

UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA

**Técnicas bioquímicas y físicas para
limitar la interacción o promover la
desorción de polifenoles ligados a
las paredes celulares de la uva**

Andrea Osete Alcaraz

2022



D^a ENCARNA GÓMEZ PLAZA, Catedrática del Área de Tecnología de Alimentos y D^a ANA BELÉN BAUTISTA ORTÍN, Profesora 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 “TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y FÍSICAS PARA LIMITAR LA INTERACCIÓN O PROMOVER LA DESORCIÓN DE POLIFENOLES LIGADOS A LAS PAREDES CELULARES DE LA UVA” realizada por D^a ANDREA OSETE ALCARAZ, 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.

Murcia, 22 de julio del 2022

Encarna Gómez Plaza

Ana Belén Bautista Ortín

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Proyecto de Investigación “TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y FÍSICAS PARA PROMOVER LA DESORCIÓN DE POLIFENOLES LIGADOS A LAS PAREDES CELULARES DE LA UVA”, subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad, con número de referencia AGL2015-65974-R y fondos FEDER.

La firmante de esta Memoria ha disfrutado de una beca predoctoral concedida por la Universidad de Murcia.

AGRADECIMIENTOS

Sabía que escribir los agradecimientos iba a ser difícil, llevo retrasándolo semanas. Estas cosas no se me dan bien, para esto siempre he tenido a Lu... Bueno... ahí va.

Esta tesis no podría haberse realizado sin la intervención y apoyo de mucha gente. Solo espero que no se me olvide nadie.

En primer lugar, quiero agradecerle a Encarna y Ana Belén todo lo que han hecho por mí durante estos años. Primero, por darme la oportunidad al inicio, todavía recuerdo aquella primera entrevista, también la segunda. En realidad, no sabía dónde me estaba metiendo, pero ha sido una de las mejores decisiones de mi vida. En segundo lugar, por todo lo que me habéis enseñado durante el doctorado, el máster y el grado. Os encanta lo que hacéis, se os nota, y lo transmitís a todos los que trabajan con vosotras. Por último, quiero agradeceros el haber creado el mejor ambiente de trabajo que se pueda pedir.

Gracias Anita, has sido un grandísimo apoyo desde el momento en el que te conocí, siempre he podido confiarte cualquier cosa. Te llevo en el corazón. Y a Rocío, mi primera compañera de despacho.

A mi grupo: Pili, te agradezco todo lo que has hecho por mí, desde el principio, no sé qué hubiera sido de mi primer año sin ti. Paula, te agradezco la comprensión y nuestras charlas profundas con una cerveza (o varias) me dieron la vida en los momentos difíciles. Leti, gracias por tu dulzura y por apreciarnos a todas desde el principio. Sonia, te echamos de menos. Alex, gracias por la alegría que has traído a nuestro grupo. Estos años junto a vosotros han sido increíbles.

Gracias a todos los profesores del departamento y a los técnicos de laboratorio por su soporte y dedicación. Y a todos los alumnos internos que han pasado por aquí desde que empecé.

Gracias a todas las personas que nos ayudaron en Sudáfrica, especialmente a John Moore, Florent, Gonzalo y Micaela. Os recuerdo mucho.

A mis amigas de toda la vida, mis sirenas de los mares, Naila y Amy. Gracias por escucharme y por vuestros acertadísimos consejos, sois las mejores chicas!!. Si me hubieran dicho que 25 años después iba a ponerlos en los agradecimientos de una tesis...

A Paqui y Juan, mi segunda familia.

Gracias Alex mio, creo que lo hemos pasado todo juntos, esto solo es otra cosa más que añadir a la lista. Estás aquí oyéndome quejarme a las doce de la noche porque no sé cómo escribir esto... y no puedo expresarte lo muchísimo que te adoro, lo que me has ayudado a lo largo de estos años. Gracias por quererme, por aguantarme y por animarme en todos los momentos de mi vida. Ya ves... el iceberg tiene su corazoncito.

Gracias a mi abuela y a mi tía, por todo vuestro interés y amor.

Gracias a mis padres, todo lo que soy es gracias a vosotros. Gracias por el apoyo al principio, en el durante y al final. Y mamá, gracias por ese empujoncito al inicio, si no me hubieras hecho mandar ese correo esta tesis no existiría.

Te dejo para el final... Lu, eres mi Persona, ya lo sabes. Porque fuiste Bajo la Montaña por mí y me sacaste.

Quiero dedicar este trabajo a:

Mi familia, toda ella, por vuestra confianza ciega.

Me hacéis sentir invencible.



ÍNDICE



1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE UVAS Y VINOS	3
1.1.1. Antocianos	3
1.1.2. Taninos	5
1.2. EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA UVA AL MOSTO/VINO: DEGRADACIÓN DE LA PARED CELULAR	7
1.2.1 Composición de la pared celular	7
1.2.2 La pared celular como barrera: problemas de extractabilidad de los compuestos fenólicos	11
1.3. INTERACCIONES ENTRE COMPONENTES DE LA PARED CELULAR Y COMPUESTOS FENÓLICOS. PAPEL EN LA VINIFICACIÓN	13
1.3.1. Interacciones según el tipo de compuesto fenólico	14
1.3.1.1. Antocianos	14
1.3.1.2. Taninos	16
1.3.2. Influencia de la composición de la pared celular	18
1.4. APLICACIÓN DE TÉCNICAS PARA LIMITAR LAS INTERACCIONES ENTRE PAREDES CELULARES Y COMPUESTOS FENÓLICOS Y/O LIBERAR LOS COMPUESTOS LIGADOS	21
1.4.1. Uso de enzimas que degradan la pared celular	22
1.4.1.1. Celulasas	22
1.4.1.2. Hemicelulasas	24
1.4.1.3. Pectinasas	24
1.4.1.4. Uso de enzimas para limitar la interacción de paredes celulares y compuestos fenólicos o favorecer su desorción	26
1.4.2. Uso de polisacáridos solubles para reducir la adsorción de compuestos fenólicos por las paredes celulares de la uva	28
1.4.3. Uso de ultrasonidos de alta potencia (US)	29
2. OBJETIVOS	45

3. RESULTADOS	49
3.1. Publicación: Elimination of suspended cell wall material in musts improves the phenolic content and color of red wines	51
3.2. Publicación: The impact of carbohydrate-active enzymes on mediating cell wall polysaccharide-tannin interactions in a wine-like matrix	55
3.3. Publicación: The influence of hydrolytic enzymes on tannin adsorption-desorption onto grape cell walls in a wine-like matrix	59
3.4. Publicación: Combined use of pectolytic enzymes and ultrasounds for improving the extraction of phenolic compounds during vinification	63
3.5. Publicación: The application of ultrasound and enzymes could be promising tools for recovering polyphenols during the aging on lees process in red winemaking	67
3.6. Publicación: The role of soluble polysaccharides in tannin-cell wall interactions in model solutions and in wines	71
3.7. Publicación: Revisiting the use of pectinases in enology: a role beyond facilitating phenolic grape extraction	75
4. DISCUSIÓN GENERAL	79
5. RESUMEN	89
6. CONCLUSIONES	95



INTRODUCCIÓN



1.1. COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO: ORIGEN E IMPORTANCIA

El tipo y cantidad de compuestos fenólicos son algunos de los parámetros más importantes de la calidad del vino. A ellos se les atribuyen parte de sus características organolépticas, como el sabor, olor, astringencia o color (Monagas et al., 2005).

Los principales compuestos fenólicos que aparecen en las uvas tintas y los vinos son los flavonoides. Las principales clases de flavonoides son flavonoles, antocianos, flavan-3-oles monoméricos y los taninos condensados. Todos los flavonoides se caracterizan por un esqueleto C6-C3-C6, dos anillos de benceno (A y B) unidos por un anillo de pirano heterocíclico. Las diferencias entre un tipo de flavonoide y otro se deben a las sustituciones en su anillo B. También son comunes, aunque en menor cantidad, otros compuestos fenólicos no flavonoides como los ácidos fenólicos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y los estilbenos. Todos ellos tienen una gran importancia a nivel biológico por su actividad antioxidante (Monagas et al., 2005).

La baya de uva está dividida en tres partes: el hollejo, la pulpa y las semillas. Los compuestos fenólicos se encuentran repartidos en estas tres áreas. Los antocianos, pigmentos naturales de la uva tinta, se encuentran exclusivamente en el hollejo de la uva. Éste también contiene otros compuestos fenólicos como flavonoles y taninos. Por otra parte, los principales compuestos fenólicos que se encuentran en la pulpa son los ácidos fenólicos. Las semillas se caracterizan por la presencia de taninos condensados o proantocianidinas (Garrido y Borges, 2013).

1.1.1. Antocianos

Son los pigmentos responsables de la coloración de los vinos rosados y tintos. Su estructura molecular se caracteriza por un esqueleto básico de carbono (C6-C3-C6). Son sales de flavilio glucosiladas, es decir, poseen un núcleo flavilio polihidroxilado y/o metoxilado y están unidos por un enlace glicosídico a una

molécula de azúcar. Cuando los antocianos no poseen esta molécula de azúcar se denominan antocianidinas. En la uva y los vinos, las principales antocianidinas son delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (Figura 1); las diferencias entre ellas dependen del número de hidroxilos (-OH) y grupos metoxilo (-OCH₃) en el anillo B (Brouillard, 1982; Cheynier et al., 2006). Generalmente se encuentran en forma de glucósidos (3-O-monoglucósidos) y también pueden aparecer en sus formas aciladas, por la esterificación del azúcar del antociano con diferentes ácidos como el ácido acético, p-cumárico, cafeíco o ácido ferúlico (Favre et al., 2019; Hermosín-Gutierrez et al., 2020).

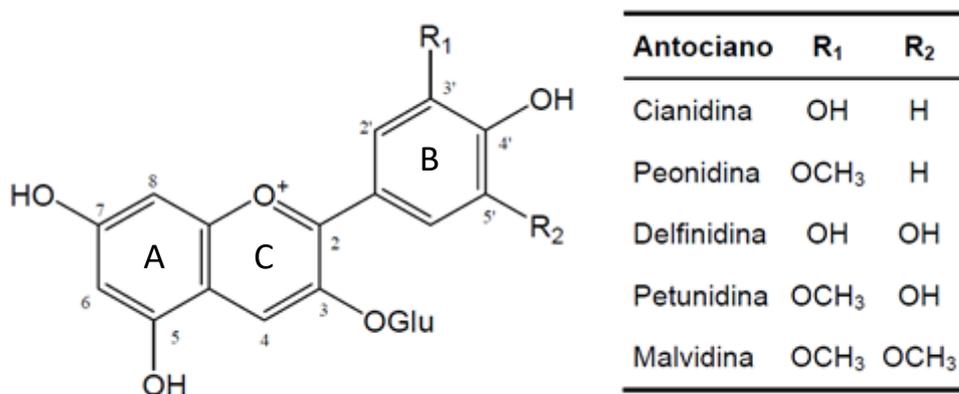


Figura 1. Estructura química de los diferentes tipos de antocianinas presentes en *Vitis Vinifera* (Romero-Cascales, 2008).

Los antocianos están localizados en el hollejo/piel de las uvas tintas y otras frutas, particularmente dentro de las vacuolas de las células vegetales del hollejo, donde se acumulan en unas vesículas esféricas denominadas antocianoplastos (Bae et al., 2006; Conn et al., 2010; Markham et al., 2000). Son compuestos hidrosolubles y su extracción al mosto comienza después del estrujado, durante la etapa de maceración, cuando se produce la degradación de la pared celular vegetal.

Durante la elaboración del vino, las concentraciones de antocianos alcanzan un máximo durante los primeros días de la fermentación alcohólica, y disminuyen hacia el final de la misma (Ribéreau-Gayon et al., 2012). Esta disminución de formas monoméricas es debida fundamentalmente a la formación de nuevos pigmentos, en general más estables, por interacción con otros

compuestos fenólicos, como, por ejemplo, los taninos (De Freitas y Mateus, 2006; Garrido y Borges, 2013). Precisamente, durante el envejecimiento, los cambios en la coloración de los vinos tintos están influidos por la formación de estos pigmentos más complejos y estables. Entre ellos destacan los piranoantocianos (los más sencillos, vitisina A y B, se forman por reacciones entre los antocianos y subproductos de levadura como ácido pirúvico y acetaldehído) (De Freitas y Mateus, 2011) y los pigmentos resultantes de las polimerizaciones con flavan-3-oles, más o menos condensados. Estos compuestos representan los pigmentos más importantes en los vinos tintos añejos, en los que predominan las tonalidades anaranjadas (De Freitas et al., 2017; Quaglieri et al., 2017).

1.1.2. Taninos

Uno de los compuestos fenólicos flavonoides más importantes en las uvas son las proantocianidinas, más comúnmente conocidas como taninos condensados. Hay que aclarar que dentro del término tanino se engloba una amplia gama de estructuras polifenólicas. Los taninos del vino se pueden clasificar en dos grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados, aunque solo los últimos se encuentran naturalmente en las uvas. En la uva estos compuestos fenólicos están localizados en el hollejo y las semillas.

Las proantocianidinas o taninos condensados son polímeros más o menos complejos de unidades de flavan-3-oles o 3-flavanoles. Los flavan-3-oles poseen dos ciclos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado saturado, esta estructura presenta dos carbonos asimétricos (C2 y C3) que originan cuatro isómeros: los más abundantes son (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina y los derivados de (-)-epicatequina en forma de éster gálico (Da Silva et al., 1991). Los taninos condensados (Figura 2) están formados por unidades de flavan-3-ol unidas por enlaces interflavánicos (C-C), siendo los más comunes los enlaces C4-C6 o C4-C8, y ocasionalmente enlaces C-O-C (Cheynier et al., 2006; Hanlin et al., 2010). El grado medio de polimerización (GPM) de estas moléculas es un factor importante, el cual determina las propiedades químicas y organolépticas del vino. Los taninos condensados de

uva y vino se pueden clasificar según su GPM en oligómeros ($2 < GPM < 10$) y polímeros ($GPM > 10$). Un grado de polimerización importante proporciona más astringencia al vino (Cheynier et al., 2001).

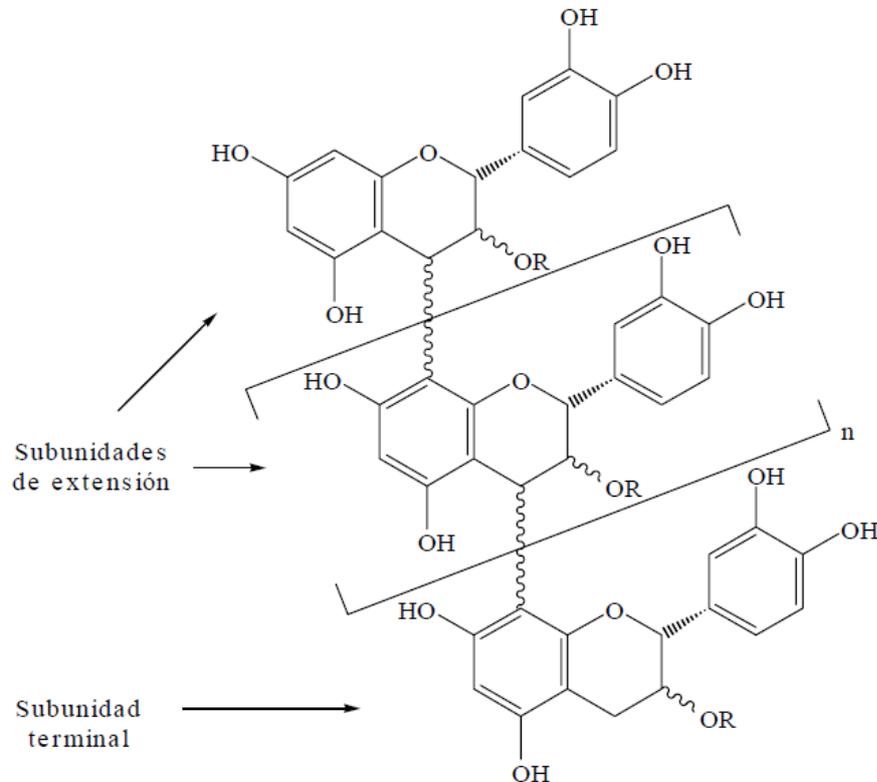


Figura 2. Estructura general de los taninos (Romero-Cascales, 2008).

Los taninos del hollejo están distribuidos en tres zonas: en la vacuola, unidos fuertemente a la membrana proteofosfolipídica o ligados a los polisacáridos de la pared celular. Los únicos taninos que se pueden extraer fácilmente son los que se encuentran en las vacuolas. Los taninos de las semillas se ubican en la epidermis, la parte media del tegumento externo y la capa media del tegumento interno y su principal objetivo es proteger el embrión (Cadot et al., 2006). Se extraen más tarde que los taninos del hollejo durante el proceso de maceración porque su extracción depende de la solubilización de la cutícula (la capa más externa de la semilla) (Amrani-Joutei et al., 1994; Rousserie et al., 2019).

Se pueden diferenciar dos tipos de proantocianidinas: procianidinas, compuestas por (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina galato y

prodelfinidinas, donde también participan unidades de (-)-epigallocatequina. Las procianidinas están presentes en el hollejo y semillas, mientras que las prodelfinidinas están presentes solamente en el hollejo (Hellström et al., 2009; Porter et al., 1985; Schofield et al., 2001). Además, los taninos derivados de semillas están menos polimerizados que los del hollejo y se caracterizan por una mayor cantidad de flavan-3-oles galoilados, especialmente de (-)-epicatequina galato (Mattivi et al., 2009). Aquellos asociados a los polisacáridos de la pared celular, tanto en el hollejo como en las semillas, tienen un grado medio de polimerización mayor que los que se encuentran en una forma no asociada (Bindon et al., 2010a).

La concentración de taninos en el mosto/vino aumenta durante la fermentación alcohólica, ya que la presencia de alcohol facilita el deterioro de las estructuras que los contienen (Ribéreau-Gayon et al., 2012). Los taninos de bajo peso molecular son altamente reactivos, una vez extraídos al mosto/vino durante la maceración inician modificaciones químicas que conducen a la formación de moléculas más estables a lo largo de todo el proceso de vinificación, al igual que ocurre en el caso de los antocianos (Smith et al., 2015).

1.2. EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA UVA AL MOSTO/VINO: DEGRADACIÓN DE LA PARED CELULAR

1.2.1. Composición de la pared celular

Las paredes celulares de la uva están estructuradas en tres partes: la lámina media, la pared primaria y la pared secundaria. Tienen tres componentes principales: polisacáridos de alto peso molecular, glicoproteínas unidas a los polisacáridos y polifenoles. Los componentes principales de la lámina media son pectinas y proteínas pequeñas, la lámina media es compartida entre células adyacentes y, la pectina que la forma, actúa como un adhesivo entre ellas (Carpita y McCann, 2000). La arquitectura de la pared celular difiere según el tejido, en la pulpa las células son de mayor tamaño y tienen paredes celulares más delgadas, mientras que las paredes

celulares del hollejo de la uva son más gruesas y compactas (Gao et al., 2016).

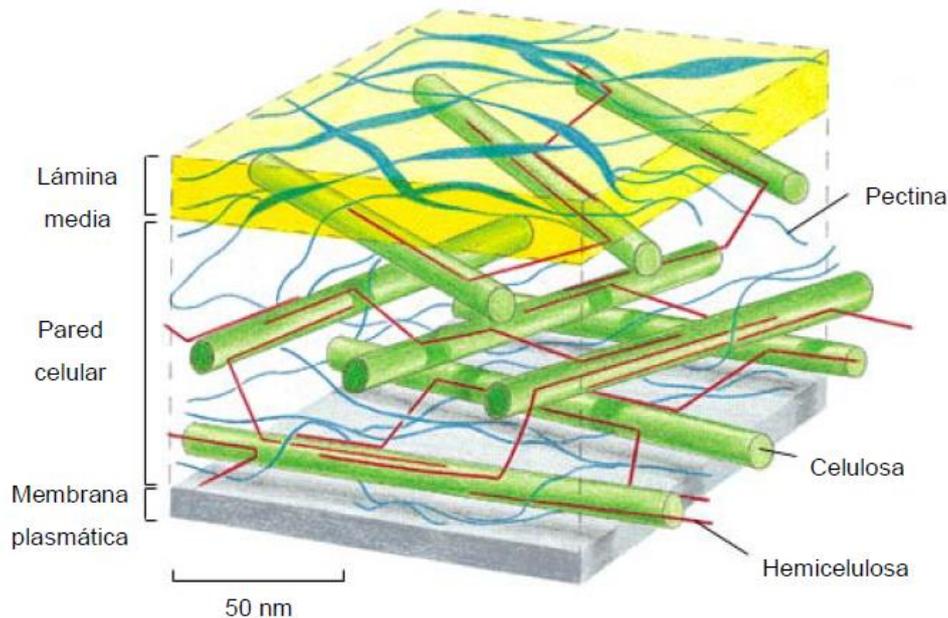


Figura 3. Estructura de la pared celular vegetal (Moreno, 2013).

La pared primaria, la más importante y gruesa, está compuesta por celulosa, hemicelulosa y pectinas (90%) y proteínas estructurales (10%).

La celulosa es un polisacárido lineal que tiene unidades de D-glucopiranosas unidas por un enlace glicosídico β -(1 \rightarrow 4). En la pared primaria, las cadenas lineales de celulosa están unidas por puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals formando microfibrillas (McCann et al., 1990), éstas confieren la resistencia mecánica a la célula. Las microfibrillas suelen estar cubiertas por glucoarabinanos y xiloglucanos unidos fuertemente, lo cual permite la existencia de espacios entre las microfibrillas que están ocupados por los polisacáridos de la matriz péctica (Carpita y Gibeau, 1993).

Las hemicelulosas son polímeros muy variables, tanto en composición como en número de ramificaciones. Pueden unirse a la celulosa mediante enlaces no covalentes formando una red, la cual tiene un papel estructural de soporte de la pared celular (Carpita y Gibeau, 1993). El xiloglucano es el

principal componente hemicelulósico en plantas dicotiledóneas y puede constituir alrededor del 20% de los polisacáridos no celulósicos de las paredes celulares primarias (Dey y Brinson, 1984; Pauly et al., 1999). Está formado por unidades de D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 4), esta cadena principal de moléculas de glucosa presenta sustituciones de residuos D-xilosa en α -(1 \rightarrow 6), a los cuales pueden estar unidos otros azúcares neutros tales como galactosa, arabinosa y fucosa (Pauly et al., 1999). Los xiloglucanos están unidos a las microfibrillas de celulosa a través de múltiples puentes de hidrógeno, conectando de esta forma la cadena principal del xiloglucano a la superficie de las microfibrillas de celulosa, confiriendo así resistencia a la pared celular (Albersheim et al., 1994).

En cuanto a la matriz péctica, esta interviene principalmente en la porosidad de la pared celular, la adhesión celular y el ambiente iónico (Carpita y Gibeaut, 1993; Jarvis et al., 2003). Está compuesta principalmente por homogalacturonanos, ramnogalacturonanos tipo I y tipo II y arabinogalactanos tipo I y tipo II. El homogalacturonano está formado por cadenas sin ramificar de unidades de ácido D-galacturónico ligados por enlaces α -(1 \rightarrow 4), que pueden estar metilesterificados. El ramnogalacturonano tipo I es un polímero con un esqueleto de residuos alternados de D-galactosa unidos en α -(1 \rightarrow 4) y L-ramnosa unidos en α -(1 \rightarrow 2) (Lau et al., 1985). Numerosas cadenas laterales de residuos de azúcares neutros pueden estar unidas a través de una molécula de ramnosa en las posiciones C4 y/o C3. Las cadenas laterales normalmente están constituidas por arabinanos, galactanos y arabinogalactanos. El ramnogalacturonano tipo II tiene un esqueleto base de ramnogalacturonano con una compleja estructura de ramificaciones de monosacáridos (Stevenson et al., 1988). Su proporción en las paredes celulares vegetales es baja (aproximadamente un 4%) (O'Neil et al., 1996). El arabinogalactano tipo II es más abundante que el tipo I, y a diferencia de este, a menudo está unido a proteínas (proteínas arabinogalactano). Este polisacárido está estructurado en una cadena principal de residuos de D-galactosa unidos por enlaces β (1 \rightarrow 3), con sustituciones de residuos de D-galactosa en β (1 \rightarrow 6). Se pueden unir otros azúcares a estos residuos, incluidos α -L-arabinosa, α -L-ramnosa y ácido β -

D-glucurónico, creando más ramificaciones (Guadalupe et al., 2014; Knoch et al., 2014).

La pared secundaria se forma a partir de la primaria, comienza a aparecer cuando la célula deja de crecer. Es rígida y gruesa y está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina. Su función principal es proporcionar resistencia mecánica a la pared (Carpita y McCann, 2000; Vorwerk et al., 2004). La lignina es un polímero natural heterogéneo, de carácter fenólico, usualmente asociado a la celulosa y la hemicelulosa. Es el segundo en abundancia en las paredes celulares tras la celulosa. Tiene carácter hidrófobo y sus principales funciones son la conducción de savia, soporte mecánico de los órganos de la planta y participa en los mecanismos de defensa de ésta (Boudet, 2000).

Gao et al. (2016) propusieron un modelo que describía la estructura de las paredes celulares de las bayas de uva y las diferentes interacciones entre tejidos y polímeros de la pared celular. Esta estructura estaría dispuesta en capas ricas en hemicelulosa y pectina. Las capas ricas en hemicelulosa de las células de hollejo de uva están asociadas al ramnogalacturonano I, el cual está recubierto con una capa de homogalacturonano altamente esterificado. Por otra parte, las capas ricas en pectina se encuentran tanto en las células del hollejo como de la pulpa. Estas pectinas presentan menor esterificación que las pectinas asociadas a la hemicelulosa (Gao et al., 2019). Esta morfología y la composición de la pared celular puede variar entre las variedades de uva (Apolinar-Valiente et al., 2015; Goulao et al., 2012).

Por último, aunque menos numerosas (aproximadamente el 10%), las proteínas son un constituyente fundamental de las paredes celulares de la uva, como las arabinogalactano proteínas, las extensinas, las proteínas ricas en glicina y las proteínas ricas en prolina (Cassab y Varner, 1988). Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas arabinogalactano son glicoproteínas en la que el arabinogalactano tipo II se une a una proteína rica en hidroxiprolina. El resto de la proteína se une a la estructura del azúcar mediante un enlace (1→4). Esta glicoproteína contiene un alto contenido de galactosa y arabinosa, es más, la porción azúcar en esta molécula constituye la mayor parte de la estructura (más del 90 %) (Fincher et al., 1983; Knoch et

al., 2014). Las proteínas de la pared celular contribuyen a la integridad y firmeza de la baya, ya que participan en la adhesión celular y la unión a los polisacáridos de la pared celular (Goulao et al., 2012).

1.2.2. La pared celular como barrera: problemas de extractabilidad de los compuestos fenólicos

Como se ha comentado anteriormente, los compuestos fenólicos, especialmente los del hollejo, se encuentran dentro de las células, en estructuras como las vacuolas o, en algunos casos, directamente ligados a los polisacáridos de la pared celular (como ocurre con parte de los taninos de hollejo de la uva). En el proceso de vinificación, particularmente durante la maceración, las paredes celulares sufren modificaciones que permiten la migración de parte de los taninos y antocianos al mosto/vino (Busse-Valverde et al., 2012). El tipo de compuesto fenólico, su localización en la uva y las técnicas que se hayan utilizado durante la vinificación determinan la velocidad y el grado de extracción de dicho compuesto. Asimismo, los compuestos de las semillas también son extraídos durante la maceración, aunque previamente es necesario una solubilización de la capa protectora que poseen las semillas.

Se han observado diferentes cinéticas de extracción para los antocianos y taninos del hollejo y los taninos de las semillas. Los antocianos difunden siguiendo un modelo exponencial en dos fases, con un incremento inicial 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 et al., 2005).

Los taninos del hollejo comienzan a solubilizarse al inicio de la maceración junto a los antocianos (Klenar et al., 2004) y suelen mostrar un ritmo de extracción sigmoidea hasta que su extracción se estabiliza (Casassa et al., 2013; Gambuti et al., 2009). Los taninos de semilla se extraen más lentamente,

acelerándose su ritmo hacia la mitad de la fermentación, cuando la cantidad de alcohol en el medio es más alta y los lípidos de las semillas desaparecen (Glories y Saucier, 2000; Romero-Cascales, 2008).

Ya se ha indicado que para que se produzca la extracción de los compuestos fenólicos al mosto/vino es necesaria la ruptura de la pared celular vegetal. Las paredes celulares son una barrera que dificulta la extracción de los compuestos fenólicos presentes en la uva (Vidal et al., 2001). Por tanto, su grado de degradación será otro factor clave que determinará el grado de extracción de estos compuestos y su contenido final en el vino (Apolinar-Valiente, 2012). La experiencia ha mostrado que existen grandes diferencias en la facilidad de extracción de antocianos y taninos entre variedades, y dentro de una variedad, entre momentos diferentes de la maduración, lo cual se ha asociado a diferencias en la estructura y/o composición de las paredes celulares (Bautista-Ortín et al., 2016; Ortega-Regules et al., 2008). Existen diversos estudios que han demostrado este hecho. Por ejemplo, en etapas tempranas de maduración de la uva, se ha demostrado que la extractabilidad de los antocianos y taninos del hollejo es baja, aumentando al mismo tiempo que incrementa la despectinación de las paredes celulares asociada a la maduración (Garrido-Bañuelos et al., 2019; Hernández-Hierro et al., 2012; Hernández-Hierro et al., 2014; Hernández-Jiménez et al., 2012). Las semillas de uva desarrollan cambios estructurales durante la maduración de la baya, fundamentalmente una lignificación intensiva que endurece la semilla. Estos cambios dificultan la extracción de taninos ya que hacen que el tegumento interno de la semilla sea menos accesible y, por lo tanto, éstos sean menos extraíbles (Bautista-Ortín et al., 2012; Casassa, 2017).

Desde el punto de vista varietal, las diferencias en la morfología o composición de la pared son las responsables de las diferencias en extractabilidad de los compuestos fenólicos. En el trabajo de Romero-Cascales et al. (2005) se estudió la extractabilidad de antocianos de cuatro variedades de uva: Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah y Monastrell, comparando la concentración de antocianos de la uva inicial y en el vino resultante. Este estudio puso en manifiesto que la uva Monastrell presentó la mayor concentración de antocianos, sin embargo, su extractabilidad fue menor que la de las otras tres variedades, a pesar de que éstas tenían menor concentración inicial de

antocianos en la uva. Ortega-Regules et al. (2006) mostraron que el grosor o la densidad de la pared celular, así como el número de capas celulares del hollejo de la uva y su morfología, podría influir en la extracción de antocianos, ya que es una barrera para los compuestos ubicados dentro de las células.

Está claro que durante la maceración se requiere que se rompan las paredes celulares para que se extraigan los compuestos de las vacuolas, y, por lo tanto, dos de los factores que condicionarán su presencia en el vino serán la cantidad de estos compuestos en el hollejo en el momento de la vendimia y la facilidad o dificultad de su extracción, lo cual está determinado, como se ha comentado, por la degradación de la pared celular. A medida que la uva madura, los componentes de la pared celular evolucionan como consecuencia de varias reacciones hidrolíticas y enzimáticas, lo que conduce a una desesterificación y despolimerización de los polisacáridos (Garrido-Bañuelos et al., 2019; Zietsman et al., 2015a). El ablandamiento de la uva durante su maduración está relacionado con una degradación y solubilización de los polisacáridos de la pared celular y un aumento en el contenido de proteínas (Goulao et al., 2012). Estos cambios estructurales conducen a un aumento de la porosidad del hollejo y su selectividad (Bindon et al., 2014; Castro-López et al., 2016).

A los cambios que sufre la pared celular durante la maduración se le suma la degradación a la que es sometida desde que comienza el proceso de vinificación. Todos estos factores influyen positivamente en la extracción de los compuestos fenólicos al mosto/vino. Sin embargo, los restos de paredes celulares que permanecen en suspensión durante la maceración del vino constituyen un problema adicional no reportado hasta hace pocos años y en el cual se centrará el estudio realizado en esta Tesis Doctoral.

1.3. INTERACCIONES ENTRE COMPONENTES DE LA PARED CELULAR Y COMPUESTOS FENÓLICOS. PAPEL EN LA VINIFICACIÓN

Algunos estudios realizados tanto en soluciones modelo como en vinificaciones reales han demostrado que determinados compuestos fenólicos

tienen gran afinidad por los polisacáridos de las paredes celulares y son susceptibles de unirse tanto a los procedentes del hollejo como a los de la pulpa de la uva. En el caso de vinificaciones reales, estas paredes celulares se encuentran, en concentración apreciable, en suspensión en el mosto/vino durante la maceración. Parte de los compuestos fenólicos extraídos podrían formar complejos con las paredes celulares en suspensión. Estos complejos, de formarse, poseerían elevados pesos moleculares y serían insolubles, lo que provocaría su precipitación en etapas posteriores del proceso de vinificación, disminuyendo, por tanto, la concentración final de los compuestos fenólicos en los vinos.

La afinidad entre polisacáridos de la pared celular vegetal y los polifenoles de la uva está determinada tanto por la estructura y composición de ambas moléculas, además de la proporción entre sus concentraciones y las condiciones ambientales o factores extrínsecos en las que se produzca la interacción como, por ejemplo, el pH, la temperatura o etanol (Bautista-Ortín et al., 2014; Bautista-Ortín et al., 2016; Bindon y Kennedy, 2011; Fernandes et al., 2014; Gonçalves et al., 2012; Le Bourvellec et al., 2004; Le Bourvellec et al., 2005; Le Bourvellec y Renard, 2005; Phan et al., 2016; Renard et al., 2017; Watrelot et al., 2013). Las interacciones que se producen entre los polisacáridos de la pared celular y los polifenoles de la uva son enlaces no covalentes, principalmente puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas (Medina-Plaza et al., 2020; Renard et al., 2017).

1.3.1. Interacciones según el tipo de compuesto fenólico

1.3.1.1. Antocianos

Existen numerosos estudios que demuestran la existencia de interacciones entre antocianos y los polisacáridos de paredes celulares, tanto en antocianos y polisacáridos procedentes de uva como de otros vegetales. En el estudio de Fernandes et al. (2014), dos antocianos (cianidina-3-O-glucósido y delfinidina-3-O-glucósido) se hicieron interactuar con pectinas cítricas, mostrando que la delfinidina-3-O-glucósido, la cual posee 3 grupos -OH, tiene

una afinidad mucho mayor que la cianidina-3-O-glucósido (con 2 grupos -OH) con la pectina. Los resultados de este estudio sugieren el importante papel de los grupos hidroxilo en las interacciones entre antocianos y pectinas, posiblemente a través de puentes de hidrógeno. Dichos puentes de hidrógeno se producían entre los grupos hidroxilo de los pigmentos y los átomos de oxígeno de los enlaces éter reticulados de los azúcares presentes en los polisacáridos de las paredes celulares, así como interacciones hidrófobas (Medina-Plaza et al., 2019). Además, también ha sido probada la existencia de interacciones más fuertes (interacciones coulómbicas) entre la antocianina y la red de celulosa/pectina del material de la pared celular (Padayachee et al., 2012a).

En el estudio de Padayachee et al. (2012b) se encontró que los antocianos interactúan tanto con la celulosa como con la pectina, en un proceso de dos etapas, en el que aproximadamente del 13-18% de los antocianos se unen inicialmente a los polisacáridos y tras una exposición prolongada (días-semanas) se produce un aumento gradual de los antocianos que han interactuado con los polisacáridos. Estos autores explican que en esta segunda etapa los antocianos posiblemente se apilan sobre una capa base. La unión de antocianos acilados y no acilados siguió un patrón similar, aunque hubo mayor interacción de las formas aciladas. Los resultados del estudio de Padayachee et al. (2012b) sugieren que la naturaleza de las interacciones entre antocianos y pectinas es de carácter iónico mientras que las interacciones entre antocianos y celulosa son hidrófobas.

En el estudio de Gonçalves et al. (2012), los antocianos acilados con restos cumaril y acetilo mostraron una unión más fuerte con el material polimérico del vino (mezcla de polisacáridos y manoproteínas de vino tinto) en comparación con los antocianos no acilados, lo cual sugirió que las interacciones entre los antocianos del vino y este material polimérico eran posiblemente de carácter hidrófobo. Se puede considerar que las interacciones entre antocianos y polisacáridos procedentes de paredes celulares vegetales son muy complejas, dependen de las características químicas de ambas partes y pueden ser de carácter iónico (puentes de hidrogeno) y/o de carácter hidrófobo.

En el trabajo de Medina-Plaza et al. (2020) se estudió la influencia del etanol y la temperatura en la adsorción y desorción de antocianos de las paredes

celulares de la uva. Sus resultados indican que más del 90% de la adsorción ocurre en los primeros 60 minutos de la adición de los antocianos a las paredes celulares. Sin embargo, la desorción parece ocurrir mucho más rápido, alcanzándose la desorción máxima después de 30 min. El grado de adsorción y desorción dependía claramente no solo de la temperatura y la concentración de etanol, sino también de la composición de la pared celular y el tipo de antociano. La polaridad de los antocianos pareció ser importante ya que las moléculas más polares mostraron un mayor porcentaje de adsorción. En cambio, la desorción estuvo influenciada principalmente por la temperatura y la concentración de etanol, las cuales aumentaron la tasa de desorción.

1.3.1.2. Taninos

En cuanto a los taninos, existen numerosos estudios que demuestran la existencia de sus interacciones con las paredes celulares. La mayoría de estos estudios se han desarrollado en soluciones que simulan la composición del vino (soluciones modelo), utilizando paredes celulares purificadas de la pulpa y el hollejo puestas en contacto con estos compuestos. En todos ellos se ha demostrado que las paredes celulares eran capaces de retirar una proporción significativa de taninos de la solución (Bindon et al., 2010a; Bindon et al., 2010b; Bindon et al., 2017; Castro-López et al., 2016). El estudio de Watrelot et al. (2013) mostró que la intensidad de la interacción entre las procianidinas y diferentes tipos de pectinas dependía de factores estructurales de las procianidinas, incluidos el tamaño, la forma, la movilidad y su flexibilidad conformacional.

Además, este fenómeno no solo se produce en la uva. En estudios de adsorción entre taninos y las paredes celulares del mesocarpio de la manzana se determinó que el grado de unión de los taninos no es proporcional a los sitios de unión de la pared celular disponibles. Se ha descrito que existe un mecanismo dual en el que los taninos se unen a las paredes celulares por puentes de hidrogeno y/o enlaces hidrófobos y luego, estos taninos interactúan mediante puentes de hidrógeno secundarios con otros taninos para aumentar su

asociación con el material de la pared celular (Le Bourvellec et al., 2004; Renard et al., 2001).

Los estudios de adsorción de taninos de semilla y hollejo con paredes celulares de pulpa y hollejo de uva llevados a cabo por Bindon et al. (2010a) mostraron que al comparar la distribución de la masa molecular de los taninos del hollejo o la semilla antes y después de su contacto con las paredes celulares su afinidad para interactuar aumentó con el incremento de la masa molecular del tanino y su porcentaje de galoilación. Existen diversos estudios que muestran que a mayor porcentaje de galoilación, la afinidad por las paredes celulares aumenta (Bautista-Ortín et al., 2014; Le Bourvellec y Renard, 2005; Renard et al., 2017).

En la bibliografía se ha demostrado consistentemente que el peso molecular de los taninos aumenta su afinidad por las paredes celulares de diferente naturaleza (Bautista-Ortín et al., 2014; Beaver et al., 2020; Bindon y Kennedy, 2011; Castro-López et al., 2016; Le Bourvellec y Renard, 2005; Renard et al., 2001; Watrelot et al., 2013). Los taninos poseen en su estructura múltiples puntos de unión simultánea con las paredes celulares, variable según el tipo de tanino y su tamaño (Baxter et al., 1997). Por lo tanto, los taninos de mayor tamaño cuentan con más sitios de unión para interactuar con los polisacáridos de la pared. La única excepción es el estudio de Bindon et al. (2012) donde se encontró una relación negativa significativa para la masa molecular promedio de los taninos y el grado de adsorción por el material de la pared celular de la piel, indicando que a medida que aumentaba la polimerización de los taninos durante la maduración, disminuía su afinidad por el material de la pared celular de la piel. Sin embargo, esta disminución de la adsorción asociada con la mayor polimerización de los taninos solo la presentaron las paredes celulares procedentes de la piel de la uva, las procedentes de la pulpa continuaron presentando altos niveles de adsorción de taninos poliméricos. La oxidación de los taninos también aumentó su unión a las paredes celulares.

En el estudio de Beaver et al. (2020), no se observó que el material de la pared celular adsorba preferentemente taninos derivados del hollejo sobre taninos derivados de semillas o viceversa, ya que las variaciones encontradas en el porcentaje de galoilación (catequina galato y epicatequina galato) y

porcentaje de unidades trihidroxiladas (galocatequina y epigalocatequina) no fueron significativas. En el estudio de Bindon et al. (2010a) también se menciona que no hay una preferencia clara entre los taninos procedentes del hollejo o de las semillas a la hora de interactuar con las paredes celulares. Que no se observe una afinidad clara hacia un tipo de tanino específico puede deberse a que el peso molecular y el porcentaje de galoilación son las dos características clave de los taninos que los hace más susceptibles a interactuar con las paredes celulares. Ya que los taninos de hollejo tienen pesos moleculares más elevados que los de semilla, pero los de semilla tienen mayor porcentaje de galoilación que los de hollejo.

En el trabajo de Beaver et al. (2020) se estudió cómo afecta la temperatura y concentración de etanol a la cinética de adsorción de taninos por parte de las paredes celulares y estos autores encontraron una correlación negativa entre la adsorción de taninos, la temperatura y la concentración de etanol. Sin embargo, en este estudio no se encontró una correlación perceptible entre la temperatura o la concentración de etanol y el porcentaje de galoilación de los compuestos adsorbidos, pero sí que observaron una adsorción preferencial de los taninos de mayor peso molecular en todas las condiciones estudiadas.

1.3.2. Influencia de la composición de la pared celular en las interacciones con los compuestos fenólicos

Uno de los factores que determinan la afinidad entre los compuestos fenólicos y la pared celular es la naturaleza de los componentes de éstas.

En el estudio de Le Bourvellec et al. (2005) donde se llevaron a cabo ensayos de afinidad entre taninos y polisacáridos (constituyentes de las paredes celulares vegetales de forma natural) se reveló que la afinidad de los taninos es mayor por la pectina, seguida por el xiloglucano, y la más baja por la celulosa. Las constantes de afinidad más altas observadas para las pectinas se atribuyen a la formación de una red similar a un gel tridimensional, el cual permite la encapsulación de taninos dentro de la estructura del polisacárido (Le Bourvellec y Renard, 2005). En el estudio de Renard et al. (2017) se demostró que las

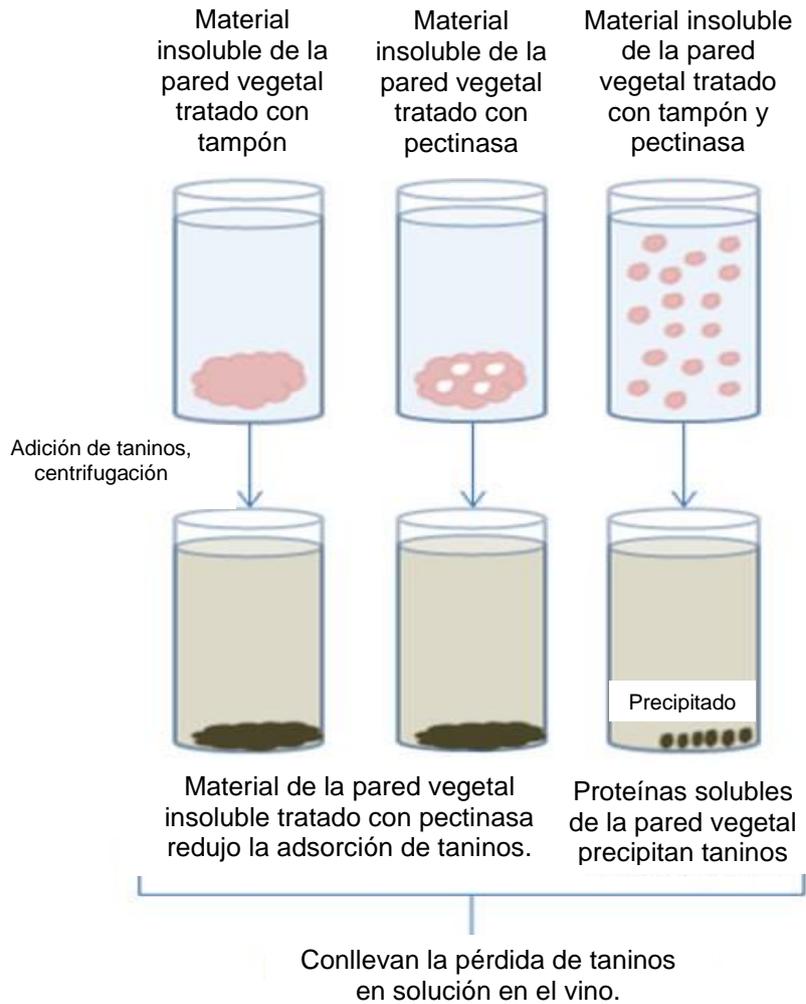
interacciones entre taninos y pectinas parecen estar influenciadas también por el grado de metilación del homogalacturonano, componente principal de las pectinas que forman la pared celular. Otros estudios muestran que polisacáridos de elevado peso molecular como las manoproteínas son capaces de formar grandes agregados con taninos, mientras que los polímeros de arabinogalactanos solo forman uniones débiles con taninos de semilla de uva (Li et al., 2019).

Bindon et al. (2012) demostraron que la correlación entre el tamaño de los taninos y su afinidad por las paredes celulares dependía de la procedencia de éstas. En este estudio se mostró que los cambios que se producen en la uva durante el envero generan un aumento en la masa molecular de los taninos, lo cual afectó negativamente a su afinidad con el material de la pared celular del hollejo, no observando el mismo comportamiento con la pared celular de la pulpa. Las paredes celulares de la pulpa tienen invariablemente una alta capacidad de adsorción de taninos, en particular por aquellos de mayor masa molecular (Bindon et al., 2010a). Por lo tanto, la procedencia de las paredes celulares determina indudablemente su capacidad de unión a los taninos. Según el estudio de Bindon et al. (2012), las paredes de las células de la pulpa se unen consistentemente a una mayor cantidad de taninos que los del hollejo. Las diferencias estructurales clave entre ambos tipos de paredes celulares que provocaron la reducción de la adsorción de taninos por parte de las paredes celulares del hollejo fueron su concentración endógenamente más alta de taninos fuertemente ligados, lignina Klason y menor cantidad de proteína unida a la pared celular. Estas diferencias pueden reducir la flexibilidad y porosidad de las paredes de las células del hollejo en relación con las paredes de las células de la pulpa.

Durante la maduración de la uva, se producen cambios estructurales en las paredes celulares del hollejo y pulpa de uva que modifican su capacidad de interactuar con los taninos. El inicio de la maduración está asociado con una pérdida de arabinogalactano tipo I y ácido galacturónico en las paredes celulares de las dos procedencias, hecho indicativo de la degradación de la pectina dentro de la pared celular. Las paredes de las células de la pulpa apenas presentaron cambios en las propiedades de adsorción de taninos después del inicio de la

maduración. Sin embargo, a medida que avanzaba la maduración, las paredes celulares del hollejo adsorbían selectivamente taninos de mayor masa molecular, lo que indica que la remodelación continua de la pared celular durante la maduración puede conferir una mayor porosidad a la pared celular del hollejo, lo que resulta en una mayor adsorción de taninos dentro de una estructura permeable (Bindon et al., 2012).

En el estudio de Bindon et al. (2016) se demostró que no solo el material insoluble que forma la estructura de las paredes celulares del hollejo y la pulpa es capaz de interactuar con compuestos fenólicos como los taninos, sino que el material soluble producido, por ejemplo, por la acción de una pectinasa, (endógena o exógena) también es capaz de interactuar y precipitar con taninos (Figura 4). Este enzima produce una despolimerización significativa de las paredes celulares de hollejo y pulpa de uva, con una solubilización de polisacáridos de bajo peso molecular ricos en ramnogalacturonano. Sin embargo, en este estudio se determinó que la composición del material solubilizado no era la misma según su procedencia, habiendo una solubilización destacada de proteína en las paredes celulares de la pulpa. El tratamiento con enzimas redujo significativamente la adsorción de taninos por las paredes celulares insolubles, pero solo si se elimina el material solubilizado de las paredes celulares de la uva. Aunque la proteína es un componente menor en términos de concentración total en comparación con los polisacáridos en las paredes celulares, en este estudio las pérdidas de taninos por precipitación con proteínas fueron del orden del 50 %. Por lo tanto, no solo los polisacáridos de las paredes celulares son clave para estudiar las interacciones polifenol-pared celular, sino también lo son las proteínas.



. **Figura 4.** Ensayos de adsorción de taninos por el material soluble e insoluble de las paredes celulares de pulpa y el hollejo de uva (Bindon et al., 2016).

1.4. APLICACIÓN DE TÉCNICAS PARA LIMITAR LAS INTERACCIONES ENTRE PAREDES CELULARES Y COMPUESTOS FENÓLICOS Y/O LIBERAR LOS COMPUESTOS LIGADOS

Habiendo sido demostrado en disoluciones modelo que una parte importante de compuestos fenólicos pueden quedar adsorbidos en el material pared celular durante la vinificación, se han investigado técnicas para que este fenómeno no sea un factor limitante en la concentración de antocianos y taninos en los vinos. Unas técnicas han sido estudiadas con el objetivo de limitar las interacciones entre las paredes celulares y los compuestos fenólicos, es decir,

evitar en cierta medida la adsorción de polifenoles y de esta forma evitar su pérdida por precipitación durante la vinificación, para conseguir así, un incremento potencial de compuestos fenólicos en el vino y otras para solucionar el problema de la pérdida de compuestos fenólicos provocada por la adsorción de las paredes celulares, es decir, para favorecer su desorción. Esto podría llevarse a cabo antes de la precipitación de los complejos pared celular-polifenol, o cuando ya se ha producido esta precipitación, lo que en una vinificación real sería intervenir sobre las lías formadas.

1.4.1. Uso de enzimas que degradan la pared celular

Los componentes estructurales por los que está formada la pared celular de la uva pueden ser degradados por diferentes enzimas. Los enzimas son proteínas naturales que poseen actividad catalítica e incrementan la velocidad de reacciones bioquímicas específicas. Generalmente cada enzima tiene un sustrato específico y trabaja en una sola dirección de la reacción. Los enzimas que degradan la pared celular vegetal pueden ser de origen vegetal o microbiano. En ocasiones, varios de estos enzimas pueden trabajar de forma sinérgica para obtener una mayor degradación de la pared (Apolinar-Valiente, 2012). Si se produce una degradación de los polisacáridos constitutivos de la pared celular, podría limitarse la adsorción de polifenoles.

1.4.1.1. Celulasas

La celulasa es un complejo enzimático formado por celobiasa o β -glucosidasa y endo- y exo-glucanasa. La celulosa es abundante en las paredes primaria y secundaria. En la pared primaria, las cadenas lineales de celulosa están unidas formando microfibrillas, las cuales están cubiertas por glucoarabinanos y xiloglucanos unidos fuertemente (McCann et al., 1990).

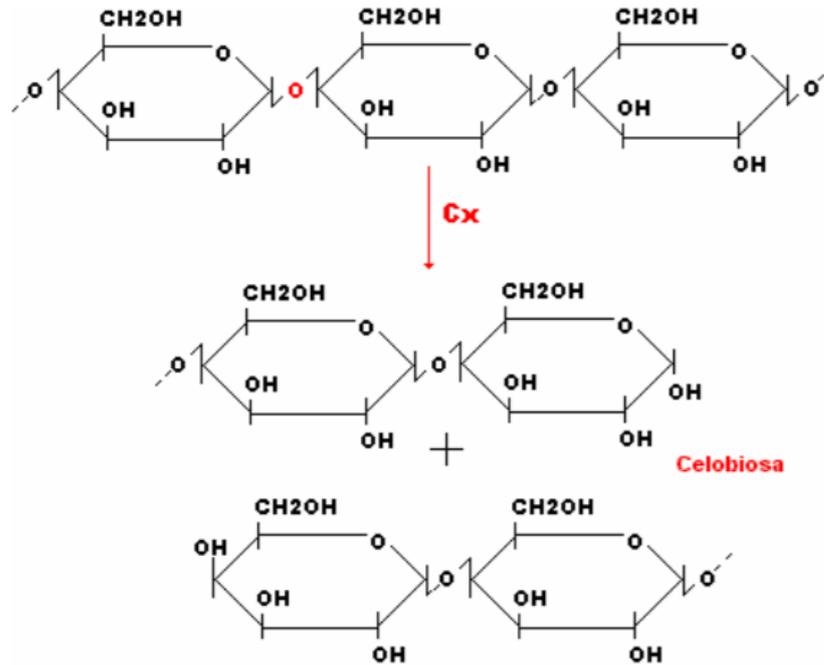


Figura 5. Actividad endo-glucanasa (Ríos-Alzate y Arias-Vargas, 2002).

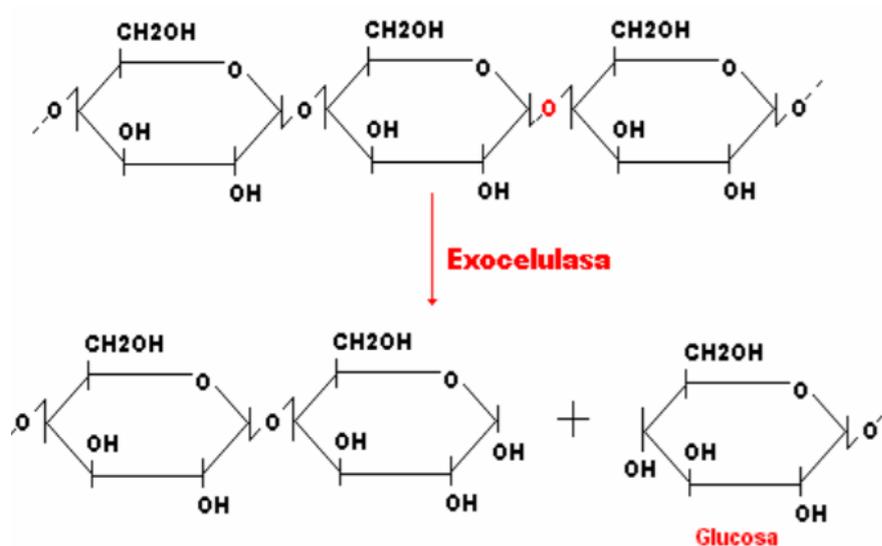


Figura 6. Actividad exo-glucanasa (Ríos-Alzate y Arias-Vargas, 2002).

La acción de las celulasas producirá una disminución de la cohesión de las fibras de celulosa cerca de la lámina media, lo cual reducirá la densidad de la pared celular (Figuras 5 y 6). James et al. (1999) demostraron que la actividad celulasa puede verse favorecida por la presencia de poligalacturonasas y hemicelulasas, mostrando un efecto sinérgico entre éstas, ya que el acceso de

la celulosa a las microfibrillas de celulosa queda parcialmente restringido por la matriz péctica de la pared primaria (Zietsman et al., 2015b).

1.4.1.2. Hemicelulasas

Las hemicelulasas son un conjunto muy variado de enzimas, que deben actuar en combinación para degradar la hemicelulosa. Esto se debe a la gran heterogeneidad de la estructura química de estos polisacáridos (Apolinar-Valiente, 2012; Romero-Cascales, 2008). En consecuencia, existen muchos enzimas implicados en la degradación de las hemicelulosas. Las arabinasas (endo, A y B) degradan los arabinanos actuando de forma conjunta (Parley, 1997). La endo- y exo-galactasas las cuales actúan rompiendo uniones β -(1 \rightarrow 6) y β -(1 \rightarrow 3) de la cadena de galactano (Okemoto et al., 2003; Pellerin y Brillouet, 1994). La endo-glucanasa corta los enlaces glucosilo β -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 4) de los xiloglucanos. Otros enzimas considerados hemicelulasas son la xilanasa o endo-1,4- β -xilanasa. Se considera xilanasa a cualquier clase de enzima que degrada el polisacárido lineal xilano en xilosa.

1.4.1.3. Pectinasas

Son un conjunto de enzimas que pueden degradar la matriz péctica de las paredes celulares. Las pectinasas se pueden clasificar en función del mecanismo de degradación de las pectinas. Por un lado, las pectín estererasas catalizan la desesterificación de las sustancias pécticas, mientras que los enzimas despolimerizantes catalizan la escisión del enlace glicosídico α -(1 \rightarrow 4) de la cadena de galacturonano de la molécula de pectina (Figura 7). Los enzimas despolimerizantes pueden clasificarse a su vez en función del mecanismo de ruptura de los enlaces glicosídicos (Romero-Cascales, 2008).

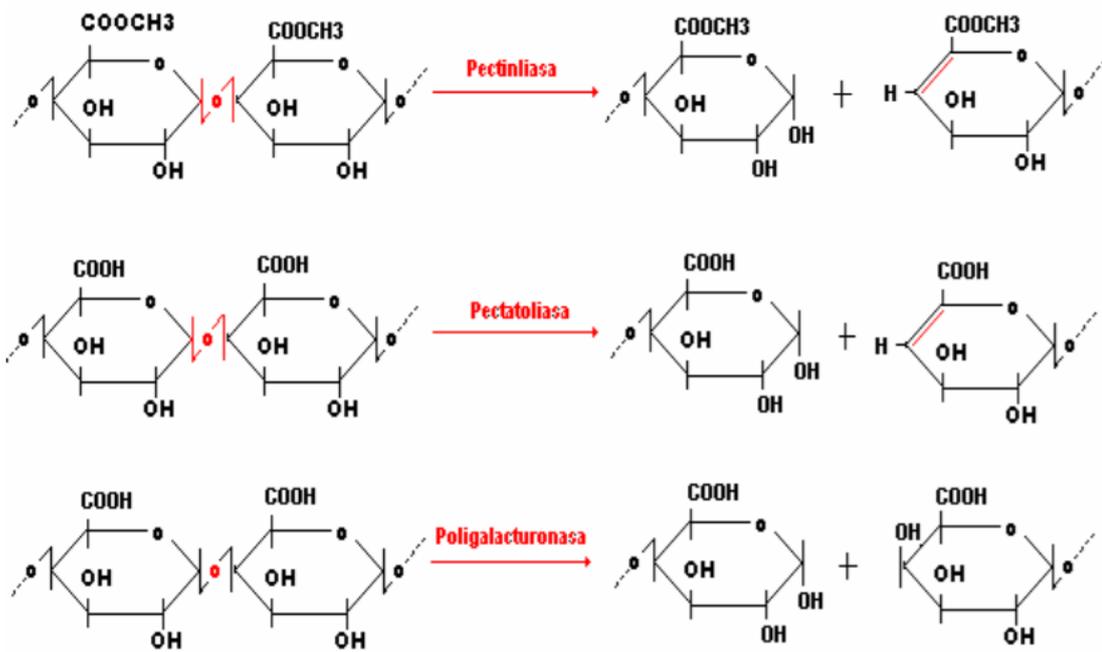


Figura 7. Actividad enzimática de pectinasas despolimerizantes (Ríos-Alzate y Arias-Vargas, 2002).

Las poligalacturonasas, son enzimas que hidrolizan el enlace α -(1 \rightarrow 4) glicosídico que une las unidades de ácido galacturónico no esterificado de los homogalacturomananos. Este enzima descompone las principales estructuras de pectina que forman las paredes celulares de la uva (Fischer y Bennett, 1991). Degrada la pared primaria y la lámina media cuando actúa en conjunto con pectinmetilesterasas.

Las pectinmetilesterasas catalizan la hidrólisis del éster metílico de homogalacturomananos (Figura 8). La desesterificación de las pectinas permite la despolimerización producida por la poligalacturonasa (Amrani-Joutei et al., 2003).

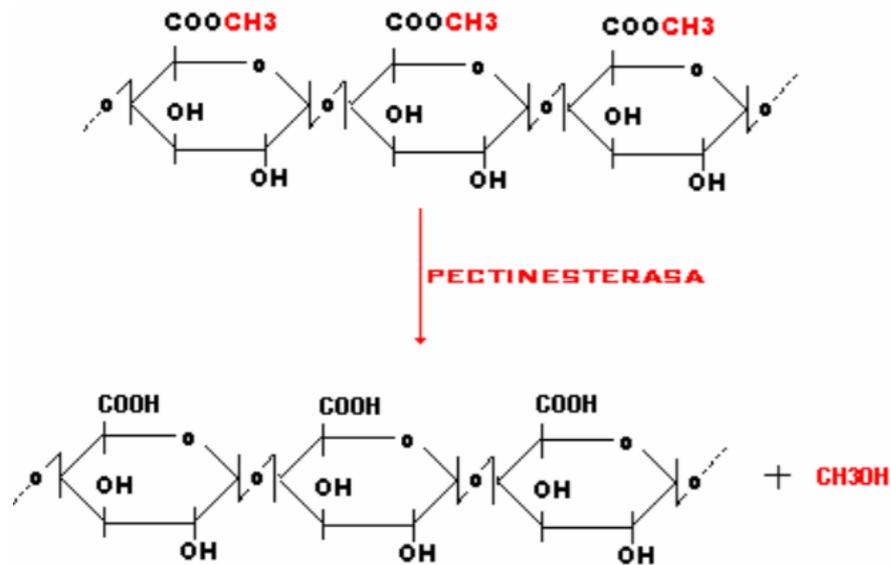


Figura 8. Actividad pectinmetilesterasa (Ríos-Alzate y Arias-Vargas, 2002).

La pectato liasa y la pectín liasa rompen los enlaces glicosídicos por eliminación β (Figura 7), estos enzimas actúan sobre pectinas de elevado grado de esterificación, produciendo un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 de la molécula del ácido galacturónico del extremo reductor. Por lo tanto, la actividad de la pectín liasa depende en gran medida del grado de metoxilación del sustrato, y también de la distribución del éster metílico, ya que las pectín liasas prefieren los enlaces entre unidades ácido galacturónico metoxiladas (Zeuner et al., 2020).

1.4.1.4. Uso de enzimas para limitar la interacción de paredes celulares y compuestos fenólicos o favorecer su desorción

Ciertos enzimas hidrolíticos son utilizados comúnmente en vinificaciones para degradar los polisacáridos de la pared celular de la uva, con el objetivo de acelerar la liberación de compuestos fenólicos presentes en la piel al mosto/vino, son los llamados enzimas de maceración (Romero-Cascales et al., 2008; Romero-Cascales et al., 2012). Estudios previos han reportado que estos enzimas pueden limitar la retención de taninos por las paredes celulares de la uva mediante la eliminación de polisacáridos pécticos ricos en ácido galacturónico (Bautista-Ortín et al., 2016; Castro-López et al., 2016). En el

estudio de Castro-López et al. (2016) se observó una limitada reducción de la adsorción de taninos por parte de las paredes celulares. Concretamente, el enzima de maceración comercial consiguió reducir un 6% la adsorción de taninos por parte de las paredes de las células del hollejo de uva madura y alrededor de un 20% por las paredes celulares del hollejo de uva inmadura. Por lo tanto, los primeros estudios realizados mostraron que la capacidad de los enzimas hidrolíticos para limitar la adsorción de taninos por las paredes celulares es bastante baja, especialmente en uvas maduras.

El estudio de Zietsman et al. (2015b) muestra que la despolimerización de las paredes celulares puede ser más eficaz si se utilizan varios enzimas de forma secuencial en lugar de adicionarlos todos al mismo tiempo tal como se hace en bodegas, donde se adicionan los enzimas en forma de cocktail enzimático. La utilización secuencial de los enzimas de maceración, comenzaría con la hidrólisis enzimática de las pectinas, lo cual "desenmascararía" la red central celulosa-hemicelulosa, y de esta forma las celulasas y hemicelulasas tendrían mejor acceso a red de celulosa y la hemicelulosa que componen la pared celular, permitiendo una mayor degradación.

La falta de efectividad de los enzimas a la hora de reducir la adsorción de polifenoles por parte de las paredes celulares de uva, puede ser debida a dos causas: o bien, no se han utilizado los enzimas de forma correcta y las paredes celulares no han perdido suficientemente su capacidad de interactuar con polifenoles o el resultado de la acción de los enzimas, provoca una liberación de polisacáridos solubles derivados de la degradación de la pared al medio y esto podría constituir un problema similar al que muestran las propias paredes celulares. Por lo tanto, la solución a buscar sería conseguir un equilibrio, entre la degradación de la pared (que evite o reduzca su capacidad de interactuar) y la liberación de polisacáridos solubles que, o bien no interactúen de nuevo con los polifenoles o bien que formen agregados solubles.

Existe otra posible aplicación de estos enzimas para resolver el problema derivado de las interacciones entre paredes celulares y compuestos fenólicos. Una vez que las interacciones entre las paredes celulares y los compuestos fenólicos se han producido, y se han formado los complejos insolubles de elevado peso molecular, la aplicación de los enzimas en este punto podría

suponer la liberación de los compuestos fenólicos adsorbidos, bien liberando los polifenoles por la degradación del polisacárido estructural de la pared celular al que está unido, o bien promoviendo una reducción por vía enzimática del peso molecular del polisacárido y, aunque no se rompa la unión con el polisacárido, el complejo que forma sea soluble tras la aplicación del enzima.

1.4.2. Uso de polisacáridos solubles para reducir la adsorción de compuestos fenólicos por las paredes celulares de la uva

Como ya se ha mencionado anteriormente, los polisacáridos estructurales de la pared celular tienen la capacidad de interactuar con compuestos fenólicos a través de mecanismos bien conocidos que se han estudiado en uva y otras plantas. Se ha demostrado que los puentes de hidrógeno y, sobre todo, las interacciones hidrofóbicas son las principales asociaciones que ocurren entre los compuestos fenólicos y los polisacáridos de la pared celular, mientras que la fuerza de tales interacciones depende de la estructura y conformación tanto de los compuestos fenólicos como de los componentes de la pared celular (Le Bourvellec et al., 2005; McMannus et al., 1985). Por ejemplo, Ruiz-García et al. (2014) demostraron que la fracción péctica de las paredes celulares presenta la mayor capacidad de unión a los taninos y que, al eliminar esta fracción de las paredes celulares con un agente quelante, la interacción con los taninos se reducía significativamente. Además de los polisacáridos pécticos, la hemicelulosa presente en las paredes celulares también tiene una alta capacidad de adsorción, aunque menor que la pectina. Le Bourvellec et al. (2005) determinaron que las constantes de afinidad aparente para polifenoles obtenidas para diferentes polisacáridos puros fueron las siguientes: pectina >> xiloglucano > almidón > celulosa. En este estudio explican que la pectina al ser un polisacárido que tiene la capacidad de desarrollar una red similar a un gel puede formar bolsas hidrófobas capaces de encapsular taninos, mientras que los polisacáridos filamentosos y globulares, como la celulosa y el xiloglucano, forman uniones más débiles con los taninos que la pectina.

Ya que no solo los polisacáridos que forman parte de las paredes celulares muestran afinidad por los compuestos fenólicos, dirigimos nuestra atención a un estudio previo de Renard et al. (2001) en el que se llevaron a cabo pruebas de adsorción entre paredes celulares de la manzana y taninos en una solución hidroalcohólica similar a un vino. En un intento por desorber los taninos ligados a los polisacáridos de las paredes celulares, se lavaron los complejos con soluciones modelo a las que se les había agregado polisacáridos solubles, observando una mayor liberación de taninos que en ausencia de estos polisacáridos, probablemente debido a la competencia entre los polisacáridos de las paredes celulares y los polisacáridos solubles en la solución. Estos complejos polisacáridos solubles-polifenoles podrían ser solubles y mantener a los taninos en la solución.

En enología, solo el uso de manoproteínas como polisacáridos solubles ha sido una práctica común durante mucho tiempo. Sus principales beneficios han sido limitar la formación de complejos insolubles de tanino-proteína (Mateus et al., 2004), lo cual tiene un impacto positivo en la sensación en boca del vino (Chong et al., 2019), además de mejorar la estabilización de polifenoles (Apolinar-Valiente et al., 2019). A modo de ejemplo, las manoproteínas, glicoproteínas presentes fundamentalmente en las paredes celulares de las levaduras, se han utilizado tradicionalmente en los vinos acabados para estabilizar los taninos del vino, aunque se pueden encontrar resultados contradictorios en la literatura (Guadalupe y Ayestarán, 2008; Guadalupe et al., 2010), probablemente debido a la presencia de una fracción proteica de la molécula de las manoproteínas.

1.4.3. Uso de ultrasonidos de alta potencia (US)

En los últimos años se han desarrollado diversas tecnologías emergentes que se están aplicando en la elaboración de vino con el objetivo de incrementar la extracción de compuestos fenólicos durante la maceración. Una de ellas son los campos eléctricos pulsados de alta intensidad, los cuales producen la electroporación de las células del hollejo de la uva, aumentando la extracción de polifenoles (López et al., 2008a, 2008b; Puértolas et al., 2010). Otra de las

tecnologías emergentes más interesantes para la vinificación son los ultrasonidos de alta potencia.

Los ultrasonidos de alta potencia (US) se han introducido en la industria enológica por su capacidad para extraer sustancias de interés del interior de las células de la uva. Esta tecnología se basa en el uso de ondas mecánicas de 16 a 100 kHz para producir cambios físicos y químicos en la matriz donde se aplican (Ferraretto et al., 2013), a través del fenómeno de cavitación. La cavitación es la formación y colapso de burbujas producidas por los movimientos involucrados en la compresión y expansión de las moléculas de un líquido (matriz en la que se aplica el tratamiento), provocado por las ondas ultrasónicas. La implosión de las burbujas cerca de las paredes celulares provoca una serie de efectos que pueden ser físicos y/o químicos. El principal efecto químico es la generación de radicales -OH que pueden oxidar algunas moléculas (Kentish y Ashokkumar, 2011). Por otra parte, uno de los efectos físicos que producen los US es la fuerza de cizallamiento generada por el movimiento relativo entre las moléculas del líquido cuando la burbuja colapsa lo que provoca la ruptura de las células (Grönroos et al., 2004), mejorando la salida de los compuestos fenólicos desde el interior. Tanto los efectos químicos como los físicos podrían afectar a la estructura y composición de las paredes celulares y, por lo tanto, aumentar la extracción de compuestos fenólicos del interior de las células del hollejo.

Existen diversos estudios en los que se han utilizado US con diversos objetivos. Tao et al. (2014) extrajeron polifenoles de orujos de uva mediante ultrasonidos de alta potencia. Ghafoor et al. (2009) y Ghafoor y Choi (2009) extrajeron compuestos fenólicos de semillas y hollejo de uva utilizando diferentes tiempos de tratamiento con ultrasonidos, disolventes y temperaturas. También se han aplicado ultrasonidos en la maceración fermentativa de vino (Bautista-Ortín et al., 2017). En este estudio se utilizaron ultrasonidos para reducir el tiempo de maceración de vinos tintos de la variedad Monastrell. La mayor y más rápida extracción de compuestos fenólicos permitió reducir el tiempo de maceración sin perjudicar la composición fenólica de los vinos tintos resultantes. Además, algunos estudios preliminares han sugerido que, aparte de aumentar la extracción de compuestos fenólicos, los ultrasonidos también podrían mejorar

algunas características físico-químicas de los vinos tintos (Zhang et al., 2016) o acelerar su envejecimiento en botella (Ferraretto y Celotti, 2016).

Al igual que en el caso de los enzimas hidrolíticos, la aplicación de ultrasonidos podría afectar a las interacciones que se producen entre compuestos fenólicos y paredes celulares, ya que las altas temperaturas y presiones que localmente se alcanzan por el fenómeno de cavitación pueden afectar a la estructura de las paredes celulares, alterando su composición y, por lo tanto, reduciendo su capacidad de adsorber compuestos fenólicos durante la maceración.

Otra posible aplicación de los ultrasonidos de alta potencia sería la posible liberación de los compuestos adsorbidos a las paredes celulares. Cuando la cavitación ocurre cerca de las paredes celulares de la uva puede dar lugar a su ruptura/disrupción. Con este objetivo, los ultrasonidos podrían aplicarse durante el envejecimiento sobre lías de un vino tinto.

Los US de alta potencia se han utilizado en los últimos años en vinificaciones de vino blanco y tinto durante la crianza/envejecimiento sobre lías (Cacciola et al., 2013; Del Fresno et al., 2018; Kulkarni et al., 2015). La crianza sobre lías es una técnica en la se conserva el vino en barricas o depósitos sin que se les hayan retirado las lías tras realizar la fermentación alcohólica y/o maloláctica. Durante el envejecimiento sobre lías, el vino es agitado con el objetivo de favorecer la transferencia de compuestos de interés desde las lías al vino. La autólisis de las levaduras provoca que su pared celular se vuelva menos rígida, favoreciendo además la liberación de polisacáridos y manoproteínas (Feuillat, 2003). La liberación de estos compuestos al vino tiene diversos efectos beneficiosos como: mejorar el color, la estabilidad proteica y tartárica y reducir su astringencia (Junior et al., 2020; Manjón et al., 2021; Morata et al., 2005). Junto con los polisacáridos también se liberan proteínas hidrolizadas y lípidos, los cuales pueden ser precursores aromáticos de compuestos como ésteres y aldehídos (Martínez-Rodríguez et al., 2001; Pueyo et al., 2000).

Como se ha mencionado anteriormente una cantidad importante de compuestos fenólicos, antocianos y taninos, precipitan unidos a las paredes celulares vegetales junto con las lías. Además, ha sido demostrado que los

polifenoles también son capaces de interactuar con las paredes celulares de las levaduras (Morata et al., 2003). Por ello, la aplicación de ultrasonidos de alta potencia, los cuales generan altas temperaturas y presiones localmente, podrían ayudar a la liberación de polifenoles adsorbidos a las paredes celulares durante la crianza sobre lías en vinos tintos, incluso aquellos que se unen a éstas, formando multicapas (Beaver et al., 2020). De esta forma, el envejecimiento sobre lías conseguiría no solo los beneficios anteriormente mencionados, sino que además aumentaría el contenido de compuestos fenólicos de los vinos resultantes. Tampoco se puede descartar la utilización de ultrasonidos para la valorización de las lías, como subproducto de la bodega (De Iseppi et al., 2021).

Para conseguir todos estos beneficios, se deben encontrar las condiciones de trabajo ideales ya que los US pueden incrementar la oxidación de compuestos fenólicos por la formación de radicales libres (Kentish y Ashokkumar, 2011). Además, al igual que ocurre con las paredes celulares, esta técnica podría afectar a la estructura de los compuestos fenólicos, como, por ejemplo, al grado de polimerización de los taninos, como ocurre cuando se aplican sobre otras moléculas de elevado peso molecular, como por ejemplo ciertos polisacáridos (Muñoz-Almagro et al., 2017; Zhang et al., 2013).

Bibliografía

- Apolinar-Valiente, R. (2012). *Pared celular de uva y polisacáridos de vinos de distinta procedencia, elaborados mediante tecnologías enzimáticas y de frío* [Tesis doctoral, Universidad de Murcia]. <http://hdl.handle.net/10201/33128>
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., & Ros-García, J. M. (2015). Cell wall compounds of red grapes skins and their grape marcs from three different winemaking techniques. *Food Chemistry*, *187*, 89-97.
- Apolinar-Valiente, R., Williams, P., Nigen, M., Tamayo, V. M., Doco, T., & Sanchez, C. (2019). Recovery, structure and physicochemical properties of an aggregate-rich fraction from Acacia senegal gum. *Food Hydrocolloids*, *89*, 864-873.
- Albersheim, P., An, J., Freshour, G., Fuller, M. S., Guillen, R., Ham, K. S., & Darvill, A. (1994). Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. *Biochemical Society Transactions*, *22*(2), 374-378.
- Amrani-Joutei, K., Glories, Y., & Mercier, M. (1994). Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis*, *33*(3), 133-138.
- Amrani Joutei, K., Ouazzani Chahdi, F., Bouya, D., Saucier, C., & Glories, Y. (2003). Electronic microscopy examination of the influence of purified enzymatic activities on grape skin cell wall. *International Journal of Vine and Wine Sciences*, *37*, 23-30.
- Bae, R. N., Kim, K. W., Kim, T. C., & Lee, S. K. (2006). Anatomical observations of anthocyanin rich cells in apple skins. *HortScience*, *41*(3), 733-736.
- Bautista-Ortín, A. B., Busse-Valverde, N., Fernández-Fernández, J. I., Gómez-Plaza, E., & Gil-Muñoz, R. (2016). The extraction kinetics of anthocyanins and proanthocyanidins from grape to wine in three different varieties. *OENO One*, *50*(2).
- Bautista-Ortín, A. B., Cano-Lechuga, M., Ruiz-García, Y., & Gómez-Plaza, E. (2014). Interactions between grape skin cell wall material and commercial enological tannins. Practical implications. *Food Chemistry*, *152*, 558-565.
- Bautista-Ortín, A. B., Jiménez-Martínez, M. D., Jurado, R., Iniesta, J. A., Terrades, S., Andrés, A., & Gómez-Plaza, E. (2017). Application of high-power ultrasounds during red wine vinification. *International Journal of Food Science & Technology*, *52*(6), 1314-1323.
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Cutillas, A., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & 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 & Technology*, *40*(8), 867-878.
- Bautista-Ortín, A. B., Rodríguez-Rodríguez, P., Gil-Muñoz, R., Jiménez-Pascual, E., Busse-Valverde, N., Martínez-Cutillas, A., & Gómez-Plaza, E. (2012). Influence of berry ripeness on concentration, qualitative composition and extractability of grape seed tannins. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *18*(2), 123-130.

- Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., & Williamson, M. P. (1997). Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, *36*(18), 5566-5577.
- Beaver, J. W., Miller, K. V., Medina-Plaza, C., Dokoozlian, N., Ponangi, R., Blair, T., & Oberholster, A. (2020). The effects of temperature and ethanol on proanthocyanidin adsorption to grape cell wall material in the presence of anthocyanins. *Molecules*, *25*(18), 4139.
- Bindon, K. A., Bacic, A., & Kennedy, J. A. (2012). Tissue-specific and developmental modifications of grape cell walls influence the adsorption of proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(36), 9249-9260.
- Bindon, K. A., Kassara, S., & Smith, P. A. (2017). Towards a model of grape tannin extraction under wine-like conditions: the role of suspended mesocarp material and anthocyanin concentration. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *23*(1), 22-32.
- Bindon, K. A., & Kennedy, J. A. (2011). Ripening-induced changes in grape skin proanthocyanidins modify their interaction with cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(6), 2696-2707.
- Bindon, K. A., Li, S., Kassara, S., & Smith, P. A. (2016). Retention of proanthocyanidin in wine-like solution is conferred by a dynamic interaction between soluble and insoluble grape cell wall components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(44), 8406-8419.
- Bindon, K. A., Madani, S. H., Pendleton, P., Smith, P. A., & Kennedy, J. A. (2014). Factors affecting skin tannin extractability in ripening grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(5), 1130-1141.
- Bindon, K. A., Smith, P. A., & Kennedy, J. A. (2010a). Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 1. Effect on proanthocyanidin composition and molecular mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(4), 2520-2528.
- Bindon, K. A., Smith, P. A., Holt, H., & Kennedy, J. A. (2010b). Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 2. Implications for vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(19), 10736-10746.
- Boudet, A. M. (2000). Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, *38*(1-2), 81-96.
- Boulton, R. 1995. Red wines. En Lea, A.; Piggott, J. (Eds.), *Fermented Beverage Production* (pp. 121-158). Springer Science & Business Media.
- Brouillard, R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. En *Anthocyanins as Food Colors* (pp. 1-40). Elsevier.
- Busse-Valverde, N., Bautista-Ortín, A. B., Gómez-Plaza, E., Fernández-Fernández, J. I., & Gil-Munoz, R. (2012). Influence of skin maceration time on the proanthocyanidin content of red wines. *European Food Research and Technology*, *235*(6), 1117-1123.

- Cacciola, V., Batllò, I. F., Ferraretto, P., Vincenzi, S., & Celotti, E. (2013). Study of the ultrasound effects on yeast lees lysis in winemaking. *European Food Research and Technology*, 236(2), 311-317.
- Cadot, Y., Miñana-Castelló, M. T., & Chevalier, M. (2006). Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during fruit development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9206-9215.
- 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), 1-30.
- Carpita, N. & McCann, M. (2000). The cell wall. En Buchananm, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. (Eds.), *Biochemistry & molecular biology of plants* (pp. 52-108). American Society of Plant Physiologists.
- Casassa, L. F. (2017). Flavonoid phenolics in red winemaking. En Soto-Hernández, M., Tenango, M. P., & García-Mateos, R. (Eds.), *Phenolic Compounds-Natural sources, importance and applications* (pp. 153-195). BoD–Books on Demand.
- Casassa, L. F., Larsen, R. C., Beaver, C. W., Mireles, M. S., Keller, M., Riley, W. R., & Harbertson, J. F. (2013). Impact of extended maceration and regulated deficit irrigation (RDI) in Cabernet Sauvignon wines: characterization of proanthocyanidin distribution, anthocyanin extraction, and chromatic properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6446-6457.
- Cassab, G. I., & Varner, J. E. (1988). Cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39(1), 321-353.
- Castro-López, L., Gómez-Plaza, E., Ortega-Regules, A., Lozada, D., & Bautista-Ortín, A. B. (2016). Role of cell wall deconstructing enzymes in the proanthocyanidin–cell wall adsorption–desorption phenomena. *Food Chemistry*, 196, 526-532.
- Cheynier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 298-305.
- Cheynier, V., Remy, S., & Fulcrand, H. (2001). Mecanism of anthocyanin and tannin changes during winemaking and aging. In *Proceedings of the ASEV 50th Anniversary Annual Meeting, Seattle, Washington, June 19-23, 2000* (pp. 337-344). American Society for Enology and Viticulture, ASEV.
- Chong, H. H., Cleary, M. T., Dokoozlian, N., Ford, C. M., & Fincher, G. B. (2019). Soluble cell wall carbohydrates and their relationship with sensory attributes in Cabernet Sauvignon wine. *Food Chemistry*, 298, 124745.
- Conn, S., Franco, C., & Zhang, W. (2010). Characterization of anthocyanic vacuolar inclusions in *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures. *Planta*, 231(6), 1343-1360.
- Da Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J. M., Moutounet, M., Cabanis, J. C., & Bourzeix, M. (1991). Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57(1), 111-125.
- De Freitas, V., Fernandes, A., Oliveira, J., Teixeira, N., & Mateus, N. (2017). A review of the current knowledge of red wine colour. *Oeno One*, 51(1).
- De Freitas, V., & Mateus, N. (2006). Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 175-183.

- De Freitas, V., & Mateus, N. (2011). Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(5), 1463-1473.
- De Iseppi, A., Marangon, M., Vincenzi, S., Lomolino, G., Curioni, A., & Divol, B. (2021). A novel approach for the valorization of wine lees as a source of compounds able to modify wine properties. *LWT*, 136, 110274.
- Del Fresno, J. M., Loira, I., Morata, A., González, C., Suárez-Lepe, J. A., & Cuerda, R. (2018). Application of ultrasound to improve lees ageing processes in red wines. *Food Chemistry*, 261, 157-163.
- Dey, P. M., & Brinson, K. (1984). Plant cell-walls. En *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Vol. 42, pp. 265-382). Academic Press.
- Favre, G., Hermosín-Gutiérrez, I., Piccardo, D., Gómez-Alonso, S., & González-Neves, G. (2019). Selectivity of pigments extraction from grapes and their partial retention in the pomace during red-winemaking. *Food Chemistry*, 277, 391-397.
- Fernandes, A., Bras, N. F., Mateus, N., & de Freitas, V. (2014). Understanding the molecular mechanism of anthocyanin binding to pectin. *Langmuir*, 30(28), 8516-8527.
- Ferraretto, P., Cacciola, V., Batllo, I. F., & Celotti, E. (2013). Ultrasounds application in winemaking: grape maceration and yeast lysis. *Italian Journal of Food Science*, 25(2).
- Ferraretto, P., & Celotti, E. (2016). Preliminary study of the effects of ultrasound on red wine polyphenols. *CyTA-Journal of Food*, 14(4), 529-535.
- Feuillat, M. (2003). Yeast macromolecules: origin, composition, and enological interest. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(3), 211-213.
- Fincher, G. B., Stone, B. A., & Clarke, A. E. (1983). Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. *Annual Review of Plant Physiology*, 34(1), 47-70.
- Fischer, R. L., & Bennett, A. B. (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annual Review of Plant Biology*, 42(1), 675-703.
- Gambutì, A., Capuano, R., Lecce, L., Fragasso, M. G., & Moio, L. (2009). Extraction of phenolic compounds from 'Aglanico' and 'Uva di Troia' grape skins and seeds in model solutions: Influence of ethanol and maceration time. *Vitis*, 48(4), 193-200.
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2), 1844-1858.
- Garrido-Bañuelos, G., Buica, A., Schückel, J., Zietsman, A. J., Willats, W. G., Moore, J. P., & Du Toit, W. J. (2019). Investigating the relationship between cell wall polysaccharide composition and the extractability of grape phenolic compounds into Shiraz wines. Part II: Extractability during fermentation into wines made from grapes of different ripeness levels. *Food Chemistry*, 278, 26-35.
- Gao, Y., Fangel, J. U., Willats, W. G., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2016). Dissecting the polysaccharide-rich grape cell wall matrix using recombinant pectinases during winemaking. *Carbohydrate Polymers*, 152, 510-519.

- Gao, Y., Zietsman, A. J., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2019). Deconstructing wine grape cell walls with enzymes during winemaking: New insights from glycan microarray technology. *Molecules*, *24*(1), 165.
- Ghafoor, K., & Choi, Y. H. (2009). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, *52*(3), 295-300.
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(11), 4988-4994.
- Glories, Y., & Saucier, C. (2000). Tannin evolution from grape to wine. Effects on wine taste. In: *Proceedings of the ASEV 50th Anniversary Annual Meeting, Seattle, WA. JM Rantz (Ed.)* (pp. 353-355).
- Gonçalves, F. J., Rocha, S. M., & Coimbra, M. A. (2012). Study of the retention capacity of anthocyanins by wine polymeric material. *Food Chemistry*, *134*(2), 957-963.
- Goulao, L. F., Fernandes, J. C., Lopes, P., & Amâncio, S. (2012). Tackling the cell wall of the grape berry. En Gerós-Minho, H., Chaves-Portugal, M. & Delrot-France, S. (Eds.), *The Biochemistry of the Grape Berry* (pp. 172-193). Bretham Books. <https://doi.org/10.2174/978160805360511201010172>
- Grönroos, A., Pirkonen, P., & Ruppert, O. (2004). Ultrasonic depolymerization of aqueous carboxymethylcellulose. *Ultrasonics Sonochemistry*, *11*(1), 9-12.
- Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2008). Effect of commercial mannoprotein addition on polysaccharide, polyphenolic, and color composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(19), 9022-9029.
- Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Williams, P., & Doco, T. (2014). Determination of must and wine polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and size-exclusion chromatography (SEC). En: Ramawat K., Mérillon JM. (Eds.), *Polysaccharides* (pp. 1-28). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03751-6_56-2
- Guadalupe, Z., Martínez, L., & Ayestarán, B. (2010). Yeast mannoproteins in red winemaking: Effect on polysaccharide, polyphenolic, and color composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, *61*(2), 191-200.
- Hanlin, R. L., Hrmova, M., Harbertson, J. F., & Downey, M. O. (2010). Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *16*(1), 173-188.
- Hellström, J. K., Törrönen, A. R., & Mattila, P. H. (2009). Proanthocyanidins in common food products of plant origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(17), 7899-7906.
- Hermosín-Gutiérrez, I., Gómez-Alonso, S., Pérez-Navarro, J., Kurt, A., Colak, N., Akpınar, E., ... & Ayaz, F. A. (2020). *Vitis vinifera* Turkish grape cultivar Karaerik. Part I: anthocyanin composition, and identification of a newly found anthocyanin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(3), 1301-1310.

- Hernández-Hierro, J. M., Quijada-Morín, N., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2012). Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 26-32.
- Hernández-Hierro, J. M., Quijada-Morín, N., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2014). Relationship between skin cell wall composition and anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo at different grape ripeness degree. *Food Chemistry*, 146, 41-47.
- Hernández-Jiménez, A., Kennedy, J. A., Bautista-Ortín, A. B., & Gómez-Plaza, E. (2012). Effect of ethanol on grape seed proanthocyanidin extraction. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(1), 57-61.
- James, J. A., Dixon, G., & Lamikanra, O. (1999). Characterization of partially purified cellulase from muscadine grapes (*Vitis rotundifolia* Michx.). *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 19-24.
- Jarvis, M. C., Briggs, S. P. H., & Knox, J. P. (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell & Environment*, 26(7), 977-989.
- Junior, W. J. F. L., Nadai, C., Rolle, L., da Silva Gulao, E., da Rocha Leãoe, M. H. M., Giacomini, A., ... & Vincenzi, S. (2020). Influence of the mannoproteins of different strains of *Starmerella bacillaris* used in single and sequential fermentations on foamability, tartaric and protein stabilities of wines. *Oeno One*, 54(2).
- Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). The physical and chemical effects of ultrasound. En Feng H., Barbosa-Canovas G., Weiss J. (Eds.), *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 1-12). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7472-3_1
- Klenar, I., Berovič, 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(1), 11-17.
- Knoch, E., Dilokpimol, A., & Geshi, N. (2014). Arabinogalactan proteins: focus on carbohydrate active enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 5, 198.
- Kulkarni, P., Loira, I., Morata, A., Tesfaye, W., González, M. C., & Suárez-Lepe, J. A. (2015). Use of non-*Saccharomyces* yeast strains coupled with ultrasound treatment as a novel technique to accelerate ageing on lees of red wines and its repercussion in sensorial parameters. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1255-1262.
- Lau, J. M., McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1985). Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research*, 137, 111-125.
- Le Bourvellec, C., Bouchet, B., & Renard, C. M. G. C. (2005). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1725(1), 10-18.

- Le Bourvellec, C., Guyot, S., & Renard, C. M. G. C. (2004). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material: Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1672(3), 192-202.
- Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. G. C. (2005). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part II: Quantification and impact of cell wall drying. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1725(1), 1-9.
- Li, S., Wilkinson, K. L., Mierczynska-Vasilev, A., & Bindon, K. A. (2019). Applying nanoparticle tracking analysis to characterize the polydispersity of aggregates resulting from tannin–polysaccharide interactions in wine-like media. *Molecules*, 24(11), 2100.
- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2008a). Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: influence of grape variety. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1099-1107.
- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2008b). Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 477-482.
- Manjón, E., Recio-Torrado, A., Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., & Escribano-Bailón, M. T. (2021). Effect of different yeast mannoproteins on the interaction between wine flavanols and salivary proteins. *Food Research International*, 143, 110279.
- 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 colouration. *Phytochemistry*, 55(4), 327-336.
- Martínez-Rodríguez, A. J., Carrascosa, A. V., & Polo, M. C. (2001). Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1-2), 155-160.
- Mateus, N., Carvalho, E., Luís, C., & de Freitas, V. (2004). Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein–tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 135-140.
- Mattivi, F., Vrhovsek, U., Masuero, D., & Trainotti, D. (2009). Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(1), 27-35.
- McCann, M. C., Wells, B., & Roberts, K. (1990). Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science*, 96(2), 323-334.
- McManus, J. P., Davis, K. G., Beart, J. E., Gaffney, S. H., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1985). Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 9, 1429-1438.

- Medina-Plaza, C., Beaver, J. W., Lerno, L., Dokoozlian, N., Ponangi, R., Blair, T., ... & Oberholster, A. (2019). Impact of temperature, ethanol and cell wall material composition on cell wall-anthocyanin interactions. *Molecules*, *24*(18), 3350.
- Medina-Plaza, C., Beaver, J. W., Miller, K. V., Lerno, L., Dokoozlian, N., Ponangi, R., ... & Oberholster, A. (2020). Cell wall–anthocyanin interactions during red wine fermentation-like conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, *71*(2), 149-156.
- Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *45*(2), 85-118.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2005). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *European Food Research and Technology*, *220*(3), 341-346.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003). Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(14), 4084-4088.
- Moreno, A.A., (2013). *Técnicas enológicas de frío y enzimáticas aplicadas a la extractabilidad de syrah, cabernet sauvignon y monastrell* (Tesis Doctoral, Universidad de Murcia). <http://hdl.handle.net/20.500.11914/1022>
- Muñoz-Almagro, N., Montilla, A., Moreno, F. J., & Villamiel, M. (2017). Modification of citrus and apple pectin by power ultrasound: Effects of acid and enzymatic treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, *38*, 807-819.
- Okemoto, K., Uekita, T., Tsumuraya, Y., Hashimoto, Y., & Kasama, T. (2003). Purification and characterization of an endo- β -(1 \rightarrow 6)-galactanase from *Trichoderma viride*. *Carbohydrate Research*, *338*(3), 219-230.
- O'Neil, M. A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1996). Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(37), 22923-22930.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., Bautista-Ortín, A. B., López-Roca, J. M., Fernández-Fernández, J. I., & Gómez-Plaza, E. (2008). Anthocyanins and tannins in four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). Evolution of their content and extractability. *OENO One*, *42*(3), 147-156.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1-2), 26-32.
- Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Zabarar, D., Mikkelsen, D., & Gidley, M. J. (2012a). Binding of polyphenols to plant cell wall analogues–Part 2: Phenolic acids. *Food Chemistry*, *135*(4), 2287-2292.

- Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Zabaras, D., Mikkelsen, D., & Gidley, M. J. (2012b). Binding of polyphenols to plant cell wall analogues—Part 1: Anthocyanins. *Food Chemistry*, *134*(1), 155-161.
- Parley, A. (1997). *The effect of pre-fermentation enzyme maceration on extraction and colour stability in Pinot noir wine* (Tesis Doctoral, Lincoln University). <https://hdl.handle.net/10182/3073>
- Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., & York, W. S. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal*, *20*(6), 629-639.
- Pellerin, P., & Brillouet, J. M. (1994). Purification and properties of an exo-(1→3)-β-d-galactanase from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Research*, *264*(2), 281-291.
- Phan, A. D. T., D'Arcy, B. R., & Gidley, M. J. (2016). Polyphenol–cellulose interactions: effects of pH, temperature and salt. *International Journal of Food Science & Technology*, *51*(1), 203-211.
- Porter, L. J., Hrstich, L. N., & Chan, B. G. (1985). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, *25*(1), 223-230.
- Puértolas, E., López, N., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale. *Journal of Food Engineering*, *98*(1), 120-125.
- Pueyo, E., Martínez-Rodríguez, A., Polo, M. C., Santa-María, G., & Bartolomé, B. (2000). Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(1), 116-122.
- Quagliari, C., Jourdes, M., Waffo-Teguo, P., & Teissedre, P. L. (2017). Updated knowledge about pyranoanthocyanins: Impact of oxygen on their contents, and contribution in the winemaking process to overall wine color. *Trends in Food Science & Technology*, *67*, 139-149.
- Renard, C. M., Baron, A., Guyot, S., & Drilleau, J. F. (2001). Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules*, *29*(2), 115-125.
- Renard, C. M., Watrelot, A. A., & Le Bourvellec, C. (2017). Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science & Technology*, *60*, 43-51.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2012). *Traité d'œnologie: Tome 1-Microbiologie du vin. Pratiques Vitivinicoles. Série Oenologie* (6^o Ed., pp. 704-p). Dunod.
- Ríos-Alzate, L. R., & Arias Vargas, F. J. (2002). *Inmovilización de pectinasas y/o celulasas y determinación de algunos de sus efectos en el jugo de guayaba*. (Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia) <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/2751>

- Romero Cascales, M. I. (2008). *Extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino. Papel de los enzimas de maceración* (Tesis Doctoral, Universidad de Murcia). <http://hdl.handle.net/10201/2117>
- Romero-Cascales, I., Fernández-Fernández, J. I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2008). Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. *International Journal of Food Science & Technology*, *43*(7), 1295-1305.
- Romero-Cascales, I., Ortega-Regules, A., López-Roca, J. M., Fernández-Fernández, J. I., & Gómez-Plaza, E. (2005). Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. *American Journal of Enology and Viticulture*, *56*(3), 212-219.
- Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2012). The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. *Food Chemistry*, *130*(3), 626-631.
- Rousserie, P., Rabot, A., & Geny-Denis, L. (2019). From flavanols biosynthesis to wine tannins: What place for grape seeds?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(5), 1325-1343.
- Ruiz-García, Y., Smith, P. A., & Bindon, K. A. (2014). Selective extraction of polysaccharide affects the adsorption of proanthocyanidin by grape cell walls. *Carbohydrate Polymers*, *114*, 102-114.
- Schofield, P., Mbugua, D. M., & Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, *91*(1-2), 21-40.
- Smith, P. A., McRae, J. M., & Bindon, K. A. (2015). Impact of winemaking practices on the concentration and composition of tannins in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *21*, 601-614.
- Stevenson, T. T., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1988). Structural features of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan-II. *Carbohydrate Research*, *182*(2), 207-226.
- Tao, Y., Zhang, Z., & Sun, D. W. (2014). Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*(4), 1461-1469.
- Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M. A., & Pellerin, P. (2001). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, *45*(4), 315-323.
- Vorwerk, S., Somerville, S., & Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science*, *9*(4), 203-209.
- Watrelot, A. A., Le Bourvellec, C., Imberty, A., & Renard, C. M. (2013). Interactions between pectic compounds and procyanidins are influenced by methylation degree and chain length. *Biomacromolecules*, *14*(3), 709-718.

- Zeuner, B., Thomsen, T. B., Stringer, M. A., Krogh, K. B., Meyer, A. S., & Holck, J. (2020). Comparative characterization of aspergillus pectin lyases by discriminative substrate degradation profiling. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 873.
- Zhang, Q. A., Shen, Y., Fan, X. H., & Garcia Martin, J. F. (2016). Preliminary study of the effect of ultrasound on physicochemical properties of red wine. *CyTA-Journal of Food*, 14(1), 55-64.
- Zhang, L., Ye, X., Ding, T., Sun, X., Xu, Y., & Liu, D. (2013). Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 222-231.
- Zietsman, A. J., Moore, J. P., Fangel, J. U., Willats, W. G., Trygg, J., & Vivier, M. A. (2015a). Following the compositional changes of fresh grape skin cell walls during the fermentation process in the presence and absence of maceration enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2798-2810.
- Zietsman, A. J., Moore, J. P., Fangel, J. U., Willats, W. G., & Vivier, M. A. (2015b). Profiling the hydrolysis of isolated grape berry skin cell walls by purified enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(37), 8267-8274.



OBJETIVOS



Los antocianos y los taninos son los compuestos fenólicos de mayor importancia de los vinos, ya que son responsables del color, amargor y cuerpo de éstos. Estos compuestos se encuentran en las células del hollejo de la uva, dentro de vacuolas o ligados a la pared celular y también, en el caso de los taninos, en las semillas. Durante la maceración, estos compuestos se extraen de la uva al mosto/vino.

Se han realizado una gran cantidad de estudios para determinar cómo funcionan los mecanismos de su extracción de la uva al mosto/vino. La ruptura de las paredes celulares es necesaria para que se extraigan los compuestos que se encuentran en el interior de las vacuolas, y, por lo tanto, dos de los factores que condicionarán su presencia en el vino serán la cantidad de estos compuestos en el hollejo en el momento de la vendimia y la facilidad o dificultad para su extracción. Pero se ha demostrado que conocer las cantidades de antocianos y taninos en el hollejo no es suficiente para estimar lo que va a encontrarse en el vino (Busse-Valverde et al., 2012; Harbertson et al., 2002), siendo normalmente las cantidades encontradas en los vinos menores que las esperadas. Una de las razones de este fenómeno es que las paredes celulares, además de ser una barrera difusional también son capaces de adsorber compuestos fenólicos. Estas paredes celulares, tanto del hollejo como de pulpa de uva, están en grandes concentraciones en el mosto recién estrujado, por lo que en la etapa de maceración acaban entrando en contacto con los compuestos fenólicos extraídos y esto deriva en la formación de complejos insolubles que acaban precipitando en etapas posteriores del proceso de vinificación.

El objetivo principal de esta Tesis doctoral es el desarrollo de técnicas bioquímicas y físicas para reducir la pérdida de compuestos fenólicos provocada por su interacción con paredes celulares de la uva. Estas técnicas se usarán, o bien para reducir la adsorción de estos compuestos por las paredes celulares, o bien para favorecer su desorción, cuando se haya producido su interacción.

Con este fin, se han propuesto los siguientes objetivos parciales:

1. Demostrar que la adsorción de compuestos fenólicos en el material en suspensión en una vinificación real es realmente un factor importante

a considerar, ya que los estudios realizados anteriormente se han llevado a cabo en soluciones de vino modelo (**Publicación 3.1.**).

2. Habiendo sido demostrado que una parte importante de compuestos fenólicos pueden quedar adsorbidos en el material de la pared celular durante la vinificación, el siguiente objetivo es investigar el papel de diferentes enzimas que degradan la pared celular para limitar la adsorción y/o favorecer la desorción de compuestos fenólicos de las paredes celulares vegetales (**Publicaciones 3.2. y 3.3.**).
3. Investigar el efecto de la aplicación conjunta de enzimas que degradan la pared celulares y ultrasonidos de alta intensidad, solos o en combinación para mejorar la composición fenólica del vino durante su elaboración (**Publicación 3.4.**) o por liberación de los compuestos fenólicos adsorbidos en las lías (**Publicación 3.5.**).
4. Estudiar la utilización de polisacáridos solubles comerciales para competir con las paredes celulares por los sitios de unión con los compuestos fenólicos y, de este modo, reducir su adsorción y precipitación con las paredes celulares (**Publicación 3.6.**).
5. Por último, con los resultados observados en disoluciones modelo de las técnicas enzimáticas, reevaluar el rol de diferentes enzimas pectinasas en la composición fenólica y cromática de vinos tintos (**Publicación 3.7.**).



RESULTADOS

- 3.1. Elimination of suspended cell wall material in musts improves the phenolic content and color of red wines.
- 3.2. The impact of carbohydrate-active enzymes on mediating cell wall polysaccharide-tannin interactions in a wine-like matrix.
- 3.3. The influence of hydrolytic enzymes on tannin adsorption-desorption onto grape cell walls in a wine-like matrix.
- 3.4. Combined use of pectolytic enzymes and ultrasounds for improving the extraction of phenolic compounds during vinification.
- 3.5. The application of ultrasound and enzymes could be promising tools for recovering polyphenols during the aging on lees process in red winemaking.
- 3.6. The role of soluble polysaccharides in tannin-cell wall interactions in model solutions and in wines.
- 3.7. Revisiting the use of pectinases in enology: a role beyond facilitating phenolic grape extraction.

3.1.

La eliminación del material de la pared celular en suspensión en los mostos mejora el contenido fenólico y el color de los vinos tintos.

Elimination of suspended cell wall material in musts improves the phenolic content and color of red wines.

Andrea Osete-Alcaraz, Ana Belén Bautista-Ortín, Ana Ortega-Regules y Encarna Gómez-Plaza.

American Journal of Enology and Viticulture, 2019, 70(2), 201-204.

<https://doi.org/10.5344/ajev.2018.18042>

RESUMEN

Algunos estudios han demostrado que la tasa de transferencia de compuestos fenólicos de la uva al mosto puede estar limitada, entre otras razones, por las interacciones entre los compuestos fenólicos y la pared celular. Una hipótesis es que después del estrujado de las uvas para obtener el mosto, los taninos y antocianos que originalmente estaban en el hollejo y semillas de la uva y han difundido al mosto durante la maceración, interaccionan con las paredes celulares del hollejo y la pulpa de la uva presentes en suspensión en el mosto en grandes concentraciones y, de esta forma dificultan que los compuestos fenólicos unidos a éstas permanezcan en el vino final. Para demostrar esta hipótesis en una vinificación real, se comparó una vinificación de vino tinto elaborado de forma tradicional con una vinificación de vino tinto modificada, en la que se incluyó un paso de desfangado, similar al utilizado comúnmente para la producción de vinos blancos y rosados, antes de la etapa de maceración. De esta forma, parte del material vegetal en suspensión fue eliminado antes de que pudiera interaccionar con los compuestos fenólicos.

Se analizaron las características cromáticas de ambas elaboraciones por espectrofotometría. Además, la concentración de taninos de los vinos se determinó por espectrofotometría, y su composición por cromatografía líquida de alta resolución, mientras que la distribución de los pesos moleculares de los taninos de ambas elaboraciones se analizó por cromatografía de exclusión por tamaño.

La eliminación del material vegetal en suspensión en el mosto dio lugar a un vino que contenía una cantidad significativamente mayor de compuestos fenólicos, con un aumento del 23% en la concentración de antocianos y un 43% en la concentración de taninos, y que presentaba una mejora en las características cromáticas. Los resultados de este estudio confirman que la concentración final de compuestos fenólicos en el vino dependerá, entre otros factores, de la capacidad de limitar las interacciones entre compuestos fenólicos y el material en suspensión. Dado que ni el grado de polimerización medio de los taninos del vino ni el porcentaje de epigallocatequina cambiaron, se pudo

confirmar que no hubo preferencia de las paredes celulares en suspensión por los taninos del hollejo o de las semillas.

3.2.

El impacto de enzimas hidrolíticos en las interacciones entre taninos y los polisacáridos de la pared celular en vino modelo.

The impact of carbohydrate-active enzymes on mediating cell wall polysaccharide-tannin interactions in a wine-like matrix.

Andrea Osete-Alcaraz, Encarna Gómez-Plaza, Pilar Martínez-Pérez, Florent Weiller, Julia Schückel, William G.T. Willats, John P. Moore, José M. Ros-García y Ana Belén Bautista-Ortín.

Food Research International, 2020, 129, 108889.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108889>

RESUMEN

Los taninos son uno de los principales compuestos responsables de la calidad del vino tinto. Estos compuestos están presentes principalmente en los hollejos y semillas de uva transfiriéndose a la matriz mosto-vino durante la etapa de maceración durante la vinificación. Sin embargo, la transferencia de taninos durante la maceración suele ser incompleta. Esto puede deberse, entre otras razones, a que los taninos se unen a los polisacáridos de la pared celular de la uva (incluidos los polímeros solubles) que se liberan durante la vinificación, y están presentes en altas concentraciones en el mosto/vino tras el estrujado de la uva. El uso de enzimas que degraden la pared celular vegetal podría ofrecer la posibilidad de reducir estas interacciones, incrementando la concentración de taninos en el vino final.

El objetivo principal de este estudio fue determinar si existe una combinación óptima de enzimas hidrolíticos que eviten asociaciones entre paredes celulares del hollejo de la uva y taninos. Para ello se pusieron en contacto en un vino modelo paredes celulares purificadas del hollejo de uva Monastrell con un tanino de semilla comercial y se adicionaron diferentes enzimas hidrolíticos: celulasa, pectinmetilesterasa, poligalacturonasa, pectín liasa y xilanas. La adición de enzimas se realizó de tres formas distintas: individualmente, añadidos de formar simultánea y secuencialmente. La medida de la concentración de taninos en el medio fue el objetivo principal del estudio. Se determinó la concentración y características de los taninos en solución por cromatografía líquida y de exclusión por tamaño. Además, se analizó la degradación de las paredes celulares producida por los enzimas mediante cromatografía de exclusión por tamaño y mediante el perfil de polímeros por microarray (CoMPPs).

Los resultados mostraron que solo cuando los enzimas se aplicaron individualmente, y particularmente el enzima pectín liasa, se obtuvo la máxima concentración de taninos libres en solución. El enzima pectín liasa mostró una notable eficacia en la degradación de las paredes celulares, debido a que el tratamiento con este enzima aumentó la exposición de las hemicelulosas de la

pared celulares del hollejo de la uva y liberó el mayor contenido de polisacáridos solubles de todos los enzimas ensayados. Además, el bajo peso molecular de los polisacáridos liberados por pectín liasa (en comparación con los otros enzimas y combinaciones probadas) dio como resultado que estas presentaran una menor capacidad para interaccionar con los taninos en solución.

Por otra parte, el uso de la combinación de enzimas añadidos simultáneamente o secuencialmente también fue, hasta cierto punto, eficaz, especialmente si la pectín liasa estaba presente en la combinación. Las combinaciones de enzimas propiciaron la degradación de la pared celular, favoreciendo la reducción de la adsorción de taninos. Sin embargo, los polisacáridos solubles de alto peso molecular liberados presentaban una alta capacidad para interaccionar con los taninos, reduciendo su contenido en la solución modelo. Por lo tanto, el aumento de la degradación de la pared celular necesaria para limitar la adsorción del tanino de uva debe equilibrarse con la necesidad de una descomposición más eficaz de los polisacáridos en solución si el objetivo es mejorar el contenido de taninos en los vinos finales, y el uso de la pectín liasa parece ser el enfoque más prometedor.

3.3.

El impacto de enzimas hidrolíticos en las interacciones entre taninos y los polisacáridos de la pared celular en vino modelo.

The influence of hydrolytic enzymes on tannin adsorption-desorption onto grape cell walls in a wine-like matrix.

Andrea Osete-Alcaraz, Encarna Gómez-Plaza, Pilar Martínez-Pérez, Florent Weiller, Julia Schückel, William G.T. Willats, John P. Moore, José M. Ros-García y Ana Belén Bautista-Ortín.

Molecules, 2021, 26(3), 770.

<https://doi.org/10.3390/molecules26030770>

RESUMEN

Este estudio complementa los resultados obtenidos en el anterior capítulo, aportando información sobre la variabilidad de la afinidad de los taninos con las paredes celulares según la variedad de uva y la capacidad de los enzimas que degradan la pared celular de la uva para promover la desorción de los taninos ligados a éstas.

En este artículo se evalúa la capacidad de cuatro enzimas hidrolíticas (celulasa, pectinmetilesterasa, pectín liasa y xilanasa) para limitar la adsorción de taninos por parte de paredes celulares del hollejo de uva y/o favorecer la desorción. Las pruebas de adsorción y desorción se realizaron poniendo en contacto un tanino de semilla comercial con paredes celulares del hollejo de uva de la variedad Syrah, en presencia o ausencia de enzimas hidrolíticos, en una solución de vino modelo.

Los efectos de los enzimas se evaluaron midiendo, por un lado, los taninos en solución mediante cromatografía líquida de alta resolución y por otro, los cambios en los polisacáridos que componen la pared celular, tanto los que, formando parte de ésta, mediante el perfil completo de polímeros determinados por microarrays (COMPPs), como los polisacáridos solubles liberados de las paredes celulares por la acción enzimática, analizados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Los resultados de este estudio mostraron que las paredes celulares de la variedad Syrah presentan una alta capacidad de adsorber taninos (aproximadamente un 41% de aquellos en solución), aunque es inferior a la reportada para las paredes celulares de Monastrell, lo que indica que la afinidad entre la pared celular y los taninos está influenciada por la variedad de uva. Este hecho habría que tenerlo en cuenta en una vinificación real, ya que ésta afinidad afectará a la cantidad de los taninos que se mantendrán solubles durante el proceso de elaboración o en el vino final.

Todos los enzimas utilizados, excepto la pectinmetilesterasa, redujeron la adsorción de taninos en las paredes celulares. Esta reducción se debe al efecto

de los enzimas sobre la estructura de la pared celular, ya que hay una degradación de la red de polisacáridos donde se unen los taninos y una liberación de polisacáridos solubles a la solución modelo, como ha quedado demostrado en el estudio. Aunque los enzimas utilizados afectaron de manera diferente a las características y la extensión de la ruptura de la pared celular, no dieron como resultado diferencias claras en su capacidad para limitar la adsorción. La pectinmetilesterasa fue el enzima que menos degradación produjo en las paredes celulares, produciendo únicamente la desmetilación de los homogalacturonanos de la pectina, siendo esto insuficiente para reducir la capacidad de adsorción de taninos de las paredes celulares.

En los ensayos de desorción, los enzimas apenas tuvieron efecto a la hora de liberar taninos previamente ligados a las paredes celulares. La celulasa y pectín liasa, a pesar de degradar ampliamente las paredes celulares en las pruebas de desorción (aunque en menor medida que en las pruebas de adsorción), no mostraron ninguna capacidad real de desorción de los taninos, lo que indica que los enzimas no fueron capaces de acceder y degradar los polisacáridos donde los taninos están fuertemente ligados.

Desde un punto de vista práctico, el uso de los enzimas ensayados en este estudio, en vinificaciones reales favorecerá la degradación de la pared celular de la uva y la extracción de los compuestos fenólicos ubicados en el interior de las células y, al mismo tiempo, podrá limitar la adsorción de taninos por las paredes celulares que están en suspensión. Sin embargo, aquellos taninos ligados a las paredes celulares no podrán ser liberados enzimáticamente y se perderán, junto con el material vegetal en suspensión, durante los procesos de clarificación y trasiegos. Por ello, es necesario buscar otras opciones que limiten estas pérdidas de taninos, especialmente buscando procesos capaces de reducir la presencia de material de pared celular en suspensión durante la vinificación.

3.4.

Uso combinado de enzimas pectolíticos y ultrasonidos para mejorar la extracción de compuestos fenólicos durante la vinificación.

Combined use of pectolytic enzymes and ultrasounds for improving the extraction of phenolic compounds during vinification.

Andrea Osete-Alcaraz, Ana Belén Bautista-Ortín, Ana E. Ortega-Regules y Encarna Gómez-Plaza.

Food and Bioprocess Technology, 2019, 12(8), 1330-1339.

<https://doi.org/10.1007/s11947-019-02303-0>

RESUMEN

Los compuestos fenólicos difunden al mosto/vino tras la degradación de las paredes celulares de las uvas (durante la etapa de maceración). Este proceso ocurre de forma natural durante la vinificación, sin embargo, la aplicación de técnicas adicionales como la adición de enzimas pectolíticos y/o los ultrasonidos de alta potencia incrementan y aceleran esta degradación, lo cual podría favorecer en gran medida la extracción de compuestos fenólicos desde los hollejos y semillas de la uva. Además, estas técnicas también podrían reducir la interacción entre paredes celulares vegetales en suspensión y los compuestos fenólicos ya extraídos.

Para este estudio se elaboraron microvinificaciones con uva de la variedad Monastrell. El objetivo fue analizar la eficiencia en la extracción de compuestos fenólicos cuando se usó un enzima pectolítico comercial, mezcla de pectín liasa y poligalacturonasa, y también ultrasonidos de alta potencia, ambos aplicados en dos momentos diferentes del período de maceración, al comienzo de la maceración y pasados tres días. Ambas técnicas fueron utilizadas de forma individual o combinadas. Las características cromáticas de los vinos se analizaron por espectrofotometría y la concentración y composición de los taninos del vino por cromatografía líquida de alta resolución y por cromatografía de exclusión por tamaño. Los análisis se realizaron al final de la fermentación alcohólica y a los tres meses del embotellado del vino.

Los resultados de este estudio indican, por primera vez, que los enzimas pectolíticos y los tratamientos con ultrasonidos no solo aumentan la composición fenólica del mosto sino, lo que es más importante, también de los vinos acabados, aunque los efectos de ambos tratamientos no son los mismos. Mientras que los enzimas aumentaron la concentración de taninos, el uso de ultrasonidos, tanto aplicados al comienzo de la maceración como tras 3 días de su comienzo, mejoró tanto las características cromáticas como la concentración de taninos de los vinos, teniendo poco efecto el tiempo de aplicación en el resultado.

El efecto más interesante se observó cuando se combinaron ambos tratamientos ya que, en este caso, el momento de aplicación de los ultrasonidos provocó grandes diferencias en la composición fenólica del vino resultante. Cuando se combinaron enzimas pectolíticos y los ultrasonidos al inicio de la maceración, los resultados no fueron mejores que cuando el enzima o los ultrasonidos se aplicaron individualmente. Además, el enzima pareció tener un efecto negativo, probablemente porque producía un aumento del material vegetal en suspensión en el mosto/vino, que tendía a adsorber los compuestos fenólicos extraídos por los tratamientos.

Cuando se deja actuar los enzimas durante los tres primeros días de maceración y después se aplican los ultrasonidos, parece haber un efecto sinérgico en los tratamientos, proporcionando mejores resultados para todos los parámetros cromáticos y en la composición y concentración de taninos en comparación con las demás vinificaciones.

Estos diferentes resultados obtenidos para las dos vinificaciones en las que se utilizaron ultrasonidos y enzimas pectolíticos evidencian la importancia de la forma de combinar los tratamientos.

3.5.

La aplicación de ultrasonidos y enzimas podría ser una herramienta interesante durante el proceso de envejecimiento sobre lías de un vino tinto.

The application of ultrasound and enzymes could be promising tools for recovering polyphenols during the aging on lees process in red winemaking.

Andrea Osete-Alcaraz, Ana Belén Bautista-Ortín, Paula Pérez-Porras y Encarna Gómez-Plaza.

Foods, 2021, 11(1), 19.

<https://doi.org/10.3390/foods11010019>

RESUMEN

Los complejos de elevado peso molecular que se forman tras la interacción entre las paredes celulares vegetales y los compuestos fenólicos son moléculas insolubles que, en su mayor parte, acaban precipitando formando las lías. La crianza sobre lías se aplica en vinos tintos para incrementar la extracción de polisacáridos de las lías, especialmente manoproteínas, con el fin de estabilizar los vinos. Sin embargo, existe la posibilidad de que durante la crianza sobre lías se pueda extraer parte de los compuestos fenólicos precipitados mediante la utilización de técnicas como los ultrasonidos y la adición de enzimas, ya utilizados desde hace un tiempo para acelerar la crianza sobre las lías.

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de tres tratamientos: a) enzimas que degradan las paredes celulares tanto de las uvas (pectín liasa) como las de las levaduras (β -glucanasa), b) el uso de ultrasonidos de alta potencia y c) la combinación de ambas, para liberar antocianos y taninos adsorbidos en lías.

Se recuperaron las lías de una vinificación en tinto tradicional, las cuales tras ser liofilizadas se disolvieron en una solución modelo y se trataron, a escala de laboratorio, con los enzimas y/o ultrasonidos. Las mejores condiciones de sonicación se probaron previamente para encontrar las condiciones óptimas de tratamiento. Se analizaron las características cromáticas de la solución modelo y la recuperación de antocianos y taninos después de los tratamientos. Los antocianos y los taninos se cuantificaron y caracterizaron por cromatografía líquida. Además, los polisacáridos solubles y los taninos extraídos de las lías tras los tratamientos se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Los resultados mostraron que la combinación de los enzimas, un enzima comercial utilizado para la clarificación y β -Glucanasa, siempre resultó ser el tratamiento más eficaz en la liberación de antocianos, tanto los acilados como los que no, y taninos que los enzimas utilizados individualmente, además de aumentar la cantidad de polisacáridos solubles extraídos en comparación con el control.

La aplicación de los ultrasonidos de alta potencia durante 120 minutos favoreció ligeramente la extracción de antocianos y duplicó la extracción de taninos, además, se logró casi la misma extracción de polisacáridos solubles que la muestra control (agitación durante 24 horas), por lo que, los ultrasonidos consiguieron resultados muy prometedores, ya que redujeron el tiempo de extracción de antocianos, taninos y polisacáridos.

La combinación de ultrasonidos (120 min de tratamiento), y los dos tratamientos enzimáticos mostró un efecto aditivo, aumentando la extracción de compuestos fenólicos (taninos y antocianos) en comparación con los tratamientos individuales y también liberando una gran cantidad de polisacáridos de bajo peso molecular, compuestos de importancia enológica.

Los resultados de este estudio podrían ser de interés para la valorización de las lías, como subproducto de la bodega, recuperando los compuestos fenólicos adsorbidos. Asimismo, y aunque se trata de un estudio preliminar realizado sobre una solución de vino modelo, es posible que la crianza sobre lías pueda mejorar la composición fenólica de un vino tinto si se aplican durante el proceso técnicas como los ultrasonidos o la adición de enzimas.

3.6.

El papel de los polisacáridos solubles en las interacciones de taninos con la pared celular de la uva en soluciones modelo y en vinos.

The role of soluble polysaccharides in tannin-cell wall interactions in model solutions and in wines.

Andrea Osete-Alcaraz, Ana Belén Bautista-Ortín y Encarna Gómez-Plaza

Biomolecules, 2019, 10(1), 36.

<https://doi.org/10.3390/biom10010036>

RESUMEN

Las interacciones de los taninos y antocianos con los componentes solubles e insolubles de la pared celular son, en parte, responsables de las bajas cantidades de estos compuestos fenólicos que se encuentran en los vinos en comparación con las cantidades presentes en la uva con las que se elaboran.

En estudios anteriores se comprobó que algunos de los polisacáridos solubles, que se generan por la degradación de las paredes celulares, tienen mayor afinidad por los taninos que las propias paredes celulares e incluso pueden ser capaces de liberar taninos ligados a éstas. Por ello, el uso de polisacáridos comerciales solubles para competir con los componentes de la pared celular en la adsorción de taninos podría ser un enfoque interesante para mejorar las características cromáticas y sensoriales de los vinos.

En este artículo se estudió el efecto de dos polisacáridos comerciales, una pectina de alto grado de esterificación y un manano, sobre la limitación de las interacciones tanino-pared celular en vino modelo, midiendo la concentración de taninos y polisacáridos que permanecen en solución y después de las diferentes interacciones. Los tratamientos también se probaron en vinificaciones a pequeña escala agregándose polisacáridos solubles al mosto antes del comienzo de la maceración, evaluándose los vinos al final de la fermentación alcohólica y después de seis meses en botella.

Los resultados confirmaron que los taninos del hollejo y las semillas de la uva interactúan fuertemente con el material de las paredes celulares, tanto el insoluble como el soluble, ambos presentes en las soluciones modelo, siendo la concentración de taninos sustancialmente menor después de la interacción. Esta pérdida se debe a la unión de los taninos al material de la pared celular en suspensión y a la formación de complejos insolubles con algunos componentes del material soluble de la pared celular y los resultados también mostraron que los polisacáridos no parecen contribuir en gran medida a la composición de estos precipitados, ya que su concentración en solución no disminuyó tanto como la concentración de taninos tras las interacciones. Por lo tanto, otros compuestos

(probablemente proteínas) podrían ser responsables de la precipitación de los taninos.

La adición de dos polisacáridos comerciales condujo a la formación de complejos solubles con los taninos. Los resultados muestran que los polisacáridos comerciales disminuyeron la adsorción de taninos por parte de las paredes celulares, mostrando, por tanto, cierta capacidad para competir con éstas.

En las vinificaciones a pequeña escala, la adición de los polisacáridos comerciales al inicio de la vinificación dio lugar a vinos con mayor contenido fenólico y mejores características cromáticas, manteniéndose estables después de seis meses en botella. El análisis sensorial mostró puntuaciones más altas para los vinos donde se adicionaron los polisacáridos, ya que la complejación de los taninos con los polisacáridos aumentó la redondez y el cuerpo de los vinos resultantes, especialmente, cuando se usó la pectina de alto grado de esterificación.

3.7.

Revisión del uso de pectinasas en enología: un papel más allá de facilitar la extracción fenólica de la uva.

Revisiting the use of pectinases in enology: a role beyond facilitating phenolic grape extraction.

Andrea Osete-Alcaraz, Ana Belén Bautista-Ortín, Paula Pérez-Porras y Encarna Gómez-Plaza.

Food Chemistry, 2022, 372, 131282.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131282>

RESUMEN

Los enzimas de maceración son una combinación de enzimas que degradan las paredes celulares, se utilizan durante ésta etapa con el objetivo de extraer compuestos de interés, como los fenólicos, desde el interior de las células vegetales. Por otra parte, estos enzimas también influyen en las interacciones entre los compuestos fenólicos extraídos y las paredes celulares vegetales, disminuyendo las interacciones y, de esta forma, aumentando la concentración de compuestos fenólicos del vino. Por lo tanto, la correcta composición y utilización de los enzimas de maceración influenciará la concentración y composición fenólica final de un vino tinto.

En este estudio se comparó el efecto de un enzima de maceración, compuesta principalmente por pectinasas (poligalacturonasa, pectinmetilesterasa y pectín liasa), con un enzima clarificante (compuesta principalmente por poligalacturonasa y pectín liasa), y con la eliminación parcial del material suspendido antes de la etapa de maceración, utilizando un enzima de clarificación, sobre la extracción de compuestos fenólicos.

Se analizaron las características cromáticas y la concentración de taninos totales de los vinos por espectrofotometría. Además, se analizó la composición y concentración de antocianos y taninos por cromatografía líquida de alta resolución de los vinos y las lías. Los vinos se analizaron cuando finalizó la fermentación alcohólica, mientras que las lías se analizaron tras ser liofilizadas.

Todos los tratamientos aplicados mejoraron la composición fenólica de los vinos resultantes, especialmente la elaboración con la eliminación de las paredes celulares antes de la fermentación y la maceración y el tratamiento con enzimas ricos en pectín liasa. Sin embargo, los mecanismos que cada uno de los tratamientos sigue para lograr esta mejora son diferentes. Para comprender los resultados de este trabajo, es necesario tener en cuenta el gradiente de concentración entre el hollejo y las semillas y el medio líquido durante la maceración.

El vino elaborado eliminando paredes celulares en suspensión mostró el contenido fenólico más alto y la mayor concentración de antocianos, por lo tanto,

la eliminación del material de la pulpa antes de la fermentación eliminó un factor que provocaba la pérdida de taninos y antocianos. Sin embargo, la aplicación del paso de clarificación previo a la maceración que se realiza en esta vinificación es complicado aplicarlo en bodega.

El tratamiento con el enzima clarificante (rica en pectín liasa) obtuvo resultados similares a la vinificación anteriormente comentada, pero por diferentes razones. El tratamiento con este enzima aumenta la extracción de compuestos fenólicos debido a su capacidad para degradar la pared celular vegetal y conduce a una mayor presencia de polisacáridos solubles de bajo peso molecular, acción ligada a la actividad pectín liasa, que interactúan con los taninos, ayudando a mantenerlos en solución. Sin embargo, el tratamiento con el enzima rico en pectín liasa generó grandes cantidades de paredes de celulares de uva degradadas suspendidas que tenían una capacidad de adsorción de compuestos fenólicos significativa. Este fenómeno, sorprendentemente, tuvo un efecto positivo ya que favoreció que hubiera un gradiente más pronunciado de compuestos fenólicos de la uva al vino. La mayor pérdida de compuestos fenólicos precipitados por las lías derivó en un aumento de la extracción de estos del hollejo y las semillas de uva, lo cual provocó un aumento de la concentración de compuestos fenólicos del vino, en comparación con un vino elaborado con un enzima de maceración tradicional. Esto sugiere que las preparaciones enzimáticas comerciales para las vinificaciones del vino tinto deben priorizar la presencia de la actividad de pectín liasa sobre otras actividades secundarias para optimizar el contenido fenólico final del vino.



DISCUSIÓN GENERAL



Los antocianos y los taninos son los compuestos más directamente responsables del color y cuerpo de los vinos. La gran importancia sensorial de estos compuestos ha sido demostrada en los estudios de Mercurio et al. (2010) y Sáenz-Navajas et al. (2011), donde se ha demostrado que la aceptación de los vinos por expertos catadores y el precio esperado de algunos vinos está directamente relacionado con el contenido de polifenoles en los vinos.

Estos compuestos se encuentran en las células del hollejo de la uva, en el interior de las vacuolas o adheridos a la pared celular, y también, en el caso de los taninos, en las semillas. Durante la maceración, estos compuestos se extraen de la uva al mosto-vino.

Dada su fuerte influencia en la calidad de los vinos tintos, se han realizado numerosos estudios para determinar cómo funcionan los mecanismos de su extracción desde la uva al mosto-vino. Está claro que durante la maceración hay que romper las paredes celulares para que los compuestos se extraigan de las vacuolas, por lo que inicialmente dos de los factores que determinarán su presencia en el vino serán la cantidad de estos compuestos en el hollejo en el momento de la vendimia y la facilidad o dificultad de su extracción. De hecho, se ha informado que conocer las cantidades de antocianos y taninos en el hollejo o las semillas no es suficiente para estimar lo que se encontrará en el vino (Busse-Valverde et al., 2012; Harbertson et al., 2002), siendo las cantidades que se encuentran en los vinos normalmente inferiores a las esperadas, y esto se ha atribuido habitualmente a que parte de los compuestos fenólicos no difunden de las células del hollejo, debido a la barrera difusional que suponen las paredes celulares (Ortega-Regules et al., 2006).

Sin embargo, en los últimos años se ha estudiado otro fenómeno y es que las paredes celulares no solo actúan como una barrera de difusión, sino que también pueden interaccionar con los compuestos polifenólicos cuando están en solución, adsorbiéndolos primero y precipitándolos después. No solo los taninos sufren esta adsorción, estudios recientes han demostrado que los antocianos también son fuertemente retenidos por las paredes celulares y que, además, compiten con los taninos por los sitios de adsorción (Bautista-Ortín et al., 2016). Las interacciones que ocurren entre los polisacáridos de la pared celular y los polifenoles de la uva son enlaces no covalentes, principalmente enlaces de

hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Medina-Plaza et al., 2020; Renard et al., 2017). Los complejos resultantes de las interacciones entre las paredes celulares y los compuestos fenólicos son generalmente insolubles, por lo que acaban precipitando en un medio líquido.

Los estudios realizados para demostrar la existencia de estas interacciones se habían llevado a cabo en soluciones modelo (Bautista-Ortín et al., 2016; Bindon et al., 2010a, 2010b; Castro-López et al., 2016). Por lo tanto, nuestro primer objetivo fue comprobar si realmente se producía dicha adsorción y precipitación de compuestos fenólicos y su influencia en las características cromáticas del vino. Por ello, desarrollamos la experiencia descrita en la **Publicación 3.1.**, en la que elaboramos una vinificación donde la materia vegetal en suspensión en el mosto, formada principalmente por paredes celulares de pulpa de uva, se eliminaba antes de la etapa de maceración. De esta forma, esta elaboración tenía una menor concentración de material vegetal en suspensión durante la etapa en la que se extraen los compuestos fenólicos del hollejo y semillas (maceración). Los resultados del **Publicación 3.1.** mostraron que las paredes celulares afectaron claramente a la composición fenólica de los vinos, ya que las características cromáticas mejoraron y la concentración de antocianos y taninos aumentó un 23% y un 43% respectivamente tras la eliminación del material vegetal en suspensión.

Por lo tanto, habiendo demostrado que una parte importante de los compuestos fenólicos pueden adsorberse en el material de la pared celular y afectar a las propiedades de los vinos resultantes, nuestro interés se centró en desarrollar técnicas que limiten o impidan la adsorción de compuestos fenólicos por estas paredes celulares o promover su desorción si las interacciones ya han ocurrido.

Las técnicas en las que nos centramos fueron la adición de enzimas que degradan las paredes celulares de la uva, el uso de ultrasonidos de alta potencia (US) y la adición de polisacáridos solubles. Cada una de estas técnicas se probó inicialmente en solución modelo, con el objetivo de seleccionar las mejores condiciones de trabajo y las técnicas más efectivas que, posteriormente, pudieran ser aplicadas en vinificaciones reales.

Inicialmente nos centramos en los enzimas de maceración (**Publicaciones 3.2. y 3.3.**). Presumimos que los enzimas que degradan los polisacáridos estructurales de la pared celular vegetal, especialmente las pectinasas, podrían limitar la adsorción de compuestos fenólicos por las paredes celulares, de hecho, estudios previos habían informado que al eliminar la fracción péctica de las paredes celulares, estas perdían cierta capacidad para unirse a los taninos (Ruiz-García et al., 2014). Por ello, en el **Publicación 3.2.** realizamos ensayos en solución modelo en los que determinamos la adsorción de taninos de semilla de uva por las paredes celulares del hollejo de uva de la variedad Monastrell en presencia de los enzimas: celulasa, poligalacturonasa, xilanasas, pectín liasa y pectinmetilesterasa. Estos se añadieron de forma individual, secuencial o simultáneamente.

Nuestra hipótesis inicial fue que la degradación extensiva de las paredes celulares producida por la combinación de varios enzimas reduciría drásticamente la adsorción de compuestos fenólicos. Sin embargo, los tratamientos en los que se utilizaron enzimas individualmente, y especialmente el que contenía pectín liasa, fueron los tratamientos en los que la mayor concentración de taninos permaneció en solución. Observamos que una consecuencia derivada de la degradación de la pared celular producida por los enzimas fue la liberación de polisacáridos solubles a la solución, y dependiendo de las características y peso molecular de estos polisacáridos, estos también tenían la capacidad de interactuar con los taninos en suspensión y precipitarlos. Las combinaciones enzimáticas (tanto secuenciales como simultáneas) liberaron altas cantidades de polisacáridos de alto peso molecular que precipitaron al formar complejos con los taninos, disminuyendo la cantidad de estos en solución. Cuando la pectín liasa se usó individualmente, se liberaron altas cantidades de polisacáridos solubles, pero, de bajo peso molecular, que no interactuaron con los taninos en solución o, si lo hicieron, formaron complejos solubles. Por tanto, la clave a la hora de utilizar enzimas es encontrar un equilibrio entre la degradación de las paredes para reducir su capacidad de interacción con los compuestos fenólicos y la producción de polisacáridos solubles que formen complejos que no precipiten.

En la **Publicación 3.3.**, cambiamos las condiciones de trabajo. Utilizamos paredes celulares de hollejo de uva de la variedad Syrah, para verificar si los tratamientos enzimáticos estaban influenciados por el efecto varietal. Tras los resultados negativos obtenidos con las combinaciones enzimáticas de la **Publicación 3.2.**, en este solo utilizamos los enzimas celulasa, pectín liasa, pectinmetilesterasa y xilanasas de forma individual. Además, queríamos comprobar si estas enzimas también eran capaces de liberar taninos una vez que ya había tenido lugar la interacción con las paredes celulares.

Las paredes celulares de Syrah adsorbieron menos taninos que las de Monastrell, un 41,8% de retención frente a un 54,5%. Este era un resultado esperado ya que el hollejo de la uva Monastrell es más grueso y presenta pectinas con un mayor grado de esterificación (Ortega-Regules et al., 2006). En este caso, los enzimas celulasa, pectín liasa y xilanasas obtuvieron resultados similares, logrando reducir la retención de taninos. Nuevamente, el enzima que produjo la degradación más extensa de las paredes celulares de la piel de Syrah fue la pectín liasa. Por tanto, podemos afirmar que los enzimas que degradan la pared celular, especialmente la pectín liasa, consiguen evitar cierta adsorción de los taninos por las paredes celulares del hollejo de la uva.

Sin embargo, en las pruebas de desorción, los enzimas mostraron poco efecto. De hecho, la simple agitación de los complejos paredes celulares-taninos en la solución hidroalcohólica conseguía una desorción de taninos similar al uso de enzimas. En el estudio de Castro-López et al. (2016) se describieron resultados similares, los enzimas no lograron una liberación significativa de taninos (apenas un 6%). El problema al que se enfrentan los enzimas parece ser que no pueden acceder a los polisacáridos de las paredes celulares cuando los taninos están ligados a ellas. Este hecho se confirma al observar la degradación que producen los enzimas en los dos ensayos. El estudio por CoMPPs de la composición de la pared celular mostró menos degradación de las paredes celulares debido a la acción de los enzimas en los ensayos de desorción, a lo que se sumó una baja liberación de polisacáridos solubles al medio.

La **Publicación 3.4.** se centró en la aplicación de enzimas y ultrasonidos en una vinificación real. En este trabajo se añadió un cóctel de enzimas cuya principal actividad era la pectín liasa y se aplicaron ultrasonidos en dos

momentos diferentes de la maceración, al principio, junto con los enzimas, y al tercer día de la etapa de maceración. En este trabajo quisimos observar cómo los enzimas y los ultrasonidos afectan tanto a la extracción de compuestos fenólicos como a su posible adsorción por parte del material vegetal en suspensión.

No fue de extrañar que tanto los enzimas como los ultrasonidos, utilizados por separado, dieran como resultado vinos con mayor contenido fenólico que el control, ya que estas técnicas ya se habían utilizado anteriormente en otros estudios (en condiciones similares) y habían obtenido resultados positivos. Sin embargo, el hallazgo más interesante fue cómo el resultado de la aplicación de los ultrasonidos se vio afectado por el momento de aplicación, siendo la extracción de compuestos fenólicos mucho más efectiva cuando se aplicaron los ultrasonidos tres días después de la adición del enzima. Creemos que se produjeron tres efectos simultáneos debido a la acción del enzima, de los ultrasonidos y el etanol. Por un lado, la extensa degradación que produce el enzima sobre los polisacáridos de las paredes celulares (efecto ya observado cuando se utilizó el enzima pectín liasa en las **Publicaciones 3.2. y 3.3.**) los hizo más susceptibles a los efectos de los ultrasonidos, especialmente tres días después del inicio del proceso de maceración fermentativa, donde ya estaba presente cierta cantidad de etanol, ya que el etanol también tiene la capacidad para degradar las paredes celulares, como se observa en el análisis CoMPPs de las **Publicaciones 3.2. y 3.3.** Además, ya hemos probado anteriormente (**Publicaciones 3.2., 3.3. y 3.5.**) que las técnicas utilizadas en esta elaboración son capaces de reducir en cierta medida, la adsorción de compuestos fenólicos por las paredes celulares vegetales, hecho que también habría contribuido al aumento de la composición fenólica.

En la **Publicación 3.5.**, centramos nuestra atención en la recuperación de los compuestos fenólicos precipitados junto con el material vegetal en las vinificaciones y que junto con las paredes celulares de las levaduras muertas forman lo que se conocen como lías. El estudio se centró en el uso de herramientas para la liberación de estos compuestos, utilizando enzimas y ultrasonidos. Las pruebas de desorción se aplicaron sobre lías liofilizadas extraídas de una vinificación tradicional, y se utilizó un enzima capaz de degradar

las paredes celulares vegetales (enzima comercial compuesto principalmente por pectín liasa y poligalacturonasa), un enzima que degrada las paredes celulares de las levaduras (β -glucanasa) y ultrasonidos de alta potencia, capaz de producir la ruptura de las paredes celulares por cavitación.

Se observaron diferencias en los tratamientos individuales de los enzimas o los ultrasonidos, pero la combinación de los enzimas y los ultrasonidos tuvo un efecto aditivo, liberando una cantidad importante de los taninos y antocianos adsorbidos sobre las lías. Además, también produjo la liberación de una gran cantidad de polisacáridos de bajo peso molecular, compuestos de importancia enológica y buscados en los procesos de crianza sobre lías. Es importante destacar que los polisacáridos liberados de las lías con estas técnicas siempre tenían pesos moleculares bajos, lo que reducía la readsorción no deseada de polifenoles por parte del material solubilizado de las lías. Los resultados de la **Publicación 3.5.** dejan claro que la aplicación de enzimas y ultrasonidos durante la crianza sobre lías podría, además de acelerar el proceso, mejorar la composición fenólica del vino. Existe una clara diferencia en la efectividad para desorber compuestos fenólicos ligados a las paredes celulares entre las **Publicaciones 3.3. y 3.5.**, y esto probablemente se deba a que la combinación de varias técnicas (ultrasonidos, enzimas pectín liasa y glucanasa) favorezca la ruptura de los enlaces polifenoles-pared celular, mientras que los tratamientos de la **Publicación 3.3.** (enzimas utilizados individualmente) no fueron lo suficientemente efectivos como para romper estos enlaces.

En la **Publicación 3.6.** se quiso comprobar si determinados polisacáridos solubles, como el manano o la pectina esterificada, podían competir con las paredes celulares en la interacción con compuestos fenólicos (taninos), formando complejos solubles e impidiendo la adsorción y precipitación de compuestos por las paredes celulares. La aplicación de polisacáridos solubles para este fin surgió del estudio de Renard et al. (2001). Estos autores consiguieron desorber los taninos ligados a las paredes celulares lavando con una solución modelo en la que se disolvieron ciertos polisacáridos solubles. En esta publicación llevamos a cabo ensayos en soluciones de vino modelo y vinificaciones a pequeña escala. En primer lugar, se estudiaron los ensayos de adsorción de los taninos de hollejo y semilla de uva en presencia de las paredes

celulares del hollejo de uva Monastrell y dos polisacáridos solubles: manano y pectina de alto grado de esterificación y, posteriormente, ensayos en vinificaciones en las que se emplearon estos polisacáridos solubles añadidos antes de la etapa de maceración.

Ambos polisacáridos formaron complejos solubles con los taninos de hollejo y semilla de uva, además, lograron reducir la adsorción de los taninos por parte de las paredes celulares, aunque resultaron más efectivos en el caso de los taninos de semillas.

En las vinificaciones con polisacáridos solubles añadidos se confirmó el papel positivo de estos, observándose una mejora en las características cromáticas y un aumento en el contenido de taninos, además de estar mejor calificados en un análisis sensorial, especialmente el vino al que se añadió pectina con un alto grado de esterificación.

Finalmente, en la **Publicación 3.7.**, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios anteriores quisimos poner de manifiesto si el enzima pectín liasa, en una vinificación real, era realmente capaz de mejorar la extracción de compuestos fenólicos de la uva y limitar sus pérdidas por adsorción en el material de pared celular en suspensión (con las consiguientes pérdidas por precipitación) cuando se compara su efecto con un enzima diseñado para aumentar la extracción de compuestos fenólicos de la uva. Por lo tanto, se realizaron dos vinificaciones con los enzimas mencionados y se compararon con una vinificación control y también con una vinificación donde se realizó una eliminación de las paredes celulares suspendidas en el mosto antes de la maceración (similar a la descrita en la **Publicación 3.1.**).

Los resultados fueron sorprendentes. Ambos enzimas aumentaron la concentración fenólica del vino, pero el enzima rico en actividad pectín liasa dio lugar al vino con las concentraciones más altas de compuestos fenólicos. Pero, sorprendentemente, este enzima también generó las mayores cantidades de lías y de pérdidas de polifenoles ligados a las lías precipitadas. Sin embargo, esto resultó en un efecto positivo, la precipitación de lías ricas en compuestos fenólicos probablemente creó un gradiente pronunciado de compuestos fenólicos de la uva al mosto/vino, mejorando, de esta forma las características

cromáticas en el vino final, en comparación con el vino elaborado mediante una maceración tradicional.

Por tanto, según los resultados de las **Publicaciones 3.2., 3.3., 3.4., 3.5. y 3.7.** se puede concluir que el enzima pectín liasa es sin duda un elemento clave a la hora de tratar los problemas derivados de las interacciones entre las paredes celulares y los compuestos fenólicos, ya que reduce la adsorción de taninos por las paredes celulares y genera polisacáridos de bajo peso molecular (**Publicaciones 3.2. y 3.3.**). Además, es capaz de aumentar la extracción de compuestos fenólicos durante la vinificación debido a su alta capacidad para degradar las paredes celulares de las plantas e incluso su efectividad aumenta considerablemente cuando se combina con otros métodos físicos como los ultrasonidos (**Publicación 3.4.**). También es capaz de promover la desorción de compuestos fenólicos precipitados en las lías (**Publicación 3.5.**) y, además, incluso cuando su actividad debería tener un efecto negativo porque produce una elevada cantidad de lías con cierta capacidad de adsorber compuestos fenólicos, el efecto resulta ser positivo porque promueve su difusión desde las semillas y el hollejo al mosto/vino.



RESUMEN



La calidad del vino tinto es evaluada según su color, sabor y aroma. Mientras que el aroma de los vinos se debe a la presencia de los compuestos volátiles; El sabor, y sobre todo el color, se deben a los compuestos fenólicos. Como se ha mencionado en el apartado **2**. la concentración de compuestos fenólicos en los vinos es baja, en parte debido a la pérdida de estos tras interaccionar con las paredes celulares de la pulpa y el hollejo, las cuales están en grandes cantidades en suspensión en el mosto. Por tanto, una extracción efectiva de compuestos fenólicos depende de la habilidad para limitar estas adsorciones o para liberar los compuestos adsorbidos.

En esta Tesis doctoral se demuestra en una vinificación real hasta qué punto la presencia de paredes celulares (o material vegetal) en suspensión durante la maceración es capaz de limitar la concentración de compuestos fenólicos de un vino tinto. Para ello se realizó una vinificación en la cual se añadió una etapa previa a la maceración en la cual se eliminó cierta cantidad de paredes celulares suspendidas mediante enzimas clarificantes (desfangado), esta vinificación poseía más concentración de antocianos y, sobre todo, taninos, que una vinificación tradicional.

Tras tener la prueba de que se puede mejorar la concentración de compuestos fenólicos de un vino tinto impidiendo las interacciones entre estos y las paredes celulares se probaron tres técnicas para lograr este objetivo: la adición de enzimas que degradan los polisacáridos constituyentes de la pared celular, la adición de polisacáridos solubles y la aplicación de ultrasonidos de alta potencia.

Cuando se estudió el efecto de diferentes enzimas que degradan la pared celular sobre la adsorción de compuestos fenólicos en solución modelo los resultados indicaron que los enzimas eran capaces de disminuir las interacciones entre paredes celulares y taninos, sobre todo cuando se utilizaban estos enzimas de forma individual, siendo la pectín liasa el enzima que más degradación produjo en la pared celular y la que más limitó la adsorción de taninos. Pero, por otra parte, se ha demostrado también que los enzimas apenas son capaces de liberar taninos ya unidos a las paredes celulares, siendo la posible razón detrás de este resultado que los enzimas no eran capaces de

acceder y degradar los polisacáridos de las paredes a los que estaban ligados los taninos.

El uso combinado de un enzima rico en actividad pectín liasa y los ultrasonidos de alta potencia lograron, tanto incrementar la extracción de compuestos fenólicos durante la maceración, como disminuir las interacciones entre estos y las paredes celulares en suspensión durante esta etapa. Los mejores efectos se observaron cuando se adiciona el enzima al comienzo de la maceración y, tras tres días, se aplica el tratamiento con ultrasonidos. Además, también se ha podido demostrar que la combinación de enzimas (β -glucanasa y pectín liasa) y ultrasonidos, pueden liberar antocianos y taninos ligados a las paredes celulares vegetales y de levaduras presentes en lías de vino tinto.

La adición de polisacáridos solubles tanto en soluciones modelo como en vinificaciones reales logró que más cantidad de compuestos fenólicos permaneciera en solución, por lo tanto, sí que son capaces de competir con las paredes celulares al interaccionar con estos.

Finalmente, dados los positivos resultados observados en todas aquellas experiencias en disolución modelo donde la actividad predominante era la pectín liasa se ha querido determinar su papel en una vinificación real, comparando el efecto de tres tratamientos sobre la concentración de compuestos fenólicos de un vino tinto (el uso de un enzima rico en actividad pectín liasa, de un enzima de maceración, es decir, un cocktail enzimático con diferentes pectinasas, celulasa y hemicelulasas, y la eliminación del material vegetal en suspensión a través de la inclusión de una etapa de desfangado antes de la maceración pelicular fermentativa. El enzima rico en pectín liasa logró aumentar la concentración de compuestos fenólicos debido a su capacidad para degradar la pared celular vegetal y a la producción de gran cantidad de polisacáridos solubles capaces de mantener los compuestos fenólicos en solución. Pero sorprendentemente, este enzima generó una gran cantidad de lías y de material fenólico unido a éstas, fenómeno que de forma inesperada tuvo un efecto positivo en la composición cromática y fenólica del vino ya que favoreció la generación de un gradiente más pronunciado de compuestos fenólicos de la uva al mosto/vino, aumentando de esta forma su extracción.

Por lo tanto, todas las técnicas empleadas consiguieron limitar las interacciones entre los compuestos fenólicos y las paredes celulares, sin embargo, todas ellas debían aplicarse con especificaciones para aumentar su efectividad:

- Técnicas enzimáticas:
 - o La combinación de varios enzimas resulta contraproducente si se van a aplicar con el objetivo de reducir las interacciones entre las paredes celulares y los compuestos fenólicos, ya que producen demasiado material solubilizado, que acaba desempeñando el mismo papel que las paredes celulares en las interacciones. Por lo tanto, la utilización de los enzimas debe hacerse de forma individual.
 - o Las pectinasas, poligalacturonasa y, sobre todo pectín liasa, son las que más reducen la adsorción de compuestos fenólicos, pero los enzimas por si solas no son capaces de liberar los compuestos fenólicos ya ligados a las paredes celulares
- Adición de polisacáridos solubles: en particular la pectina de alto grado de esterificación, deben ser utilizados en pequeñas concentraciones ya que pueden dar problemas de filtrabilidad al vino.
- Tratamiento de ultrasonidos de alta potencia:
 - o Su efectividad aumenta considerablemente si se combina con pectinasas.
 - o Es importante optimizar el tiempo de tratamiento, ya que utilizado en tiempos prolongados puede dar lugar a oxidaciones y tiempos reducidos no producen cambios significativos.



CONCLUSIONES



1. Se ha demostrado inequívocamente y en una vinificación real que las interacciones entre compuestos fenólicos, específicamente taninos y antocianos y el material vegetal en suspensión en el mosto tienen una gran influencia en la composición fenólica final de los vinos, al presentar aquellos a los que se les eliminó dicho material, concentraciones muy superiores de taninos y antocianos respecto a los obtenidos en una vinificación tradicional (**Publicación 3.1.**).
2. La utilización de enzimas que degradan la pared celular del hollejo de la uva es efectiva en la reducción de la adsorción de compuestos fenólicos, pero depende del tipo de enzima y la forma de utilización. Las mayores reducciones en la adsorción de compuestos fenólicos se obtuvieron cuando se utilizó el enzima pectín liasa, el cual produce una degradación extensa de las paredes celulares, limitando la adsorción y liberando al mismo tiempo polisacáridos solubles de bajo peso molecular que no producen la precipitación de compuestos fenólicos (**Publicación 3.2.**).
3. La capacidad de adsorción de compuestos fenólicos de las paredes celulares depende de la variedad, ya que se han observado diferentes capacidades de adsorción en Syrah y Monastrell y por tanto, la forma de utilizar los tratamientos para evitar las interacciones entre paredes celulares y compuestos fenólicos deben estar adaptados a la variedad/es de uva con las que se vaya a elaborar el vino (**Publicación 3.2. y 3.3.**).
4. Los tratamientos enzimáticos son poco efectivos para liberar compuestos fenólicos ya adsorbidos en las paredes celulares, indicando que los enzimas no son capaces de acceder a los polisacáridos de las paredes celulares a los que están unidos los compuestos fenólicos (**Publicación 3.3.**).
5. El material solubilizado de las paredes celulares ha mostrado, en una solución modelo, que tiene una alta capacidad de interaccionar y precipitar compuestos fenólicos, especialmente si se generan polisacáridos de alto peso molecular. Esto constituye un gran problema a la hora de utilizar

ciertas técnicas como la aplicación de enzimas o ultrasonidos para incrementar la extracción de compuestos fenólicos de las uvas, ya que éstas tienden a aumentar la degradación de las paredes celulares y, por lo tanto, la producción de este material solubilizado. Por tanto, es determinante controlar las condiciones en las que se aplican estos tratamientos, como, por ejemplo, el tipo de enzimas que utilizar o el tiempo de tratamiento de los ultrasonidos (**Publicación 3.2., 3.3. y 3.6.**).

6. La combinación de enzimas (especialmente aquellas donde la actividad pectín liasa es alta) y ultrasonidos aumenta la extracción de compuestos fenólicos de la uva, y, además, reduce su adsorción por parte del material celular en suspensión en vinificaciones reales, dando lugar a un vino con mayor concentración de polifenoles (**Publicación 3.4.**).
7. Los compuestos fenólicos unidos al material vegetal precipitado (que forma parte de las lías) pueden ser liberados con una combinación de enzimas (pectín liasa y β -glucanasa) y ultrasonidos de alta potencia, indicando que la crianza sobre lías pueda mejorar la composición fenólica de un vino tinto si se aplican durante el proceso técnicas que rompan las uniones de compuestos fenólicos con las paredes celulares vegetales y de levaduras (**Publicación 3.5.**).
8. La adición de polisacáridos solubles comerciales en soluciones modelo y en vinos reales crea una competencia con las paredes celulares a la hora de interaccionar con los compuestos fenólicos, formando complejos solubles y, de este modo, evitando su precipitación con las mismas. Las vinificaciones en las que se adicionaron los polisacáridos solubles presentaron mayor concentración de compuestos fenólicos (taninos y antocianos) que una vinificación tradicional, obteniendo, además, mejores puntuaciones en el análisis sensorial (**Publicación 3.6.**).
9. Los resultados positivos del enzima pectín liasa en las características cromáticas finales de un vino tinto se han demostrado en vinificaciones reales, comparándolo con la acción de otro tipo de enzima pectolítico y

con la eliminación de material soluble antes de la fermentación. El tratamiento con un enzima rico en pectín liasa aumenta la extracción de compuestos fenólicos debido a su capacidad para degradar la pared celular vegetal. Además, aunque este enzima genera una gran formación de lías y precipitación de compuestos fenólicos, en una vinificación real este fenómeno tiene un efecto positivo ya que favorece la generación de un gradiente más pronunciado de compuestos fenólicos de la uva al mosto/vino, lo que da como resultado una concentración final mayor de compuestos fenólicos en los vinos terminados (**Publicación 3.7.**).

BIBLIOGRAFÍA

- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Hernández, A., Ruiz-García, Y., Gil-Muñoz, R., & Gómez-Plaza, E. (2016). Anthocyanins influence tannin–cell wall interactions. *Food Chemistry*, *206*, 239-248.
- Bindon, K. A., Smith, P. A., & Kennedy, J. A. (2010a). Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 1. Effect on proanthocyanidin composition and molecular mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(4), 2520-2528.
- Bindon, K. A., Smith, P. A., Holt, H., & Kennedy, J. A. (2010b). Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 2. Implications for vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(19), 10736-10746.
- Busse-Valverde, N., Bautista-Ortín, A. B., Gómez-Plaza, E., Fernández-Fernández, J. I., & Gil-Munoz, R. (2012). Influence of skin maceration time on the proanthocyanidin content of red wines. *European Food Research and Technology*, *235*(6), 1117-1123.
- Castro-López, L., Gómez-Plaza, E., Ortega-Regules, A., Lozada, D., & Bautista-Ortín, A. B. (2016). Role of cell wall deconstructing enzymes in the proanthocyanidin–cell wall adsorption–desorption phenomena. *Food Chemistry*, *196*, 526-532.
- Harbertson, 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*(1), 54-59.
- Medina-Plaza, C., Beaver, J. W., Miller, K. V., Lerno, L., Dokoozlian, N., Ponangi, R., & Oberholster, A. (2020). Cell wall–anthocyanin interactions during red wine fermentation-like conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, *71*(2), 149-156.
- Mercurio, M. D., Dambergs, R. G., Cozzolino, D., Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2010). Relationship between red wine grades and phenolics. 1. Tannin and total phenolic concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(23), 12313-12319.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1-2), 26-32.
- Renard, C. M., Baron, A., Guyot, S., & Drilleau, J. F. (2001). Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules*, *29*(2), 115-125.
- Renard, C. M., Watrelot, A. A., & Le Bourvellec, C. (2017). Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science & Technology*, *60*, 43-51.
- Ruiz-Garcia, Y., Smith, P. A., & Bindon, K. A. (2014). Selective extraction of polysaccharide affects the adsorption of proanthocyanidin by grape cell walls. *Carbohydrate Polymers*, *114*, 102-114.

Sáenz-Navajas, M. P., Martín-López, C., Ferreira, V., & Fernandez-Zurbano, P. (2011). Sensory properties of premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(1), 9-19.

