diferencias en la composición de las paredes celulares de los orujos recogidos después de la maceración.

6. Cuando se estudió el efecto de la aplicación de un enzima comercial en vinos elaborados con distinto tiempo de maceración (5, 10 y 15 días), los resultados muestran que el uso de enzimas macerativos parece ser una buena herramienta para acortar el tiempo de permanencia de la masa de vinificación en los depósitos, consiguiéndose un adelanto en la extracción de los compuestos fenólicos de alrededor de tres días, en comparación con los vinos elaborados sin adición de enzima.

7. Los resultados obtenidos parecen indicar que el enzima extractor de color va a tener influencia sobre la estructura de la pared celular de las pieles de las uvas. El enzima va a ayudar a la liberación de compuestos contenidos en el interior de las células por la degradación de la pared y parece que su efecto se asemeja a las transformaciones que sufren las paredes celulares durante el proceso de maduración de la uva. Los efectos principales están claramente relacionados con la fracción péctica de la pared celular, donde se parece producir la mayor degradación, efecto que va aumentando conforme aumenta el tiempo de maceración.

9. Cuando el enzima se ensayó durante la elaboración de vinos con uvas de diferente grado de madurez se observó que en uvas poco o muy maduras, el efecto del enzima es menor que en uvas con un grado de maduración más adecuado para la vinificación. Esto puede ser debido a que, en la vinificación con las uvas más inmaduras, la aplicación del enzima, aunque consiga degradar parte de las paredes celulares, no llega a superar la degradación natural de éstas debida al proceso natural de maduración de las bayas. Así mismo, en la elaboración del vino con uva sobremadura, su piel presenta un alto grado de degradación natural

debido a los procesos de maduración y, por ello, el enzima es menos efectivo, puesto que las paredes celulares de la piel de la uva estarían lo suficientemente degradadas para permitir una extracción fácil de los compuestos fenólicos, incluso aunque no se utilice enzima de maceración. Además, los enzimas también son adecuados cuando se elaboran vinos con uvas de baja madurez fenólica, especialmente si se van a emplear tiempos cortos de maceración, puesto que se facilitará la difusión de antocianos sin promover una excesiva extracción de taninos agresivos, procedentes de las semillas.

10. El uso de un enzima de maceración provoca una mayor degradación de las paredes celulares en uvas con mayor madurez. En los orujos procedentes de las elaboraciones con uvas menos maduras (12 °Be), no se observa un efecto del enzima en el contenido total en azúcares, lo que puede justificar las menores diferencias cromáticas que se encontraron en el vino elaborado con estas uvas y el enzima macerativo.



## **6. BIBLIOGRAFÍA.**



---

## 6. BILIOGRAFÍA.

Abu-Bakr, A.; Abu-Goukh y Hind A. Bashir. 2003. Changes in pectics enzymes and cellulase activity during guava fruit ripening. *Food Chemistry*, 83: 213-218.

Adler-Nilssen, J. 1979. Determination of the degree of hidrolisis of food protein hydrolysates by trinitrobenzeesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 1256-1262.

Ahmed, A. E.; Labavitch, J. M. 1980. Cell wall metabolism in ripening fruit. II. Changes in carbohydrate-degrading enzymes in ripening 'Bartlett' pears. *Plant Physiology*, 65, 1014-1016.

Albersheim, P.; An, J.; Freshour, G.; Fuller, M. S.; Guillén, R.; Ham, K.; Hahn, M. G.; Huang, J.; O'Neill, M. A.; Whitcombe, A.; Williams, M. V.; York, W. S.; Darvill, A. G. 1994. Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. *Biochemical Society Transactions*, 22: 374-378.

Albersheim, P.; Mühlethaler, K.; Frey-Wyssling, A. 1960. Stained pectin as seen in the electron microscope. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 8: 501-506.

Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. 2006. Changes in the detiled pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, 563: 238-254.

Ali, Z. M.; Chin, L.; Lazan, H. 2004. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science*, 167: 317-327.

Alvarez, I., Alexandre, J. L., García, M. J.; Lizama, V. 2005. Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta*, 563: 109-115.

Amrani Joutei, K. ; Glories, Y. 1995. Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Revue Francaise d'OEnologie*, **153**: 28-31.

Amrani Joutei, K. ; Glories, Y. 1994. Etude en conditions modèles de l'extractibilité des composés phenoliques des pellicules et des pepins de raisin rouges. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **28** : 303-317.

Amrani Joutei, K.; Glories, Y. ; Mercier, M. 1994. Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis* **33**: 133-138.

Amrani-Joutei, A.; Ouazzani Chandi, F.; Bouya, D.; Saucier, C.; Glories, Y. 2003. Examen en microscopie electronique de l'influence d'activites enzymatiques purifiées sur les parois cellulaires des pellicules des raisins. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **37**: 23-30.

Arozarena, I.; Ayestaran, B.; Cantalejo, M. J.; Navarro, M.; Vera, M.; Abril, I.; Casp, A. 2002. Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyards over two years. *European Food Reseach and Technology*, **214**: 303-309.

Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. 2000. Differentiation of some spanish wines according to variety and region base don their anthocyanin composition. *European Food Research and Technology*, **212**: 108-112.

Asen, S; Stewart, R.N.; Norris, K.H. 1972. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tisúes and its effect on color. *Phytochemistry*, **11**: 1139-1145.

Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V. ; Moutounet, M. 2002a. Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Letters*, **43**: 6151-6153.

Atanasova V., Fulcrand H., Cheynier V., Moutonet M. 2002b. Effect of the oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Analítica Chimica Acta*, 458: 15-27.

Auw, J. M.; Blanco, V.; O'Keefe, S. F.; Sims, C. A. 1996. Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin and Noble wines and juices. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47: 279-286.

Award, M.; Young, R. E. 1979. Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase, and pectinmethylesterase in avocado (*Persea americana Mill*, cv. Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiology*, 64, 306-308.

Ayestarán, B.; Guadalupe, Z.; Santibáñez, A.; León, D. 2004. Efecto de las enzimas de maceración comerciales en el color de vinos tintos de variedad Tempranillo. En: *IV Foro Mundial del Vino*, Logroño.

Azcón-Bieto, J.; Talón, M. 1993. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Interamericana (Ed.) Mc Graw-Hill, Madrid, España.

Bacic, A.; Harris, P. J.; Stone, B. A. 1988. Structure and function of plant cell walls. En: *The Biochemistry of Plants*, Preiss, J. (Ed.), Academic Press, New York, pp. 297-371.

Bakker, J; Bellworthy, S.J.; Reader, H.P.; Watkins, S.J. 1999. Effect of enzymes during vinification on color and sensory properties of Porto wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50: 271-276.

Barka, E. A.; Kalantari, S.; Makhlouf, J.; Arul, J. 2000. Impact of UV-C irradiation on the cell wall-degradatin enzymes during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum L.*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 667-671.

Barnavon, L.; Doco, T.; Terrier, N.; Ageorges, A.; Romieu, C. y Pellerin, P. 2001. Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape

berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry*, 58: 693-701.

Barnavon, L.; Doco, T.; Terrier, N.; Ageorges, A.; Romieu, C.; Pellerin, P. 2000. Analysis of cell wall neutral sugar composition,  $\alpha$ -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 289-300.

Batisse, C.; Buret, M. y Coulomb, P. J. 1996. Biochemical differences in cell wall of cherry fruit between soft and crisp fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 453-457.

Bautista-Ortín, A.B. 2005. Técnicas enológicas para la obtención de vinos de Monastrell de alto contenido polifenólico. *Tesis doctoral*, Universidad de Murcia.

Bautista-Ortín, A.B.; Fernández-Fernández, J. I.; Ortega-Regules, A.; López-Roca, J. M.; Gómez-Plaza, E. 2006. Aplicación de diferentes técnicas enológicas para mejorar el color de los vinos de Monastrell. *Enólogos*, 41: 41-45.

Bautista-Ortín, A.B.; López-Roca, J. M.; Fernández-Fernández, J. I.; Martínez-Cutillas, A.; Gómez-Plaza, E. 2004a. Colour characteristics of Monastrell wines depending on the date of harvest. En: *Pigments in Food. More than color*. Dufosse, L. (Ed), Université de Bretagne Occidentale, Quimper, France, pp. 300-302.

Bautista-Ortín, A.B.; Fernández-Fernández, J. I.; López-Roca, J. M.; Gómez-Plaza, E. 2004b. Wine-making of high coloured wines: extended pomace contact and run-off of juice prior to fermentation. *Food Science and Technology International*, 10(5): 287-295.

Bautista-Ortín, A.B.; López-Roca, J. M.; Martínez-Cutillas, A.; Gómez-Plaza, E. 2005. Improving colour extraction and stability in red wines: the

use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology*, 40: 1-12.

Beg, Q. K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 326-338.

Bermúdez-Jiménez, S.; Redondo-Nevado, J.; Blanco, J. M.; Caballero, J. L.; Aranda, J. M. L.; Valpuesta, V.; Alfaro, P.A.; Quesada, M. A.; Mercado, J. A. 2002. Manipulation of strawberry fruit softening during antisense expresión of pectate liase gene. *Plant Physiology*, 128: 751-775.

Blakeney, A. B.; Harris, P. J.; Henry, R. J.; Stone, B. A. 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*, 113: 291-299.

Boudet, A. 2000. Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 81-96.

Boulton, R. 1995. Red wines. En: *Fermented Beverage Production*. Lea, A.; Piggott, J. (Eds.), Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall, London, pp. 121-158.

Boulton, R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal Enology and Viticulture*, 52: 67-87.

Bourzteix, M.; Weyland, D.; Heredia, N. 1986. Étude des catechines et des proanthocyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bulletin de l'OIV*, 699-670: 1171-1253.

Bourzteix, M.; Mourges, J.; Aubert, S. 1970. Influence de la duree de maceration sur la constitution en polyphenols et sur la degustation des vins rouges. *Connaissance Vigne Vin*, 4: 447-460.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Brillouet; J.M.; Williams, P.; Moutounet, M. 1991. Purification and some properties of a novel endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-galactanase from *Aspergillus niger*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55: 1565-1571.

Brownleader, M. D.; Ahmed, N.; Trevan, M. D.; Chaplin, M. F.; Dey, P. M. 1995. Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiology*, 109: 1115-1123.

Brownleader, M. D.; Dey, P. M. 1993. Purification of extensin from cell walls of tomato cells in suspension culture. *Planta*, 191: 457-469.

Brownleader, M. D.; Jackson, P.; Mobasheri, A.; Pantelides, A. T.; Sumar, S.; Treva, M.; Dey, P. M. 1999. Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39: 149-164.

Brummell, D. A.; Dal Cin, V.; Crisosto, C. H.; Labavitch, J. M. 2004. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2029-2039.

Budić-Leto, I.; Lovrić, T.; Gajdoš-Kljusurić, J.; Pezo, I.; Vrhovšek, U. 2006. Anthocyanin composition of the red wine Babić affected by maceration treatment. *European Food Research and Technology*, 222: 397-402.

Budić-Leto, I.; Lovrić, T.; Vrhovšek, U. 2003. Influence of different maceration techniques and ageing on proanthocyanidins and anthocyanins of red wine cv. Babić (*Vitis vinifera*, L.). *Food Technology and Biotechnology*, 41: 299-303.

Cabanne, C.; Donéche, B. 2001. Changes in polygalacturonase activity and calcium content during ripening of grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 331-335.

Cacho, J.; Fernandez, P.; Ferreira, V.; Castells, J. E. 1992. Evolution of five anthocyanidin-3-glucosides in the skin of the Tempranillo, Moristel, and Garnacha grape varieties and influence of climatological variables. *American Journal of Enology and Viticulture* 43: 244-248.

Canal Llaubères, R. M. 2003. The purification of enzymatic preparations for oenology. Effects on the quality of red and white wines. *Vinidea.net, Wine Internet Technical Journal*, 10: 1-7.

Canal Llaubères, R. M. 2002. Le procédé de production des préparations enzymatiques. Applications à l'œnologie. *Revue des Œnologues*, 104 : 35-37.

Canal Llaubères, R. M. 1993. Enzymes in winemaking. En: *Wine microbiology and biotechnology*. Fleet, G. H. (Ed), Hardwood Academic Publishers, Philadelphia, pp. 477-506.

Canal-Llaubères, R. M.; Barbe, C. 1995. The use of purified pectolytic enzyme preparations for limiting the formation of volatile phenols in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46: 416.

Canal-Llaubères, R.M. ; Pouns, J. P. 2002. Les enzymes de macération en vinification en rouge. Influence d'une nouvelle préparation sur la composition des vins. *Revue des Œnologues*, 104 : 29-31.

Cano-López, M.; Pardo-Minguez, F.; López-Roca, J.M.; Gómez-Plaza, E. 2006. The effect of micro-oxygenation on the anthocyanin and derived pigments content and chromatic characteristics of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3): 325-331.

Capdebosq, V.; Leske, P.; Bruer, N. 1994. An evaluation of some winemaking characteristics of commercial pectic enzyme preparations. *Australian Grapegrower and Winemaker*, 366 A: 146-150.

Carpita, N. C.; Gibeaut, D. M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3: 1-30.

Carrillo-López, A.; Cruz-Hernández, A.; Cárabez-Trejo, A.; Guevara-Lara, F.; Paredes-López, O. 2002. Hydrolytic activity and ultrastructural changes in fruits skins from two prickly pear (*Opuntia* sp.) varieties during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1681-1685.

Carrington, C. M. S.; Pressey, R. 1996.  $\beta$ -galactosidase II activity in relation to changes in cell wall galactosyl composition during tomato ripening. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 121: 132-146.

Casavecchia, C.; Magnisi, R.; LaPera, L.; Maisano, R.; Dugo, G. 2007. Classification of sicilian red wines from autochthonous and allochthonous cultivars according to anthocyanin pattern. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58 (2): 286-290.

Cassab, G.I. 1998. Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 281-309.

Cassab, G. I.; Varner, J. E. 1988. Cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 321-353.

Castia, T.; Franco, M. A.; Mattivi, F.; Muggioli, G.; Sferlazzo, G.; Versini, G. 1992. Characterization of grapes cultivated in Sardinia: chemometric methods applied to the anthocyanic fraction. *Sciences des Aliments*, 12: 239-255.

Castro-Vazquez, L.; Pérez-Coello, M. S.; Cabezudo, M. D. 2002. Effects of enzyme treatments and skin extraction on varietal volatiles in spanish vines made from Chardonnay, Muscat, Airen and Macabeo grapes. *Analytica Chimica Acta*, 458: 39-44.

Cayla, L.; Cottureau, P.; Renard, R. 2002. Estimation de la maturité phénolique du raisin rouge par la méthode I.T.V. standard. *Revue des Œnologues*, 193: 84-87.

Chardonnet, C.; Gomez, H.; Doneche, B. 1994. Evolution of cell wall polysides during grape berry growth and ripening. *Vitis*, 33: 69-74.

Charpentier, C.; Dos Santos, A. M.; Feuillat, M. 2004. Release of macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* during ageing of French flor sherry wine "Vin jaune". *International Journal of Food Microbiology*, 96: 253-262.

Chen, L.J.; Hrazdina, G. 1981. Structural properties of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant color. *Phytochemistry*, 20: 297-302.

Cheyrier, V. 2003. El color de los vinos tintos. *Wine Internet Technical Journal*, 4: 1-9.

Cheyrier, V.; Osse, C.; Rigaud, J. 1998. Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *Journal of Food Science*, 53: 1729-1732.

Cheyrier, V.; Remy, S.; Fulcrand, H. 2000. Mechanisms of anthocyanin and tannin changes during winemaking and aging. En: *The ASEV 50<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting*. Rautz, J. (Ed.), ASEV, Davis, CA, pp. 337-344.

Cheyrier, V.; Souquet, J. M.; Kontek, A.; Moutounet, M. 1994. Anthocyanin degradation in oxidising grape musts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66: 283-288.

Chun, J. P.; Huber, D. J. 1998. Polygalacturonase-mediated solubilization and depolymerization of pectic polymers in tomato fruit cell walls. Regulation by pH and ionic conditions. *Plant Physiology*, 117: 1293-1299.

Clare, S.; Skurray, G.; Theaud, L. 2002. Effect of a pectolytic enzyme on the colour of red wine. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 456: 29-35.

Condit, C. M.; McClean, B. G.; Meagher, R. B. 1990. Characterization of the expression of the petunia glycine-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Plant Physiology*, 93, 596-602.

Crookes, P. R.; Grierson, D. 1983. Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiology*, 72: 1088-

Darias-Martín, J.; Carrillo, M.; Diaz, E.; Boulton, R. 2001. Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chemistry*, 73: 217-220.

Darias-Martín, J.; Carrillo-López, M.; Echevarria-Granado, J. F.; Díaz-Romero, C. 2007. The magnitude of copigmentation in the color of aged red wines made in the Canary Islands. *European Food Research and Technology*, 224: 643-648.

Darne, G. 1988. Evolution of different anthocyanins in the skins of Cabernet Sauvignon grapes during the development of berries. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 22, 225-231.

Daudt, C.E.; Polenta, G.A. 1999. Les phénols dans les moûts de Cabernet sauvignon et d'Isabel soumis à divers traitements. *Journal des Sciences et Techniques de la Tonnellerie*, 5: 47-55.

De la Hera, M. L.; Martínez-Cutillas, A.; Lopez Roca, J. M.; Pérez-Prieto, L. J. y Gomez-Plaza, E. 2005. Effect of deficit irrigation on anthocyanin content of Monastrell grapes and wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 39: 1-9.

De la Hera, M. L.; Pérez Prieto, L. J.; Fernández, J. I.; Martínez Cutillas, A.; López Roca, J. M.; Gómez Plaza, E. 2002. Partial rootzone drying.

Una experiencia española para la variedad Monastrell. *Viticultura y Enología Profesional*, 83: 70-76.

De Lorenzo, G.; Cervone, F.; Hahn, M. G.; Darvill, A.; Albersheim, P. 1991. Bacterial endopectate lyase: evidence that plant cell wall pH prevents tissue maceration and increases the half-life of elicitor-active oligogalacturonides. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 34: 335-344.

Delteil, D. 2000a. Utilisation de tannins oenologiques sur les raisins et les vins rouges mediterraneens et rhodanines. *Revue Francaise d'OEnologie*, 181: 20-22.

Delteil, D. 2000b. Effet d'une préparation enzymatique sur l'évolution du profil polyphénolique et sensoriel d'un vin rouge de Mourvèdre. 25<sup>ème</sup> Congrès Mondial de la Vigne et du Vin, OIV, Paris, France.

Delteil, D. 2000c. Interés de las maceraciones cortas: un nuevo enfoque para los vinos mediterraneos. *Viticultura y Enología Profesional*, 20: 39-43.

Deng, Y.; Wu, Y.; Li, Y. 2005. Changes in firmness, cell wall composition and cell wall hydrolases of grapes stored in high oxygen atmospheres. *Food Research International*, 38: 769-776.

Dey, P. M.; Brinson, K. 1984. Plant cell walls. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 42: 265-382.

Dey, P. M.; Brownleader, M. D.; Pantelides, A. T.; Trevan, M.; Smith, J. J. y Saddler, G. 1997. Extensin from suspension-cultured potato cells: a hydroxyproline-rich glycoprotein, devoid of agglutinin activity. *Plant Physiology*, 202: 179-187.

Di Stefano, R. 1995. Extraction of phenolics from grape solids during fermentation. *Acta Horticulturae*, 388: 163-170.

Doco, T.; Brillouet, J. M. 1993. Isolation and characterisation of a rhamnogalacturonan II from red wine. *Carbohydrate Research*, 243: 333-343.

Downey, M.; Harvey, J.; Robinson, S. 2003. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9: 15-27.

Dupin, I. V. S.; Stockdale, V. J.; Williams, P. J.; Jones, G. P.; Markides, A. J.; Waters, E. J. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: evaluation of extraction methods and immunolocalization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 1086-1095.

Esteban, M. A.; Villanueva, M. J. y Lissarrague, J. R. 2001. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 409-420.

Estrada, B.; Pomar, F.; Díaz, J.; Merino, F.; Bernal, M. A. 1999. Pungency level in fruits of the Padrón pepper with different water supply. *Scientia Horticulturae*, 81 (4): 385-396.

Felix, R.; Vilettaz, J.C. 1983. Wine. En: *Industrial Enzymology: The applications of enzymes in industry*. T. Godfrey and J. Reichelt (Eds). The Nature Press, New York, pp. 410-421.

Fernandes-Bolaños, J.; Rodríguez, R.; Guillén, R.; Jiménez, A.; Heredia, A. 1995. Activity of cell wall-associated enzymes in ripening olive fruit. *Physiologia Plantarum*, 93: 651-658.

Fernández, J. I.; Martínez, A.; Romero, I.; Bautista, A. B.; Cardenal, J. V.; Corredor, J.; Carcelén, J. C.; Fernández, S.; García, M. G.; Carrión, M.; Lozano, J. M.; Palencia, M. S. 2003. Evaluación enológica de clones seleccionados de la variedad Monastrell. Elaboraciones 2000-2002. En:

---

*Reunión Anual del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología*. MAPA(Ed), Madrid, pp: 91-113.

Fernández-López, J. A.; Almela, L.; Lopez-Roca, J. M. 1995. Studies on the anthocyanin makeup in the Monastrell grape variety. *Anales de Química Internacional Edition*, 91: 380-387.

Fernández-López, J. A.; Almela, L.; Muñóz, J. A.; Hidalgo, V.; Carreño, J. 1998. Dependence between colour and individual anthocyanin content in ripening grapes. *Food Research International*, 31: 667-672.

Fernández-López, J. A.; Hidalgo, V.; Almela, L.; Lopez-Roca, J. M. 1992. Quantitative changes in anthocyanin pigments of *Vitis vinifera* c.v.Monastrell during maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58: 153-155.

Fischer, R. L.; Bennett, A. B. 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 675-703.

Fogarty, W. M.; Kelly, C.T. 1990. Microbial enzymes and biotechnology, 2<sup>a</sup> Edition. Elsevier science publisher Ltd, Essex, England.

Förster, H. 1988. Pectinesterases from *Phytophthora infestans*. *Methods in Enzymology*, 161: 355-361.

Francia-Aricha, E. M.; Guerra, M. T.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. 1997. New anthocyanins pigments formed after condensation with flavonols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 2262-2266.

Fry, S. C. 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46: 497-520.

Fry, S. C. 1982. Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell-wall glycoprotein. *Biochemical Journal*, 204: 449-455.

Fulcrand, H.; Atanasova, V.; Salas, E.; Cheynier, V. 2004. The fate of anthocyanins in wine. Are they determining factors?. En: Red wine color. Revealing the mysteries. ACS Symposium Series 886, Waterhouse, A. y Kennedy, J. A. (Eds.), American Chemical Society, Washington, pp. 68-88.

Fulcrand, H.; Benabdejalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. 1997. A new class of wine pigments generated by reaction between piruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, 47: 1401-1407.

Fulcrand, H.; Cameira dos Santos, P.; Sarni Manchado, P.; Cheynier, V.; Favre Bonvin, J. 1996. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal Chemical Society PT.1*, 7: 735-739.

Fulcrand, H.; Dueñas, M.; Salas, E.; Cheynier, V. 2006. Phenolics reactions during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3): 289-297.

Gallego, P. P.; Zarra, I. 1997. Changes in cell wall composition and water-soluble polysaccharides during kiwifruit development. *Annals of Botany*, 79: 695-701.

Gambutì, A.; Stollo, D.; Ugliano, M.; Leche, L.; Moio, L. 2004. *trans*-Resveratrol, quercetin, (+)-catechin, and (-)-epicatechin content in south italian monovarietal wines: relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5747-5751.

García-Beneytez, E.; Cabello, F.; Revilla, E. 2003. Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5622-5629.

García-Beneytez, E.; Revilla, E.; Cabello, F. 2002. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *European Food Research and Technology*, 215: 32-37.

García-Escudero, E.; Zaballa, O. 1997. Efecto asociado del riego y del aclareo de racimos sobre la expresión vegetativa de la vid. En: *Reunión Anual del Grupo de Trabajo en Experimentación en Viticultura y Enología*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Ed.), Madrid, pp:1-10.

García-Puente Rivas, E.; Alcalde-Eon, C.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. 2006. Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. *Analytica Chimica Acta*, 563: 215-222.

Gil, J.V.; Vallés, S. 2001. Effect of macerating enzymes on red wine aroma at laboratory scale: Exogenous addition or expression by transgenic wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5515-5523.

Gil-Muñoz, R.; Gómez-Plaza, E.; Martínez, A.; López-Roca, J.M. 1999. Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation. Influence of grape temperature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12: 259-272.

Glories, Y. 2001. Caractérisation du potentiel phénolique: adaptation de la vinification. *Progrès Agricole et Viticole*, 118: 347-350.

Glories, Y. 1999. La maturità fenolica delle uve: primo parametro da controllare per una corretta vinificazione in rosso. *Vignevine*, 3: 46-50.

Glories, Y. 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. *Thèse d'Université*, Université de Bordeaux.

Glories, Y. ; Augustin, M. 1993. *Actes du Colloque Journée Technique du CIVB*, Burdeos.

Glories, Y.; Saucier, C. 2000. Tannin evolution from grape to wine. Effects on wine taste. En: *Proceedings of the ASEV 50<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting*, Rantz, J. M. (Ed.), ASEV, Davis, CA, pp. 353-355.

Gómez-Mínguez, M.; González-Manzano, S.; Escribano-Bailon, M.; Heredia, F.; Santos-Buelga, C. 2006. Influence of different phenolic

copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5422-5429.

Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J. M.; Martínez-Cutillas, A. y Fernández-Fernández, J. I. 2001. Phenolic compounds and color stability of red wines. Effect of skin maceration time. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 271-275.

Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J.M.; Martínez, A. 2000a. Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of winemaking techniques, storage temperature and length of storage time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 736-741.

Gómez-Plaza, E.; Conesa-Alcazar, R.; Pérez-Prieto, L.J.; Fernández-Fernández, J.I.; Martínez-Cutillas, A.; López-Roca, J.M. 2000b. Influencia del tiempo de maceración sobre el color de los vinos tintos de la D.O. Jumilla. *Viticultura y Enología Profesional*, 69: 34-36.

González, J. L.; Hernández, M. A.; Díaz, E.; Darías, J. 2001. Evolución de los caracteres madurativos de las variedades tintas Listán Negro y Negramole. *Viticultura y Enología Profesional*, 76: 27-37.

González-Neves, G.; Charamelo, D.; Balado, J.; Barreiro, L.; Bochicchio, R.; Gato, G.; Gil, G.; Tessore, A.; Carboneau, A.; Moutounet, M. 2004. Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Analytica Chimica Acta*, 513: 191-196.

González-Neves, G.; Gil, G.; Ferrer, M. 2002. Effect of different vineyard treatments on the phenolic contents in Tannat (*Vitis vinifera* L.) grapes and their respective wines. *Food Science Technology International*, 8: 315-321.

González-San José, M. L.; Santa-María, G.; Diez, C. 1990. Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing

---

region, and wine-making methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 3: 54-66.

Grant Reid, J. S. 2000. Cementing the wall: cell wall polysaccharide synthesizing enzymes. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 512-516.

Gris, E.; Ferreira, E.; Falcao, L.; Bordignon-Luiz, M. T. 2007. Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. *Food Chemistry*, 100: 1289-1296.

Gross, K. C.; Sams, C. E. 1984. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry*, 23, 2457-2461.

Guadalupe, Z.; Palacios, A.; Ayestarán, B. 2007. Maceration enzymes and mannoproteins: a posible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4854-4862.

Guerrand, D.; Aloisio, S.; Palacios, A.; Santiago, L.; Macías, C.; Navascues, E. 2003. Elaboración de vinos tintos de crianza: impacto de nuevas preparaciones enzimáticas sobre la variedad Cabernet Sauvignon y Tempranillo. *Viticultura Enología Profesional*, 85: 45-50.

Guerrand, D.; Gervais, J.P. 2002. Extraction of red wine phenolics during fermentation : A new pectinase preparation. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 466: 61-64.

Gump, B.H.; Haight, K. G. 1995. A preliminary study of industrial enzyme preparations for color extraction/stability in red wines. En: *Cati publication 950901*, Viticulture and Enology Research Centre, California State University, Fresno.

Gunata, Y. Z.; Sapis, J.-C. ; Moutounet, M. 1987. Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenol oxidases. *Phytochemistry*, 26: 1573-1575.

Haight, K. G.; Gump, B. H. 1994. The use of maceration enzymes in grape juice processing. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 113-116.

Harberston, J. F.; Kennedy, J. A.; Adams, D. O. 2002. Tannin in skins and seeds of Cabernet sauvignon, Syrah and Pinot noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53: 54-59.

Harbord, R.; Simpson, C.; Wegstein, J. 1990. The use of macerating enzymes in grape juice processing. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 113-116.

Haslam, E. 1980. In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the aging of red wines. *Phytochemistry*, 19: 2577-2582.

Hellín, M.P. 2000. Producción de endopoligalacturonasas de interés tecnológico mediante cultivo de *Rhizopus nigricans* sobre subproductos de la industria alimentaria. *Tesis Doctoral*, Universidad de Murcia.

Hermosín, I.; Blanco, F. J.; Castro, J. M. 2002. Evolución de la madurez fenólica en uvas tintas de las variedades Cencibel (Tempranillo) y Cabernet Sauvignon. *Tecnología del Vino*, 8: 37-47.

Hermosín-Gutiérrez, I.; Sánchez-Palomo, L.; Vicario-Espinosa, A. 2005. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged wines made from the cultivars Cabernet Sauvignon, Cencibel y Syrah. *Food Chemistry*, 92: 269-283.

Hernández, L. F.; Espinosa, J. C.; Fernández-González, M.; Briones, A. 2003.  $\beta$ -glucosidase activity in a *Saccharomices cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, 80: 171-176.

Hesford, F.; Schneider, K. 1997. Anthocyanins, the natural red coloring matter of the wine. *Schweizerische Zeitschrift für Obst- and Weinbau*, 133: 559-561.

Holbach, B.; Marx, R.; Ackermann, M. 1997. Determination of anthocyanins composition of red wine by HPLC. *Lebensmittelchemie*, 51: 78.

Huang, H. P. 1955. Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 3: 141-146.

Huang, X. M.; Huang, H. B.; Wang, H. C. 2005. Cell walls of loosening skin in post-veraison grape berries lose structural polysaccharides and calcium while accumulate structural proteins. *Scientia Horticulturae*, 104: 249-263.

Huber, D. J. 1991. Acidified phenol alters tomato cell wall pectin solubility and calcium content. *Phytochemistry*, 30: 2523-2527.

Huber, D. J. 1984. Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science*, 47: 1310-1315.

Huber, D. J. 1983. Polyuronide degradation and hemicellulose modifications in ripening tomato fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108: 405-409.

Huber, D. J. 1981. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Horticultural reviews*, 5: 169-219.

Imam, S. H.; Snell, W. J. 1987. Degradation of the framework of *Chlamydomonas* cell wall by proteases present in a commercially available  $\alpha$ -amilase preparation. *Applied Environmental Microbiology*, 53 (7): 1701-1704.

Ishimaru, M.; Kobayashi, S. 2002. Expression of a xyloglucan endo-transglycosylase gene is closely related to grape berry softening. *Plant Science*, 162: 621-628.

Izcarra, E.; Gonzalez-San Jose, M. L. 2001. Análisis de métodos rápidos de extracción para la maduración fenólica de la uva. *Enólogos*, 14: 14-28.

James, A. J.; Dixon, G. y Lamikanra, O. 1999. Characterization of partially purified cellulase from muscadine grapes (*Vitis rotundifolia* Michx.). *American Journal of Enology and Viticulture*, 50: 19-24.

Jarvis, M. C. 1998. Intercellular separation forces generated by intracellular pressure. *Plant, Cell and Environment*, 21: 1307-1310.

Jarvis, M. C. 1984. Structure and properties of pectic gels in plant cell walls. *Plant Cell and Environment*, 7: 153-164.

Jarvis, M. C.; Briggs, P. H.; Knox, J. P. 2003. Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell and Environment*, 26: 977-989.

John, M.; Dey, P. M. 1986. Postharvest changes in fruit cell wall. *Advances in Food Research*, 30: 139-193.

Kang, H-C.; Lee, S-H. 2001. Characteristics of an  $\alpha$ -glucosidase associated with grape flesh. *Phytochemistry*, 51: 213-219.

Kantz, K.; Singleton, V. L. 1991. Isolation and determination of polymeric polyphenols in wines using Sephadex LH-20. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42: 309-316.

Kallithraka, S.; Arvanitoyannis, I. S.; Kefalas, P.; El-Zajouli, A.; Soufleros, E.; Psarra, E. 2001. Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin. *Food Chemistry*, 73: 501-514.

Katalinic, V.; Males, P. 1997. Compositional changes in grape polyphenols throughout maturation. *Journal of Wine Research*, 8: 169-177.

Kelebec, H.; Canbas, A.; Cabaroglu, T.; Selli, S. 2007. Improvement of anthocyanin content in the cv. Öküzgözü wines by using pectolytic enzymes. *Food Chemistry*, 105: 334-339.

Kelebec, H.; Canbas, A.; Serkan, S.; Saucier, C.; Jourdes, M.; Glories, Y. 2006. Influence of different maceration times on the anthocyanin

composition of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs. Boğazkere and Öküzgözü. *Journal of Food Engineering*, 77: 1012-1017.

Keller, B. 1993. Structural cell wall proteins. *Plant Physiology*, 101, 1127-1130.

Keller, B.; Sauer, N.; Lamb, C. J. 1988. Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. *The EMBO Journal*, 7: 3625-3633.

Keller, B.; Templeton, M. D.; Lamb, C. J. 1989. Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein protoxylem cells of the vascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 1529-1533.

Keller, M.; Hrazdina, G. 1998. Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49: 341-349.

Kennedy, J. A.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E. J.; Jones, G. P. 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5348-5355.

Ketsa, S.; Chidtragool, S.; Klein, J. D.; Lurie, S. 1998. Effect of heat treatment on changes in softening, pectic substances and activities of polygalacturonase, pectinesterase and  $\beta$ -galactosidase of ripening mango. *Journal of Plant Physiology*, 153: 457-461.

Klenar, I.; Berovic, M.; Wondra, M. 2004. Phenolic compounds from the fermentation of cultivars Cabernet Sauvignon and Merlot from the Slovenian Coastal region. *Food Technology and Biotechnology*, 42: 11-17.

Košir, I. J.; Lapornik, B.; Andrešek, S.; Wondra, A. G.; Vrhovšek, U.; Kidič, J. 2004. Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography,

liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Analytica Chimica Acta*, 513 (1): 277-282.

Kovac, V.; Bourzeix, M.; Heredia, A.; Ramos, T. 1990. Étude des catéchines et proanthocyanidols de raisins et vins blancs. *Revue Française d'Oenologie*, 30: 7-14.

Lamadon, F. 1995. Protocole pour l'évaluation de la richesse polyphénolique des raisins. *Revue des Oenologues*, 76: 37-38.

Lanzarini, G. ; Pifferi, P. G. 1989. Enzymes in the fruit juice industry. En: *Biotechnology Applications in Beverage Production*. Cantarelli, C. y Lanzarini, G. (Eds.), Elsevier Science Publishers Ltd, London., pp. 189-222.

Larice, J. L.; Archier, P.; Rocheville-Divorne, C.; Coen, S. ; Roggero, J. P. 1989. Composition anthocyanique des cepages. II. Essai de classification sur trois ans par analyse en composantes principales et étude des variations annuelles de cépages de meme provenance. *Revue Française d'Oenologie*, 121: 7-12.

Lau, J. M.; McNeil, M.; Darvill, A. G. ; Albersheim, P. 1985. Structure of the backbone of rhamnogalacturonano I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research*, 137: 111-125.

Lazan, H.; Kasim, S.; Mhod Ali, Z. 1995. Galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, 95: 106-112.

Lazan, H.; Ng, S. Y.; Goh, L.; Ali, Z. M. 2004. Papaya  $\beta$ -galactosidase / galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 847-853.

Lecas, M.; Brillouet, J.M. 1994. Cell wall composition of grape berry skins. *Phytochemistry*, 35: 1241-1243.

Levengood, J.; Boulton, R. 2004. The variation in the color due to copigmentation in young Cabernet Sauvignon wines. In: *Red wine color. Revealing the mysteries*. Waterhouse, A.; Kennedy, J. (Eds), American Chemical Society, Washington DC, pp. 35-52.

Liao, H.; Cai, Y.; Haslam, E. 1992. Polyphenol interactions. Anthocyanins : Co-pigmentation and colour changes in red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59: 299-305.

Liu, S. Q.; Pilone, G. J. 2000. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science and Technology*, 35: 49-61.

Lohani, S.; Trivedi, P.K.; Nath, P.; 2004. Changes of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology and Technology*, 31 (2): 119-126.

Mailen-Aubert, C.; Dangles, O.; Amiot, M. J. 2001. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 170-176.

Manganaris, G. A.; Vasilakakis, M.; Diamantidis, G. 2005. Effect of calcium additives on physicochemical aspects of cell wall pectin and sensory attributes of canned peach (*Prunus persica* (L) Batsch cv Andross). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1773-1778.

Manrique, G. D.; Lajolo, F. M. 2004. Cell-wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). *Postharvest Biology and Technology*, 33: 11-26.

Marín-Rodríguez, M. C.; Orchard, J.; Seymour, G. B. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2215-2119.

Markham, K. R.; Gould, K. S.; Winefield, C. S.; Mitchell, K. A.; Bloor, S. J.; Boase, M. R. 2000. Anthocyanic vacuolar inclusions - their nature and significance in flower coloration. *Phytochemistry*, 55: 327-336.

Martino, A.; Pifferi, P. G.; Spagna, G. 1994. The separation of pectinlyase from  $\beta$ -glucosidase in a commercial preparation. *Food Chemistry, Technology and Biotechnology*, 61: 255-260.

Mateos, S.; Valls, J.; Nadal, M.; Arola, L. 2001. Estudio de madurez fenólica sobre diferentes variedades tintas y su relación con el color de los vinos. *Tecnología del Vino*, 2: 45-50.

Mateus, N.; Machado, J. M.; De Freitas, V. 2002. Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 1689-1695.

Matsuda, Y.; Saito, T.; Yamaguchi, T.; Kawase, H. 1985. Cell wall lytic enzyme released by mating gametes of *Chlamydomonas reinhardtii* is a metalloprotease and digests the sodium perchlorate-insoluble component of cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 6373-6377.

Mayen, M.; Mérida, J.; Medina, M. 1995. Flavonoid and non-flavonoid compounds during fermentation and post-fermentation standing of must from Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46: 255-261.

Mazza, G. 1995. Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34 (4): 341-371.

Mazza, G.; Miniati, E. 1993. Grapes. En: *Anthocyanins in fruit vegetables and grains*, CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 149-199.

Mazza, G.; Fukumoto, L.; Delaquis, P.; Girard, B.; Ewert, B. 1999. Anthocyanins, phenolics and color of Cabernet Franc, Merlot and Pinot

---

Noir wines from British Columbia. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 4009-4017.

McCann, M. C.; Bush, M.; Milioni, D.; Sado, P.; Stacey, N. J.; Catchpole, G.; Defernez, M.; Carpita, N. C.; Hofte, H.; Ulvskov, P.; Wilson, R. H.; Roberts, K. 2001. Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. *Phytochemistry*, 57: 811-821.

McCann, M. C.; Wells, B.; Roberts, K. 1990. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science*, 96: 323-334.

McCleary, B. V.; Harrington, J. 1988. Purification of  $\beta$ -d-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Methods in Enzymology*, 160: 575-583.

McCollum, T. G.; Huber, D. J.; Cantliffe, D. J. 1989. Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit softening. *Physiologia Plantarum*, 76: 303-308.

McNeil, M.; Darvill, A. G.; Fry, S. C.; Albersheim, P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*, 53: 625-663.

Membré, J.; Burlot, P. 1994. Effects of Temperature, pH, and NaCl on Growth and Pectinolytic Activity of *Pseudomonas marginalis*. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 2017-2022.

Mohd Ali, Z.; Armugam, S.; Lazan, H. 1995. Galactosidase and its significance in ripening mang fruit. *Phytochemistry*, 38: 1109-1114.

Monk, B.C.; Adalr, W.S.; Coben, R.A.; Goodenough, U.W. 1983. Topography of *Chlamydomonas* fine structure and polypeptide components of the gametic flagellar membrane surface and cell wall. *Planta*, 158: 517-533.

Morata, A.; Calderón, F.; González, M. C.; Colomo, B.; Suárez, J. A. 2004. Influencia de las levaduras en el color de los vinos. X Congreso Nacional de Enólogos, Valencia.

Morata, A.; Gómez-Cordovés, M. C.; Suberviola, L.; Bartolomé, B.; Colomo, B.; Suárez, J. A. 2003. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 4084-4088.

Moskowitz, A. H.; Hrazdina, G. 1981. Vacuolar contents of fruit subepidermal cells from *Vitis* species. *Plant Physiology*, 68: 686-692.

Mourgues, J. 1981. Évolution au cours de la maturation des substances pectiques et des polyosides neutres non cellulosiques dans les baies de raisin "carignan" et dans les moûts. *Sciences des Aliments*, 1: 377-388.

Moustacas, A. M.; Nari, J.; Borel, M.; Noat, G.; Richard, J. 1991. Pectin methylesterase, metal ions and plant cell wall extension: the role of metal ions in plant cell wall extension. *Biochemical Journal*, 279: 351-354.

Nagel, C. W.; Wulf, L. W. 1979. Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30: 111-116.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153: 375-380.

Neubeek, C. E. 1975. Fruits, fruit products and wines. En: *Enzymes in Food Processing*. Reed, G. (Ed.), Academic Press, New York, pp. 397-442.

Nunan, K. J.; Davies, C.; Robinson, S. P.; Fincher, G. B. 2001. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta*, 214: 257-264.

Nunan, K. J.; Sims, I. M.; Bacic, A.; Robinson, S. P. 1998. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology*, 118: 783-792.

Nunan, K.J.; Sims, C.A.; Bacic, A.; Robinson, S.P.; Fincher, G.B. 1997. Isolation and characterization of cell walls from the mesocarp of mature grape berries (*Vitis vinifera*). *Planta*, 203 (1):93-100.

O'Donoghue, E. M.; Huber, D. J. 1992. Modification of matrix polysaccharides during avocado (*Persea americana*) fruit ripening: an assessment of the role of C<sub>x</sub>-cellulase. *Physiologia Plantarum*, 86: 33-42.

O'Neill, M. A.; Warrenfels, D.; Kates, K.; Pellerin, P.; Doco, T.; Darvill, A. G.; Albersheim, P. 1996. Rhamnogalacturonan-II: a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 22923-22930.

Okemoto, K.; Uekita, T.; Tsumuraya, Y.; Hashimoto, Y.; Kasama, T. 2003. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-galactanase from *Trichoderma viride*. *Carbohydrate Research*, 338:219-230.

Ortega-Regules, A. E. 2006. Antocianos, taninos y composición de la pared celular en distintas variedades de uva. Evolución durante la maduración e implicaciones tecnológicas. *Tesis doctoral*, Universidad de Murcia.

Ortega-Regules, A. E.; Romero-Cascales, I.; López-Roca, J. M.; Ros-García, J. M.; Gómez-Plaza, E. 2006. Anthocyanin fingerprint of grapes: environmental and genetic variations. *Journal Science of Food and Agriculture*, 86: 1460-1467.

Oszmanski, J.; Romeyer, F.; Sapis, J.; Macheix, J. 1986. Grape seed phenolics: Extarction as affected by some conditions occurring during wine processing. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37: 7-12.

Ough, C. S.; Berg, H. W. 1974. The effect of two commercial pectic enzymes on grape musts and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25: 108-211.

Ough, C. S.; Crowell, E. A. 1979. Pectic-enzyme treatment of white grapes: temperature, variety and skin-contact time factors. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30: 22-27.

Ough, C. S.; Noble, A.; Temple, D. 1975. Pectin enzyme effects on red grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 26: 195-200.

Palacios, A.; Santiago, L.; Guerrand, D. 2003. Utilización de enzimas de maceración en vinificación en tinto. *Wine Internet Technical Journal*. <http://www.haro.org/ingles/pdf/cursoharoantonio.pdf>.

Pardo, F.; Salinas, R.; Alonso, G.; Navarro, G.; Huerta, M. D. 1999. Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. *Food Chemistry*, 67: 135-142.

Parley, A. 1997. The Effect of Pre-Fermentation Enzyme Maceration on Extraction and Colour Stability in Pinot noir Wine. *Tesis de Master*, Lincoln University, Nueva Zelanda.

Parley, A.; Vanhanen, L.; Heatherbell, D. 2001. Effects of prefermentation enzyme maceration on extraction and colour stability in Pinot noir. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7: 146-152.

Parr, A. J.; Ng, A.; Waldron, K. W. 1997. Ester-linked phenolic components of carrot cell walls. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 2468-2471.

Pauly, M.; Albersheim, P.; Darvill, A. G.; York, W. S. 1999. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal*, 20: 629-639.

Pellerin, P.; Brillouet, J. M. 1994. Purification and properties of an exo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactanase from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Research*, 264:281-291.

Pellerin, P.; Cabanis, J. C. (2000). Los Glúcidos. En: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*, Flanzky, C. (Ed.), AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 66-96.

Pérez-Magariño, S.; González-San José, M. L. 2004. Evolution of flavanols, anthocyanins and their derivatives during the aging of red wines, elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 1181-1189.

Pérez-Magariño, S.; González-San José, M. L. 2001. Influence of commercial pectolytic preparations on the composition and storage evolution of Albillo white wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 789-796.

Peynaud, E. 1984. *Knowing and Making Wine*. John Wiley & Sons, New York.

Pharr, D.M.; Dickinson, D.B. 1973. "Partial characterization of Cx cellulose and cellobiase from ripening tomato fruits". *Plant Physiology*, 51: 577-583.

Plank, P. F. H.; Zent, J. R. 1993. Use of enzymes in wine making and grape processing. En: *Beer and Wine Production Analysis, Characterisation, and Technological Advances*. Gump, B. H. y Pruet, D. J. (Eds.), American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 191-196.

Redgwell, R. J.; Fisher, M.; Kendal, E.; MacRae, E. A. 1997. Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta*, 203, 174-181.

Redgwell, R. J.; Melton, L. D.; Brasch, D. J. 1990. Cell wall changes in kiwifruit following post harvest ethylene treatment. *Phytochemistry*, 29 : 399-407.

Revilla, E.; Garcia-Beneytez, E.; Cabello, F.; Martin-Ortega, G.; Ryan, J. M. 2001. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of

anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, 915: 53-60.

Revilla, I.; González-SanJosé, M. L. 2003a. Compositional changes during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivate levels. *Food Chemistry*, 80: 205-214.

Revilla, I.; González-San José, M. L. 2003b. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 38: 29-36.

Revilla, I.; González- San José, M. L. 2002a. Efecto de la aplicación de enzimas pectinolíticas sobre la calidad del vino tinto. *Tecnología del Vino*, 6: 71-78.

Revilla, I.; González-San José, M. L. 2002b. Multivariate Evaluation of Changes Induced in Red Wine Characteristics by the Use of Extracting Agents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 4525-4530.

Revilla, I.; González-San José, M.L. 2001. Evolution during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: new anthocyanin pigment formation. *Journal of Wine Research*, 12: 183-197.

Revilla, E.; Ryan, J. M.; Martín-Ortega, G. 1998. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 4592-4597.

Ribereau-Gayon, P. 1982. The anthocyanins of grapes and wines. En : *Anthocyanins as food colors*. Markakis, P (Ed), Academic Press, New York, pp. 209-243.

Ribéreau Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A. ; Dubourdieu, D. 1998a. *Traité d'Oenologie.2. Chimie du vin. Stabilisation et traitements*. Ed. Dunod, Paris.

Ribéreau Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B. ; Lonvaud, A. 1998b. *Traité d' Oenologie 1. Microbiologie du vin. Vinifications.* Ed. Dunod, Paris.

Ricard, J.; Noat, G. 1986. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 1. A theory of the ionic control of a complex multi-enzyme system. *European Journal of Biochemistry*, 155: 183-190.

Ricardo da Silva, J. M.; Rosec, J.; Bourzeix, M.; Mourgues, J.; Moutounet, M. 1992. Dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvedre grapes and red wines. *Vitis*, 31: 55-63.

Roby, G.; Matthews, M. 2004. Relative proportions of seed, skin and flesh in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10: 74-82.

Roldan, J. C.; Vian, B. 1981. Use of purified endopolygalacturonase for a topochemical study of elongation cell walls at the ultrastructural level. *Journal of Cell Science*, 48: 333-343.

Romero, C.; Bakker, J. 2000. Effects of acetaldehyde in model wine solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, 35: 129-140.

Ros, J.M. 1989. Producción de poligalacturonasas termoestables de interés tecnológico por *Rhizopus nigricans*. *Tesis de Licenciatura*, Universidad de Murcia.

Ros Barcelo, A.; Calderon, A. A.; Zapata, J. M.; Muñoz, R. 1994. The histochemical localization of anthocyanins in seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera*). *Scientia Horticulturae*, 57: 265-268.

Rosli, H. M.; Civello, P. M. 2004. Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 823-831.

Sacchi, K.; Bisson, L. F.; Adams, D. O. 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56: 197-206.

Saint-Cricq, N.; Vivas, N.; Glories, Y. 1999. Maduración fenólica de las uvas tintas. Relación con la calidad de los vinos. Comparación entre los viñedos Merlot y Tempranillo. *La Semana Vitivinícola*, 2748: 1126-1136.

Saint-Cricq, N.; Vivas, N.; Glories, Y. 1998. Maturité phenolique: définition et contrôle. *Revue Francaise d' OEnologie*, 173: 22-25.

Sakurai, N. ; Nevins, D. J. 1997. Relationship between fruit softening and wall polysaccharides in avocado (*Persea americana* Mill) mesocarp tissues. *Plant Cell Physiology*, 38: 603-610.

Sakurai, N.; Nevins, D. J. 1993. Changes in physical properties and cell wall polysaccharides of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pericarp tissues. *Physiologia Plantarum*, 89: 681-686.

Santos-Buelga, C.; Bravo-Haro, S.; Rivas-Gonzalo, J. C. 1995. Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in models solutions. *Z Lebensm Unters Forsch*, 201: 269-274.

Sarni, P.; Fulcrand, H.; Souillol, V.; Souquet, J. M. ; Cheynier, V. 1995. Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must like model solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69: 385-391.

Schnitzler, J. P.; Madlung, J.; Rose, A.; Seitz, H. U. 1992. Biosynthesis of *p*-hydroxybenzoic acid in elicitor-treated carrot cell cultures. *Planta*, 188: 594-600.

Scott, R.W. 1979. Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Analytical Chemistry*, 51: 936-941.

Scudamore-Smith, P.; Hooper, R.; Mclaran, E. 1990. Color and phenolics changes of Cabernet Sauvignon wine made by simultaneous

yeast/bacterial fermentation and extended pomace contact. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41: 57-67.

Sella, J.; Espinas, E.; Villaroya, A.; Mínguez, S. 1998. Factores agronómicos que inciden sobre la composición fenólica de la uva. En: *Las materias fenólicas del vino*. Villafranca del Penedés.

Selvendran, R. R. 1985. Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. *Journal of Cell Science Supplement*, 2: 51-88.

Servili, M.; Begliomini, A.L.; Montedoro, G. 1992. Utilisation of yeast pectinase in olive oil extraction and red wine making processes. *Journal Science of Food and Agriculture*, 58: 253-260.

Seymour, G. B.; Gros, K. C. 1996. Cell wall disassembly and fruit softening. *Postharvest News and Information*, 7: 45N-52N.

Showalter, A. M. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5: 9-23.

Sims, C.; Bates, R. P. 1994. Effects of skin fermentation time on the phenols, ellagic acid sediment and sensory characteristics of a red *Vitis rotundifolia* wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 56-62.

Singleton, V. L.; Draper, D. E. 1964. The transfer of polyphenolic compounds from grape seed into wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 34-40.

Singleton, V. L.; Esau, P. 1969. Phenolic substances in grapes and wines and their significance. Academic Press, New York.

Singleton, V. L.; Trouslade, E. K. 1992. Anthocyanin-Tannin interactions explaining differences in polymeric Phenols between White and Red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43: 63-70.

Sipiora, M. J.; Gutiérrez Granda, M. J. 1998. Effects of pre-veraison irrigation cutoff and skin contact time on the composition, color, and phenolic content of young Cabernet Sauvignon wines in Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49: 152-162.

Somers, T.C. 1980. Pigment phenomena. En: *Centennial Grape Symposium*. Webb, A. (Ed), University of California Press, Davis, California.

Souquet, J.; Cheynier, V.; Brossand, F. ; Moutounet, M. 1996b. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43: 509-512.

Souquet, J. M.; Cheynier, V.; Sarni-Machado, P. ; Moutounet, M. 1996a. Les composés phenoliques du raisin. *Journal International de la Vigne et du Vin, Hors Série: La viticulture à l'Aube de l'le Millénaire*, 99-107.

Spagna, G.; Barbagallo, R. N.; Palmeri, R.; Restuccia, C.; Giudici, P. 2002. Properties of endogenous  $\beta$ -glucosidase of *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 1036-1041.

Spranger, M. I.; Clímaco, M. C.; Sun, B.; Eiriz, N.; Fortunato, C.; Nunes, A.; Conceição, L.; Alvelar, M. L.; Belchior, A. P. 2004. Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Analytica Chimica Acta*, 513: 151-161.

Stevenson, T. T.; Darvill, A. G.; Albersheim, P. 1988a. 3-Deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid, a component of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 179: 269-288.

Stevenson, T. T.; Darvill, A. G.; Albersheim, P. 1988b. Structural features of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 182: 207-226.

Stone, B. A.; Clarke, A. E. 1992. Chemistry and physiology of higher plant 1,3- $\beta$ -glucans (callose). En: *Chemistry and Biology of (1-3)- $\beta$ -Glucans*.

- 
- Stone, B. A. y Clarke, A. E. (Eds.), La Trobe University Press, Bundoora, Australia, pp. 365-429.
- Stuart, D. A.; Varner, J. E. 1980. Purification and characterization of a salt-extractable hydroxyproline-rich glycoprotein from aerated carrot disc. *Plant Physiology*, 66: 787-792.
- Sudraud, P. 1958. Interpretacion des courbes d'absorption des vins rouges. *Annals de Technologie Agricole*, 7: 203-208.
- Takayanagi, T.; Uchibori, T.; Yokotsuka, K. 2001. Characteristics of yeast poligalacturonases induced during fermentation on grape skins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52 (1): 41-44.
- Thorngate, J. H.; Singleton, V. L. 1994. Localization of procyanidins in grape seeds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 259-262.
- Van Balen, J. 1984. Recovery of anthocyanins and other phenols from converting grapes into wine. *M.S. Thesis*, University of California, Davis, CA.
- Varner, J. E.; Lin, L. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell*, 56: 231-239.
- Vasserot, Y.; Caillet, S.; Maujean, A. 1997. Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48: 433-437.
- Vidal, S.; Williams, P.; O'Neill, M.; Pellerin, P. 2001. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I. Tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 45: 315-323.
- Villiers, A.; Lynen, F.; Crouch, A.; Sandra, P. 2004. Development of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of polyphenols, organic acids and sugars in wine. *Chromatographia*, 59: 403-409.

Vivar-Quintana, A. M.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, C. 2002. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta*, 458: 147-155.

Vivas de Gaulejac, N.; Vivas, N.; Guerra, C. y Nonier, M. 2001. Anthocyanin in grape skins during the maturation of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon and Merlot Noir from different Bordeaux terroirs. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 35: 149-156.

Von Baer, D.; Mardones, C.; Gutierrez, L.; Hofman, G.; Becerra, J.; Hitschfeld A.; Vergara, C. 2005. Varietal authenticity verification of Cabernet Sauvignon, Merlot and Carmenère wines produced in Chile by their anthocyanin, flavonol and schikinic acid. *Bulletin de l'OIV*, 78: 45-57.

Voragen, A. G. J., Schols, H. A.; Pilnik, W. 1986. Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by H.P.L.C. *Food Hydrocolloids*, 1: 65-70.

Voragen, A. G. J.; Van den Broek, L. A. M.; 1991. Fruit juices. En: *Biotechnological Innovations in Food Processing*. Green, J. (Ed), Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, England, pp. 187-210.

Vrhovsek, U.; Vanzo, A.; Nemanic, J. 2002. Effect of red wine maceration techniques on oligomeric and polymeric proanthocyanidins in wine cv Blaufränkisch. *Vitis*, 41: 47-51.

Waldron, K. W.; Selvendran, R. R. 1990. Effect of maturation and storage on asparagus (*Asparagus officinalis*) cell wall composition. *Physiologia plantarum*, 80: 568-575.

Waldron, K. W.; Smith, A. C.; Parr, A. J.; Ng, A.; Parker, M. L. 1997. New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 213-221.

Wang H., Edward J.R., Shrikhande J. 2003. Anthocyanin transformation in Cabernet Sauvignon Wine during Aging. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 7989-7994.

Watson, B.; Chen, H.; Price, S. F. 2000. Maceration enzymes affect Oregon Pinot noir color and phenolic profiles. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51: 297.

Watson, B.; Goldberg, N.; Chen, H.; McDaniel, M.; Price, S. 1999. Effects of macerating pectinase enzymes on color, phenolic profile and sensory characteristics of Pinot Noir wines. En: *2nd Joint Burgundy-California-Oregon Winemaking Symposium*. Waterhouse, A. L. (Ed.), Davis, California, pp. 36-44.

Wegrzyn, T.; MacRae, E. A. 1992. Pectinesterase, polygalacturonase, and  $\beta$ -galactosidase during softening of ethylene-treated kiwifruit. *HortScience*, 27, 900-902.

Whitaker, J. R. 1990. Microbial pectolytic enzymes. En: *Microbial enzymes and biotechnology*, 2<sup>o</sup> edition. Fogarty, W. M.; Kelly, C. T. (Eds). Elsevier Science Publishers Ltd, Essex, England, pp. 133-176.

Wightman, J.D.; Price, S.F.; Watson, B.T.; Wrolstrad, R.E. 1997. Some effects of processing enzymes on anthocyanins and phenolics in Pinor noir and Cabernet sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48: 39-48.

Wightman, J. y Wrolstad, R. 1996.  $\beta$ -Glucosidase activity in juice-processing enzymes based on anthocyanin analysis. *Journal of Food Science*, 61: 544-547,552.

Wightman, J.D.; Wrolstrad, R.E. 1995. Anthocyanin analysis as a measure of glycosidase activity in enzymes for juice processing. *Journal of Food Science*, 60: 862-867.

Yáñez, F.; Duque, M.C.; Bravo de Mingo, J. 1998. Riego localizado en el viñedo. En: *Reunión Anual del Grupo de Trabajo en Experimentación en Viticultura y Enología*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Ed.), La Guardia, Álava, pp: 1-18.

Yokotsuka, K.; Sato, M.; Ueno, N.; Singleton, V. 2000. Colour and sensory characteristics of Merlot red wines caused by prolonged pomace contact. *Journal of Wine Research*, **11**: 7-18.

Zamora, F. 2002. La madurez fenólica, un tema abierto. *Enólogos*, **18**: 24-28.

Zamora, F. 2003. Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. AMV, Madrid.

Zarra, I.; Revilla, G. 1993. Pared celular. Estructura y función. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcón-Bieto, J.; Talón, M. (Eds.), McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid, pp. 1-24.

Zent, J.B.; Inama, S. 1992. Influence of macerating enzymes on the quality and composition of red wines obtained from Valpolicella wine grape. *American Journal of Enology and Viticulture*, **43**: 311.

Zimman, A.; Joslin, W.; Lyon, M.; Meier, J.; Waterhouse, A. 2002. Maceration variables affecting phenolic composition in commercial-scale Cabernet Sauvignon winemaking trials. *American Journal of Enology and Viticulture*, **53**: 93-98.

Zimman, A.; Waterhouse, A. L. 2004. Incorporation of malvidine-3-glucoside into high molecular weight polyphenols during fermentation and wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, **55** (2): 139-146.

Zinnai, A.; Venturi, F.; Silvestri, S.; Andrich, G. 2003. L'impiego di coadiuvanti tecnologici nella vinificazione di uve Sangiovese. *Vignevini*, **11**: 141-144.

Zoecklein, B. 1991. An overview of maceration during red winemaking. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 6: 265-567.