



## ***UNIVERSIDAD DE MURCIA***

**Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y  
Bromatología**

# **TÉCNICAS ENOLÓGICAS PARA LA OBTENCIÓN DE VINOS DE MONASTRELL DE ALTO CONTENIDO POLIFENÓLICO**

**Ana Belén Bautista Ortín  
2005**





## ***UNIVERSIDAD DE MURCIA***

**Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y  
Bromatología**

# **TÉCNICAS ENOLÓGICAS PARA LA OBTENCIÓN DE VINOS DE MONASTRELL DE ALTO CONTENIDO POLIFENÓLICO**

**MEMORIA PRESENTADA PARA ASPIRAR AL GRADO DE  
DOCTOR**

Ana Belén Bautista Ortín, 2005





# UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPTO. DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS,  
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

*Facultad de Veterinaria*

**GASPAR ROS BERRUEZO**, CATEDRÁTICO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

INFORMA

Que la Tesis Doctoral titulada “**TÉCNICAS ENOLÓGICAS PARA LA OBTENCIÓN DE VINOS DE MONASTRELL DE ALTO CONTENIDO POLIFENÓLICO**” ha sido realizada por la Licenciada en Ciencias Químicas D<sup>a</sup>. Ana Belén Bautista Ortín, bajo la inmediata supervisión de la Dra. Encarna Gómez Plaza y el Dr. Jose María López Roca, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Lo que se hace constar a efectos oportunos en Murcia a 20 de Julio de 2005





**UNIVERSIDAD  
DE MURCIA**

DEPTO. DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS,  
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

*Facultad de Veterinaria*

**D<sup>a</sup> ENCARNA GÓMEZ PLAZA**, Profesora Titular de Universidad y **D. JOSE MARÍA LÓPEZ ROCA**, Catedrático de Universidad, pertenecientes al Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Murcia

**HACEN CONSTAR,**

Que la memoria titulada “**TÉCNICAS ENOLÓGICAS PARA LA OBTENCIÓN DE VINOS DE MONASTRELL DE ALTO CONTENIDO POLIFENÓLICO**”, que presenta D<sup>a</sup>. Ana Belén Bautista Ortín para aspirar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología.

Lo que se hace constar a efectos oportunos en Murcia a 20 de Julio de 2005



## **AGRADECIMENTOS**

*En primer lugar deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, José María López Roca, catedrático del departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología y a la doctora Encarna Gómez Plaza, profesora de dicho departamento, por su orientación y coordinación, esenciales para el desarrollo de esta Tesis.*

*También quiero dar las gracias al personal de la Estación Enológica de Jumilla: Vicente, Mariano, Pascual, Juan, Juan Carlos... y sobre todo a José Ignacio por su ayuda y amistad.*

*Como no agradecer también la ayuda, el apoyo y sobre todo el cariño de mis compañeros y amigos de la Universidad: Luis Javier por su tiempo dedicado a ponerme al día con la analítica; Inma por su ayuda en la Enológica y su amistad; Anita mi mexicanita favorita, nunca me podré olvidar de ti y Marta, para que veas que hay gente que te quiere, gracias a todos por animarme a seguir adelante.*

*Tampoco me puedo olvidar de ti, Antonio Vicente, “técnico de laboratorio a tu servicio”, estas fueron tus primeras palabras y la verdad es que ha sido así, gracias por secarme tantos filtros y por tu buen humor.*

*También quiero dar mi agradecimiento a mis amigos de carrera: José Antonio, Mari Luz, Mari Carmen, Teresa y Eva, os llevare siempre en mi corazón.*

*También quiero dar mis más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han colaborado en la realización de este proyecto.*

*Gracias a mis padres: Pepe y Juana, hermanas: Salva, Tere, Jose, Eva y Alicia, mi hermano Juan Antonio, mis sobrinas: María, Sandra y Judit y a los más pequeños de la casa: Juan Antonio, Elena, Ainoa y María por quererme*

*tanto y por estar ahí siempre conmigo apoyándome y ayudándome de manera incondicional.*

*Finalmente quiero dedicar este trabajo a mi abuela Teresa, que siempre la llevaré en mi corazón y a Pepe, mi marido, no tengo palabras para ti, solo darte las gracias por quererme tanto.*

*La realización de este trabajo ha tenido lugar, en parte, en el marco de una beca asociada a la realización de proyectos de I+D, Innovación y Transferencia Tecnológica concedida por la Fundación Séneca y gracias a la colaboración de la empresa Julia Roch e Hijos.*



# ÍNDICE

I. OBJETIVOS .....	1
II. INTRODUCCIÓN .....	7
II.1 COLOR DE LOS VINOS TINTOS .....	9
II.1.1 COMPUESTOS FENÓLICOS RESPONSABLES DEL COLOR .....	9
II.1.1.1 ANTOCIANOS .....	9
II.1.1.2 TANINOS .....	10
II.1.2 EQUILIBRIOS DE LOS ANTOCIANOS EN LOS VINOS .....	11
II.1.3 ESTABILIZACIÓN DEL COLOR MEDIANTE LA COPIGMENTACIÓN .....	13
II.1.4 EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL CURSO DE LA ELABORACIÓN DEL VINO Y EFECTOS SOBRE EL COLOR .....	15
II.1.4.1 REACCIONES ENZIMÁTICAS .....	15
II.1.4.2 REACCIONES QUÍMICAS .....	16
II.1.4.2.1 Condensaciones antocianos-taninos .....	17
II.1.4.2.2 Formación de nuevos pigmentos derivados de los antocianos .....	22
II.1.4.2.3 Polimerización de taninos .....	23
II.1.5 INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL VINO EN LA PROPORCIÓN DE REACCIONES DE COMBINACIÓN ENTRE ANTOCIANOS Y TANINOS .....	25
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	29
III.1 UVA .....	31
III.1.1 MATERIAL VEGETAL .....	31
III.1.2 CONTROL DE LA MADURACIÓN .....	31
III.1.3 DETERMINACIONES GENERALES .....	32
III.1.3.1 GRADO BRUX .....	32
III.1.3.2 pH .....	32
III.1.3.3 ACIDEZ TOTAL .....	32
III.1.3.4 ÁCIDO L-MÁLICO .....	33
III.1.3.5 ÁCIDO TARTÁRICO .....	33
III.1.4 DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS .....	33
III.1.4.1 INTENSIDAD DE COLOR Y TONO .....	33

## Índice

III.1.4.2 PARÁMETROS CIELAB .....	34
III.1.4.3 ANTOCIANOS TOTALES .....	34
III.1.4.4 ÍNDICE DE POLIFENOLES TOTALES (IPT) .....	35
III.1.5 MÉTODOS PARA EL CÁLCULO DE MADURACIÓN POLIFENÓLICA .....	35
III.1.5.1 MÉTODO LAMADÓN .....	35
III.1.5.2 MÉTODO DE SAINT-CRICQ .....	36
III.1.6 DETERMINACIÓN DE LOS ANTOCIANOS DE LOS HOLLEJOS DE LA UVA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA .....	37
III.1.6.1 EXTRACCIÓN DE ANTOCIANOS .....	37
III.1.6.2 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN .....	37
III.2 VINO .....	39
III.2.1 VINIFICACIONES .....	39
III.2.1.1 DISEÑO DE LAS VINIFICACIONES .....	39
III.2.1.2 PROCESO DE ELABORACIÓN .....	41
III.2.2 DETERMINACIONES GENERALES .....	42
III.2.2.1 GRADO ALCOHÓLICO .....	42
III.2.2.2 SULFUROSO LIBRE Y TOTAL .....	43
III.2.2.3 ACETALDEHÍDO .....	43
III.2.2.4 GLICERINA .....	43
III.2.3 DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS .....	43
III.2.3.1 ANTOCIANOS MONÓMEROS Y POLÍMEROS .....	44
III.2.3.2 TANINOS TOTALES .....	44
III.2.3.3 TANINOS MONOMÉRICOS, OLIGOMÉRICOS Y POLIMÉRICOS .....	45
III.2.3.4 ÍNDICE DE CLORHÍDRICO .....	47
III.2.4 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC .....	48
III.2.5 ANÁLISIS SENSORIAL .....	50
III.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	52
IV. INFLUENCIA DEL GRADO DE MADURACIÓN DE LA UVA EN EL COLOR DEL VINO .....	53
IV.1 INTRODUCCIÓN .....	55
IV.1.1 LOCALIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS .....	55
IV.1.1.1 ANTOCIANOS .....	55
IV.1.1.2 TANINOS .....	57
IV.1.2 LA MADURACIÓN DE LA UVA Y LOS COMPUESTOS FENÓLICOS .....	58
IV.1.2.1 CARACTERES GENERALES DE LA MADURACIÓN .....	58
IV.1.2.2 SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS .....	62

IV.1.2.3 EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS .....	62
IV.1.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA	
DE LA UVA .....	64
IV.1.3.1 FACTORES EDAFOCLIMÁTICOS .....	64
IV.1.3.1.1 Clima .....	64
IV.1.3.1.2 Temperatura .....	66
IV.1.3.1.3 Iluminación .....	66
IV.1.3.1.4 Suelo .....	66
IV.1.3.2 FACTORES VARIETALES .....	67
IV.1.3.2.1 Variedad de uva, clon y portainjerto .....	67
IV.1.3.2.2 Edad del viñedo .....	67
IV.1.3.3 FACTORES CULTURALES .....	68
IV.1.3.3.1 Conducción del viñedo y densidad de plantación .....	69
IV.1.3.3.2 Poda y otras operaciones en verde .....	69
IV.1.3.3.3 Fertilización .....	70
IV.1.3.3.4 Riego .....	70
IV.1.4 CRITERIOS PARA DETERMINAR LA MADUREZ ÓPTIMA DE LAS UVAS .....	71
IV.1.5 LA MADUREZ FENÓLICA .....	74
IV.2 RESULTADOS .....	81
IV.2.1 EVOLUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA UVA DURANTE	
LA MADURACIÓN .....	81
IV.2.1.1 SÓLIDOS SOLUBLES .....	82
IV.2.1.2 PESO DE BAYA .....	83
IV.2.1.3 ACIDEZ TOTAL Y pH .....	85
IV.2.1.4 ÁCIDO TARTÁRICO Y ÁCIDO MÁLICO .....	86
IV.2.1.5 COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL MOSTO .....	89
IV.2.1.5.1 Compuestos fenólicos totales .....	89
IV.2.1.5.2 Antocianos totales .....	91
IV.2.1.5.3 Antocianos en el hollejo .....	92
IV.2.1.5.4 Parámetros cromáticos .....	95
IV.2.1.5.5 Análisis de componentes principales .....	97
IV.2.1.5.6 Índices de maduración fenólica .....	99
IV.2.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS VINOS OBTENIDOS CON UVAS	
DE DISTINTO GRADO DE MADURACIÓN .....	105
IV.2.2.1 PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2001 .....	105
IV.2.2.2 PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2002 .....	106
IV.2.2.2.1 Parámetros de color de los vinos de 2002 durante la vinificación .....	106

IV.2.2.2.2 Parámetros cromáticos y compuestos fenólicos de los vinos de 2002 durante su conservación en botella .....	111
IV.2.2.2.2.1 Parámetros espectrofotométricos .....	111
IV.2.2.2.2.2 Compuestos fenólicos individuales .....	114
IV.2.2.3 ANÁLISIS SENSORIAL .....	119

## V. INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE ENZIMAS

### EN EL COLOR DEL VINO ..... 125

#### V.1 INTRODUCCIÓN ..... 127

##### V.1.1 ESTRUCTURA CELULAR DE LA UVA ..... 127

##### V.1.2 ACCIÓN DE LOS ENZIMAS SOBRE LOS SUSTRATOS ..... 129

###### V.1.2.1 PECTINAS Y PECTINASAS ..... 129

###### V.1.2.2 HEMICELULOSA Y HEMICELULASAS ..... 131

###### V.1.2.3 CELULOSA Y CELULASAS ..... 132

##### V.1.3 UTILIZACIÓN DE ENZIMAS COMERCIALES EN LA ELABORACIÓN DEL VINO ..... 133

##### V.1.4 ACTIVIDADES DE LOS ENZIMAS DE MACERACIÓN DE PECTINASAS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DEL VINO ..... 135

#### V.2 RESULTADOS ..... 137

##### V.2.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICO-FÍSICAS DE LA UVA EN EL MOMENTO DE VENDIMIA ..... 137

##### V.2.2 PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2001 ..... 138

##### V.2.3 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2002 ..... 140

###### V.2.3.1 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DURANTE LA VINIFICACIÓN ..... 140

###### V.2.3.1.1 Antocianos totales ..... 140

###### V.2.3.1.2 Índice de polifenoles totales (IPT) ..... 141

###### V.2.3.1.3 Intensidad de color y tono ..... 143

###### V.2.3.1.4 Parámetros $L^*$ , $a^*$ y $b^*$ ..... 146

###### V.2.3.2 PARÁMETROS CROMÁTICOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS EN EL 2002 DURANTE SU CONSERVACIÓN EN BOTELLA ..... 147

###### V.2.3.2.1 Parámetros de color espectrofotométricos ..... 147

###### V.2.3.2.2 Compuestos fenólicos individuales ..... 152

##### V.2.4 ANÁLISIS SENSORIAL ..... 154

<b>VI. INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE TANINOS ENOLÓGICOS EN EL COLOR DEL VINO</b> .....	161
<b>VI.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	163
VI.1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS .....	163
VI.1.1.1 TANINOS CONDENSADOS O PROCIANIDINAS .....	164
VI.1.1.2 TANINOS HIDROLIZABLES .....	165
VI.1.2 PROPIEDADES DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS .....	167
VI.1.2.1 EFECTO DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS SOBRE EL COLOR DEL VINO .....	168
VI.1.2.2 EFECTO DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS SOBRE EL CUERPO Y LA ESTRUCTURA DEL VINO .....	169
VI.1.2.3 EFECTO DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS SOBRE LOS OLORES A REDUCCIÓN .....	169
VI.1.2.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS .....	170
VI.1.2.5 EFECTO QUELANTE DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS .....	170
<b>VI.2 RESULTADOS</b> .....	171
VI.2.1 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DURANTE LA VINIFICACIÓN .....	171
VI.2.1.1 ANTOCIANOS TOTALES .....	171
VI.2.1.2 ÍNDICE DE POLIFENOLES TOTALES (IPT) .....	172
VI.2.1.3 INTENSIDAD DE COLOR Y TONO .....	173
VI.2.1.4 PARÁMETROS L*, a* Y b* .....	176
VI.2.2 PARÁMETROS CROMÁTICOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS DURANTE SU CONSERVACIÓN EN BOTELLA .....	177
VI.2.2.1 PARÁMETROS DE COLOR ESPECTROFOTOMÉTRICOS .....	177
VI.2.2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES .....	181
VI.2.3 ANÁLISIS SENSORIAL .....	184
 <b>VII. INFLUENCIA DE LAS LEVADURAS EN EL COLOR DEL VINO</b> .....	 189
<b>VII.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	191
VII.1.1 LEVADURAS Y COLOR DEL VINO .....	192
VII.1.1.1 ADSORCIÓN DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS SOBRE LAS LEVADURAS .....	192
VII.1.1.2 FORMACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS: PIRANOANTOCIANOS .....	194

## Índice

VII.1.2 MANOPROTEÍNAS DE LEVADURA .....	195
VII.1.3 PAPEL DE LAS LEVADURAS SOBRE LOS AROMAS .....	199
VII.2 RESULTADOS .....	201
VII.2.1 PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2001 .....	201
VII.2.2 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2002 .....	203
VII.2.2.1 EVOLUCIÓN DE LA FERMENTACIÓN DE LAS DIFERENTES VINIFICACIONES .....	203
VII.2.2.2 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2002 DURANTE LA VINIFICACIÓN .....	204
VII.2.2.2.1 Antocianos totales .....	204
VII.2.2.2.2 Índice de polifenoles totales (IPT) .....	205
VII.2.2.2.3 Intensidad de color y tono .....	207
VII.2.2.2.4 Parámetros L*, a* y b* .....	209
VII.2.2.3 PARÁMETROS CROMÁTICOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS DE 2002 DURANTE SU CONSERVACIÓN EN BOTELLA .....	210
VII.2.2.3.1 Parámetros de color espectrofotométricos .....	210
VII.2.2.3.2 Compuestos fenólicos individuales .....	214
VII.2.3 ANÁLISIS SENSORIAL .....	216
VIII. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE MACERACIÓN Y LA APLICACIÓN DE SANGRADOS PARCIALES DEL MOSTO EN EL COLOR DEL VINO .....	223
VIII.1 INTRODUCCIÓN .....	225
VIII.1.1 FENÓMENOS QUE OCURREN DURANTE LA MACERACIÓN .....	225
VIII.1.2 EVOLUCIÓN DE ANTOCIANOS Y TANINOS DURANTE LA MACERACIÓN .....	227
VIII.1.3 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE MACERACIÓN EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y EL COLOR DEL VINO .....	231
VIII.1.4 LA TÉCNICA DEL SANGRADO .....	232
VIII.2 RESULTADOS .....	235
VIII.2.1 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DURANTE LA VINIFICACIÓN .....	235
VIII.2.1.1 PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS .....	235
VIII.2.1.1.1 Antocianos totales .....	236
VIII.2.1.1.2 Índice de polifenoles totales (IPT) .....	238

VIII.2.1.1.3 Intensidad de color y tono .....	240
VIII.2.1.1.4 Parámetros L*, a* y b* .....	245
VIII.2.2 PARÁMETROS CROMÁTICOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS DE 2002 DURANTE SU CONSERVACIÓN EN BOTELLA .....	245
VIII.2.2.1 PARÁMETROS DE COLOR ESPECTROFOTOMÉTRICOS .....	245
VIII.2.2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES .....	249
VIII.2.3 ENSAYOS DE OXIDACIÓN ACELERADA .....	253
VIII.2.4 ANÁLISIS SENSORIAL .....	259
IX. TRATAMIENTOS SELECCIONADOS Y COLOR DEL VINO ...	265
IX.1 RESULTADOS .....	267
IX.1.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICO-FÍSICAS DE LA UVA EN EL MOMENTO DE VENDIMIA .....	268
IX.1.2 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DURANTE LA VINIFICACIÓN .....	269
IX.1.2.1 ANTOCIANOS TOTALES .....	269
IX.1.2.2 ÍNDICE DE POLIFENOLES TOTALES (IPT) .....	270
IX.1.2.3 INTENSIDAD DE COLOR Y TONO .....	272
IX.1.2.4 PARÁMETROS L*, a* Y b* .....	274
IX.1.3 PARÁMETROS CROMÁTICOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS DURANTE SU CONSERVACIÓN EN BOTELLA .....	275
IX.1.3.1 PARÁMETROS DE COLOR ESPECTROFOTOMÉTRICOS .....	275
IX.1.3.2 COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES .....	279
IX.1.4 ANÁLISIS SENSORIAL .....	283
IX.1.4.1 CATA DESCRIPTIVA .....	283
IX.1.4.2 CATA TRIANGULAR .....	288
X. CONCLUSIONES .....	291
XI. BIBLIOGRAFÍA .....	297



## **I. OBJETIVOS**



El sector vitícola de la Región de Murcia cuenta con unas 50.000 Has cultivadas de viña, distribuidas principalmente en las tres Denominaciones de Origen de vinos de calidad (Jumilla, Yecla y Bullas) y en dos áreas de vinos de la tierra (Abanilla y Campo de Cartagena). En el mapa varietal de Murcia, el cultivar Monastrell supone más del 85% de la superficie vitícola, lo que ha dado lugar a una gran proporción de vinos monovarietales. En los últimos años se han estado elaborando excelentes tintos jóvenes tanto de maceración carbónica como de manera tradicional, pero todavía no han despegado con igual fuerza los vinos tintos de crianza, que por otro lado son los que más está demandando el mercado. El descenso en el consumo de vino per capita, experimentado en España y en los grandes países consumidores de la Unión Europea, ha afectado a los vinos de mesa, mientras que el consumo de los vinos de calidad y, principalmente los vinos de crianza, sigue una línea de lento pero continuado ascenso. Esta tendencia del mercado nos obliga claramente a buscar la calidad como única vía de solución para la vitivinicultura murciana, vía que pasa por la mejora de la calidad de la materia prima, la uva, y de las técnicas de elaboración y la crianza.

El color de los vinos y su estabilidad en el tiempo es una característica de fundamental importancia en la calidad de éstos, sobre todo para aquellos vinos destinados a envejecimiento. El color rojo de los vinos tintos es debido a los antocianos. Según su estado de equilibrio y la combinación con otras moléculas, los antocianos pueden estar coloreados en rojo, malva, amarillo o incoloros. El color de los antocianos depende del pH, SO<sub>2</sub> y la presencia de taninos, compuestos que juegan un importante papel en la estructura del vino y en la protección de las formas coloreadas.

El principal reto de las distintas técnicas empleadas en vinificación consiste en extraer estos compuestos polifenólicos de las uvas (responsables del color y estructura de los vinos tintos) sin afectar al correcto desarrollo de la fermentación alcohólica. El éxito en la elaboración de un vino ligero y afrutado o de un vino muy estructurado, así como el potencial futuro desarrollo de las características organolépticas, se basa en el control apropiado de la extracción

## Objetivos

de antocianos y taninos de las uvas al vino.

Esta extracción es siempre incompleta y sujeta a fuertes variaciones. Generalmente, los vinos contienen solo del 20 al 50% de los compuestos fenólicos originalmente presentes en la uva. El objetivo principal no es la máxima extracción, sino una óptima extracción de los compuestos de máxima calidad.

Diversos factores controlan la extracción y afectan de distinta forma a los diferentes compuestos. El primer factor es la calidad de la vendimia. El grado de madurez y la calidad sanitaria determina el contenido en polifenoles así como su extractabilidad. Disponer de una vendimia sana y de calidad es indispensable para la obtención de vinos de calidad. Es necesario que las condiciones climáticas sean favorables y la uva se coseche en su momento oportuno. El segundo factor es la duración de la maceración, donde se forma gran parte de la estructura del futuro vino. Los antocianos difunden fácilmente en el medio acuoso que es el mosto pero los taninos requieren la presencia de alcohol para su extracción, principalmente los de las semillas que requieren la degradación de la cutícula. Como el etanol se incrementa durante la fermentación, la duración de la maceración afectará al contenido en antocianos y taninos. También hay otras técnicas que permiten ajustar la extracción, por ejemplo el sangrado parcial del mosto, que influye sobre la abundancia de polifenoles en el vino. También durante la fermentación alcohólica, las levaduras pueden jugar un papel importante en el color de los vinos. Por una parte adsorbiendo y, por tanto, eliminando parte de los antocianos del vino y por otra parte, liberando sustancias al medio que facilitan la estabilización del color de los vinos.

Otras técnicas que se están empleando para facilitar la extracción de compuestos coloreados y la estabilización de ese color son los enzimas de maceración, los cuales no solo pueden ayudar a la extracción de antocianos sino también pueden facilitar la liberación de taninos, permitiendo la formación más precoz de complejos antociano-tanino. Otra posibilidad para estabilizar el color de los vinos tintos es el aporte de taninos enológicos.

El objetivo global de este trabajo de investigación, es estudiar la influencia del grado de maduración de la uva y de diferentes técnicas de elaboración, en el color de vinos de uvas de variedad Monastrell, con objeto de establecer una base sólida para la elaboración de vinos de alta calidad (crianza, reserva y gran reserva).

Para ello se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Optimizar la fecha de vendimia de la uva para obtener vinos de Monastrell con alto contenido polifenólico.
- Determinar si existe alguna ventaja en la utilización de enzimas que favorezcan la extracción y estabilidad polifenólica.
- Encontrar aquellas levaduras que provoquen la menor pérdida de pigmentos durante el proceso de maceración y la mayor estabilidad polifenólica de los vinos de Monastrell.
- Determinar si existe alguna ventaja en la utilización de taninos enológicos en la estabilización del color de vinos de Monastrell.
- Optimizar el tiempo de maceración de las partes sólidas de la uva con el mosto-vino para obtener un producto con alto contenido polifenólico y estable.
- Comprobar el efecto del sangrado parcial del mosto sobre el contenido de compuestos fenólicos y su estabilidad en los vinos de Monastrell.



## **II. INTRODUCCIÓN**



## II.1. COLOR DE LOS VINOS TINTOS

El color es uno de los aspectos organolépticos más importantes de un vino, no sólo porque es la primera e inmediata imagen, sino también porque es indicador de otros aspectos relacionados con su aroma y su sabor.

El color del vino tinto, así como parte de las características que definen su calidad, están en gran medida relacionadas con su composición en compuestos fenólicos.

### II.1.1 COMPUESTOS FENÓLICOS RESPONSABLES DEL COLOR

Los compuestos fenólicos que normalmente aparecen en los vinos tintos pueden ser clasificados como compuestos no flavonoides (ácidos benzoicos y cinámicos) y flavonoides (flavonoles, antocianos y flavanoles). De todos ellos, los antocianos y los taninos (flavanoles polimerizados, también conocidos como procianidinas) son los que mayor influencia tienen sobre el color del vino tinto.

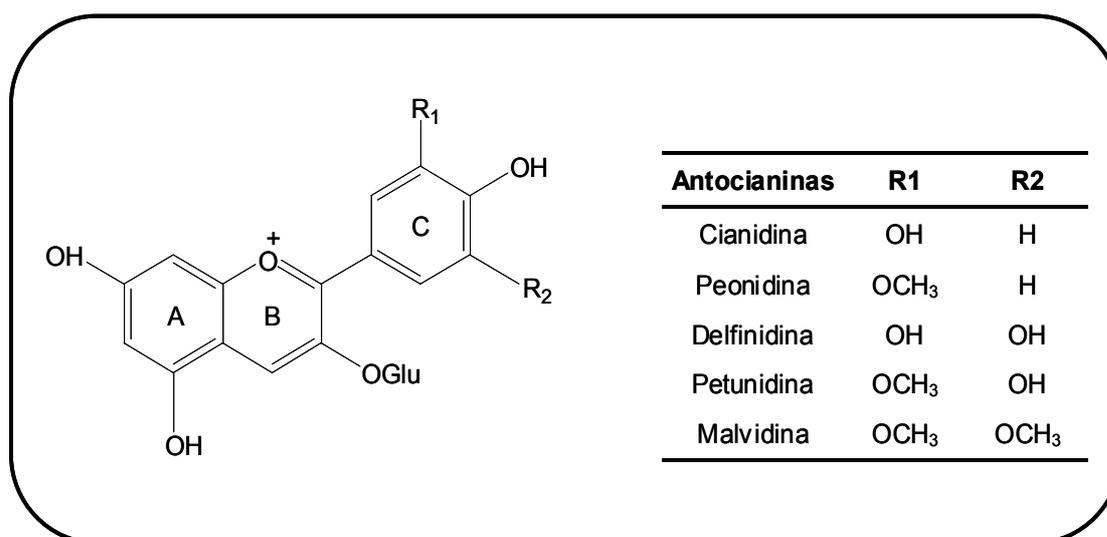
#### II.1.1.1 ANTOCIANOS

La estructura de los antocianos comprende dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado, insaturado y catiónico denominado ión flavilium. Bajo la forma heterosídica se denominan antocianinas, bastante más estables que la forma aglicona o antocianidinas.

En *Vitis vinífera* se distinguen cinco tipos de moléculas de antocianinas que difieren en el número de hidroxilos (OH) y grupos metilos (OCH<sub>3</sub>) en el anillo B (Figura II.1), aunque también se obtiene mayor diversidad de estos compuestos por la acilación de los azúcares con los ácidos acético, p-cumárico

y cafeico. En otras especies del mismo género, como *Vitis riparia* o *Vitis rupestris*, los antocianos aparecen como diglucósidos, con dos moléculas de glucosa en las posiciones 3 y 5.

**Figura II. 1** Estructura de las principales antocianinas encontradas en *Vitis vinífera*.



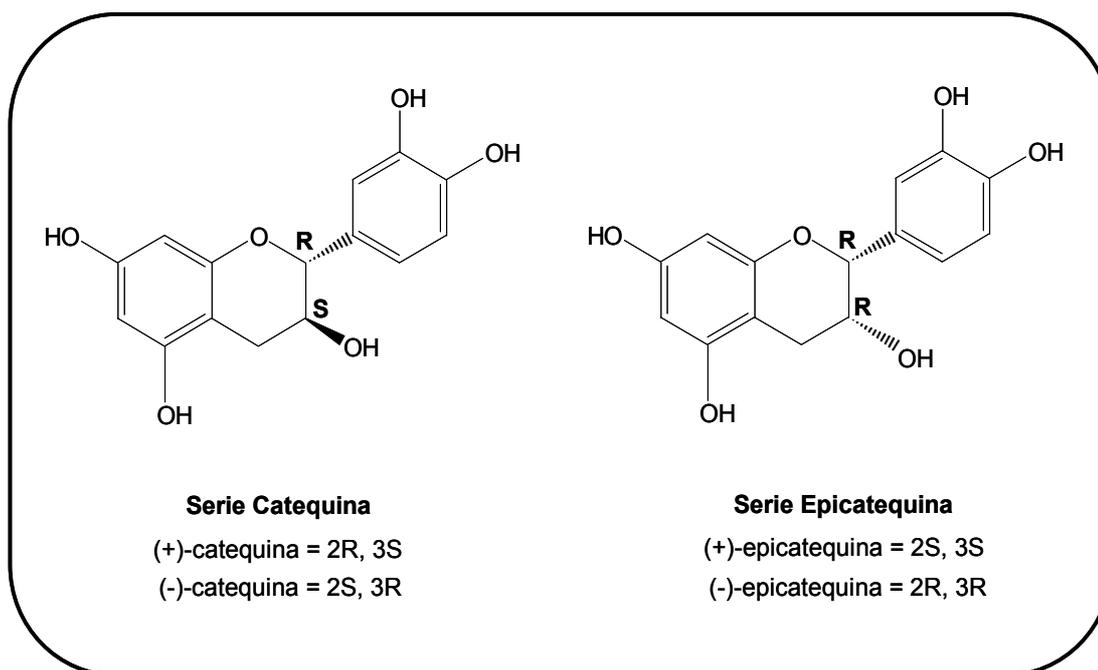
### II.1.1.2 TANINOS

Los taninos naturales de la uva y del vino son principalmente procianidinas. Su estructura se basa en polímeros más o menos complejos de los flavan-3-oles o 3-flavanoles.

Los flavan-3-oles monómeros están formados por dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado saturado, pudiendo encontrarse cuatro isómeros: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-catequina y (+)-epicatequina (Figura II.2). Los más abundantes son los dos primeros, así como también los derivados de la epicatequina en forma de éster gálico. Los taninos son complejos derivados de los compuestos anteriores, como las procianidinas dímeras, oligoméricas y polímeras. Las procianidinas oligoméricas son

moléculas de 3 a 10 unidades de flavanoles y las polímeras están formadas por más de 10 unidades de flavanoles, alcanzando un peso molecular superior a 3000.

**Figura II.2** Estructura de los flavan-3-oles, unidades básicas de las procianidinas.



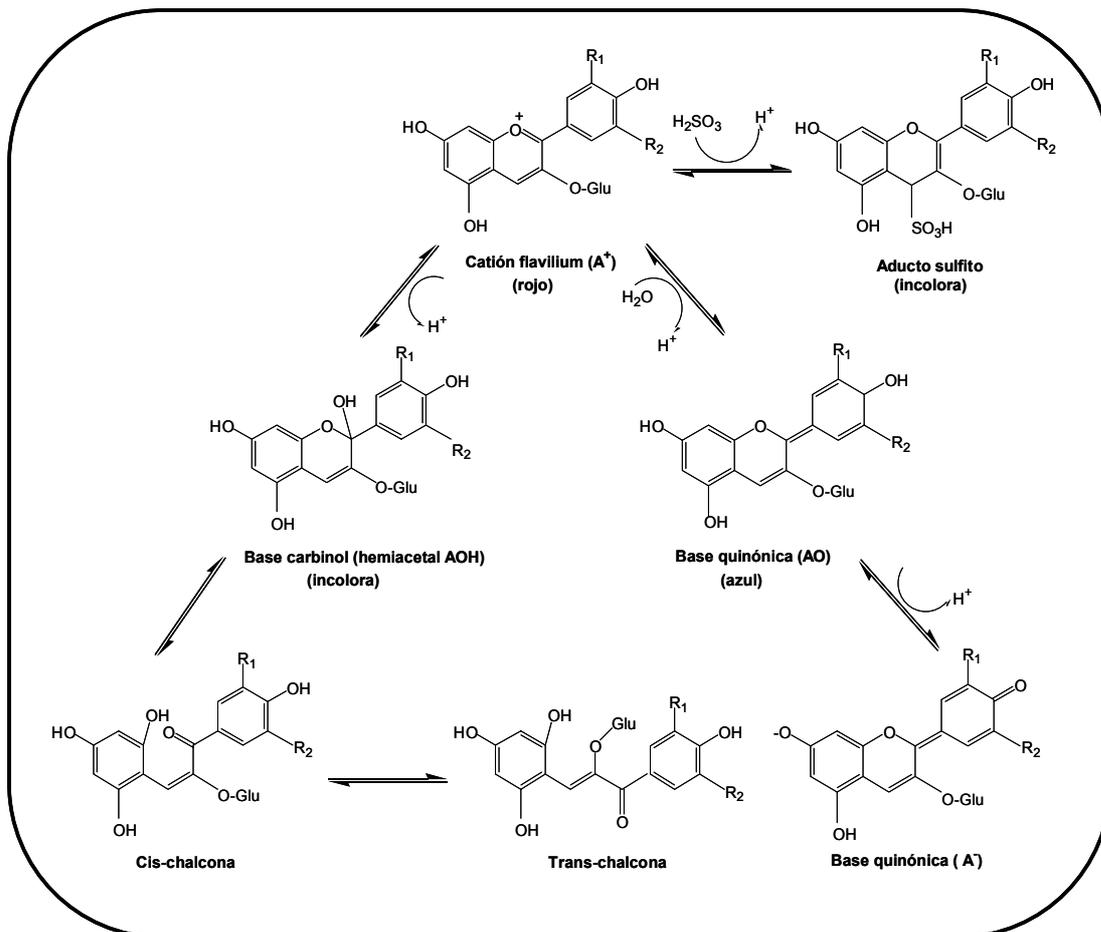
## II.1.2 EQUILIBRIOS DE LOS ANTOCIANOS EN LOS VINOS

Los antocianos en los vinos pueden encontrarse bajo diferentes formas, dependiendo de diversos factores exteriores (Figura II.3). Cuando el pH del medio es bajo, la molécula de antociano se encuentra en forma de catión flavilium de color rojo vivo. A medida que el pH se eleva, los antocianos se transforman en una base quinónica (AO) de color azulado, variando el color

desde el malva al azul e incluso amarillo a valores de pH superiores a 7. Todas estas reacciones son reversibles (Ribéreau Gayon et al., 1998a).

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

**Figura II.3** Cambios de la estructura de los antocianos en un medio acuoso y en función del pH.



La presencia de anhídrido sulfuroso en los vinos tintos produce también una fuerte decoloración de los antocianos, mediante una reacción totalmente reversible, que puede suponer una pérdida temporal de la intensidad de color. Al pH del vino, la mayor parte del anhídrido sulfuroso libre se encuentra bajo la forma de anión  $\text{SO}_3\text{H}^-$ , que se combina con los antocianos bajo la forma de catión flavilium, produciéndose un complejo incoloro, pero transcurrido un cierto tiempo se produce una descombinación de este compuesto cuando tiene lugar una reducción de la fracción anhídrido libre.

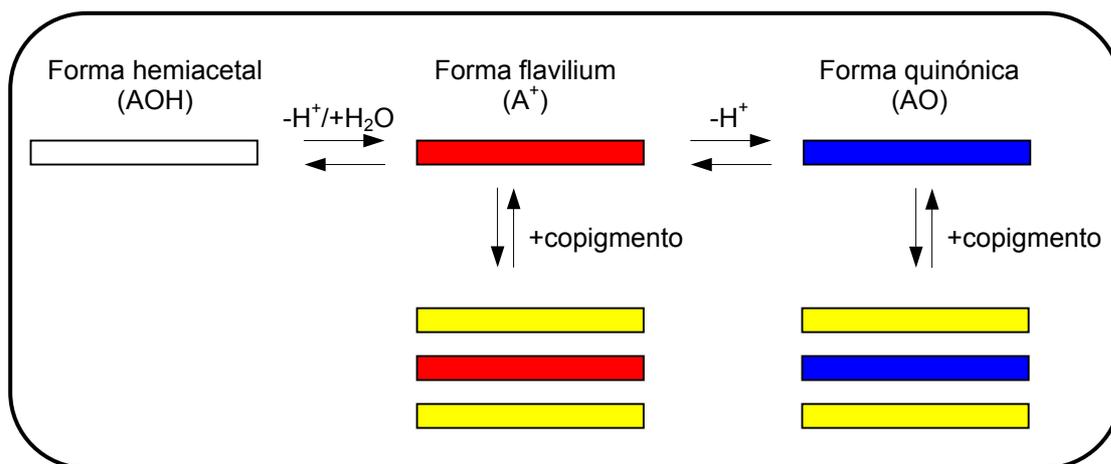
### **II.1.3 ESTABILIZACIÓN DEL COLOR MEDIANTE LA COPIGMENTACIÓN**

A los valores de pH del vino, cerca del 80% de los antocianos se encuentran en forma hidratada incolora, excepto si tienen lugar algún tipo de mecanismo estabilizador del color. Los antocianos pueden unirse de forma no covalente con otros compuestos fenólicos presentes en el medio (copigmentación), los cuales pueden ser otra molécula de antociano (copigmentación intramolecular) u otra molécula diferente, como los ácidos cinámicos, flavanoles y flavonoles y sus glicósidos (copigmentación intermolecular). Estos compuestos reciben el nombre de cofactores o copigmentos. Como resultado se produce un aumento de la cantidad de color (efecto hiperocrómico) así como también un cambio de tonalidad hacia el color púrpura y azul (efecto batocrómico) (Vivar-Quintana et al., 2002).

El incremento en la intensidad y estabilidad del color, resultante de la copigmentación, es debido a un cambio en el equilibrio de la hidratación hacia formas flavilium, que luego son atrapadas por los cofactores, o hacia bases quinónicas en los complejos antociano-copigmento (Figura II.4). Entre los antocianos y los cofactores se forma una estructura en capas, en número variable de dos a diez. Esto es importante en el rango del pH del vino donde

predominan las formas hidratadas de los antocianos, pues la inclusión de los cationes flavilium en los complejos de copigmentación desplaza el equilibrio hacia la formación de más cationes flavilium.

**Figura II.4** Principio del proceso de copigmentación.



La copigmentación influye sobre las reacciones de oxidación, condensación y polimerización de sustancias fenólicas ya que disminuye la cinética de las reacciones que se producen durante el envejecimiento de los vinos (Boulton, 2001). La cinética de las reacciones de oxidación depende de la concentración de sustancias fenólicas en forma libre, no de su concentración en valor absoluto. Determinados flavonoides son fuertes copigmentos y rápidamente participan en reacciones de copigmentación lo que hace que la concentración en forma libre de tales compuestos disminuya y de este modo, no estén disponibles para reacciones de oxidación y polimerización (Darias-Martín et al., 2001).

## **II.1.4 EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL CURSO DE LA ELABORACIÓN DEL VINO Y EFECTOS SOBRE EL COLOR**

En el curso de la elaboración de los vinos, tienen lugar dos grupos principales de reacciones que afectan al color del vino, los procesos enzimáticos y las reacciones químicas que involucran antocianos y/o taninos. Aunque los dos tipos de reacciones ocurren simultáneamente, las primeras predominan en las etapas tempranas de la elaboración, mientras que las segundas comienzan a predominar en las últimas etapas, cuando la actividad enzimática decrece.

### **II.1.4.1 REACCIONES ENZIMÁTICAS**

Las reacciones enzimáticas, en su mayoría catalizadas por las enzimas polifenoloxidasas (PPO), peroxidasa, glicosidasas y esterasas, comienzan en el estrujado, cuando se daña la estructura de la célula y en presencia de oxígeno.

Entre los sustratos preferidos por la PPO destaca el ácido caftárico. El elevado potencial redox de la o-quinona del ácido caftárico permite oxidar otros constituyentes del mosto, como por ejemplo otros difenoles que no son sustratos de la PPO y que si están implicados en los fenómenos de pardeamiento oxidativo. Las o-quinonas secundarias generadas por este fenómeno reaccionan espontáneamente con moléculas nucleófilas del mosto para formar distintos aductos que pueden incorporarse a nuevas reacciones de degradación (Sarni et al., 1995). Así, la oxidación enzimática de ácidos fenólicos a quinonas, catalizada por la PPO empieza desde el momento en que las uvas son estrujadas. Los antocianos son sustratos pobres para la PPO pero pueden reaccionar con las o-quinonas generadas por oxidación enzimática de otros fenoles, especialmente los antocianos o-difenólicos (delfinidina, cianidina y petunidina), produciéndose una importante decoloración. Pero los otros

antocianos también pueden reaccionar mediante la formación de aductos con o-quinonas. En una disolución modelo se observó que la oxidación acoplada ocurre a mas alta velocidad, lo que parcialmente protege a los antocianos que no son o-difenoles (malvidina y peonidina) de la degradación (Sarni et al., 1995).

Los antocianos también pueden ser oxidados directamente por peroxidadas y lacasas con la consecuente decoloración. La enzima lacasa, en general parece ser más resistente a las condiciones de vinificación que la enzima PPO y su presencia suele ser un gran problema con respecto a la calidad del vino.

También los antocianos pueden ser degradados por glicosidasas. Estas enzimas no se encuentran en la uva en cantidades significativas, generalmente se añaden durante la elaboración para liberar compuestos volátiles de sus precursores glicosídicos o pueden estar presentes como actividades secundarias en preparados enzimáticos del tipo pectinasas e incluso pueden ser liberadas por algunas cepas de levaduras durante la fermentación. Como resultado se obtienen las agliconas de los antocianos, que son más inestables en el medio, dando lugar a una pérdida de color. Esto puede ser acrecentado por la presencia de acil esterasas (Cheynier, 2003). Estas enzimas actúan sobre los ésteres de los ácidos hidroxicinámicos incrementando sus respectivos ácidos libres (Wightman et al., 1997) y aumentando la actividad de la enzima polifenoloxidasa (Gunata et al., 1987), la cual va a producir la pérdida de antocianos por oxidación.

### **II.1.4.2 REACCIONES QUÍMICAS**

Durante el proceso de envejecimiento de un vino, la concentración de antocianos libres va disminuyendo hasta incluso desaparecer, sin que el color rojo del vino se pierda en la misma proporción. Esta disminución de la concentración de antocianos se debe a reacciones de degradación y

estabilización. Las reacciones de estabilización tienen, la mayoría de las veces, su origen en la formación de combinaciones entre antocianos y taninos. Los antocianos son inestables y deben estar combinados con taninos para formar pigmentos estables, que realmente son los responsables del color de los vinos con el tiempo.

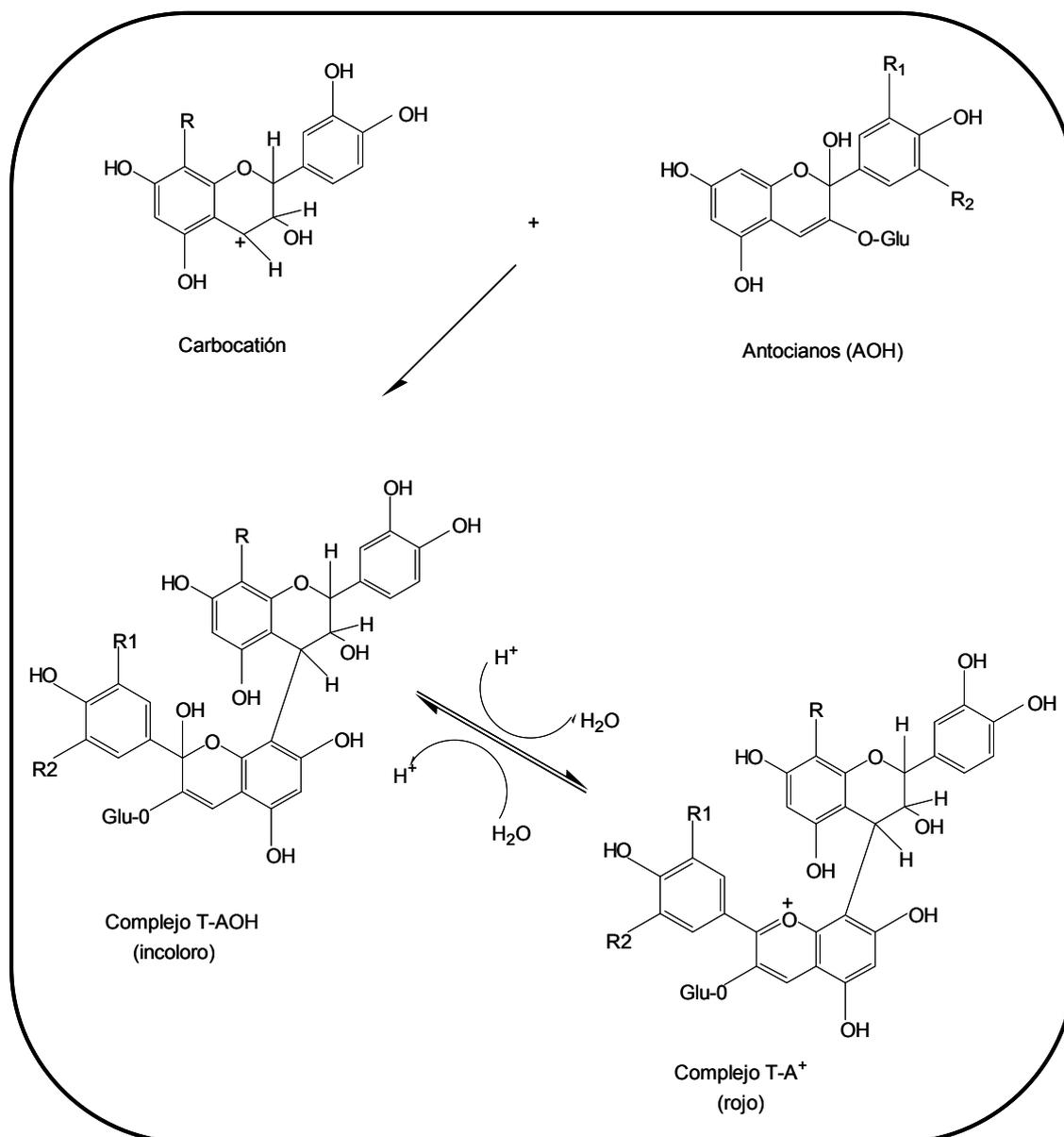
#### II.1.4.2.1 Condensaciones antocianos-taninos

Estas reacciones están basadas en procesos de adición nucleofílica en donde los antocianos y los taninos pueden actuar tanto como agentes electrofílicos, moléculas que presentan una deficiencia de electrones y tienden a extraer moléculas con exceso de electrones, como nucleofílicos. Los antocianos pueden reaccionar como electrofílicos, a través de la carga positiva de la forma flavilium ( $A^+$ ). Los flavonoides neutros, como los taninos, muestran un exceso de electrones en las posiciones C8 y C6 y de esta manera, pueden comportarse como nucleofílicos. Por otro lado, las formas hidratadas de los antocianos pueden tener cierta densidad de carga negativa y actuar como nucleofílicos y las rupturas de los enlaces C-C de las unidades constitutivas de los taninos, fenómeno que ocurre espontáneamente en el vino, genera carbocationes ( $T^+$ ) intermediarios que son electrofílicos.

Consecuentemente, las condensaciones antocianos-taninos pueden ser:

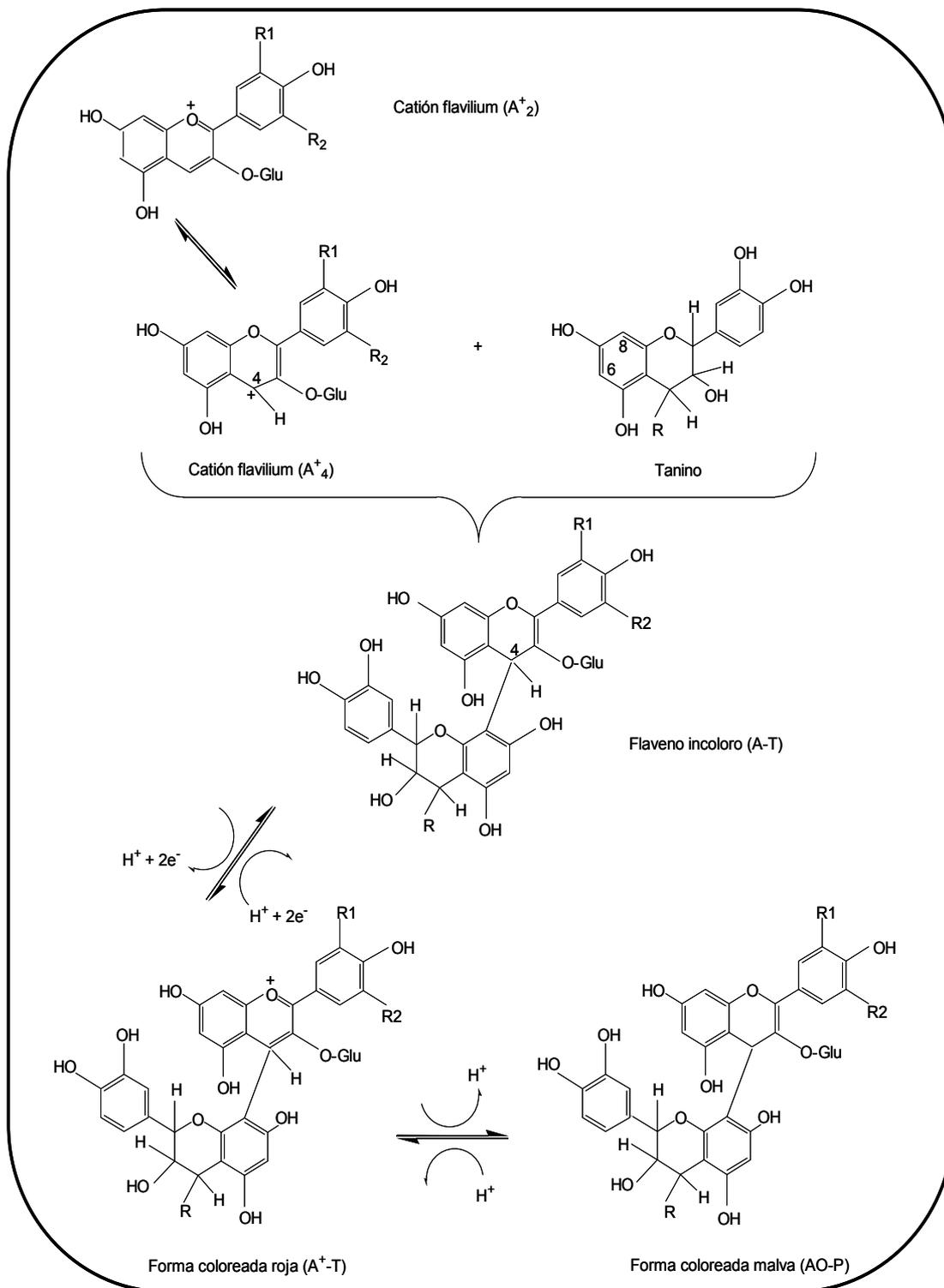
- Condensación taninos-antocianos (T-A): las procianidinas en medio ácido como el vino, se pueden hidrolizar formando un carbocatión o catequina activada, reaccionando así con los antocianos bajo la forma hemiacetálica (AOH), produciendo un complejo incoloro que se colorea seguidamente de rojo anaranjado después de su deshidratación (Figura II.5). Esta condensación se ve favorecida en ausencia de oxígeno y por la temperatura, siendo ésta la explicación de la evolución de los vinos almacenados en ambientes reductores como depósitos o botella. Este tipo de reacción depende de la concentración de antocianos en el medio y el color varía con la naturaleza del carbocatión y el grado de polimerización.

Figura II.5 Condensación directa de taninos y antocianos de tipo T-A.



- Condensación antocianos-taninos (A-T): los antocianos bajo su forma catiónica (A<sup>+</sup>) reaccionan con las posiciones negativas C6 ó C8 de los taninos, formando un flaveno incoloro (A-T), el cual, posteriormente, se puede colorear de rojo (A<sup>+</sup>-T) en presencia de oxígeno, estableciéndose un estado de equilibrio entre ambas formas (Figura II.6).

Figura II.6 Condensación directa de antocianos y taninos de tipo A-T.



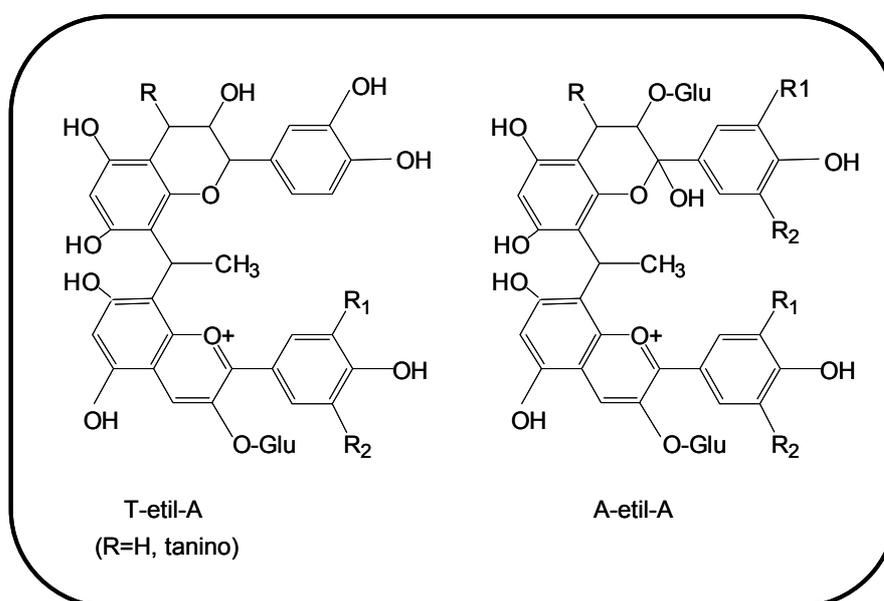
La conservación al abrigo del aire de soluciones de antocianos en presencia de flavanoles y a temperaturas superiores a 20°C, produce una disminución del color que puede recuperarse después de aireación. Este tipo de compuestos pueden evolucionar a tonalidades amarillas por la aparición de estructuras xantilium (Dallas et al., 1996; Gawel, 1998).

Los compuestos de condensación entre antocianos y taninos ( $T-A^+$  y  $A^+-T$ ) son de color similar a los antocianos. Pero los compuestos  $A^+-T$  son resistentes a la decoloración por  $SO_2$  debido a la sustitución de la posición 4 del anillo C del antociano, mientras que los aductos  $T-A^+$  teóricamente serían susceptibles a la decoloración por  $SO_2$  y a la hidratación.

También se ha demostrado que en el vino, tanto los antocianos como los taninos pueden unirse por medio de una reacción en la que interviene el acetaldehído. Esto da lugar a productos enlazados por puente de etilo, incluyendo taninos ( $T\text{-etil-T}$ ), aductos de taninos-antocianos ( $T\text{-etil-A}$ ) y antocianos entre sí ( $A\text{-etil-A}$ ) (Figura II.7). La formación de estos compuestos implica la adición nucleofílica de antocianinas hidratadas o de unidades de taninos con el carbocatión resultante de la protonización del acetaldehído. El tamaño molecular de estos productos es variable ya que depende del número de pasos sucesivos en la reacción inducida por el acetaldehído y del tamaño de los reactivos polifenólicos, los cuales también varían desde monómeros hasta taninos con más de veinticinco unidades. El acetaldehído puede proceder de la oxidación del etanol, aunque también puede tener su origen en las levaduras, las bacterias acéticas y la autooxidación de compuestos fenólicos (Liu y Piloni, 2000). Los antocianos también pueden unirse de una manera similar al acetaldehído, mediante un puente donde el etanal es reemplazado por otro aldehído o bien con el ácido glioxálico procedente de la oxidación del ácido tartárico catalizada por hierro. De las uniones de antocianos con el ácido glioxálico se forman compuestos incoloros, que rápidamente evolucionan hacia colores amarillos (Fulcrand et al., 1997a; Es-Safi et al., 1999; Es-Safi et al., 2000)

Los pigmentos del tipo T-etil-A y A-etil-A son de color púrpura y mucho más resistentes a la decoloración por hidratación y  $\text{SO}_2$  que los antocianos libres. Como el anillo C de los antocianos no está sustituido en los derivados etilados, esta resistencia es debido probablemente a su envolvimiento durante la asociación molecular. Ha sido recientemente demostrado que la única forma significativa de polimerización entre antocianos en el vino es la  $\text{A}^+$ -etil-AOH, en donde una unidad de antociano es incolora y la otra roja (Atanasova et al., 2002). Esto significa que la conversión de los pigmentos de la uva (70-80% AOH, 20-25%  $\text{A}^+$  en los valores de pH del vino) a derivados con puentes de etilos (50% AOH, 50%  $\text{A}^+$ ) no solo resulta en un leve cambio de rojo a púrpura, sino también incrementa la intensidad de color.

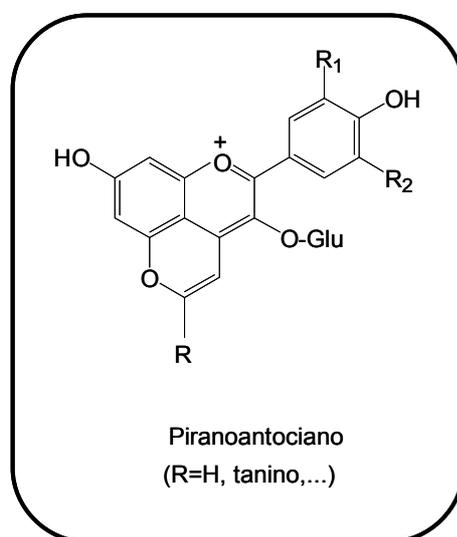
**Figura II.7** Estructuras de los pigmentos formados por la reacción de acetaldehído con antocianos y taninos.



### II.1.4.2.2 Formación de nuevos pigmentos derivados de los antocianos

También, se han identificado en el vino nuevos pigmentos derivados de los antocianos y conocidos con el nombre de piranoantocianos (Fulcrand et al., 1996; Fulcrand et al., 1997b). Estos pigmentos se originan por reacción de los antocianos con compuestos de bajo peso molecular, principalmente metabolitos producidos por las levaduras, como el acetaldehído, ácido pirúvico o vinilfenol, por medio de una reacción de cicloadición (Figura II.8). También pueden incluir especies de más alto peso molecular, en las cuales la unidad de piranoantociano está unida a moléculas de tanino (Francia-Aricha et al., 1997). Los pigmentos formados absorben a longitudes de onda más bajas que los antocianos y se les ha relacionado con el cambio de color de rojo malva a rojo anaranjado que sufren los vinos durante el envejecimiento. Son muy estables e insensibles a las variaciones del pH y sulfuroso.

**Figura II.8** Estructura de nuevos pigmentos.



### II 4.2.3 Polimerización de taninos

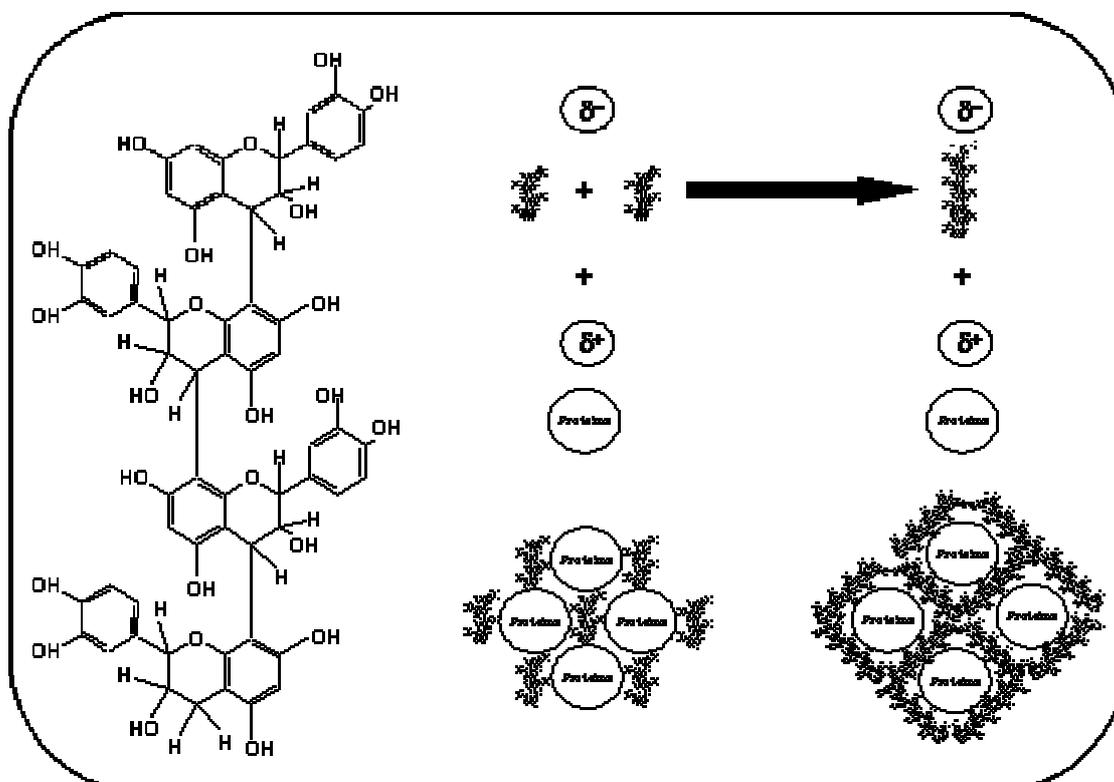
Los taninos son las principales sustancias responsables de la astringencia de los vinos, siendo los flavanoles monómeros los más amargos y astringentes, mientras que los oligómeros y polímeros correspondientes formados durante el envejecimiento se suavizan al perder el carácter amargo (Singleton y Trouslade, 1992).

En el vino, los taninos son muy reactivos y con el tiempo se producen reacciones de polimerización que tienden a incrementar el tamaño medio de la fracción procianidínica. Dos son las posibles vías que siguen los taninos para su polimerización, en función de la forma de interactuar entre ellos:

- Polimerización lineal: en ausencia de oxígeno y con temperaturas elevadas, las procianidinas se hidrolizan formando un carbocatión, que reacciona con la carga negativa de otra procianidina, formando un polímero de mayor peso molecular mediante uniones C4-C8 o C4-C6 (Figura II.9). Se dice entonces que la polimerización es homogénea u ordenada, también llamada polimerización lineal, donde los compuestos formados son de color amarillo, pudiendo precipitar en función de su complejidad, aunque continúan presentando las mismas propiedades de astringencia que un tanino menos polimerizado.

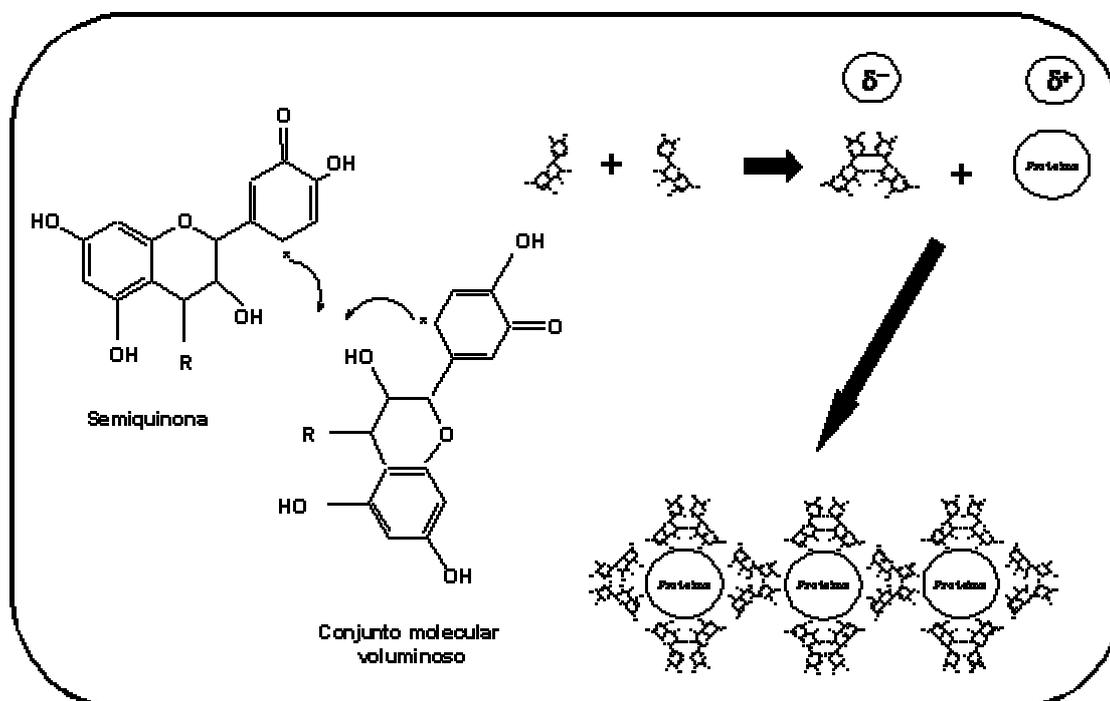
- Polimerización cruzada: con temperaturas más reducidas y en presencia de oxígeno, la oxidación del etanol forma etanal, sustancia capaz de unir moléculas de procianidinas, formando un polímero de elevado peso molecular mediante la polimerización heterogénea o desordenada, también conocida como polimerización cruzada (Figura II.10), donde los compuestos formados son también amarillos pero menos reactivos y su astringencia se ve muy atenuada por lo que participan en las sensaciones de volumen en boca. Este tipo de reacción tiene una cinética superior a la polimerización lineal lo que conduce a la formación rápida de compuestos polímeros susceptibles de precipitar en función del grado de polimerización y de la concentración.

Figura II.9 Polimerización ordenada o lineal de taninos.



También las procianidinas se pueden hidrolizar formando carbocationes de carga eléctrica positiva que pueden sufrir una adición nucleofílica por otra molécula de flavanol, o bien, por un antociano en su forma hemiacetal. Este proceso conduce a la reducción de la longitud media de las cadenas de procianidinas y finalmente, a la acumulación de proantocianidinas oligoméricas (Vidal et al., 2002). Las procianidinas polímeras reaccionan más lentamente que las oligoméricas y las procianidinas formadas por puente de etilo son las que más rápidamente reaccionan. Estas reacciones de ruptura de cadenas de proantocianidinas, que conduce a un descenso de la longitud media de las moléculas, parece ser que organolépticamente produce un descenso de la astringencia y un aumento de las sensaciones amargas (Vidal et al., 2002).

Figura II.10 Polimerización desordenada o cruzada de taninos.



En estas mismas condiciones pueden unirse a antocianos bajo la forma carbinol y dar lugar a reacciones de condensación. La consecuencia de este fenómeno es la disminución de la intensidad de color acompañado de la evolución hacia matices anaranjados o amarillentos y pérdida de astringencia por la formación de compuestos polimerizados menos reactivos.

### II.1.5 INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL VINO EN LA PROPORCIÓN DE LAS REACCIONES DE COMBINACIÓN ENTRE ANTOCIANOS Y TANINOS

Todas las reacciones descritas anteriormente tienen lugar en el vino a lo largo de la elaboración y envejecimiento y, evidentemente, condiciona la

evolución de su color, de su astringencia y sus características organolépticas, pero el que predomine un tipo de reacción u otra va a depender de varios factores entre los que destacan:

**A) Relación entre la concentración de antocianos y taninos:** la concentración de estos compuestos en el vino depende de la variedad y madurez de la uva, pero también está profundamente influenciada por cambios en las condiciones de maceración, ya que los antocianos se difunden más rápido que los taninos y por las prácticas de elaboración utilizadas. La distinta estructura polifenólica de los vinos puede dar lugar a las siguientes situaciones (Ribéreau Gayon et al., 1998a):

- Concentración de antocianos superior a los taninos: es la situación de vinos rosados, vinos tintos poco macerados o procedentes de variedades poco tánicas. En este caso todas las reacciones tendrían lugar. Los taninos podrán polimerizar entre ellos, pero difícilmente esta reacción estará favorecida ya que, al hallarse en baja concentración, será difícil que se asocien entre ellos. También se podrá producir la combinación entre antocianos y taninos, pero al haber más antocianos que taninos, no todos podrán combinarse. Por lo tanto, muchos de los antocianos se oxidarán, evolucionando irreversiblemente hacia fenoles incoloros, produciéndose una importante destrucción del color. La solución es aportar mayor cantidad de taninos activando las maceraciones o añadiendo taninos exógenos

- Concentración equilibrada de antocianos y taninos: corresponde a la situación ideal de equilibrio, donde todas las reacciones serán igualmente probables. En este caso, una buena elaboración y una correcta crianza podrán favorecer la reacción de combinación y por tanto la estabilización del color, junto con una disminución de la astringencia.

- Concentración de antocianos inferior a la de taninos: corresponde a vinos procedentes de variedades con poco color o de cosechas poco maduras. También en este caso, si se realizan maceraciones prolongadas se extraerán bastante tanino, sin que llegue a extraer suficiente cantidad de antocianos.

También en esta caso, todas las reacciones tendrán lugar, pero habrá una que predomine sobre las demás. Todos los antocianos disponibles pueden ser polimerizados. Los taninos que se encuentran en exceso deben eliminarse posteriormente mediante una clarificación proteica o bien compensar la carencia de antocianos mediante el *coupage* con otros vinos que suplieran sus deficiencias, pues de no ser así podrían evolucionar hacia una condensación entre ellos y en el vino predominarán tonalidades amarillas y un sabor astringente.

**B) Cepas de levaduras:** las cepas de levaduras van a influir en la proporción relativa de los piranoantocianos, derivados etilados y los productos de condensación en el vino, ya que tanto el acetaldehído como el ácido pirúvico proceden del metabolismo de estos microorganismos durante el proceso de fermentación, siendo las cantidades liberadas de estos compuestos diferentes en función de la cepa de levadura utilizada (Morata et al., 2004). El acetaldehído también se origina de la oxidación del etanol, por lo tanto su nivel aumenta con la exposición al aire. Tras el proceso de envejecimiento, los productos de condensación y los derivados etilados que son inestables, se transforman en flavanil-piranoantocianos, produciendo un cambio en el color del vino hacia tonalidades más rojo anaranjadas. También las levaduras liberan polisacáridos, los cuales van a contribuir a la estabilización de los polímeros formados, debido a su papel de coloide protector (Dupin et al., 2002; Charpentier et al., 2004). También se debe tener en cuenta que estos microorganismos presentan diferente capacidad para retener o adsorber compuestos fenólicos sobre su pared celular, lo cual va afectar al color del vino (Vasserot et al., 1997; Morata et al., 2003a).

**C) pH del vino:** el pH es otro parámetro importante; de hecho, la ruptura de los taninos poliméricos, catalizada por ácidos, es el paso clave en la formación de polímeros T-A<sup>+</sup> y tanino-piranoantociano, estando más favorecida a bajos pH. La protonación del acetaldehído, que también es favorecida por la elevada acidez, aparece como un factor clave en la formación de los derivados de puente de etilo. Finalmente, ya que la hidratación de los antocianos depende

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

**D) Presencia de oxígeno:** las reacciones de oxidación donde se ven involucrados compuestos fenólicos son extremadamente complejas. El oxígeno necesita ser activado por catálisis enzimática, iones metálicos o radicales libres. En los vinos, la oxidación enzimática prevalece en las etapas tempranas de la elaboración, mientras que las oxidaciones químicas comienzan a predominar al final del proceso. Las oxidaciones químicas no son debidas principalmente a compuestos fenólicos, sino también a otros componentes importantes del vino, como el etanol y el ácido tartárico. El acetaldehído procede de la oxidación del etanol y, aunque también puede proceder del metabolismo de las levaduras, este puede ser considerado como un marcador de oxidación. Consecuentemente, los pigmentos formados por este compuesto también pueden ser utilizados como marcadores de oxidación del vino. Por otra parte, todos los pasos de cicloadición requieren una etapa de oxidación para recuperar el catión flavilium en las estructuras finales y también es necesario en reacciones directas de especies A<sup>+</sup>-T (Fulcrand et al., 2004).

Por tanto, la capacidad de un vino para soportar periodos más o menos largos de envejecimiento depende de numerosos factores ligados a su composición, riqueza polifenólica, naturaleza y estructura de sus taninos, proporción entre la concentración de antocianos y taninos y su concentración de polisacáridos y factores ligados a todo aquello que favorezca la formación de piranoantocianos.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **III.1 UVA**

### **III.1.1 MATERIAL VEGETAL**

El material vegetal de estudio ha sido uva (*Vitis vinífera* L.) de la variedad Monastrell, cultivada en secano y sistema de vaso, en una parcela de la D.O. de Jumilla, perteneciente a la Bodega Casa Castillo. La edad del viñedo es de diez años, óptima para la obtención de vinos de calidad.

### **III.1.2 CONTROL DE LA MADURACIÓN**

Se ha realizado un muestreo semanal de uva, por triplicado, desde el envero hasta su recolección.

Para obtener una muestra representativa de los racimos, se cortaban pequeños trozos (5-6 granos) de todas las direcciones del racimo (norte, sur, este y oeste) y de los distintos brazos de la cepa.

Las muestras de uva eran recogidas a primera hora de la mañana y trasladadas en el menor tiempo posible al laboratorio para su posterior procesamiento.

### **III.1.3 DETERMINACIONES GENERALES**

Se prepara una muestra de aproximadamente 300 g de uva, cortando los granos por el pedúnculo y eligiendo aquellos más representativos de la muestra recogida en la parcela. A continuación, se procedió a su trituración, usando un Robot coupe modelo Gt 550 (Robot coupe, Francia) durante dos minutos, seleccionando una baja velocidad para evitar la ruptura de las pepitas.

En el mosto obtenido por centrifugación del triturado de la uva a 4400 rpm durante 15 minutos, se determinan el grado Brix, acidez total, pH, ácido málico y tartárico.

#### **III.1.3.1 GRADO BRIX**

La medida se realizó en un refractómetro digital Atago modelo PR-101 (Atago, USA) con sensor de temperatura y ajuste previo del cero con agua destilada. A partir de este dato se obtienen mediante tablas, los valores de grado Baumé, contenido de azúcares, densidad y grado probable del vino.

#### **III.1.3.2 pH**

Se mide con un valorador automático Metrohm modelo 686 (Metrohm, Suiza), siguiendo el método oficial CEE, Reglamento N° 2676/90.

#### **III.1.3.3 ACIDEZ TOTAL**

Se obtiene potenciométricamente con un valorador automático Metrohm modelo 686 (Metrohm, Suiza), según el método oficial CEE, Reglamento N° 2676/90. Los resultados se expresan en g/L de ácido tartárico.

#### **III.1.3.4 ÁCIDO L-MÁLICO**

Mediante test enzimático con secuenciador automático Hycel, modelo Lisa 200 (Hycel Diagnostics, EEUU), según el método oficial CEE Reglamento N° 2676/90. Los resultados se expresan en g/L de ácido málico en el mosto.

#### **III.1.3.5 ÁCIDO TARTÁRICO**

Se ha determinado siguiendo el método colorimétrico Rebelein modificado, con valorador secuencial automático Hycel, modelo Lisa 200 (Hycel Diagnostics, EEUU). Los resultados se expresan en g/L de ácido tartárico en el mosto.

### **III.1.4 DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS**

En el mosto obtenido por doble centrifugación del triturado a 4400 rpm durante 15 minutos, se analizan la intensidad de color, tono, parámetros CieLab, antocianos totales y el índice de polifenoles totales.

#### **III.1.4.1 INTENSIDAD DE COLOR Y TONO**

La intensidad de color se obtiene mediante suma de las absorbancias a 620 (componente azul), 520 (componente roja) y 420 nm (componente amarilla) del mosto sin diluir, utilizando cubetas de 1 mm de paso óptico y el tono se calcula mediante el cociente entre las absorbancias a 520 y 420 nm (Glories, 1984). Las medidas se realizan en un espectrofotómetro HELIOS  $\alpha$  (TermoSpectronic, EEUU) referidas a cubetas de 1 cm.

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

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

#### III.1.4.2 PARÁMETROS CIELAB

Se obtienen a partir de las medidas de absorbancia del mosto, realizadas en el rango de longitudes de onda comprendidas entre 380 y 780 nm, con cubetas de 1 mm de espesor y referidas a un observador de 10°, un iluminante D65 y cubetas de 1 cm. Para ello se emplea un espectrofotómetro HEΛIOS α (TermoSpectronic, EEUU), conectado a un ordenador con un programa específico de color (MIDAS) que realiza el cálculo directo de los parámetros CieLab L\*, a\*, b\*, C\* y H\*.

#### III.1.4.3 ANTOCIANOS TOTALES

Se obtienen por lectura de la absorbancia a 520 nm en cubetas de 1 cm de paso óptico, transcurridos 30 minutos desde la adición de 0,5 mL de mosto a 25 mL de HCl 0,1 N (Cayla et al., 2002).

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

#### III.1.4.4 ÍNDICE DE POLIFENOLES TOTALES (IPT)

Se obtiene por lectura de la absorbancia a 280 nm con cubetas de 1 cm de paso óptico, del mosto diluido 100 veces con agua destilada.

$$IPT = A_{280} \times 100$$

#### III.1.5 MÉTODOS PARA EL CÁLCULO DE MADURACIÓN POLIFENÓLICA

##### III.1.5.1 MÉTODO LAMADON

Se pesan 50 g del triturado inicial en un vaso de 250 mL y se le añaden 15 mL de etanol 96% y 85 mL de HCl 0,1% (v/v). Se dejan macerar durante dos horas, agitando periódicamente cada 15 minutos. A continuación, se centrifugan a 4400 rpm durante 15 minutos y en el sobrenadante se determinan los antocianos totales (AT) y compuestos fenólicos totales (CFT) (Lamadon, 1995).

$$AT \text{ (g/kg uva)} = \frac{3}{1000} \times [\text{antocianos (mg/L)}]$$

$$CFT \text{ (g/kg uva)} = 3 \times 0,08 \times [IPT]$$

### III.1.5.2 MÉTODO DE SAINT-CRICQ

Este método consiste en extraer rápidamente los polifenoles que contienen los granos de uva, por una parte, de un modo suave reproduciendo las condiciones industriales de maceración (pH 3,6) y también en condiciones extremas (pH 1). La diferencia entre ambos resultados es un reflejo del grado de fragilidad de la membrana celular y, por tanto, de la madurez fenólica de la uva, la cual influirá en la capacidad de extracción de los polifenoles.

Se pesan dos fracciones de 25 g del triturado de uva en vasos de precipitado de 250 mL. A uno se le adiciona 25 mL de una disolución a pH 1 (HCl 0,1 N) y al otro 25 mL de una disolución a pH 3,6, preparada con 10 g de ácido tartárico, 9 mL de NaOH 32% y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de dos litros. Se deja macerar a temperatura ambiente durante cuatro horas. Transcurrido este tiempo se centrifuga a 4400 rpm durante 15 min y en el sobrenadante se determinan:

**a) Concentración de antocianos a pH 3,6:** representa el potencial de antocianos fácilmente extraíbles de la uva durante el proceso de vinificación.

**b) IPT a pH 3,6:** representa la cantidad de compuestos fenólicos de la uva que pueden ser extraídos fácilmente durante el proceso de vinificación.

**c) Concentración de antocianos a pH 1:** representa el potencial total de antocianos de la uva

A partir de estos parámetros se calculan el **índice de madurez celular (IMC)**, también llamado **extractabilidad de los antocianos (Ea)** y el **índice de madurez de las pepitas (Mp)** (Saint-Cricq et al., 1998) mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{IMC (\%)} = \frac{(A_{pH1} - A_{pH3,6})}{A_{pH1}} \times 100$$

$$Mp (\%) = \frac{(IPT_{pH3,6} - Ap_{H3,6} \times 40/1000)}{IPT_{pH3,6}} \times 100$$

### III.1.6 DETERMINACIÓN DE LOS ANTOCIANOS DE LOS HOLLEJOS DE LA UVA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

#### III.1.6.1 EXTRACCIÓN DE ANTOCIANOS

Durante el control de maduración, una parte de las muestras de uva se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$ . De estas muestras se seleccionan 30–40 granos y se separan las pieles de la pulpa con ayuda de un bisturí para obtener aproximadamente unos 5 g de hollejo. Los hollejos pesados se colocan en tubos de 60 mL de cierre hermético y se les adicionan 50 mL de metanol. A continuación, se colocan en una placa de agitación a 150 rpm, a temperatura ambiente, durante 14 horas. El extracto metanólico obtenido se pasa por filtros de nylon de  $0,45 \mu\text{m}$  y se analiza por cromatografía líquida de alta resolución.

#### III.1.6.2 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La separación de los antocianos se lleva a cabo en un cromatógrafo líquido Waters 2690 (Waters, PA, USA), equipado con un detector diodo-array Waters 996. La columna utilizada fue una Licrochart RP-C18 (Merk, Darmstadt,

## Material y Métodos

Alemania), 25 x 0,4 cm de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. El volumen de la muestra inyectada fue de 20  $\mu\text{L}$  y el análisis fue realizado a temperatura ambiente. Los disolventes utilizados fueron ácido fórmico al 4,5% y acetonitrilo con un flujo de 1,5 mL/min. Las condiciones de gradiente fueron las mostradas en la tabla III.1.

Los diferentes compuestos son identificados a 520 nm comparando sus espectros con los indicados en la bibliografía (Hebrero et al., 1988; Hebrero et al., 1989; Revilla et al., 1999) y cuantificados con ayuda de un patrón externo, cloruro de malvidina-3-glucósido (Extrasynthèse, Genay, Francia) (Cacho et al., 1992). La ecuación de la recta patrón fue:

$$y = 27,121x + 0,5199 \quad r^2 = 0,997$$

**Tabla III.1.** Condiciones cromatográficas.

Tiempo (min)	%CH <sub>3</sub> CN	%HCOOH
0	10	90
10	10	90
25	15	85
65	21	79
68	21	79
73	100	0
76	10	90
80	10	90

Los resultados son expresados en mg de malvidina por peso fresco de hollejo, ó mg de malvidina por baya, para cada uno de los antocianos monoglucósidos y de sus correspondientes derivados acilados.

## **III.2 VINO**

### **III.2.1 VINIFICACIONES**

Las elaboraciones se realizaron durante las vendimias de 2001, 2002 y 2003. Los objetivos de las elaboraciones de 2001 y 2002 fueron por un lado, determinar el momento óptimo de vendimia y por otro, el efecto de la aplicación de distintas prácticas enológicas como la adición de enzimas, levaduras, taninos y la aplicación de distintos tiempos de maceración y sangrados parciales del mosto, para conseguir vinos con alto contenido polifenólico y con un color estable en el tiempo. Las elaboraciones de 2003 se centraron en la comprobación de aquellos factores de vinificación que mejor resultado dieron los dos años anteriores.

#### **III.2.1.1 DISEÑO DE LAS VINIFICACIONES**

Para determinar el momento óptimo de vendimia, se realizaron vinificaciones por triplicado, en depósitos de 12 litros, de 10 kg de uva con distinto grado de maduración. En el 2001 se elaboraron uvas aproximadamente con 11, 12, 12,5 y 13 °Be y en el 2002 con 11, 12,5, 13, 14 y 15 °Be. La duración de la maceración fue siempre de 15 días y la levadura utilizada Fermirouge (Gist-Brocades, Francia).

Para determinar el efecto de las levaduras en el color de los vinos se utilizaron tres tipos de levaduras comerciales: Fermirouge (Gist-Brocades, Francia), normalmente utilizada en la zona de Jumilla (vinificación testigo), Fermicru® VR5 (DSM, Alemania) y Rhône 2323 (Uvaferm, Alemania). En el 2001 se elaboraron en depósitos de 12 litros a partir de 10 kg de uva con 13,2

°Be y en el 2002 en depósitos de 100 litros a partir de 90 kg de uva con 13,7 °Be. La dosis aplicada para cada una de las levaduras fue de 25 g/Hl y la duración de la maceración fue en todos los casos de 15 días.

En el estudio del efecto de los enzimas sobre el color de los vinos, se aplicaron dos enzimas comerciales, Rapidase Excolor (DSM, Alemania) y Lallzyme (Lallemand, Alemania), en elaboraciones los años 2001 y 2002, en depósitos de 12 litros por triplicado, a partir de 10 kg de uva con 13,2 y 13,7 °Be respectivamente. La adición de estas enzimas se realizó al comienzo de la maceración con dosis de 2 g/Hl. Los resultados se compararon con una vinificación testigo sin adición de enzimas, utilizando como levadura de fermentación Fermirouge (Gist-Brocades, Francia) con una dosis de 25 g/Hl. El tiempo de maceración fue de 15 días para todas las vinificaciones.

Para determinar el efecto de los taninos exógenos sobre el color, se adicionaron dos tipos de taninos enológicos: Gallo tanin B (Lamothe Abiet Pinosa, Francia), galotanino de castaño y Gallo tanin R (Lamothe Abiet Pinosa, Francia), tanino proantociánico procedente del orujo de uva. Los vinos de esta experiencia se elaboraron en el 2002 en depósitos de 12 litros por triplicado, a partir de 10 kg de uva con 13,7 °Be. Se adicionaron los taninos al principio de la maceración con dosis de 15 g/Hl para el Gallo tanin B y de 40 g/Hl para el Gallo tanin R. La levadura de fermentación utilizada fue Fermirouge (Gist-Brocades, Francia) con una dosis de 25 g/Hl y el tiempo de maceración fue de 15 días. La vinificación testigo es la misma que la utilizada para el ensayo de enzimas.

Para optimizar el tiempo de maceración se llevaron a cabo vinificaciones en el 2001 y 2002 en depósitos de 100 litros, por triplicado, a partir de 90 kg de uva con 13,2 y 13,7 °Be respectivamente con tres tiempos de maceración: 15 (vinificación testigo), 25 y 35 días. La levadura de fermentación utilizada fue Fermirouge (Gist-Brocades, Francia) con una dosis de 25 g/Hl.

Para determinar el efecto del sangrado parcial del mosto, se realizaron vinificaciones en el 2001 y 2002 en depósitos de 100 litros, por triplicado, a

partir de 90 kg de uva con 13,2 y 13,7 °Be respectivamente, con una eliminación del mosto antes de maceración (referidos a kilos de uva en el depósito) del 7,5 y 15 %. En el primer caso supuso eliminar 6,75 litros de mosto y 13,5 litros en el segundo. La levadura de fermentación utilizada fue Fermirouge (Gist-Brocades, Francia) con una dosis de 25 g/Hl y el tiempo de maceración fue de 15 días

En el año 2003, todas las vinificaciones se realizaron también por triplicado, en depósitos de 100 litros con uva de 14,1 °Be. La duración de la maceración fue de 15 días y la levadura utilizada fue Rhône 2323. Se elaboraron un testigo y cuatro vinificaciones: una con sangrado parcial de 15%, otra con Rapidase Excolor, otra con Gallo tanin B y otra con Gallo tanin R.

### **III.2.1.2 PROCESO DE ELABORACIÓN**

La uva es vendimiada de forma manual en cajas de 20 kg, siendo transportada rápidamente a la bodega experimental de Jumilla. Se pesa y se obtiene una muestra representativa de entrada a bodega para ser analizada posteriormente. A continuación, la uva se introduce en la cámara frigorífica para disminuir su temperatura a 10°C y que el inicio de la maceración tenga lugar a baja temperatura. En todas las vinificaciones, la uva fue despalillada, estrujada y sulfitada con una dosis de 8-10 g de SO<sub>2</sub> por cada 100 kg de uva. La pasta se distribuye en los depósitos y permanece encubada durante 24 horas, tras lo cual se procedió a su análisis (pH, acidez total, grado beaumé, ácido málico y tartárico), corrección de acidez con ácido tartárico hasta 5,5 g/L y adición del pie de cuba.

La fermentación se realizó a 25°C y se tomaron lecturas de temperatura y densidad del mosto, dos veces al día hasta que el baume llegó a cero. Durante el proceso de maceración se realizaron dos remontados diarios para favorecer el proceso de oxigenación y de extracción de compuestos fenólicos.

Transcurrido el tiempo de maceración, se procede al descube para obtener finalmente un vino, mezcla del vino flor y del vino prensa.

Finalizada la fermentación alcohólica tiene lugar la fermentación maloláctica, durante la cual se controló la temperatura para que ésta no bajase de los 18°C, además se realizaron de 1 a 3 trasiegos, en función de la formación de SH<sub>2</sub> en los depósitos, manteniendo siempre el espacio de cabeza con CO<sub>2</sub> para evitar posibles oxidaciones en el vino. Concluida la fermentación maloláctica, los vinos se trasiegan y se adiciona SO<sub>2</sub> y a continuación se procede a la estabilización del vino a -3°C.

Tras el proceso de elaboración y estabilización por frío, las vinificaciones son embotelladas y conservadas en el sótano de la bodega experimental a una temperatura constante de 15°C.

### **III.2.2 DETERMINACIONES GENERALES**

En el vino, al finalizar la fermentación maloláctica se analiza el grado alcohólico, densidad, extracto seco, SO<sub>2</sub> libre y total, pH, acidez total, ácido málico, ácido tartárico, acetaldehído y glicerina.

El pH, acidez total, ácido málico y tartárico se determinan de la misma manera que en el mosto.

#### **III.2.2.1 GRADO ALCOHÓLICO**

Se ha utilizado el método oficial CEE 1990, por destilación y medida del grado con balanza hidrostática.

### **III.2.2.2 SULFUROSO LIBRE Y TOTAL**

Método rápido de ensayo CEE 1990, por valoración yodométrica directa, con valorador potenciométrico Metrohm, modelo 686.

### **III.2.2.3 ACETALDEHÍDO**

Se ha determinado mediante test enzimático, (Boehringer Mannheim GMBH, Mannheim, Alemania). La determinación enzimática del acetaldehído está basada en el cambio de absorbancia a 340 nm causada por reducción del  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}^+$  (usado como cofactor por la acetaldehído deshidrogenasa durante la oxidación del acetaldehído a ácido acético).

### **III.2.2.4 GLICERINA**

Se ha determinado mediante test enzimático, (Boehringer Mannheim GMBH, Mannheim, Alemania). La determinación enzimática de la glicerina está basada en el cambio de absorbancia a 340 nm causada por la oxidación del  $\text{NADH}^+$  a  $\text{NAD}^+$  (usado como cofactor por la L-lactato deshidrogenasa durante la reducción del piruvato, el cual es obtenido previamente a partir del glicerol a L-lactato).

## **III.2.3 DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS**

En el mosto-vino y en el vino, previamente centrifugados y exentos de  $\text{CO}_2$ , se analizan la intensidad de color, tono, parámetros CieLab, antocianos totales, antocianos moméricos y poliméricos y el índice de polifenoles totales.

En el vino terminado también se analizan taninos totales, taninos monoméricos, oligoméricos y poliméricos y el índice de HCl.

Los métodos utilizados para la determinación de intensidad de color, tono, parámetros CieLab, antocianos totales y el índice de polifenoles totales son los mismos que los descritos para el mosto.

### III.2.3.1 ANTOCIANOS MONÓMEROS Y POLÍMEROS

Se obtienen por fraccionamiento, según el método descrito por Ho et al. (2001). Así, 0,5 mL de vino son pasados a través de un cartucho Sep-Pack C<sub>18</sub> (Waters, USA) previamente acondicionado para fenoles neutros, pasando secuencialmente 5 mL de metanol y 5 mL de tampón fosfato a pH 7. Los antocianos monómeros (AM) son eluidos con 10 mL de acetonitrilo al 16% a pH 2, y los antocianos polímeros (AP) con 10 mL metanol a pH 2. Cada fracción fue medida a 520 nm en cubetas de 1 cm de paso óptico. Los datos son expresados en mg/L de malvidina-3-glucósido (peso molecular 529) y un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de 28000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

$$\text{AM ó AP (mg/L)} = \frac{A_{520}}{28000} \times 529 \times \text{dilución}$$

### III.2.3.2 TANINOS TOTALES

Para el análisis de taninos totales se utilizan dos muestras conteniendo cada una de ellas 4 mL de vino (dilución 1:50), 2 mL de H<sub>2</sub>O y 6 mL de HCl (12N). Una de ellas se calienta en un baño de aceite a 100°C durante 30 minutos y se le agrega 1 mL de etanol (95%) para solubilizar el color rojo aparecido. La otra muestra (referencia) no es calentada y se le adiciona

también 1 mL de etanol (95%). Se miden los incrementos de absorbancia de la muestra con y sin calentamiento a 520, 470, y 570 nm con cubetas de 1 cm de paso óptico. Obtenemos, por tanto, tres valores posibles de incremento de absorbancia a 520 nm, de los cuales se coge el valor mínimo al representar mejor la transformación de las procianidinas, ya que en función de la presencia de sustancias parasitarias, la reacción se amplifica hacia longitudes de onda mayores (malva), o hacia longitudes de onda cortas (naranja-amarillo) (Ribéreau Gayon et al., 1998a). Los taninos se miden en g/L mediante la siguiente relación:

$$\Delta A_{520} = 1,1 \times \Delta A_{470}$$

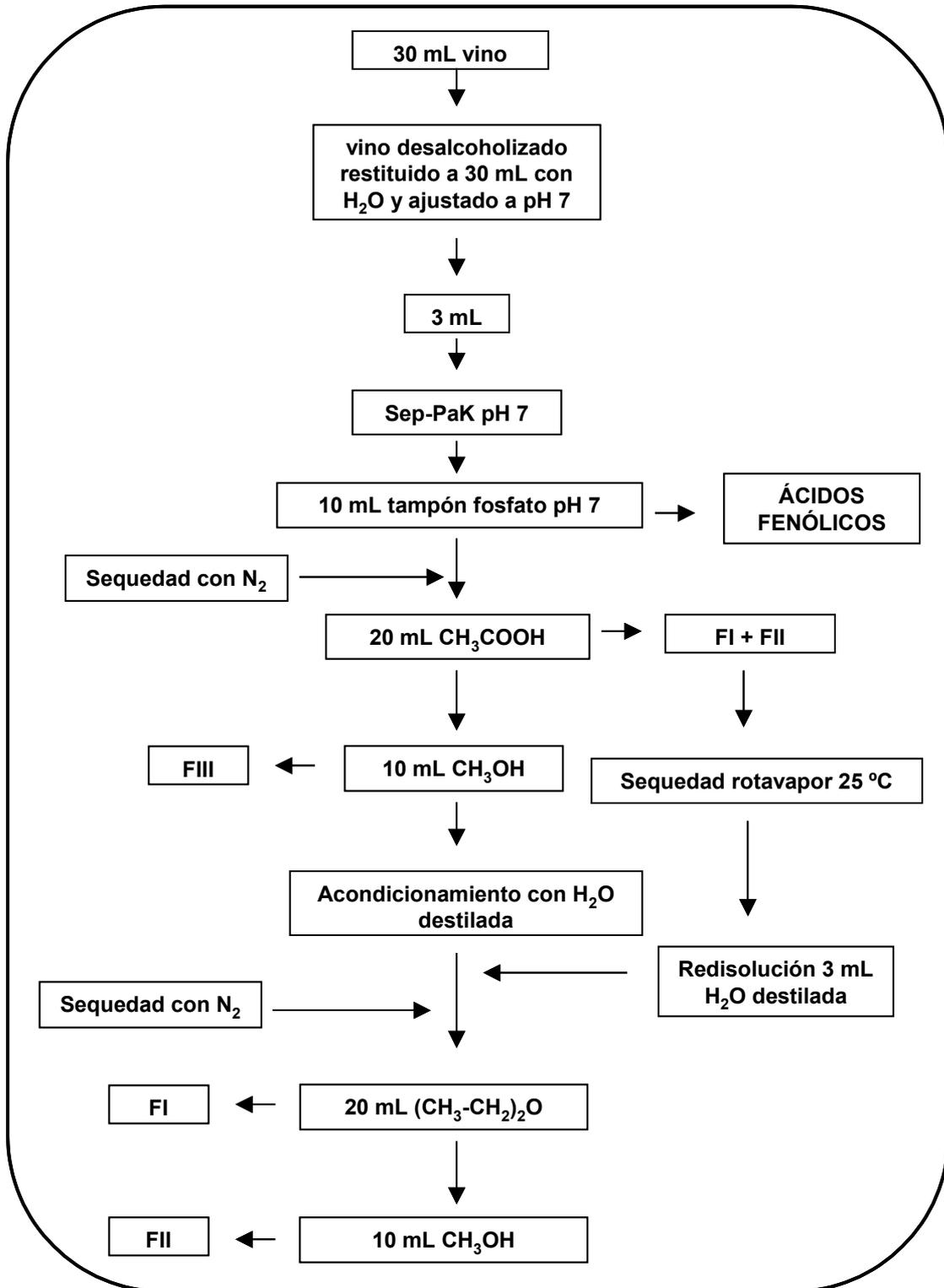
$$\Delta A_{520} = 1,54 \times \Delta A_{570}$$

$$C \text{ (g/L)} = 15,7 \times \Delta A_{520}$$

### III.2.3.3 TANINOS MONOMÉRICOS, OLIGOMÉRICOS Y POLIMÉRICOS

El fraccionamiento se realiza a partir de 30 mL de vino previamente desalcoholizado en un rotavapor a temperatura inferior a 30°C, restituidos a su volumen inicial con H<sub>2</sub>O destilada y ajustado su pH a 7 con una disolución de NaOH. A continuación se pasan 3 mL a través de dos cartuchos Sep-Pack conectados en serie: en la parte superior se coloca un Sep-Pack tC<sub>18</sub> y en la parte inferior un Sep-Pack C<sub>18</sub>, acondicionados ambos previamente según lo indicado por Sun et al. (1998a), primero con 10 mL de metanol y seguidamente con 10 mL de tampón fosfato a pH 7. La elución se lleva a cabo con 10 mL de tampón fosfato a pH 7 para eliminar los ácidos fenólicos.

Figura III.1 Fraccionamiento de taninos.



Después, los Sep-Pack se secan con N<sub>2</sub> y las eluciones se llevan a cabo pasando primero 20 mL de acetato de etilo, para eluir los taninos monoméricos y oligoméricos (Fracciones I y II) y después con 10 mL de metanol para eluir los taninos poliméricos (FIII). Para la separación de las fracciones I y II, el extracto que contiene ambas fracciones es evaporado en un rotavapor a 25°C, se redisuelve en 3 mL de H<sub>2</sub>O destilada y se pasa de nuevo por los Sep-Pack acondicionados esta vez con H<sub>2</sub>O destilada. Después se secan los Sep-Pack con N<sub>2</sub> y la separación de taninos monoméricos y oligoméricos se realizó por elución secuencial con 20 mL de dietil eter (FI) y 10 mL de metanol (FII) (Figura III.1).

La cuantificación de las fracciones obtenidas (FI, FII Y FIII) se realiza según el método descrito por Sun *et al.* (1998b). Para ello se evaporan hasta sequedad en un rotavapor a 25°C y el residuo se redisuelve en 3 mL de metanol. Así, 1 mL de esta solución metanólica se mezcla primero con 2,5 mL de vanillina al 1% en metanol y después con 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,6 N en metanol. Se prepara simultáneamente un blanco de la misma forma pero sustituyendo la vanillina al 1% en metanol por metanol. La reacción de la vanillina con FI se realiza a 30°C y con FII y FIII a temperatura ambiente. Transcurridos 15 minutos de la reacción, se realiza la lectura de la absorbancia a 500 nm. Los valores de las tres fracciones son expresados en mg/L de catequina tras la realización de una recta de calibrado cuya ecuación fue:

$$y = A_{500} \times 383,45 + 8,0768 \quad r^2 = 0,999$$

#### III.2.3.4 ÍNDICE DE CLORHÍDRICO

Se basa en la inestabilidad de las procianidinas en medio clorhídrico fuerte; la velocidad de precipitación está condicionada por el grado de polimerización.

Se mezcla 10 mL de vino, 15 mL de HCl 12N y 5 mL de H<sub>2</sub>O y se realiza una medida instantánea de la absorbancia ( $A_0$ ), a 280 nm y en cubetas de 1 cm de paso óptico, del vino diluido treinta veces. Se efectúa la misma operación transcurridas 7 horas y después de centrifugación, y se obtiene un nuevo valor ( $A_1$ ) (Ribéreau Gayon et al., 1998a). El índice de clorhídrico es dado por la relación:

$$I(HCl) = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

### III.2.4 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC

Se realiza por inyección directa de la muestra (vino ó mosto-vino) previamente filtrada (filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ ) en un cromatógrafo líquido Waters 2690 (Waters, PA, USA), equipado con un detector diodo-array Waters 996. La columna utilizada fue una Licrochart RP-C18 (Merk, Darmstadt, Alemania), 25 x 0,4 cm de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. El volumen de la muestra inyectada fue de 20  $\mu\text{l}$  y el análisis fue llevado a temperatura ambiente. Los disolventes utilizados fueron ácido fórmico al 5% y metanol, con un flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Las condiciones de gradiente utilizadas fueron una optimización de las propuestas por Cantos et al. (2003) y se muestran en la tabla III.2. Los cromatogramas fueron analizados a 280 nm (ácidos fenólicos y flavan -3-oles), 320 nm (ácidos hidroxicinámicos y ésteres hidroxicinámicos), 360 nm (flavonoles) y 520 nm (antocianos).

Tabla III.2 Condiciones cromatográficas.

Tiempo (min)	%CH <sub>3</sub> OH	%HCOOH
0	2	98
30	32	68
40	40	60
65	40	60
70	50	50
75	60	40
80	60	40
85	100	0
90	2	98
95	2	98

Tabla III.3 Cuantificación de compuestos fenólicos.

COMPUESTOS FENÓLICOS	ECUACIÓN DE LA RECTA	R <sup>2</sup>
Ácido gálico	$y = 19,925x + 0,0065$	0,999
Ácido protocatéquico	$y = 30,494x + 0,0018$	1
Ácido siríngico	$y = 17,719x + 0,0016$	1
Ácido cumárico	$y = 6,829x + 0,0010$	1
Ácido ferúlico	$y = 9,111x + 0,0056$	0,999
Catequina	$y = 78,500x + 0,0068$	0,999
Epicatequina	$y = 72,051x + 0,0015$	1
Rutina	$y = 33,139x + 0,0036$	0,999
Miricetina	$y = 19,543x + 0,0012$	1
Quercitrina	$y = 25,050x + 0,0046$	0,999
Quercetina	$y = 12,572x + 0,0024$	0,999
Kampferol	$y = 13,314x + 0,0003$	1
Malvidina	$y = 19,260x + 4 \times 10^{-5}$	1

La identificación de los diferentes compuestos fenólicos se realiza principalmente por comparación de sus espectros UV y sus tiempos de retención respecto a patrones externos, excepto la identificación del ácido caftarico y cutárico que es realizada por comparación de los espectros mostrados en la bibliografía. La cuantificación de estos compuestos ha sido llevada a cabo con la utilización del ácido cafeico y el ácido p-cumárico respectivamente como patrones externos.

La cuantificación de los antocianos es realizada utilizando cloruro de malvidina-3-glucósido como patrón y la del resto de compuestos fenólicos respecto a sus patrones puros. Las ecuaciones de las restas patrón fueron las mostradas en la tabla III.3

### **III.2.5 ANÁLISIS SENSORIAL**

Se llevaron a cabo dos tipos de pruebas sensoriales, una descriptiva de perfil y otra triangular. En el primer caso, los atributos a valorar son previamente descritos (Figura III.2) y se les pide a los catadores que cuantifiquen la magnitud de las características del vino que se pretende describir. Estas características se dividen en tres grandes grupos que hacen referencia al color, al aroma y al gusto. El panel de cata para este tipo de pruebas estaba formado por cinco catadores experimentados, miembros de la Estación Enológica de Jumilla.

La prueba triangular se aplica para determinar si existen diferencias entre las características de dos vinos. Es una prueba de diferenciación en la que se presentan al catador tres muestras codificadas, dos de las cuales son iguales y se le pide que indique cual es la muestra diferente y cual es la muestra preferida. Para determinar los resultados se utilizó la técnica del “juicio forzado” en la que se suman únicamente las respuestas correctas y se

comprueba mediante tablas estadísticas si la diferencia es significativa. Los catadores que participaron en esta prueba fueron ocho, sin entrenamiento previo, a los que se les presentó una ficha de cata en la que debían evaluar el grado de diferencia apreciado para los atributos de la fase visual, olfativa y gustativa.

**Figura III.2** Ficha de cata descriptiva.



**UNIVERSIDAD  
DE MURCIA**

DEPTO. DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS,  
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

*Facultad de Veterinaria*

---

**FECHA:**

**CATADOR:**

**MUESTRA:**

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

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

**Observaciones:**

---

Campus Universitario de Espinardo  
Apartado de correos 4021 \* 30071 Murcia

### **III.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis de la varianza se ha utilizado para determinar si existen diferencias significativas entre las medias. La separación de medias se ha realizado aplicando el test LSD.

El manejo de un número tan elevado de datos y variables nos ha obligado al uso de técnicas estadísticas multivariantes, cuyo objetivo fundamental consiste en resumir y sintetizar grandes conjuntos de variables en función de ciertos objetivos de cara a obtener informaciones válidas que permitan una mejor comprensión del fenómeno objeto de estudio. En este estudio se ha utilizado el análisis de componentes principales.

Todos los análisis estadísticos han sido realizados utilizando el paquete estadístico Statgraphics 2.0 Plus.

#### **IV. INFLUENCIA DEL GRADO DE MADURACIÓN DE LA UVA EN EL COLOR DEL VINO**



## **IV.1 INTRODUCCIÓN**

### **IV.1.1 LOCALIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS**

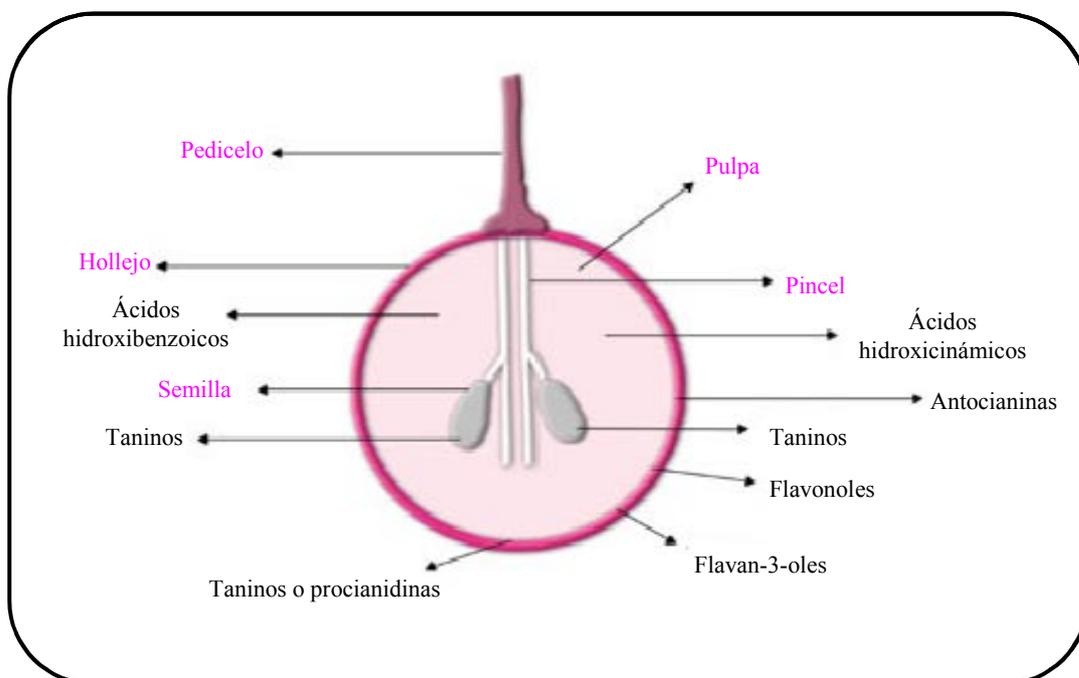
La calidad de la uva es esencial para la calidad del producto final y ésta depende de numerosos factores, entre ellos, el grado de maduración. Durante la vinificación en tinto, la maceración es una etapa esencial para la obtención de vino con alto índice de color, ya que es durante esta etapa cuando son extraídos los compuestos fenólicos de las pieles y semillas. Pero la extracción de estos compuestos no está siempre en relación directa con su contenido en la uva, pues uvas ricas en compuestos fenólicos no conducen necesariamente a vinos muy coloreados. Tres factores son indispensables para comprender este fenómeno: la localización de los compuestos fenólicos en las pieles, su evolución durante la maduración y su extractabilidad.

#### **IV.1.1.1 ANTOCIANOS**

Estos compuestos están presentes en variedades tintas y se encuentran localizados en el hollejo de la uva (Figura IV.1), concretamente en las vacuolas de las capas celulares de la hipodermis, como masa amorfa o como finas granulaciones (Amrani Joutei y Glories, 1995). Las células adyacentes a la pulpa pueden estar excepcionalmente coloreadas ciertos años e inclusive la pulpa misma, en el caso de las llamadas uvas tintoreras (Bakker y Timberlake, 1985). Estas últimas presentan una composición antociánica en la pulpa muy distinta al hollejo. En la pulpa, la peonidina-3-glucósido es el pigmento mayoritario, mientras que en el hollejo suele ser la malvidina-3-glucósido.

Los antocianos presentes en el hollejo y en las vacuolas se encuentran en estado libre (Hrazdina y Moskowitz, 1980) y no formando complejos antociano-flavonoide como ocurre en la mayoría de las flores coloreadas (Asen et al., 1972). Además, se encuentran en equilibrio entre la sal flavilio de color rojo, la base anhidro de color púrpura y las formas de base carbinol menos coloreadas. Al pH de las vacuolas de los hollejos, el equilibrio está menos desplazado hacia la base anhidro de color púrpura y no contribuye por tanto en el color de las células. La apariencia azulada de las uvas tintas está causada por las altas concentraciones de los antocianos en las vacuolas, a los efectos de dispersión de la luz en las vacuolas y a la presencia de clorofila en las capas subepidérmicas.

**Figura IV.1** Localización de los compuestos fenólicos en la uva.



### IV.1.1.2 TANINOS

Están presentes, tanto en variedades tintas como en variedades blancas, en el hollejo, en la semilla y en la pulpa (Figura IV.1).

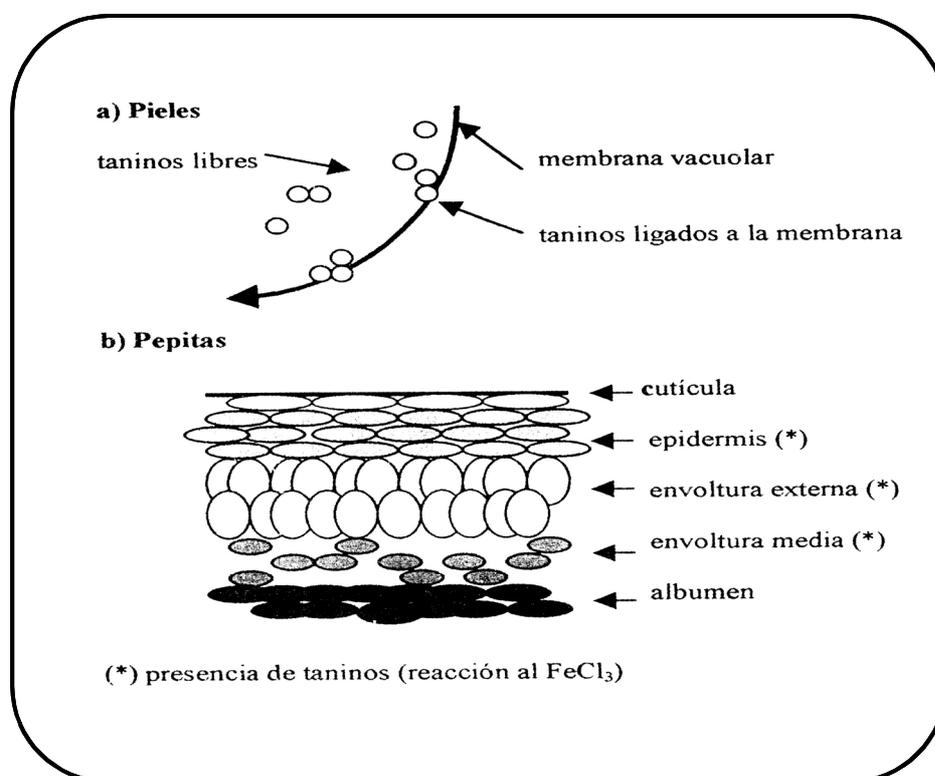
Los taninos presentes en los hollejos pueden ser clasificados en tres categorías en función de su localización (Amrani Joutei et al., 1994) (Figura IV.2).

**a) Taninos de las vacuolas**, que están en forma condensada en las células próximas a la epidermis y en forma de granulaciones difusas en las células internas del mesocarpio.

**b) Taninos ligados** a la membrana proteofosfolipídica de las células de la piel, insensibles a la acción de ultrasonidos

**c) Taninos integrados** en la pared celulopectídica.

Figura IV.2 Localización de los taninos en la baya (Saint-Cricq et al., 1999).



Solamente los taninos de las vacuolas pueden ser fácilmente extraídos y pueden ser considerados como taninos libres, a diferencia de los que están enlazados a otros compuestos como proteínas, pectinas y fosfolípidos. Su estructura consiste en procianidinas más polimerizadas que la de las semillas e incluyen algunas unidades tri-hidroxiladas (Souquet et al., 1996).

Los taninos no se encuentran en la misma cantidad en todas las células del hollejo. Algunas células poseen grandes cantidades de taninos, que son las localizadas en la epidermis del hollejo, mientras que otras contienen pequeñas cantidades e incluso ninguna (Glories y Saucier, 2000).

En las semillas, los taninos ocupan una posición de defensa del embrión en las cubiertas externas e internas y su difusión al medio exterior va a depender de la solubilización de la cutícula (Thorngate y Singleton, 1994; Amrani Joutei y Glories, 1995).

## **IV.1.2 LA MADURACIÓN DE LA UVA Y LOS COMPUESTOS FENÓLICOS**

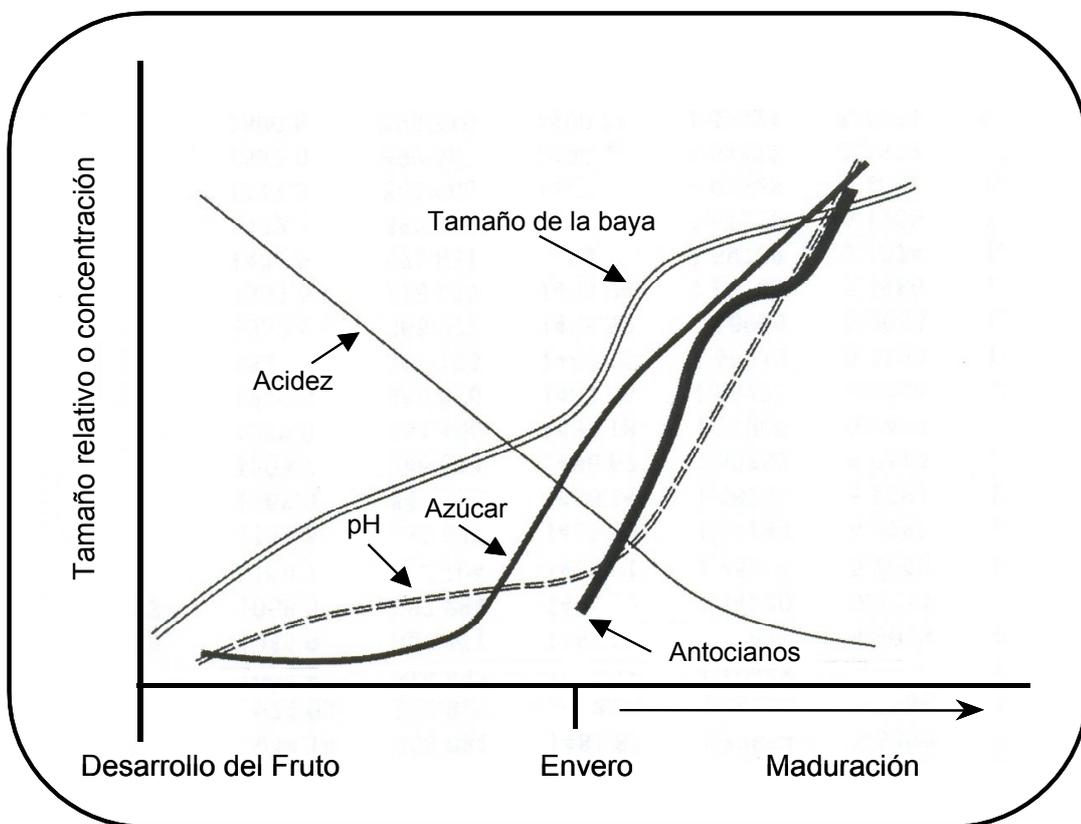
### **IV.1.2.1 CARACTERES GENERALES DE LA MADURACIÓN**

El desarrollo vegetativo de la baya pasa, desde su formación hasta su maduración completa, por dos períodos perfectamente definidos (herbáceo y de maduración), separados entre sí por el envero (Hidalgo y Candela, 1972).

Durante el periodo herbáceo, el epicarpio del grano posee clorofila, aumentando el tamaño de la baya debido a la multiplicación celular, sobre todo en el pericarpio.

El envero se caracteriza por una paralización momentánea del crecimiento del fruto, pérdida progresiva de la clorofila y aparición de los pigmentos que darán al grano el color característico de la variedad. También en esta etapa empiezan a desarrollarse los aromas, principalmente en los hollejos de muchas variedades de uva y el raspón logra su desarrollo completo, dejando de crecer (Peynaud, 1989; Watson, 2003) (Figura IV.3).

**Figura IV.3** Cambios en la composición de la uva durante su desarrollo y maduración (Watson, 2003).



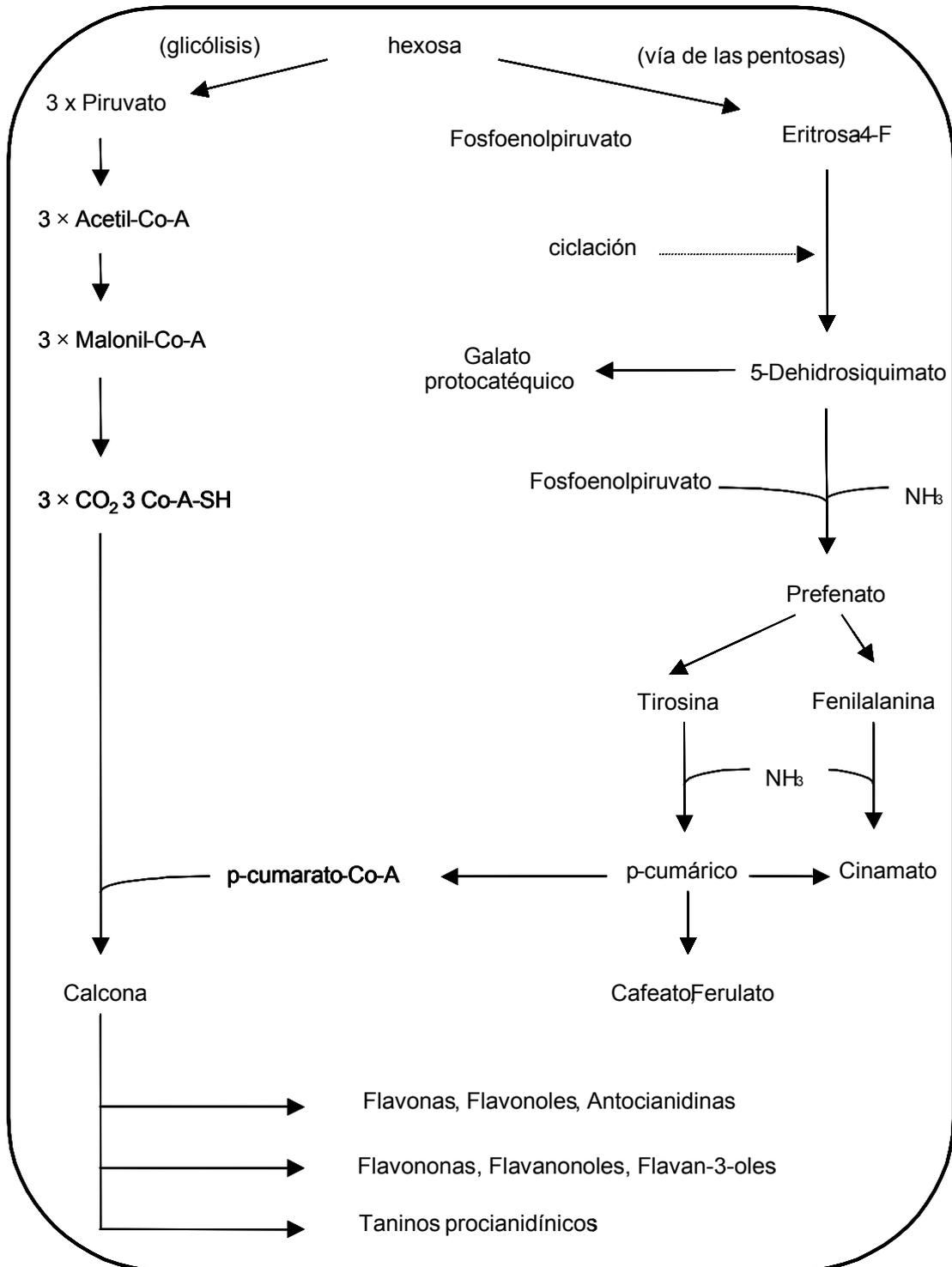
Durante la maduración, la uva acumula una cantidad importante de solutos y agua que va a producir un aumento importante del tamaño de la baya (Catalina et al., 1982). Entre estos solutos, se acumulan principalmente azúcares, los cuales migran desde las hojas hacia las bayas en forma de

sacarosa. En las bayas, la sacarosa (azúcar no reductor) es hidrolizada en glucosa y fructosa (azúcares reductores). En el momento del envero, la relación glucosa/fructosa está próxima a 2 para disminuir hasta 0,9-1 en la maduración (Watson, 2003). Aunque estos azúcares son los más abundantes en el momento de vendimia, también están presentes otros azúcares tales como la ramnosa, arabinosa, xilosa, etc.

Paralelamente a la acumulación de azúcares, tiene lugar una disminución en el contenido de ácidos orgánicos. Los ácidos tartárico y málico representan el 90% de los ácidos de la baya. Según Watson (2003), desde el envero hasta la vendimia el ácido tartárico decrece debido al aumento del tamaño de la baya, para después permanecer relativamente constante durante las últimas etapas de la maduración y el ácido málico disminuye debido al incremento de tamaño de la baya pero también por su utilización como fuente de energía (respiración). La disminución del ácido málico es más rápida en los periodos de temperaturas más elevadas. La relación del ácido tartárico/málico varía en función de la variedad de uva, el grado de maduración y las condiciones ambientales durante la maduración. La disminución de la acidez de la baya en las últimas etapas de la maduración es debida principalmente a la disminución del ácido málico.

La maduración también va acompañada de la solubilización de las pectinas de la pared celular del hollejo, teniendo lugar un ablandamiento del grano de uva. Esta solubilización es debida a una acción enzimática (Hidalgo y Candela, 1972) y va a producir, por tanto, un enriquecimiento en el mosto de sustancias pécticas solubles, donde el ácido galacturónico es el constituyente mayoritario, disminuyendo el contenido en pectinas hacia el final de la maduración (Esteban et al., 1993). Esta operación, que entraña la degradación de la pared celular, contribuye a facilitar la extracción de la materia colorante en la vinificación (Amrani Joutei y Glories, 1994).

Figura IV.4 Biosíntesis de los compuestos fenólicos en la uva (Hobson, 1981).



#### **IV.1.2.2 SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS**

Según Gonzalez-Sanjose y Diez (1992), Ribéreau Gayon et al. (1998a) y Guidoni et al. (2002), la síntesis de los compuestos fenólicos es una consecuencia colateral de la formación y acumulación de azúcares en el grano de uva (Figura IV.4).

Estas reacciones son reguladas por la enzima fenilalanina-amonioliasa (PAL) (Roubelakis-angelakis y Kliewer, 1986), que, eliminando amonio de la fenilalanina y tirosina, forma los primeros compuestos fenólicos. Está exclusivamente localizada en las células del hollejo y de algunos tejidos de pepitas, lo que explica la acumulación de los polifenoles en estas partes del grano de uva. En el periodo herbáceo, la concentración de la enzima PAL es máxima en las pepitas, decreciendo durante la maduración. Otra enzima, la chalcona-sintetasa, específica de otra vía de síntesis de flavonoides, alcanza su máxima concentración en el envero, para luego disminuir con rapidez.

La luz es indispensable para la actividad de la fenilalanina y ésta se incrementa al aumentar la temperatura (hasta un cierto límite) obteniéndose así uvas con una mayor concentración de compuestos fenólicos (Roubelakis-angelakis y Kliewer, 1986; Hiratsuka et al., 2001).

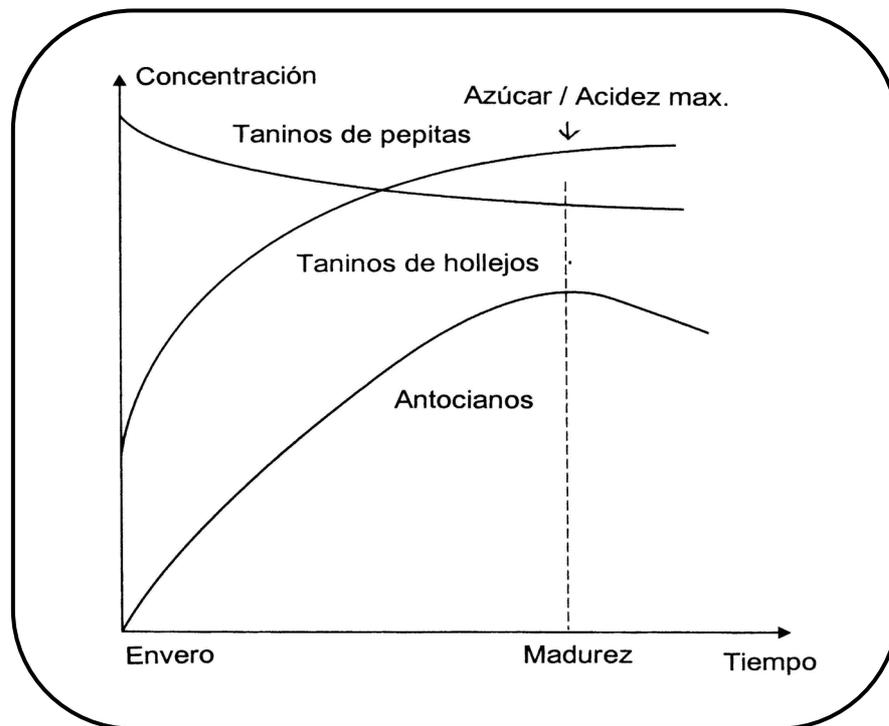
#### **IV.1.2.3 EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS**

Los antocianos aparecen en el envero y se acumulan durante la maduración (Ribereau-Gayon y Glories, 1996; Glories, 1999), alcanzando generalmente su valor más alto cuando la relación azúcares/acidez en el mosto es máxima para después disminuir; esta caída suele coincidir con la sobremaduración de la uva. La presencia de taninos en los hollejos también aumenta durante este periodo, aunque su acumulación es más lenta y su máximo se alcanza algunos días después de los antocianos, por lo que la evolución de estos compuestos y el máximo alcanzado no siempre coincide. Los taninos contenidos en la pepitas sufren un progresivo descenso desde el

envero hasta la maduración a la vez que se incrementa su grado de polimerización (Figura IV.5).

Los taninos de las pepitas son proantocianidinas de bajo grado de polimerización, aunque éste se incrementa algo desde el envero hasta la maduración, presentando por lo tanto sensaciones sensoriales de notable acidez y astringencia. Sin embargo, los taninos de los hollejos presentan estructuras complejas, con altos grados de polimerización que varían poco durante la maduración, uniéndose a las proteínas y polisacáridos del hollejo, comunicando sensaciones muy apreciadas de tipo más suaves, carnosas y grasas (Ribéreau-Gayon y Glories, 1980).

**Figura IV.5** Evolución de los compuestos fenólicos durante la maduración (Glories, 1999; Ribéreau-Gayon y Glories, 1980).



### **IV.1.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LA UVA**

En la maduración del racimo influyen un considerable número de factores que, al expresarse, determinarán las características de las vendimias producidas y, como consecuencia, la del vino elaborado. De una manera general, la cantidad de vendimia se contrapone con su calidad, pues los grandes rendimientos suelen diluir sus caracteres de bondad y tipicidad; pero esto no siempre se cumple, pues hoy en día existe tecnología vitícola suficiente, capaz de obtener considerables producciones armonizadas con altos niveles de calidad y como es lógico, todo ello dentro de unos límites razonables.

#### **IV.1.3.1 FACTORES EDAFOCLIMÁTICOS**

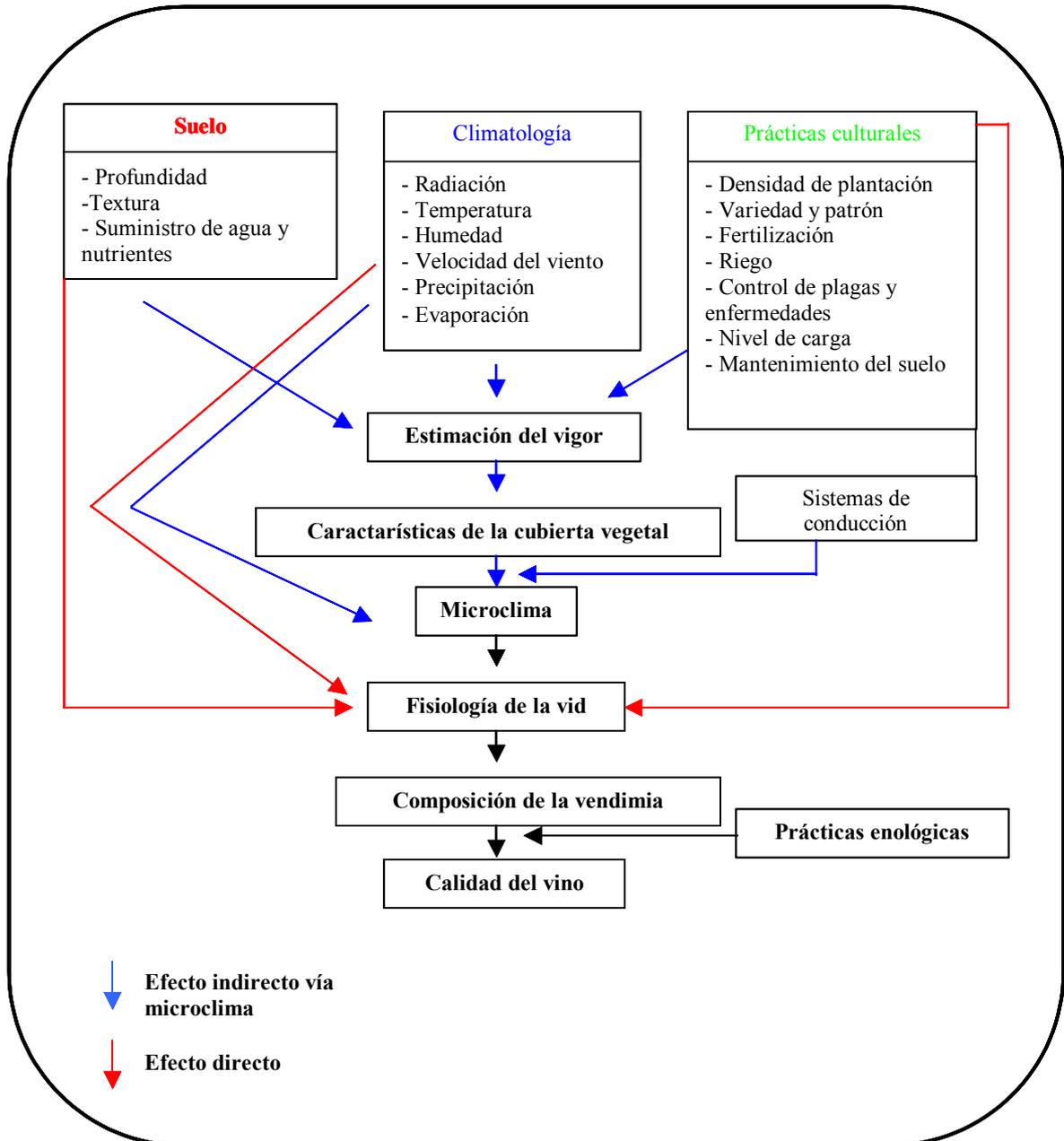
La Figura IV.6 muestra un modelo conceptual de cómo el suelo, el clima y las prácticas culturales pueden afectar a la calidad de la uva y por tanto a la calidad del vino.

##### **IV.1.3.1.1 Clima**

Es el resultado de las condiciones atmosféricas generales anuales donde se asienta el viñedo.

Los orígenes de la *Vitis vinífera* en la cuenca mediterránea hacen que sea una planta muy rústica de clima cálido, estando especialmente adaptada al calor y resistente a las condiciones de sequía, aunque también es capaz de vegetar en zonas más frías. En general, la vid en los climas cálidos produce vendimias ricas en azúcares y polifenoles y pobres en acidez (Bergqvist et al., 2001), sucediendo lo contrario en climas fríos (Mateus et al., 2001).

**Figura IV.6** Modelo conceptual que muestra como el suelo, el clima y las prácticas culturales pueden afectar a la calidad del vino (Smart et al., 1985).



La elección de la variedad en función de las características climáticas de la zona de cultivo es una cuestión de gran importancia de cara a obtener vendimias bien maduras y equilibradas. Lo deseable es ajustar a cada clima,

las variedades con posibilidades de madurar casi exactamente en el periodo climatológicamente favorable.

#### **IV.1.3.1.2 Temperatura**

La síntesis de los compuestos formados y acumulados en los racimos dependen en gran parte de este factor. Las temperaturas bajas ocasionan una reducción en los niveles polifenólicos en las uvas, al igual que ocurre con temperaturas muy altas (Crippen y Morrison, 1986; Mateus et al., 2001; Spay et al., 2002), pues la síntesis de estos compuestos se inhibe por encima de los 35°C (Kliewer y Torres, 1972); pero si existe durante la maduración una alternancia de temperaturas altas y bajas entre las horas del día y de la noche, la acumulación de antocianos y taninos se ve favorecida (Cresy, 2001).

El rango óptimo de temperatura para la síntesis de antocianos está en torno a 17-26°C, siendo en los climas cálidos donde se producen uvas más pigmentadas ya que el óptimo de temperatura coincide con la maduración (Pirie y Mullins, 1977).

#### **IV.1.3.1.3 Iluminación**

Es necesaria para activar al enzima PAL (Roubelakis-angelakis y Kliewer, 1986; Hiratsuka et al., 2001), enzima que regula la síntesis de los compuestos fenólicos y así favorecer su acumulación en la uva (Crippen y Morrison, 1986; Mateus et al., 2001; Spay et al., 2002).

#### **IV.1.3.1.4 Suelo**

De una manera general, se puede afirmar que terrenos pobres, sueltos, calizos y pedregosos dan lugar a vendimias de alta calidad (Ribéreau-Gayon y Glories, 1980); por el contrario, las altas producciones se encuentran en terrenos fértiles, ricos en materia orgánica y con alto contenido de nitrógeno.

### **IV.1.3.2 FACTORES VARIETALES**

#### **IV.1.3.2.1 Variedad de uva, clon y portainjerto**

Evidentemente, la variedad determina en gran medida la composición en compuestos fenólicos de la uva (Cravero y Di Stefano, 1990; Rosillo et al., 1998; Revilla García et al., 1998; Pérez-Magariño y González-Sanjosé, 2002) y por tanto del vino (García-Beneytez et al., 2002; Pérez-Magariño y González-Sanjosé, 2002). En primer lugar, por el tamaño del grano, que condiciona la proporción de las pieles y semillas respecto al volumen del mosto. Las variedades de grano pequeño presentan una mayor relación superficie/volumen y por tanto una mayor superficie de intercambio. Además, cada variedad vinífera presenta una capacidad potencial diferente para sintetizar compuestos fenólicos (Roson y Moutounet, 1992).

Únicamente se podrá garantizar una concentración suficiente en compuestos fenólicos eligiendo aquellas variedades que posean la capacidad de acumular, en nuestras condiciones edafoclimáticas particulares, la necesaria concentración en antocianos y taninos.

Además de la variedad, también presenta gran importancia el tipo de clon y portainjerto, ya que van a influir en el vigor y la productividad y por tanto en la concentración de compuestos fenólicos en la uva y en la calidad del vino (Gómez-Plaza et al., 2000; Fernández et al., 2003).

#### **IV.1.3.2.2 Edad del viñedo**

En general, a medida que la viña alcanza edades más avanzadas, la calidad de las uvas aumenta debido a que se produce un equilibrio a lo largo de los años, entre los medios de producción de la vid y su cosecha, haciendo que la maduración se optimice (Yuste et al., 2000). Los factores que van a influir son:

- **El potente sistema radicular**, ya que explora un mayor volumen de terreno, asegurándose su nutrición mineral, así como también una mayor disponibilidad de agua. Son menos sensibles a las variaciones climáticas de cada año y aseguran una elevada y constante maduración a lo largo del tiempo. Además, el extenso sistema radicular del viñedo viejo permite, en la etapa de maduración, que las raíces profundas dispongan de agua, mientras que las superficiales permanecen en sequía induciendo la formación de compuestos fenólicos.

- **El mayor volumen de madera vieja**, que acumula una mayor cantidad de reservas, que movilizadas hacia los racimos, contribuyen a mantener la calidad en las sucesivas vendimias.

- **Cicatrices producidas por las heridas de la poda**, que dificultan la circulación de la savia por los vasos conductores, haciendo que se produzca un menor número de racimos y siendo estos de menor tamaño. Además, estas dificultades circulatorias, mayores en las cepas viejas, tienden a producir una mayor acumulación de azúcares y compuestos fenólicos en la uva

#### **IV.1.3.3 FACTORES CULTURALES**

Antes de iniciar el estudio de los efectos de los factores culturales sobre cualquier parámetro de calidad, también es necesario volver a destacar la gran influencia que el tamaño de la baya tiene en la calidad de mostos y vinos. La piel o el hollejo de la baya constituye una fuente fundamental de metabolitos secundarios, indispensables en la elaboración de vinos tintos. Bayas grandes dan una relación disolvente (pulpa)/solute (metabolitos secundarios contenidos en el hollejo) mayor que la correspondiente a bayas de menor tamaño, como consecuencia de una menor proporción superficie/volumen de baya. Es un principio totalmente asumido por los especialistas aquél según el cual a partir de bayas más pequeñas se obtienen los mejores vinos, encontrando una fuerte correlación negativa entre la calidad del vino y el tamaño de la baya (Dry y

Loveys, 1998). Sin embargo, los tratamientos que tienden a minimizar el tamaño de la baya muchas veces tienen efectos negativos en la acumulación de metabolitos y el incremento en su concentración es un puro espejismo, ya que se debe a una reducción en el volumen de disolvente y no a un incremento en la producción por baya (Iland et al., 1996).

#### **IV.1.3.3.1 Conducción del viñedo y densidad de plantación**

Condicionan la fisiología de la planta, en el ámbito de la explotación del suelo por las raíces y de la utilización de la energía solar por las hojas. Estos factores actúan especialmente sobre el vigor de la vid y su influencia sobre la acumulación de compuestos fenólicos en la uva es solamente indirecta, actuando particularmente sobre el microclima que rodea los racimos (temperatura e iluminación) (Yuste et al., 2000).

#### **IV.1.3.3.2 Poda y otras operaciones en verde**

La poda equilibra la producción del viñedo con el potencial del medio vitícola (suelo, clima y microclima), así como con las fluctuaciones anuales de los factores variables (iluminación, temperatura y humedad). La influencia del sistema de poda sobre la composición fenólica se basa en la disposición de los racimos en la cepa, y su consecuente exposición solar, y en la producción de la misma, que queda determinada por el número de yemas (Rosillo et al., 2003; Gonzalez-Neves et al., 2004).

Otras operaciones en verde que se pueden realizar en el viñedo son el aclareo de frutos, despunte o supresión de las extremidades de los pámpanos en crecimiento y el desfoliado o eliminación de las hojas más viejas y fotosintéticamente menos activas. Con estas operaciones se consigue modificar la relación superficie foliar/uva para favorecer la maduración de las bayas e incrementar la acumulación de los compuestos fenólicos en la uva (Valerio y Gutiérrez, 2002; Guidoni et al., 2002; Gonzalez-Neves et al., 2004).

#### **IV.1.3.3.3 Fertilización**

Los grandes vinos proceden generalmente de suelos pobres en compuestos fertilizantes, pero no obstante en algunas ocasiones se hace necesario las correcciones mediante los oportunos tratamientos del suelo para restituir los elementos fertilizantes extraídos por las cosechas en función de las necesidades de las cepas en las diferentes etapas del ciclo vegetativo y de sus capacidades de absorción (Cresy, 2001).

#### **IV.1.3.3.4 Riego**

El principal propósito del riego es reducir el estrés hídrico en las plantas e incrementar la producción. Pero el riego en las uvas de vinificación influye indirectamente en la calidad del vino a través de su influencia en el crecimiento vegetativo y por tanto en el microclima de los racimos, en el metabolismo del fruto y en la producción (Sipiora y Gutierrez Granda, 1998).

Existe una gran controversia respecto a los efectos positivos y negativos del riego sobre la calidad de los mostos. Un exceso de riego llevará a un crecimiento vegetativo excesivo (Mccarthy, 1984; Bravdo et al., 1985; Hong y Wrolstad, 1990); el tamaño de las bayas se incrementará, con dilución de importantes compuestos (color y aroma) (Gonzalez-Neves et al., 2002), el contenido en azúcares disminuirá por competición entre el crecimiento vegetativo y el desarrollo del fruto. Además, el riego puede tener un efecto indirecto sobre los antocianos. Teniendo en cuenta que la iluminación es un factor fundamental en el desarrollo de la baya y los antocianos (D'Agostino, 1986; Rojas-Lara y Morrison, 1989; Glories, 1994; Gao y Cahoon, 1994; Fuleki y Ricardo da Silva, 1997) un riego excesivo puede contribuir a incrementar la cubierta vegetal y el sombreado de los racimos (Mccarthy et al., 1983; Smart et al., 1990; Gonzalez-San José et al., 1990a).

Por otro lado, un estrés hídrico severo, tiende a decrecer el vigor pero también se pueden ver comprometidos la acumulación de azúcares y ácidos puesto que la actividad fotosintética se ve reducida (Flexas et al., 1999).

Indirectamente, los antocianos también se pueden ver afectados. El enzima PAL está relacionada con el metabolismo de los carbohidratos y por tanto también se ve afectada por el estrés hídrico severo (Roubelakis-angelakis y Kliewer, 1986). Mas aun, un desarrollo inadecuado de las hojas llevará a temperaturas demasiado altas en la zona de los racimos, especialmente en zonas muy cálidas y altas temperaturas se han correlacionado con un descenso en los niveles de antocianos (Mateus et al., 2001).

En un estudio realizado con Monastrell en nuestras condiciones edafoclimáticas se ha demostrado que el riego moderado favorece la acumulación de antocianos en las bayas (De la Hera Orts et al., 2004)

#### **IV.1.4 CRITERIOS PARA DETERMINAR LA MADUREZ ÓPTIMA DE LAS UVAS**

Para determinar el momento óptimo de vendimia de la uva se han propuesto varios índices de maduración (Ribéreau Gayon et al., 1998a):

- **Índices o caracteres generales de maduración**, que se basan en el análisis organoléptico de los granos de uva, es decir, en la impresión visual que nos producen, así como en la táctil, gustativa e incluso olfativa. Así, el momento de vendimia se caracteriza por una pérdida de la rigidez que el racimo tenía antes de madurar, grano coloreado con una consistencia elástica, raspón lignificado, desprendimiento fácil del grano de uva del escobajo, sabor azucarado y suave del grano, separación fácil de las semillas de la pulpa, separación de la pulpa del hollejo apretando las bayas entre los dedos y la aparición de aromas propios de la variedad.

- **Índices de maduración físicos**, que determinan cuantitativamente una característica propia de la maduración de la uva. Aunque ellos solos no revelan de un modo claro y determinante este estado, pueden ser muy útiles cuando se

les asocia a otros índices. Entre estos índices se encuentran el color del grano, peso de racimo o granos de uva, resistencia del pedicelio al desprendimiento del grano de uva, firmeza de la pulpa y hollejo, rendimiento en mosto y la densidad del mosto.

- **Índices de maduración químicos**, que se basan fundamentalmente en la determinación analítica del contenido de azúcares y ácidos de la uva durante la maduración.

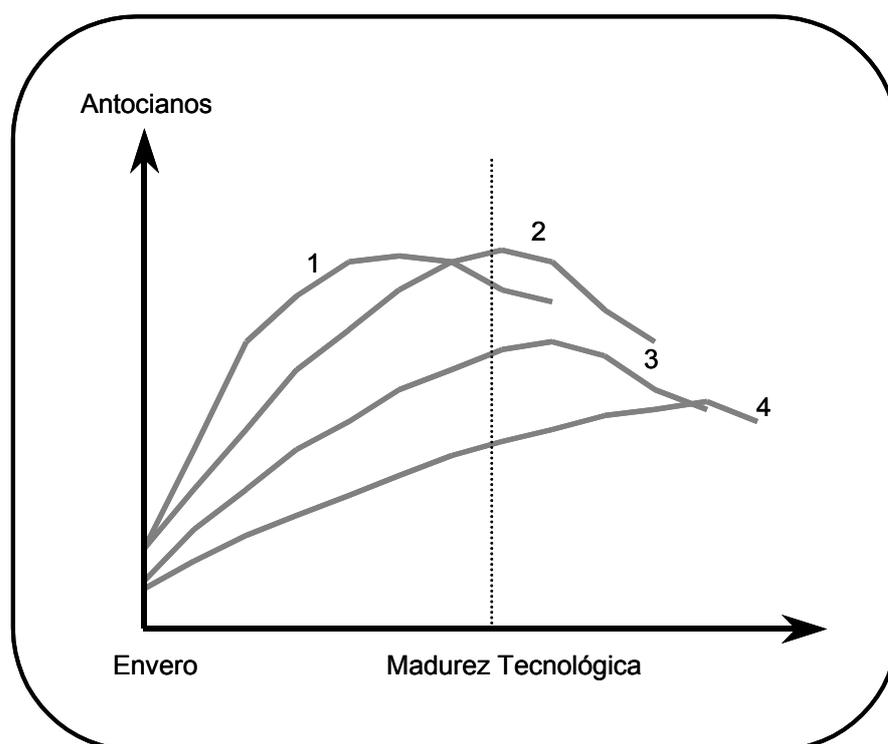
- **Índices fisiológicos**, que se basan en la determinación analítica de los productos formados o desprendidos durante el proceso de maduración de la uva, no siendo muy exactos en su apreciación, pero, sin embargo, útiles cuando acompañan al cálculo de otros índices. Estos índices son la desaparición de la clorofila, respiración del racimo y análisis de etileno.

A pesar de las distintas variantes de control propuestas para determinar el momento óptimo de vendimia, hasta la fecha sólo se utilizaban los índices basados en la determinación química de los componentes de la pulpa, es decir el contenido de azúcares y ácidos de la uva (madurez tecnológica) (Junquera y Diez, 1986; Chirivella et al., 1992; Watson, 2003). La madurez de la pulpa puede ser perfectamente válida para la determinación de la fecha de vendimia para la elaboración de vinos blancos, pero no sirve de referencia correcta en el caso de los vinos tintos (Junquera y Diez, 1986), ya que los compuestos responsables que van a dotar de calidad a estos vinos son principalmente el contenido de antocianos y taninos y la máxima concentración de estos compuestos en la uva no siempre coincide con la madurez tecnológica (Glories, 1999). Así, la figura IV.7 muestra algunas de las situaciones que nos podemos encontrar:

La curva 1 muestra un caso de maduración precoz de los compuestos fenólicos, ya que ésta tiene lugar antes de que se haya llegado a la madurez ideal de la pulpa. Se trata de un caso de incorrecta adaptación de la variedad a las condiciones edafoclimáticas. Será necesario vendimiar antes de alcanzar la madurez de la pulpa y corregir en bodega el grado alcohólico probable. Este es

el caso de los vinos de ciertas regiones, donde se obtienen vinos realmente provistos de color y de tanicidad, pero en cambio la chaptalización es casi imprescindible.

**Figura IV.7** Acumulación de los antocianos en el transcurso de la maduración de la uva en función de la cosecha y del terruño (Glories, 1999).



La curva 2 muestra un caso de una buena adecuación de la variedad al terruño. En este caso ideal, la maduración de los compuestos fenólicos y la de la pulpa tienen lugar simultáneamente. Es conveniente tratar de seleccionar aquellas variedades que se aproximen más a esta curva en cada condición edafoclimática concreta.

La curva 3 muestra un caso de maduración de los compuestos fenólicos tardía. Se necesita una cierta sobremaduración de la pulpa para alcanzar una correcta maduración de las semillas y de las pieles.

La curva 4 muestra un caso de maduración de compuestos fenólicos excesivamente tardía. Se trata de un caso de maduración insuficiente y por tanto de unas condiciones edafoclimáticas no aptas para la elaboración de vinos de calidad.

#### **IV.1.5 LA MADUREZ FENÓLICA**

Teóricamente, la uva rica en antocianos debe de conducir durante el proceso de vinificación a un vino altamente coloreado, pero esto no siempre es así, ya que la extracción de estos compuestos y de otros componentes de las partes sólidas de la uva durante la maceración no solo depende de la cantidad en la que se encuentren, sino también, del grado de maduración de la uva y de las distintas técnicas empleadas en vinificación. A su vez, la extracción de los diversos componentes fenólicos es diferente, de acuerdo con su solubilidad y la localización.

En correspondencia con su localización, la extractabilidad de los antocianos está fuertemente condicionada por la degradación de las membranas y de las paredes celulares de las células del hollejo, mientras que la de los taninos, especialmente los de las semillas, depende menos de este factor (Saint-Cricq et al., 1998).

Los taninos de las semillas no son extraíbles si no disuelve el recubrimiento lipídico de las mismas, y son más o menos solubles según su grado de polimerización, que va aumentando durante la maduración, lo que los hace menos extraíbles.

También la correspondencia entre la fermentación alcohólica y la maceración condiciona la extracción de los taninos, ya que estas moléculas son poco solubles en agua y más solubles en alcohol. A su vez, el alcohol tendría el efecto de disgregar las membranas vacuolares y celulares, facilitando

la liberación de los taninos ligados (Glories y Saucier, 2000; Amrani Joutei y Glories, 1995).

Las paredes celulares forman una barrera frente a la difusión de los constituyentes deseados de la piel, que son los antocianos, taninos y otros polifenoles (Lecas y Brillouet, 1994; Kennedy et al., 2001). Los constituyentes de la pared celular de las uvas son principalmente celulosa, hemicelulosa, xiloglucanos y arabinosilanos, pectinas y glicoproteínas estructurales. Se han dedicado pocos estudios a las paredes celulares de la piel de la uva, a pesar de que su conocimiento puede constituir un elemento fundamental para el control de las extracciones y maceraciones en vinificación. Aunque las pieles no representan más del 10-15% del peso fresco de las bayas, ahí las paredes de las células son más gruesas y constituyen un obstáculo frente a la liberación al medio líquido de los compuestos mencionados anteriormente. La concentración de pectinas es más débil que en la pulpa, ya que aquí predominan las hemicelulosas y las celulosas. La tasa de esterificación de los ácidos galacturónicos es ligeramente más débil que en la pulpa y cercana al 60%.

Entre los numerosos fenómenos fisiológicos que caracterizan la maduración, los poliosidos estructurales están implicados desde el envero (Yakushiji et al., 2001). En el momento del envero, la protopectina (pectinas insolubles) se solubiliza con un enriquecimiento del mosto en sustancias pécticas solubles donde el ácido galacturónico es el constituyente mayoritario, disminuyendo el contenido en pectinas hacia el final de la maduración. El reblandecimiento de la baya se acompaña de la aparición de actividades endopoligalacturonasas (endo-PG) y pectinmetilesterasas (PE) a partir del envero (Lee et al., 1979). La actividad endo-PG permanece constante y a niveles débiles y la PME aumenta con la madurez, siendo estas enzimas posteriormente liberados en los mostos (Doco et al., 1995). Los enzimas pectolíticos degradan las protopectinas en sustancias solubles en agua. Esta fracción soluble posee numerosos ésteres metílicos que serán hidrolizados por PME. Después entran en juego las PG, degradando las moléculas en

pequeñas cadenas de ácidos galacturónicos. Esta operación que entraña la degradación de la pared celular contribuye a facilitar la extracción de la materia colorante en la vinificación (Amrani Joutei y Glories, 1994).

Vistos todos estos fundamentos, se desarrolló el concepto de madurez polifenólica.

El control de la madurez polifenólica se basa en los siguientes hechos:

**a) En las pieles**, se observa durante la maduración, la acumulación de antocianos y taninos. Sus concentraciones pasan por un máximo cerca de la madurez tecnológica si las condiciones edafoclimáticas son las adecuadas.

**b) Las membranas de las células de las pieles** se degradan, cerca de la madurez, permitiendo la extracción de antocianos y taninos.

**c) En las semillas**, la cantidad de taninos extraíbles disminuye durante el proceso de maduración.

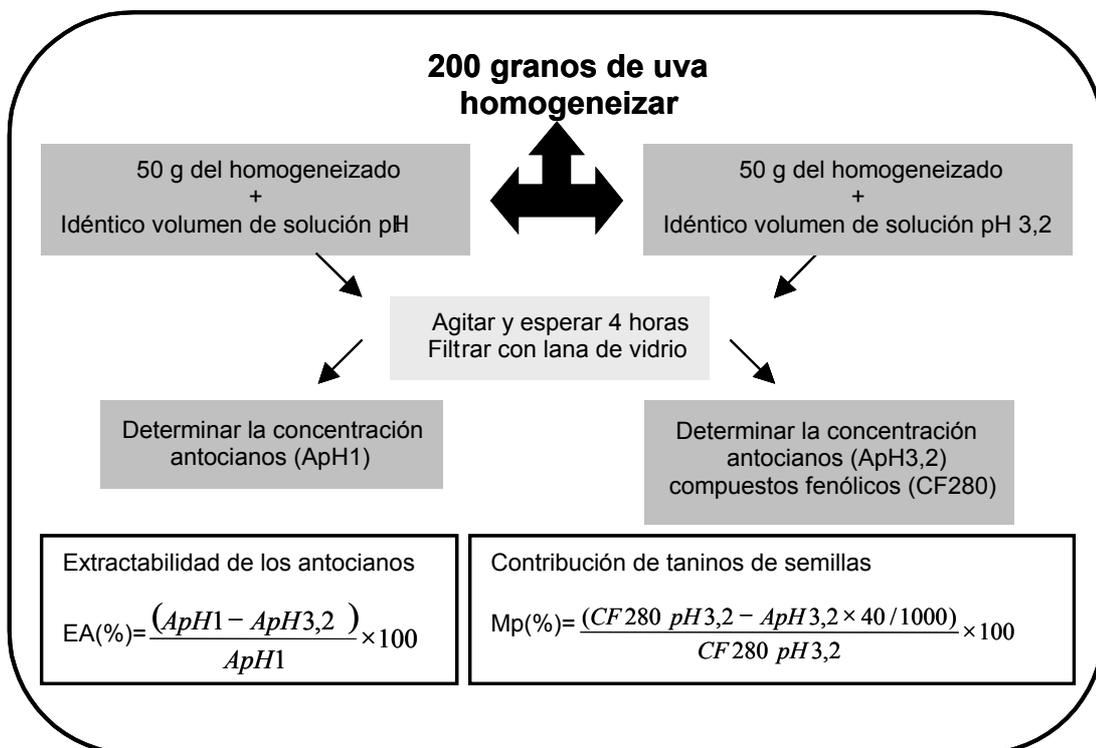
Una uva madura se caracteriza por una piel rica en antocianos y taninos y semillas pobres en taninos. Un déficit de madurez dará lugar a una pequeña acumulación de pigmentos y dificultad en su extracción, poca acumulación de taninos poco astringentes en las pieles y una fuerte concentración de taninos astringentes en las semillas.

Se han intentado desarrollar numerosos métodos para la medida de la madurez polifenólica (Amrani Joutei y Glories, 1994; Lamadon, 1995; Izcarra y González-San José, 2001). El método más utilizado es el desarrollado por Glories y Agustin (1993), descrito de nuevo por Saint-Cricq et al. (1998) (Figura IV.8).

**ApH1** representa el potencial total de antocianos: el medio ácido permite romper las membranas y liberar el contenido vacuolar por lo que todos los antocianos son extraídos, **ApH3,2** representa a los antocianos extraíbles: la extracción se realiza de forma similar a la vinificación; si la membrana no es porosa, los antocianos difundirán poco, si ya está degradada por los enzimas, los pigmentos saldrán de la vacuola. **EA%** es la extractabilidad celular o índice

de madurez celular (**IMC**): aptitud de las uvas para liberar antocianos (cuanto más bajo sea este índice, mayor facilidad de extracción) y **Mp** la madurez polifenólica de las semillas, porcentaje de la contribución de las semillas a la densidad óptica a 280 nm de la solución a pH 3,2.

**Figura IV.8** Esquema del metodo de extractabilidad propuestos por Saint-Cricq et al. (1998).



Este método considera, por tanto, que la extracción de antocianos se debe en parte a la cantidad de estas moléculas, biosintetizadas en las células peliculares (ligado esencialmente a la variedad) pero influenciado por las características climáticas, del terreno y condiciones de cultivo como se ha demostrado (Esteban et al., 2001; De la Hera et al., 2002; Arozarena et al., 2002) y al estado de degradación de las paredes de las células en madurez

(que parece ser característico de la cepa, aunque no se han realizado estudios al respecto).

Es un concepto que no pretende sustituir a la madurez tecnológica (medida de azúcares y ácidos de las bayas), que es la que más se aplica sobre el terreno pues es de rápida realización y su valor contribuye a fijar la fecha de vendimia. Como constata Zamora (2002), la aplicación del concepto de madurez polifenólica como único instrumento para la decisión de la fecha de vendimia es difícil. La vendimia está condicionada por numerosos aspectos como son la climatología, estado sanitario de las uvas, la capacidad de la bodega, que por desgracia son muchas veces de mayor peso que la propia madurez de la uva. Pero la medida de madurez polifenólica en el momento de vendimia puede ser muy útil para clasificar la uva y aplicar aquellas estrategias de vinificación que permitan el grado de extracción más adecuado.

Se han dado algunos ejemplos de vinificación adaptada a la maduración de la uva (Glories, 1999):

- **Uvas perfectamente maduras desde el punto de vista fenólico** (EA% débil, Mp débil), la vinificación consistirá en guiar con suavidad la extracción de los diferentes constituyentes: remontados moderados con un máximo hacia el medio de la fermentación alcohólica, temperatura inferiores a 30°C. Se pueden emplear maceraciones largas.
- **Uvas con antocianos difíciles de extraer** (EA% elevado): remontados frecuentes en la primera parte de fermentación alcohólica, intensidad de estos remontados según la riqueza de la uva en antocianos (ApH1), sulfitados más fuertes y uso de enzimas para ayudar a la disgregación de las paredes celulares.
- **Uvas que poseen muchos taninos en las pepitas** (Mp elevado): remontados reducidos al final de la fermentación alcohólica para evitar el defecto de la astringencia (los taninos de pepitas son muy astringentes y la solubilización de estas moléculas es máximo en fase alcohólica). Una

temperatura al final de la fermentación alcohólica y maceración post-fermentación cercana a 30°C.

- **Uvas con pocos taninos en las semillas** (Mp débil): remontes para aportar suficiente estructura y cuerpo al vino.

Un buen conocimiento de las características fenólicas de la uva y el estado de las paredes celulares puede conducir a un buen control de la vinificación: remontados, intensidad, temperatura y duración de la maceración son factores adaptables cada año según las uvas. Por tanto, los cálculos de EA% y Mp podrían ser útiles como herramienta de control en la entrada en bodega y la uva sería clasificada y tasada en su valor real, pudiéndose aplicar estrategias de vinificación adecuadas. Si la uva está polifenólicamente madura, la extracción de antocianos será rápida y fácil, para vinos jóvenes bastará con maceraciones cortas y largas para los crianza. Por el contrario, si la uva está insuficientemente madura, habrá que aplicar medidas para acelerar la disolución de las moléculas responsables del color, evitando extraer en exceso los taninos más agresivos de las semillas. Se puede alargar la maceración prefermentativa (así no hay extracción de tanino porque no hay alcohol), adicionar enzimas pectolíticas, incrementar el tratamiento mecánico del hollejo, proteger los antocianos de la oxidación (uso de SO<sub>2</sub>, tanino enológico), eliminar parte de las semillas o evitar altas temperaturas para evitar la solubilización de tanino (Glories, 1999).

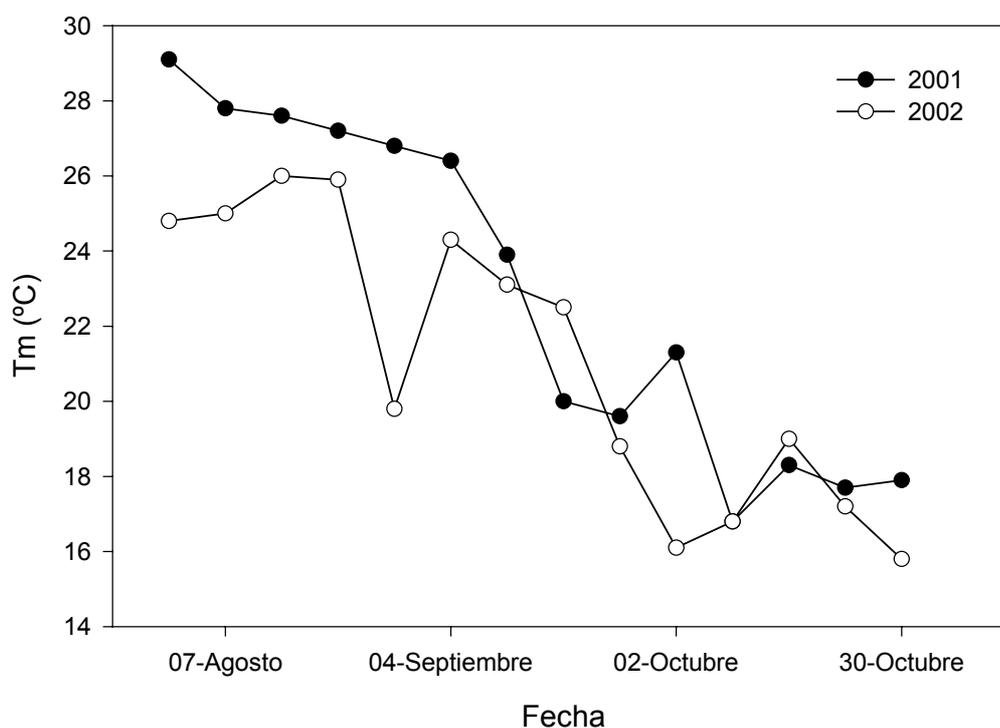


## IV.2 RESULTADOS

### IV.2.1 EVOLUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA UVA DURANTE LA MADURACIÓN

La composición de la fruta depende de la variedad, de la ubicación de la parcela, del microclima, del desarrollo de la baya y del brote que la mantiene (Coombe y Iland, 1986). Entre los factores que afectan a la acumulación de azúcar, la temperatura entorno al racimo juega un papel decisivo, habiéndose citado como temperaturas óptimas entre 21-22°C si no hay déficit hídrico, ya que en caso contrario, las altas temperaturas tienen un efecto negativo en la acumulación (Calo et al., 1997).

**Gráfica IV.1** Evolución de la temperatura media ( $T_m$ ) durante la maduración de la uva en los años 2001 y 2002.



La temperatura de la baya tiene una importancia decisiva en la composición del fruto ya que afecta a las reacciones metabólicas que se producen en su interior (Smart, 1982). Las temperaturas medias de los dos años se muestran en la gráfica IV.1.

#### **IV.2.1.1 SÓLIDOS SOLUBLES**

En la gráfica IV.2 podemos observar la evolución del contenido en sólidos solubles, expresados en °Be, en la uva durante la maduración de los años 2001 y 2002.

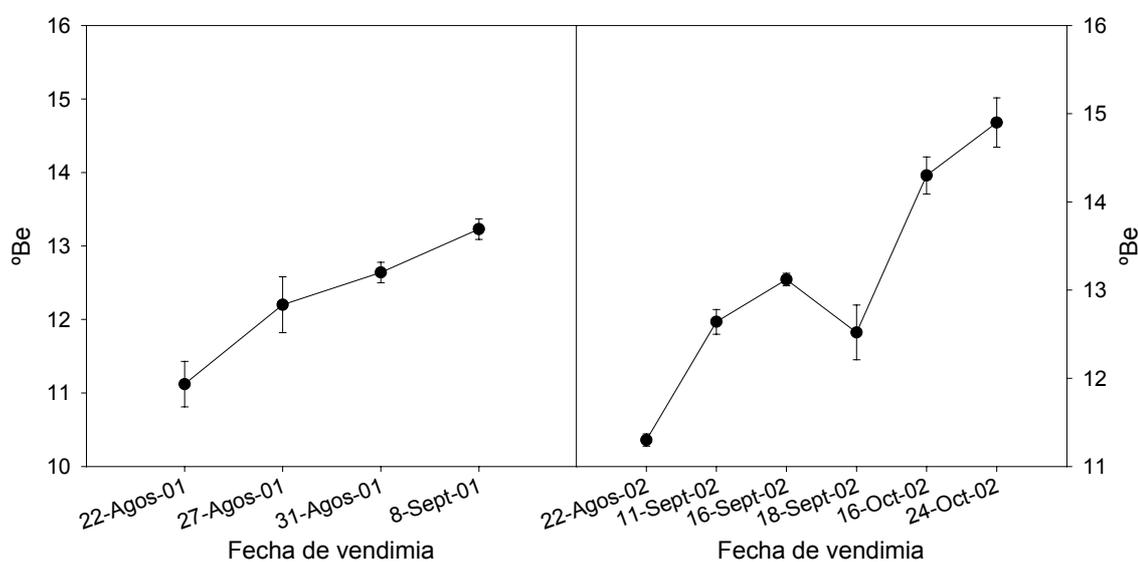
El contenido de azúcares ha sido el criterio tradicionalmente utilizado para determinar el grado de maduración de la uva. Como se puede observar en las gráficas, se produce un incremento en el contenido de sólidos solubles a lo largo de la maduración, como consecuencia de la acumulación de azúcares en la uva, tanto para el 2001 como el 2002. La primera muestra de uva vendimiada en ambos años presenta un valor de °Be prácticamente similar (11,1 para el 2001 y 11,3 para el 2002), mientras que la uva de la última fecha de vendimia para el año 2001 tiene un valor 13,2 °Be y para el 2002 de 14,9 °Be. Este hecho fue debido a que en el año 2001, la uva tuvo que ser vendimiada antes de completar el estudio, debido al granizo caído en la zona donde está localizada la parcela de investigación.

Se puede apreciar que la acumulación de los azúcares en la uva es más lenta en el año 2002 que en el 2001, observándose un retraso aproximado de unos 8 días. Hay que destacar que, en el año 2002, del 16 al 18 de septiembre se produce una disminución en una unidad en los valores de los °Be, debida a la dilución que sufre la uva como consecuencia de la lluvia caída en esos días.

El adelanto en la acumulación de azúcares que se observa para la uva del 2001, también lo observaron otros autores en diversos ensayos (Neja et al., 1977; Bravdo et al., 1985; Van Leeuwen y Seguin, 1994) y puede ser debido, tal y como hemos comentado y también según Bravdo y Hepner (1986), a

efectos indirectos entre los que podemos destacar: mayor exposición de los racimos a temperaturas medias más altas (Gráfica IV.1) y la menor dilución existente en las bayas debido a la ausencia de precipitaciones durante el periodo de estudio.

**Gráfica IV.2** Evolución del °Be de la uva durante la maduración de los años 2001 y 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media.



#### IV.2.1.2 PESO DE BAYA

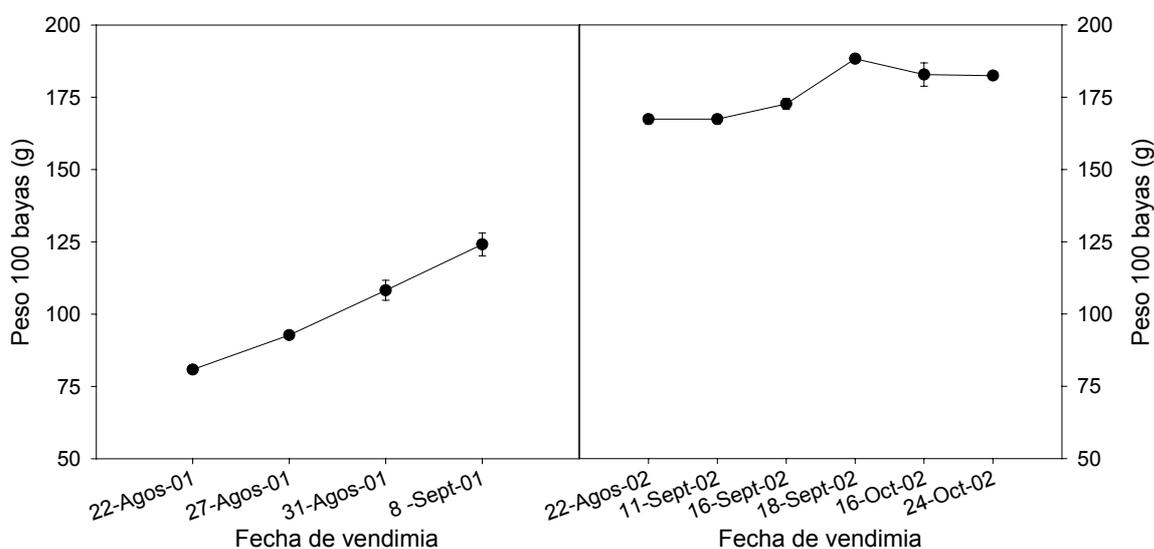
En la gráfica IV.3 se presenta la evolución del peso de 100 bayas durante la maduración de los años 2001 y 2002.

En el 2001, el tamaño de la baya se incrementa durante todo el periodo estudiado, mientras que en el 2002 se mantiene prácticamente estable en las tres primeras fechas de vendimia, aumentando después tras las precipitaciones y estabilizándose de nuevo, aunque con una ligera disminución en las dos

últimas fechas de vendimia, probablemente debido a la pérdida de agua por evaporación en las bayas.

También se puede observar que el tamaño del grano de uva en la primera fecha de vendimia para el año 2001 es la mitad que para el 2002 y cuando la uva alcanza durante la maduración la misma concentración de sólidos solubles (entorno a 13 °Be) el tamaño de la baya en el 2001 es aproximadamente 1,5 veces más pequeño que en el 2002. Esto es debido a que el año 2002 fue un año con más precipitaciones durante el desarrollo del fruto que el 2001, provocando por tanto un aumento importante del tamaño de la baya.

**Gráfica IV.3** Evolución del peso de 100 bayas (g) durante la maduración de los años 2001 y 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media.



Es importante destacar que, en el año 2001, el peso máximo obtenido está por debajo de 1,6 g por baya, por lo que nos encontramos con un tamaño que muchos autores consideran como medio para obtener una calidad óptima. Reyero et al. (1999) mantienen que el tamaño ideal de la baya no debe superar 1,5 g, valor que si lo es por las uvas vendimiadas en el 2002. Estos mismos

autores y coincidiendo con Esteban et al. (1999), indican que el mayor tamaño de baya está directamente relacionado con dilución de los diferentes compuestos de la uva y a raíz de un ensayo realizado con diversas variedades, concluyen que la variedad Monastrell tiene una rápida respuesta ante una mayor disponibilidad hídrica.

El tamaño afectará a la extracción de antocianos y taninos durante la vinificación a través de su impacto sobre las proporciones de hollejo/mosto.

#### **IV.2.1.3 ACIDEZ TOTAL Y pH**

La tabla IV.1 muestra los cambios de acidez total (g/L) y pH en la uva durante la maduración, utilizados también como indicadores de la calidad de la uva de gran importancia ya que de ellos va a depender la estabilidad del mosto y del vino (Watson, 2003).

La acidez depende de la variedad, de las condiciones edafoclimáticas y del terreno, estando su valor en función del estado de maduración de la uva (Andrades, 1990). La disminución de la acidez durante la maduración se debe a la movilización de bases que neutralizan los ácidos del fruto, a procesos de combustión interna y sobre todo a fenómenos de dilución (Catalina et al., 1982; Iland, 1987; Watson, 2003). Según Calo et al. (1997), la degradación sufrida por algunas formas ácidas es producida fundamentalmente por la temperatura.

Tanto en el 2001 como en el 2002, se produce un descenso en los valores de acidez durante la maduración, incrementándose por tanto los valores de pH en la uva. Como se observa, pequeños cambios en los valores de pH se reflejan en grandes cambios en los valores de acidez. Esteban et al. (2002) encontraron que el pH se incrementa linealmente con la maduración de la baya mientras que la acidez disminuye exponencialmente. Los valores de pH encontrados en el mosto en la maduración no fueron demasiado altos, estando entorno a 3,8 en la última vendimia. Aun así, se sabe que un valor de pH por encima de 3,6 incrementa la actividad de los microorganismos, disminuye la

intensidad de color de los vinos, combina más sulfuroso, reduce el sulfuroso libre y afecta por tanto a la estabilidad del vino en el tiempo (Jackson y Lombard, 1993). Por ello, la uva con una acidez baja y un valor de pH entorno a 3,8 nos forzó a corregir los valores de pH del mosto en el momento de la elaboración, adicionando ácido tartárico.

**Tabla IV.1** Cambios en la acidez total (g/L) y pH en la uva durante la maduración de los años 2001 y 2002. Letras diferentes en la misma columna y para cada año estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ .

Año	Fecha vendimia	Acidez total (g/L)	pH
2001	22 Agosto	8,0 d	3,20 a
	27 Agosto	6,8 c	3,28 a
	31 Agosto	5,9 b	3,46 b
	8 Septiembre	4,4 a	3,80 c
2002	16 Agosto	7,8 c	3,32 a
	11 Septiembre	5,7 b	3,51 b
	16 Septiembre	5,7 b	3,50 b
	18 Septiembre	5,5 b	3,47 b
	16 Octubre	4,3 a	3,78 c
	24 Octubre	4,2 a	3,85 c

#### IV.2.1.4 ÁCIDO TARTÁRICO Y ÁCIDO MÁLICO

La tabla IV.2. muestra los cambios en la concentración de ácido tartárico (g/L) y ácido málico (g/L) en la uva durante la maduración de los años 2001 y 2002.

En el año 2001, el ácido tartárico permanece prácticamente constante durante la maduración, sufriendo la caída más importante del 31 de agosto al 8 de septiembre; en cambio el ácido málico disminuye fundamentalmente del primer al segundo muestreo, manteniéndose prácticamente constante en las uvas de las últimas vendimias. Esta disminución del ácido málico puede ser debida al efecto de la dilución por aumento del tamaño del grano y por su combustión en la respiración, siendo el responsable principal de la caída que sufre la acidez durante la maduración. En la uva de la última fecha de vendimia esta caída de la acidez puede ser atribuida a la disminución que sufre el ácido tartárico por el efecto de la dilución, ya que el contenido del ácido málico se mantiene constante (Catalina et al., 1982; Iland, 1987; Watson, 2003).

**Tabla IV.2** Cambios en la concentración de ácido tartárico (g/L) y ácido málico (g/L) en la uva durante la maduración de los años 2001 y 2002. Letras diferentes en la misma columna y para cada año estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ .

Año	Fecha vendimia	Ácido tartárico (g/L)	Ácido málico (g/L)
2001	22 Agosto	7,3 b	2,8 c
	27 Agosto	8,3 c	1,3 b
	31 Agosto	7,0 b	1,2 ab
	8 Septiembre	6,3 a	1,1 a
2002	16 Agosto	6,7 c	4,0 c
	11 Septiembre	6,5 d	2,6 b
	16 Septiembre	6,8 c	2,1 a
	18 Septiembre	6,0 c	2,1 a
	16 Octubre	5,9 b	2,1 a
	24 Octubre	5,4 a	2,3 ab

En el año 2002, el contenido del ácido málico en la uva disminuye desde el 16 de agosto hasta el 16 de septiembre. Esta caída es la causante de la disminución de la acidez en las tres primeras fechas de vendimia y es atribuida a su combustión por respiración y no al efecto de la dilución ya que el tamaño del grano permanece constante (Catalina et al., 1982; Iland, 1987; Watson, 2003). El ácido tartárico permanece constante a lo largo de la maduración, disminuyendo ligeramente en las dos últimas fechas de vendimia. La disminución de la acidez en las dos últimas fechas de vendimia podría ser debido a la salificación del ácido málico, al mantenerse constante su concentración (Somers, 1975; Hepner y Bravdo, 1985; Watson, 2003) y a la ligera disminución sufrida por el ácido tartárico.

El contenido de ácido málico a lo largo de la maduración en la uva del 2002 es el doble que en el 2001, mientras que en los valores del ácido tartárico prácticamente no hay grandes diferencias entre los dos años. Las temperaturas más altas registradas en 2001 podrían explicar la menor cantidad del ácido málico en la uva; mientras que el ácido tartárico parece ser más estable ante la degradación que provocan las altas temperaturas.

García-Beneytez et al. (2002) obtuvieron un comportamiento similar en la evolución de los ácidos málico y tartárico, siendo esta independiente de la variedad considerada y considerando como periodo óptimo de vendimia aquel en el que el contenido de estos dos ácidos permanece prácticamente constante.

## **IV.2.1.5 COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL MOSTO**

### **IV.2.1.5.1 Compuestos fenólicos totales**

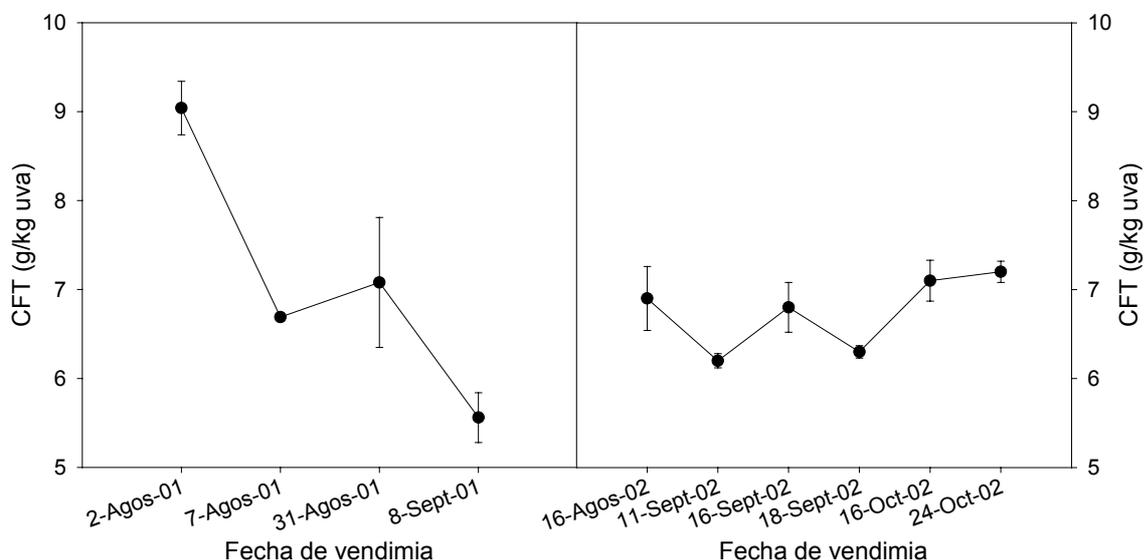
La evolución de los compuestos fenólicos totales en la uva (g/kg uva) a lo largo de la maduración se presenta en la gráfica IV.4 para los distintos años.

La síntesis de compuestos fenólicos está sometida a una mayor variación que la que experimentan otros componentes de la uva, ya que las condiciones edafoclimáticas y de cultivo de cada año son decisivas para su formación. Así, la concentración de estos compuestos puede verse modificada de un año a otro dependiendo de las condiciones climáticas (Ribéreau-Gayon y Glories, 1987).

En el 2001, se produce una disminución en el contenido de compuestos fenólicos totales a lo largo de la maduración, obteniéndose los valores más bajos en las uvas de la última fecha de vendimia.

En el 2002, el contenido inicial de estos compuestos en la uva es un poco más bajo que en el año 2001, manteniéndose a lo largo de la maduración prácticamente constante. Singleton (1966), en un estudio con ocho variedades tintas y cuatro blancas implantadas en California, señaló que el contenido de polifenoles totales por baya de uva sufre altibajos durante la primera fase de fructificación, aumentando drásticamente hasta el envero y descendiendo ligeramente a continuación, pero cuando el contenido de fenoles es expresado en miligramos por gramo de uva, hay un descenso muy notable tras el envero, que se explica por la considerable acumulación de azúcares que tiene lugar en esa época.

**Gráfica IV.4** Evolución de los compuestos fenólicos totales (g/kg uva) (Lamadon, 1995) en la uva durante la maduración de los años 2001 y 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media.

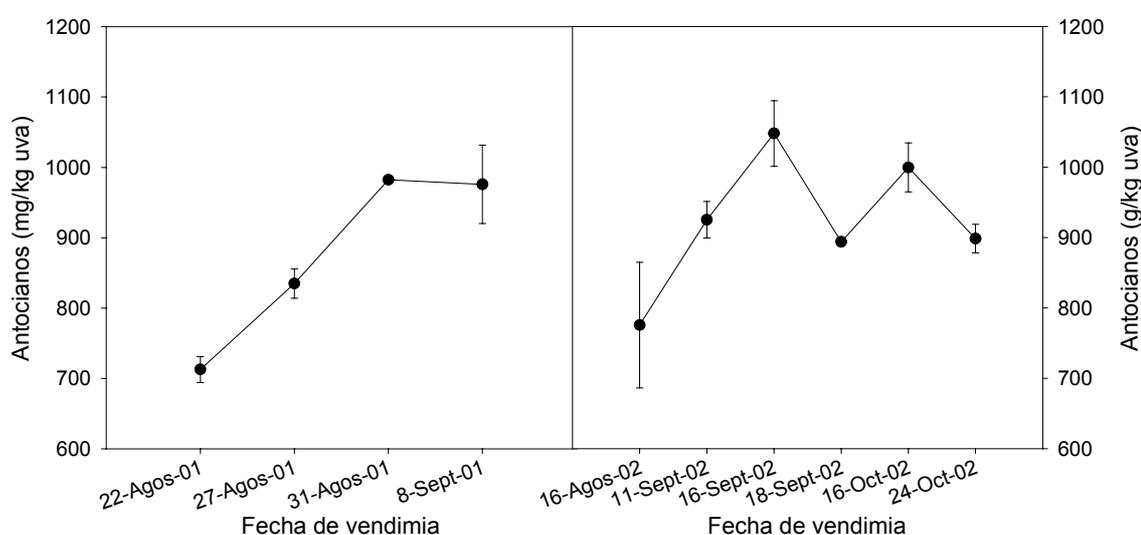


En el envero, la medida de compuestos fenólicos totales está influenciada principalmente por el contenido de taninos procedentes de las semillas. Durante la maduración, estos taninos se polimerizan, viéndose dificultado su paso al mosto, mientras que en el hollejo se produce un incremento en el contenido de antocianos y de taninos que están menos polimerizados que los de las semillas (Ribereau-Gayon y Glories, 1996; Glories, 1999). El aumento del tamaño de la baya durante la maduración hace disminuir la relación superficie/volumen y puesto que es en la superficie de la baya (hollejo) donde se encuentran la mayor parte de los polifenoles que van a pasar al mosto, puede ser que el efecto de la dilución sea mayor que el de acumulación, contrariamente a lo obtenido por Esteban et al. (2001), lo que explicaría la disminución de estos compuestos en el 2001. En el 2002, aunque el tamaño de la baya es mayor, el incremento que sufre el tamaño de la baya durante la maduración, no es tan grande como en el año en el 2001, lo cual justificaría la pequeña variación del contenido de polifenoles totales.

#### IV.2.1.5.2 Antocianos totales

La gráfica IV.5 presenta la evolución de la concentración de antocianos totales en el mosto (mg/kg) a lo largo de la maduración para los dos años.

**Gráfica IV.5** Evolución de los antocianos totales (mg/kg uva) (Lamadon, 1995) en la uva durante la maduración de los años 2001 y 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media.



En el 2001, durante la maduración se produce un incremento en el contenido de antocianos en la uva hasta la vendimia de 31 de agosto, manteniéndose constante en la última semana de muestreo.

En el 2002, el contenido de antocianos aumenta desde agosto hasta septiembre, alcanzando los valores más altos sobre el 16 de septiembre. Después, se observa un descenso provocado por la dilución causada por la lluvia, para incrementarse de nuevo en la uva de la vendimia del 16 de octubre y descender en la última fecha de vendimia.

En el 2001, la uva contiene un valor inicial de antocianos un poco más bajo que en el 2002, obteniendo sin embargo en los primeros días de

septiembre un mayor contenido de estos compuestos, posiblemente debido al menor tamaño del grano alcanzado. También se observa en la uva del 2002, que la acumulación de antocianos se extiende hasta mitad de octubre.

Este comportamiento del contenido de antocianos totales en el mosto se corresponde con la evolución de los antocianos obtenida por Ribéreau-Gayon y Glories (1980) y Glories (1999) en el hollejo; según estos autores, los antocianos incrementan su contenido durante la maduración y tras alcanzar su valor máximo, sufren una disminución.

#### **IV.2.1.5.3 Antocianos en el hollejo**

La tabla IV.3 muestra los resultados del análisis de antocianos en el hollejo expresados en mg/kg de peso fresco de uva.

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

El análisis de los antocianos totales en el hollejo, tanto en el 2001 como en el 2002, refleja que continúa la síntesis de éstos durante las tres primeras fechas de vendimia, en una tasa suficientemente alta como para eliminar el efecto de la dilución provocado por el aumento del tamaño del grano durante la maduración. En el 2001, la máxima concentración de antocianos se encontró en la uva vendimiada el 31 de agosto, disminuyendo la concentración en la uva de la última vendimia. En el 2002, el mayor contenido de antocianos se observó en la uva vendimiada el 16 de septiembre, a continuación la concentración de antocianos disminuye presentando el valor de antocianos más bajo la uva vendimiada el 24 de octubre. Hay que destacar, que la caída tan acusada que sufren los antocianos entre el 16 y 18 de septiembre es debido al efecto de la dilución causado por la lluvia, mientras que la sufrida entre el mes de

septiembre y octubre puede ser debido a la degradación que sufren estos compuestos en la uva cuando la maduración ya está muy avanzada.

Durante los dos años, malvidina-3-glucósido es el antociano mayoritario en la uva, resultado obtenido también por otros autores como Fernández-López et al. (1992) y Garcia-Beneytez et al. (2002) y, junto con el resto de antocianos monoglucósidos y de sus correspondientes derivados acilados, aumenta su contenido significativamente durante las primeras fechas de vendimia. Tanto en el 2001 como en el 2002 tiene lugar un descenso de antocianos individuales después de alcanzar la máxima concentración.

Gonzalez-San José et al. (1990b), para la variedad Tempranillo, obtuvieron una acumulación progresiva de los antocianos monoglucósidos durante la maduración, mientras que para sus correspondientes formas aciladas observaron que en general tenían lugar tres fases bien diferenciadas: primero una de acumulación, después una fase de caída en su concentración y por último una fase de rápida acumulación hasta que es alcanzada la madurez fisiológica. En cambio, en nuestra experiencia se observa tanto para los antocianos monoglucósidos como para sus formas aciladas una etapa de acumulación y otra de degradación.

En el 2001, la uva de la primera vendimia presenta la mitad de concentración de antocianos que en el 2002, sin embargo la concentración máxima obtenida de estos compuestos es similar en los dos años.

**Tabla IV.3** Cambios de antocianos totales e individuales (mg/kg de peso fresco de uva) en el hollejo de la uva durante la maduración de los años 2001 y 2002. Letras diferentes en la misma columna y para cada año estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: Del-3-G: delphinidina-3-glucósido, Cian-3-G: cianidina-3-glucósido, Pet-3-G: petunidina-3-glucósido; Pn-3-G: peonidina-3-glucósido, Mal-3-G: malvidina-3-glucósido, Cum: cumaratos.

Año	Fecha vendimia	Del-3-G	Cian-3-G	Pet-3-G	Pn-3-G	Mal-3-G	Del-3-G Cum	Cian-3-G Cum	Pet-3-G Cum	Pn-3-G Cum	Mal-3-G Cum	Total
2001	22 Agosto	61,1 a	25,8 a	63,8 a	21,5 a	206,5 a	16,6 a	4,5 a	13,2 a	1,6 a	49,7 a	465,2 a
	27 Agosto	69,5 a	18,5 a	76,1 a	22,6 a	254,6 a	18,6 a	4,1 ab	13,2 a	3,8 b	52,2 a	532,7 a
	31 Agosto	109,9 b	38,4 b	116,4 b	50,0 b	380,0 b	30,5 b	7,5 b	21,3 b	4,1 c	88,4 b	845,9 b
	8 Septiembre	69,9 a	52,3 c	75,2 a	76,9 c	250,2 a	18,5 a	7,3 b	12,5 a	2,2 a	59,3 a	624,2 a
2002	16 Agosto	93,7d	62,2 a	103,7 cd	68,2 a	307,3 bc	18,6 bc	8,7 a	9,3 b	7,9 a	42,9 ab	722,6 b
	11 Septiembre	94,2 d	91,8 c	108,9 d	109,0 cd	343,2 cd	20,3 c	11,3 b	10,3 b	12,4 b	54,4 c	855,8 c
	16 Septiembre	106,1 e	103,7 d	121,1 e	116,1 d	356,8 d	20,0 c	11,4 b	10,4 b	12,6 b	51,5 bc	909,7 c
	18 Septiembre	81,6 c	80,1 b	92,9 bc	92,0 b	280,5 b	17,0 b	9,5 a	9,6 b	11,6 b	46,9 bc	721,8 b
	16 Octubre	69,1 b	71,6 ab	86,2 b	97,7 bc	272,0 b	16,1 b	9,6 a	9,1 b	11,6 b	46,0 bc	689,0 b
	24 Octubre	54,6 a	74,5 b	69,1 a	98,6 bc	222,7 a	13,1 a	9,0 a	7,0 a	11,7 b	36,3 a	597,0 a

#### IV.2.1.5.4 Parámetros cromáticos

La tabla IV.4 muestra los cambios de intensidad de color, tono, L\*, a\* y b\* en la uva durante la maduración para los años 2001 y 2002.

En el 2001, no se observan diferencias significativas en los valores de intensidad de color, mientras que, para el tono, sí que son observadas, teniendo lugar una disminución de este parámetro a lo largo de la maduración. En cuanto a las coordenadas cromáticas L\*, a\* y b\*, los valores más bajos son presentados por la uva de la última fecha de vendimia (8 de septiembre) diferenciándose significativamente de la uva vendimiada el 31 de agosto.

**Tabla IV.4** Cambios de los valores de intensidad de color, tono, L\*, a\* y b\* en la uva durante la maduración para los años 2001 y 2002. Letras diferentes en la misma columna y para cada año estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color.

Año	Fecha vendimia	IC	Tono	L*	a*	b*
2001	22 Agosto	6,5 a	2,14 c	35,3 c	65,1 d	50,9 d
	27 Agosto	7,1 a	2,16 c	31,3 b	59,9 c	46,9 c
	31 Agosto	7,5 a	1,99 b	28,0 b	56,6 b	43,4 b
	8 Septiembre	7,3 a	1,65 a	24,0 a	52,2 a	37,2 a
2002	16 Agosto	4,5 a	0,57 ab	40,4 c	60,6 e	39,1 c
	11 Septiembre	5,7 b	0,54 a	33,6 d	58,9 de	41,2 cd
	16 Septiembre	8,1 c	0,58 b	23,6 c	51,4 c	37,9 c
	18 Septiembre	5,9 b	0,60 b	32,2 d	57,1 d	42,7 d
	16 Octubre	9,9 d	0,67 c	15,4 b	26,2 b	26,2 b
	24 Octubre	10,9 c	0,74 d	10,7 a	18,3 a	18,3 a

En el 2002, durante la maduración, se produce un incremento en los valores de intensidad de color y del tono, mientras que  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  disminuyen, siendo la uva vendimiada el 24 de octubre, la más oscura pero también la que tiene mayor tono (como consecuencia de una menor contribución de la componente roja). La lluvia caída sobre el 16 de septiembre produce cambios significativos en los valores de intensidad de color,  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , los cuales son observados en la uva de la vendimia del 18 de septiembre, dando lugar a una uva con menor color y menos oscura.

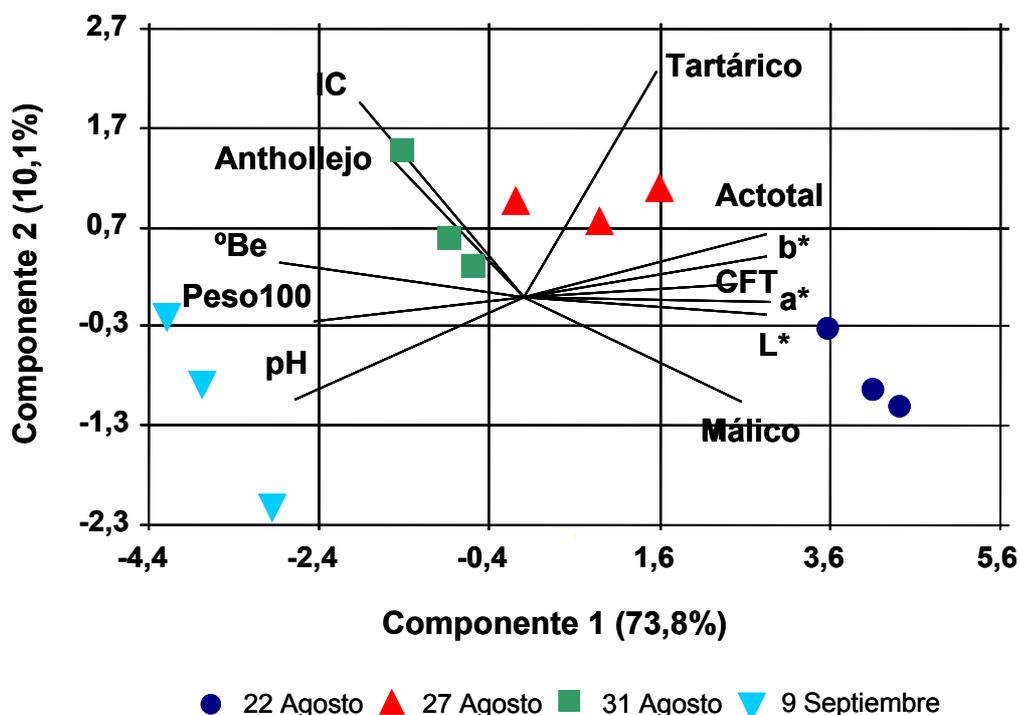
Los valores de estos parámetros dependen del contenido de compuestos fenólicos de la uva que van a pasar al mosto, principalmente antocianos y taninos y de las asociaciones que se van a establecer entre ellos (Mateus et al., 2002). Por ello, el que la intensidad de color permanezca estable en el 2001 puede ser debido a que la disminución que sufre la componente amarilla, como consecuencia de la caída de los compuestos fenólicos, se compense con el incremento de la componente roja, al aumentar los antocianos. Por otro lado, en el caso tono, al ser determinado como el cociente entre las absorbancias de estos compuestos, disminuye, como también fue encontrado por Esteban et al. (2001) para la variedad Tempranillo. En el 2002, se puede decir que los valores de estos parámetros van a estar más ligados al contenido de antocianos ya que los compuestos fenólicos totales permanecen prácticamente constantes durante toda la maduración.

Romero Cascales (2002) también obtiene un incremento de la intensidad de color y un descenso en los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  durante la maduración para cuatro variedades cultivadas en dos zonas diferentes de Jumilla.

#### IV.2.1.5.5 Análisis de componentes principales

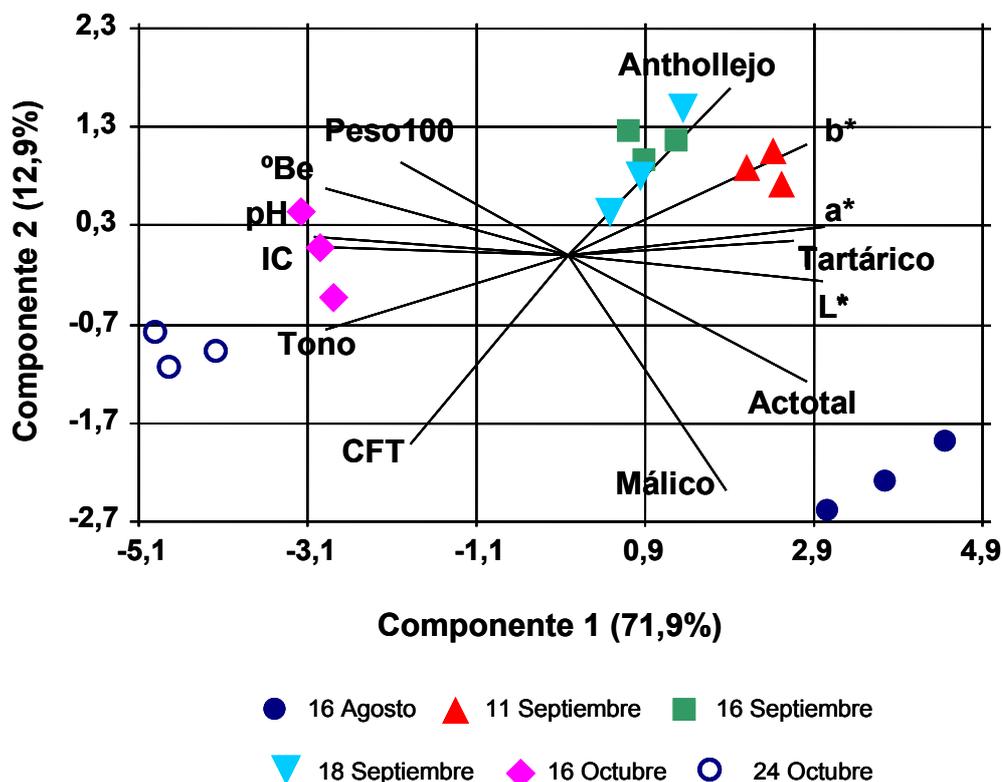
Las gráficas IV.6 y IV.7 muestran el análisis estadístico multivariable que se ha realizado en los dos años para comprobar si existen diferencias entre las distintas uvas, teniendo en cuenta todos los parámetros analíticos medidos.

**Gráfica IV.6** Distribución de la uvas vendimiadas durante la maduración en el 2001 en un sistema de coordenadas bidimensional definido por dos componentes principales (el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal es mostrado entre paréntesis). Abreviaciones: IC: intensidad de color, Anthollejo: antocianos totales en el hollejo, Peso 100: peso de 100 bayas, CFT: compuestos fenólicos totales, Actotal: acidez total.



En el 2001, las distintas uvas vendimiadas se diferencian entre sí, separándose principalmente a través de la componente 1. Se observa que durante la maduración disminuye la acidez, los compuestos fenólicos totales, las coordenadas cromáticas ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) y aumenta el pH, el contenido de azúcares ( $^{\circ}\text{Be}$ ), el peso de la baya y el contenido de antocianos en los hollejos.

**Gráfica IV.7** Distribución de las uvas vendimiadas durante la maduración en el 2002 en un sistema de coordenadas bidimensional definido por dos componentes principales (el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal es mostrado entre paréntesis). Abreviaciones: IC: intensidad de color, antholloje: antocianos totales en el hollejo, peso 100: peso de 100 bayas, CFT: compuestos fenólicos totales, Actotal: acidez total.



En el 2002, se distinguen tres grupos bien diferenciados que se corresponden con las uvas vendimiadas en agosto, en septiembre y en octubre; siendo la uva vendimiada en agosto la que presenta los valores más bajos de intensidad de color, tono, °Be, peso de 100 bayas y pH, mientras que el contenido de acidez, ácido málico y L\* es elevado. La uva vendimiada en septiembre muestra los valores más altos de antocianos en el hollejo y de las coordenadas a\* y b\*, no observándose una separación clara entre la uva vendimiada el 16 y el 18 de septiembre. La uva vendimiada en octubre posee los valores más altos de pH, tono, °Be, intensidad de color y los valores más

bajos de acidez y  $L^*$ , diferenciándose perfectamente las dos vendimias realizadas este mes.

#### **IV.2.1.5.6 Índices de maduración fenólica**

Las gráficas IV.8 y IV.9 muestran los valores de concentración de antocianos en las disoluciones a pH 1 y 3,6, expresados en mg/L de mosto, el índice de madurez celular (IMC) y el índice de madurez de las pepitas (IMP) en la uva durante la maduración de los años 2001 y 2002.

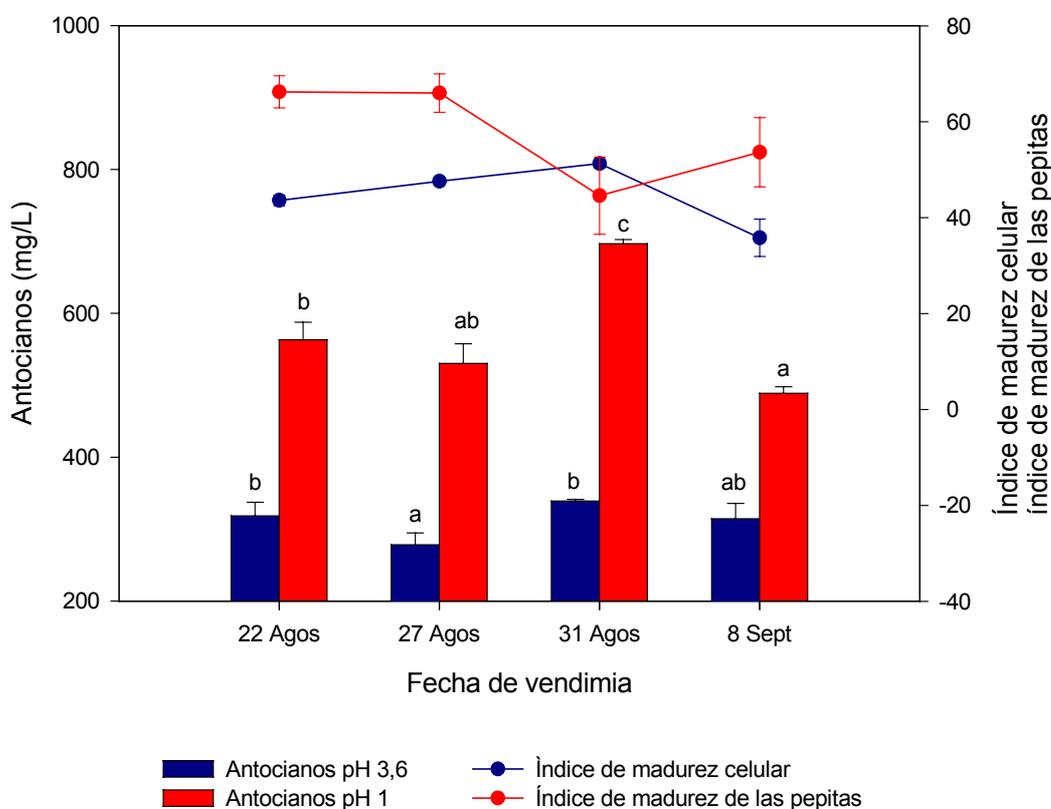
La extracción de los antocianos se debe en parte a la cantidad de estas moléculas biosintetizadas en las células peliculares influenciada por las características climáticas, del terreno, condiciones de cultivo, etc y al estado de degradación de las paredes de las células durante la maduración que parece ser característico de la cepa (Vivas de Gaulejac et al., 2001)

En el 2001, el contenido de antocianos a pH 1 es máximo para la uva de la vendimia del 31 de agosto, indicando que la acumulación de antocianos tendría que ser máxima en las pieles de las uvas en ese momento, descendiendo el valor para las uvas de la última fecha de vendimia. En la medida de antocianos a pH 3,6 se observa que también el valor máximo se alcanza en el mismo momento y disminuye ligeramente para las uvas del 8 de septiembre. El índice de madurez celular va aumentando durante la maduración, mostrando un comportamiento contrario al esperado. Ribéreau Gayon et al. (1998b) y Zamora (2002) encontraron una disminución constante del índice de madurez celular y el índice de madurez de las pepitas durante la maduración de la uva. En cambio, nosotros no obtenemos una evolución clara de estos índices, coincidiendo con las observaciones de Gonzalez-Neves et al. (2002), quienes tampoco encontraron una relación clara entre el índice de madurez fenólica y la madurez tecnológica.

Este índice alcanza el valor máximo (51%) para la uva del 31 de agosto y sólo a partir de este momento, disminuye hasta un 36%. El índice de madurez de las pepitas disminuye durante la maduración, obteniendo el valor más bajo

entorno al 45% la uva de la vendimia del 31 de agosto, observándose a continuación un incremento.

**Gráfica IV.8** Evolución de antocianos a pH 1 y 3,6 expresados en mg/L de mosto, el índice de madurez celular y el índice de madurez de las pepitas en la uva durante la maduración del año 2001. Cada valor corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Letras diferentes en el gráfico muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ .



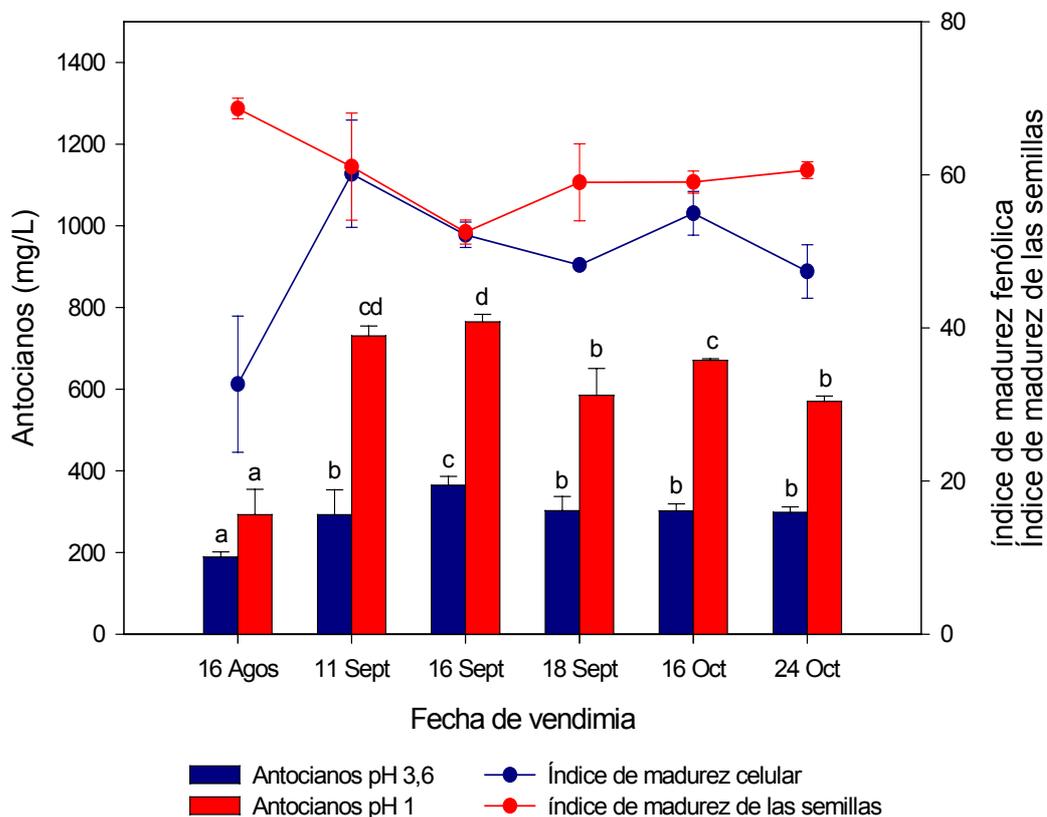
En el 2002, el contenido de antocianos a pH 1 se incrementa durante la maduración, alcanzando el máximo valor en la uva del 16 de septiembre, después disminuye por el efecto de la dilución como consecuencia de la lluvia, aumentando de nuevo en la uva vendimiada el 16 de octubre y disminuyendo en la última vendimia. Los antocianos medidos a pH 3,6 evolucionan de igual forma que los antocianos a pH 1 del 16 de agosto al 18 de septiembre pero se

mantienen constantes en la uva de las últimas fechas de vendimia. El índice de madurez celular sufre fluctuaciones a lo largo de la maduración, obteniendo los valores más bajos la uva de la vendimia del 16 de septiembre y 24 de octubre (48 y 47% respectivamente). El índice de madurez de las semillas disminuye durante la maduración (52% es el valor más bajo alcanzado), aumentando en la uva de la vendimia del 18 de septiembre para mantenerse después prácticamente constante (entorno al 60%). Los valores más bajos de los índices obtenidos en esta campaña son mayores que los alcanzados en la campaña del 2001. Darias Martín et al. (2003) observaron que los valores del índice de madurez de las semillas para variedades cultivadas en Tenerife sufrían oscilaciones a lo largo de la maduración, pero con una tendencia descendente, similar a la nuestra.

Se aprecia que el contenido de antocianos a pH 1 durante la maduración, es por término medio, el doble que el obtenido a pH 3,6, indicando que la acumulación de antocianos en los hollejos es mayor que los que van a ser realmente extraídos durante la vinificación. Destacar que tanto en el 2001 como en el 2002, el máximo potencial de antocianos (antocianos pH 1) y de antocianos medidos en el hollejo lo presenta la uva de la misma fecha de vendimia (31 de agosto de 2001 y 16 de septiembre de 2002 respectivamente).

Al igual que nosotros González et al. (2001), encontraron para la variedad Listán Negro valores irregulares en el contenido de antocianos a pH 1 con fluctuaciones en los distintos muestreos, e incluso descendiendo a lo largo de la maduración. Sin embargo, para la variedad Negramolle obtuvieron una progresión en el contenido de antocianos más o menos constante. Asimismo, observaron en la evolución del IMC para las variedades Listán Negro y Negramolle, un ligero aumento al principio de la maduración para luego ir descendiendo más rápidamente hacia el final de la maduración, situación similar a la obtenida por nosotros para la uva de 2001.

**Gráfica IV.9** Evolución de antocianos a pH 1 y 3,6 expresados en mg/L de mosto, el índice de madurez celular y el índice de madurez de las pepitas en la uva durante la maduración del año 2002. Cada valor corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Letras diferentes en el gráfico muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ .



Diversos estudios han mostrado que los valores del índice de madurez celular son muy variables y no sólo en función del grado de madurez sino también en función de la cepa y el terreno (Saint-Cricq et al., 1998; González et al., 2001; Mateos et al., 2001; Fernández et al., 2003) oscilando entre 70-20% (Ribéreau Gayon et al., 1998b). Así, Saint-Cricq et al. (1998) encontraron grandes diferencias del índice de madurez celular en el momento de vendimia en la variedad Merlot en cuatro zonas diferentes de Burdeos, variando éste entre 54-28% y en dos zonas de la Rioja obteniendo valores de 54% a 22%. Sin embargo, la variedad Tempranillo se muestra más estable, ya que en un ensayo realizado en cuatro zonas diferentes de Rioja encontraron variaciones

entre 38-48%. También comprobaron el comportamiento de Tempranillo y Merlot en la misma parcela, encontrándose valores muy similares para antocianos a pH1 para ambas variedades, pero el índice de madurez celular varió de 47 a 54% respectivamente. Parece ser que la adaptabilidad de Merlot al terreno es mucho más delicada que la de Tempranillo y esto puede ser debido a diferencias en la composición de la pared celular.

En otro estudio, Vivas de Gaulejac et al. (2001), obtuvieron (para cinco zonas de la región de Burdeos) que la extractabilidad de antocianos en el momento de vendimia para Cabernet Sauvignon era más homogénea y más pequeña que para Merlot Noir.

El índice de madurez de las semillas estima la contribución de los taninos de las semillas en la contenido fenólico del vino y alcanza valores entre 60-0% (Ribéreau Gayon et al., 1998b). Valores altos de este índice son indicativos de una alta contribución de los taninos de las semillas en el vino y esto podría afectar negativamente en las propiedades organoléptica del vino (Ribéreau Gayon et al., 1998b). Saint-Cricq et al. (1998) han mostrado que este índice para la variedad Merlot cultivada en cuatro zonas diferentes de Burdeos presenta valores que varían de 14-48%, mientras que para Tempranillo en cuatro zonas diferentes de la Rioja oscilan entre 37-54%. Los valores bajos del índice de maduración de las semillas que pueden ser encontrados en Merlot pueden ser debidos a una biosíntesis precoz de los taninos, debido esencialmente a las condiciones climáticas y a una gran extensión de las reacciones de polimerización disminuyendo el contenido de taninos extraíbles. Sin embargo, cuando se comprobó el comportamiento de Merlot en dos zonas diferentes de la Rioja, se obtuvieron valores de Mp más elevados, comparables con los presentados por la variedad Tempranillo. En estos terrenos españoles, la biosíntesis de los taninos es tardía y la polimerización de estas moléculas está casi limitada en el momento de la vendimia, presentando por tanto una cantidad de taninos extraíbles de las pepitas bastante elevada.

Algunos autores han criticado este tipo de índices de extractabilidad, indicando que el extractante utilizado a pH 1 tiene un valor superior al ser el

mosto un medio tamponado y probablemente no todos los antocianos son extraídos (Hermosín et al., 2002). También, la suposición de la existencia de la relación entre la biosíntesis de antocianos y el metabolismo de taninos (en el cual está basado el índice de madurez de las semillas) es contradictorio con las observaciones de Downey et al. (2003) y Roby y Matthews (2004), los cuales sugieren que el mecanismo que controla la biosíntesis de antocianos y taninos en el hollejo de la uva son independientes, como también, la acumulación de los taninos en las semillas y en el hollejo.

Para escoger la fecha óptima de vendimia en función de estos parámetros, Zamora (2002) propone que se debería de apuntar hacia valores de antocianos potenciales altos (más de 1000 mg/L), y a niveles del índice de madurez celular y de las semillas bajos (inferiores a 30% en ambos casos), que en ningún momento son obtenidos por nosotros para la variedad Monastrell durante la maduración.

Antes de fijar la fecha de vendimia en función de los resultados obtenidos, primero hay que ver si realmente los datos que medimos en la uva se correlacionan con las características cromáticas del vino. Hasta este momento, nosotros sólo podemos decir que, en el 2001, sería la uva de la vendimia el 31 de agosto la que debería dar lugar a un vino con mayor contenido de antocianos y por tanto mayor color, mientras que en el 2002 el vino más coloreado sería el obtenido con la uva vendimiada el 18 de septiembre y el 24 de octubre, presentando en todos los casos un alto contenido de taninos extraíbles de las semillas.

## IV.2.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS VINOS OBTENIDOS CON UVAS DE DISTINTO GRADO DE MADURACIÓN

### IV.2.2.1 PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2001

Los valores de los parámetros cromáticos medidos en los vinos al finalizar la fermentación alcohólica son presentados en la tabla IV.5. No tenemos datos de los vinos de 2001 al finalizar la fermentación maloláctica al oxidarse mientras la hacían.

**Tabla IV.5** Cambios de los parámetros cromáticos en los vinos elaborados a partir de uva con distinto grado de maduración al finalizar la fermentación alcohólica en el 2001. Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, IPT: índice de polifenoles totales, %520: porcentaje de color rojo, %620: porcentaje de color azul, %420: porcentaje de color amarillo.

Parámetros	22 Agosto	27 Agosto	31 Agosto	8 Septiembre
IC	12,7 a	15,2 b	17,0 c	17,3 c
Tono	0,47 b	0,43 a	0,48 b	0,48 b
%420	29,0 a	27,6 b	28,8 b	28,9 b
%520	62,2 a	63,9 b	61,7 a	61,8 a
%620	8,7 a	8,5 a	9,5 b	9,3 ab
IPT	44,6 a	45,6 a	49,9 b	62,1 c
AT (mg/L)	384,9 a	456,1 b	516,5 c	547,1 c
L*	13,4 b	11,6 b	7,0 a	8,1 a
a*	44,2 b	42,7 b	35,7 a	37,7 a
b*	22,9 b	20,0 b	12,0 a	13,9 a

Los vinos elaborados en el 2001 muestran un incremento en el contenido de compuestos fenólicos, antocianos e intensidad de color al aumentar el estado de maduración de la uva, mientras que los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  sufren una disminución respecto a su valor inicial. No se encuentran diferencias significativas en las características cromáticas entre los vinos de la uva vendimiada el 31 de agosto (IMC más alto) y la del 8 de septiembre (IMC más bajo). También se observa que el contenido de antocianos que presentan los vinos en general no se correlaciona con el contenido antocianos extraíbles (pH 3,6) medidos en la uva, ni tampoco con el valor del índice de madurez celular, aunque sí con el contenido de antocianos monoglucósidos y con el contenido de antocianos totales determinados por el método de Lamadon.

#### **IV.2.2.2 PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2002**

##### **IV.2.2.2.1 Parámetros de color de los vinos de 2002 durante la vinificación**

Los valores de los parámetros cromáticos medidos en los vinos al finalizar la fermentación alcohólica y maloláctica son presentados en la tabla IV.6.

Al final de fermentación alcohólica, al igual que ocurría en los vinos del 2001, también tiene lugar un incremento en el contenido de polifenoles totales, antocianos totales y sus respectivas fracciones, y en la intensidad de color al aumentar el estado de maduración de la uva, siendo el vino elaborado a partir de la uva vendimiada el 16 de octubre el que presenta los valores más altos de estos parámetros y también el más oscuro al tener el valor de  $L^*$  más bajo. Sin embargo, se observa un descenso en la intensidad de color y el contenido en antocianos totales en el vino elaborado con las uvas vendimiadas el 24 de octubre.

De agosto a septiembre el contenido de antocianos en el vino si que se correlaciona con la cantidad de antocianos monoglucósidos presentes en la uva, al igual que obtenemos en el 2001. Pero la uva vendimiada el 16 de septiembre, la cual presentaba el mayor contenido de antocianos monoglucósidos, antocianos totales por el método de Lamadon y antocianos a pH 1 y pH 3,6 y la uva de la vendimia del 18 de septiembre y 24 de octubre que tenían el valor del índice de madurez celular más bajo, dieron vinos con un contenido en polifenoles totales, antocianos e intensidad de color menor que el obtenido con las uvas de la vendimia del 16 de octubre. La lluvia caída entre el 16 y 18 de septiembre no afectó a los parámetros de color al no haber diferencias significativas entre los valores medidos en los respectivos vinos.

Coincidiendo con los nuestros resultados obtenidos en estos vinos 2002, Sims y Bates, (1994) y Pérez-Magariño y González-San José (2004) encontraron que los vinos de uvas vendimiadas unas dos semanas después de alcanzar la madurez tecnológica de la uva (es decir cuando ya se ha desarrollado todo el color y el aroma) tenían la mayor intensidad de color y mayor contenido de antocianos y de polifenoles totales. Glories (1999) estudiando la relación entre antocianos en la uva y el vino en la variedad Cabernet Sauvignon, no obtuvo el vino más coloreado y con mayor concentración de antocianos y polifenoles a partir de uva más coloreada, sino cuando los antocianos ya habían empezado a decaer en la uva.

Se debe destacar que los parámetros de color (intensidad de color, IPT, tono, L\*, a\* y b\*) presentados por el vino elaborado a partir de la uva vendimiada el 8 de septiembre de 2001 son muy similares a los obtenidos con la uva vendimiada el 16 de octubre de 2002, lo cual puede ser debido al menor tamaño de la baya en el 2001, ya que va a proporcionar un mayor número de bayas por kg de uva dando lugar a una mayor extracción de compuestos fenólicos en el vino (Mateus et al., 2002; Gonzalez-Neves et al., 2002).

**Tabla IV.6** Cambios de los parámetros cromáticos en los vinos elaborados a partir de uva con distinto grado de maduración al finalizar la fermentación alcohólica y fin de fermentación maloláctica en el 2002. Letras diferentes en la misma columna y para cada periodo estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, %520: porcentaje de color rojo, %620: porcentaje de color azul, %420: porcentaje de color amarillo.

Fecha vendimia	IC	Tono	% 420	% 520	% 620	IPT	AM (mg/L)	AP (mg/L)	AT (mg/L)	L*	a*	b*
<b>Fin fermentación alcohólica</b>												
16 Agosto	12,7 a	0,50 d	29,0 b	61,2 b	9,8 b	48,8 a	152,6 a	69,2 a	409,3 a	12,1 cd	42,9 bc	20,6 cd
11 Septiembre	14,4 b	0,45 a	28,4 a	62,7 c	8,8 a	51,4 ab	207,5 b	81,1 b	562,2 b	12,7 d	44,4 c	21,8 d
16 Septiembre	15,5 c	0,47 bc	29,2 b	61,5 b	9,3 a	58,4 bc	227,2 c	92,8 d	557,2 b	11,3 bc	43,1 bc	19,5 bc
18 Septiembre	15,3 cd	0,46 ab	28,8 ab	62,0 bc	9,2 a	55,8 abc	228,1 c	89,6 cd	555,3 b	11,6 bcd	43,3 c	20,0 bcd
16 Octubre	17,2 d	0,48 c	29,9 c	61,3 b	8,8 a	62,9 c	247,6 d	96,4 d	648,5 c	9,6 a	40,4 a	16,6 a
24 Octubre	15,1 c	0,53 d	31,7 d	59,0 a	9,3 a	60,8 c	206,0 b	84,8 bc	548,3 b	10,7 ab	41,6 ab	18,4 ab
<b>Fin fermentación maloláctica</b>												
16 Agosto	7,6 a	0,61 c	33,6 bc	54,8 a	11,6 c	35,6 a	113,4 a	68,9 a	297,8 a	19,8 b	51,3 b	28,1 c
11 Septiembre	14,7 c	0,53 a	30,5 a	57,6 bc	11,9 c	47,0 b	139,8 b	113,8 c	396,5 b	8,6 a	39,4 a	14,8 a
16 Septiembre	9,8 b	0,55 ab	32,3 ab	57,9 cd	9,8 ab	48,1 bc	202,7 c	78,3 a	498,4 c	17,0 b	49,3 b	28,5 c
18 Septiembre	9,3 ab	0,59 bc	33,5 bc	56,5 abc	10,0 b	50,6 c	215,3 c	76,1 a	519,9 c	17,6 b	50,2 b	29,4 c
16 Octubre	14,9 c	0,52 a	31,2 a	59,5 d	9,2 a	63,1 d	200,7 c	107,4 c	521,5 c	11,2 a	42,4 a	19,3 b
24 Octubre	13,3 c	0,62 c	34,6 c	55,8 ab	9,5 ab	61,2 d	137,2 b	94,5 b	393,4 b	12,2 a	43,5 a	21,1 b

La mayor concentración de antocianos en el vino de la uva vendimiada el 16 de octubre del 2002 puede ser debido a una mayor permeabilidad de las paredes celulares de la uva al estar ésta más madura (Amrani Joutei y Glories, 1994), aunque eso debería haber quedado reflejado en el IMC, que no es menor en estas uvas que en las del 16 de Septiembre.

Otros factores deben influir en la mayor extracción, no solo la degradación de las paredes celulares. También se incrementa el contenido de etanol producido en la fermentación, que es mayor en los vinos elaborados de las uvas más maduras (el contenido de etanol para los vinos de las uvas vendimiadas el 16 de agosto 11,16 y 18 de septiembre y 16 y 24 de octubre fue 11,2, 13,6, 13,8, 13,6, 14,6 y 15,9% respectivamente). Con el etanol aumenta la degradación de la pared celular de los hollejos y de la cutícula de las semillas, favoreciendo la salida de los compuestos fenólicos al mosto-vino durante la maceración (Amrani Joutei y Glories, 1995) y esto, no es evaluado en los índices de madurez fenólica utilizados. La baja permeabilidad de las paredes también explicaría por qué en el 2002 las uvas de la vendimia del 16 de agosto tienen un valor de antocianos a pH 3,6 más bajo que las uvas del 24 de octubre, ya que cuando las uvas están menos maduras, aunque la concentración de antocianos monoglucósidos en los hollejos que pudiera presentar fuera relativamente alta, son más difíciles de extraer.

Esto nos hace pensar que la determinación de los índices de maduración debemos moldearla a nuestras condiciones climáticas que en definitiva son los que van a condicionar la acumulación de los compuestos fenólicos en la uva y la degradación de las paredes celulares durante la maduración, incluyendo además, para la determinación de antocianos extraíbles la adición de etanol en la misma cantidad que se podría generar en función del contenido de azúcares de la uva de partida.

Al final de fermentación maloláctica, se observa para todos los vinos una disminución en la intensidad de color, especialmente en los obtenidos a partir de las uvas vendimiadas en agosto y el 16 y 18 de septiembre. Una excepción es el vino elaborado a partir de la uva vendimiada el 11 de septiembre, donde

la intensidad de color se mantiene constante, mientras que los antocianos monómeros disminuyen y los antocianos polímeros aumentan, alcanzando valores similares a la de los vinos obtenidos de las uvas vendimiadas en octubre. Una posible explicación a este hecho puede ser la formación de importantes cantidades de acetaldehído en este vino al finalizar la fermentación alcohólica (la concentración de acetaldehído, medido por test enzimático, para los vinos de las uvas vendimiadas el 16 de agosto, 11,16 y 18 de septiembre y 16 y 24 de octubre fueron de 26, 42, 35, 36. 24 y 18 mg/L respectivamente). Quizás una mayor oxigenación del vino promoviera una mayor formación de acetaldehído por oxidación del etanol (Liu y Pilone, 2000), y de esta manera, se incrementara el contenido de antocianos polímeros y el porcentaje de color azul en el vino de la uva vendimiada el 11 de septiembre (Dallas et al., 1996).

La polimerización de los antocianos y de los taninos es muy importante para asegurar la estabilidad del vino. Los antocianos pueden reaccionar con los taninos en forma de catión flavilio o bajo forma hemiacetal. Las cinéticas de ambas reacciones son algo lentas y son más rápidas en presencia de acetaldehído (Cheynier et al., 2000a), el cual se encuentra en el vino como resultado del metabolismo de las levaduras y por oxidación del etanol (Dallas y Laureano, 1994). Se ha demostrado que el acetaldehído incrementa el color y la polimerización de los antociano-tanino en los vinos tintos (Sims y Morris, 1986), sin incrementar el pardeamiento (Dallas et al., 1996) y esto coincide con nuestros resultados. Dallas et al. (1996) indicaron que la interacción entre antocianos y acetaldehído permite la formación de nuevos compuestos que mostraron un cambio hipercrómico hacia el color violeta. En nuestros resultados, se puede observar como el porcentaje de color azul aumentó en el vino de la uva vendimiada el 11 de septiembre. En nuestra experiencia se obtienen por tanto dos vinos que prácticamente poseen similar intensidad de color después de la fermentación maloláctica, habiendo diferencias en los restantes parámetros de color medidos en los vinos. Así, el vino de la uva vendimiada el 11 de septiembre presenta un menor contenido de polifenoles totales, antocianos totales y un alto valor del porcentaje de color azul y de antocianos polímeros.

#### **IV.2.2.2.2 Parámetros cromáticos y compuestos fenólicos de los vinos de 2002 durante su conservación en botella**

##### IV.2.2.2.2.1 Parámetros espectrofotométricos

La tabla IV.7 muestra las características cromáticas de los vinos de la campaña 2002 en el momento del embotellado y a los 8 meses de envejecimiento en botella. Este estudio no fue realizado para los vinos obtenidos de la uva de la primera y última vendimia, el primero debido a su baja intensidad de color y el segundo por su alto porcentaje de color amarillo y su alto grado alcohólico.

Zamora (2003a) indicó que la composición fenólica de un vino joven tiene gran influencia en la evolución futura de su color durante su envejecimiento. Este autor da como valores orientativos de un vino apto para envejecer, un contenido de antocianos totales superior a 800 mg/L, el de taninos totales superior a 3 g/L y el índice de polifenoles totales debería ser mayor de 60, con un mínimo valor de 40.

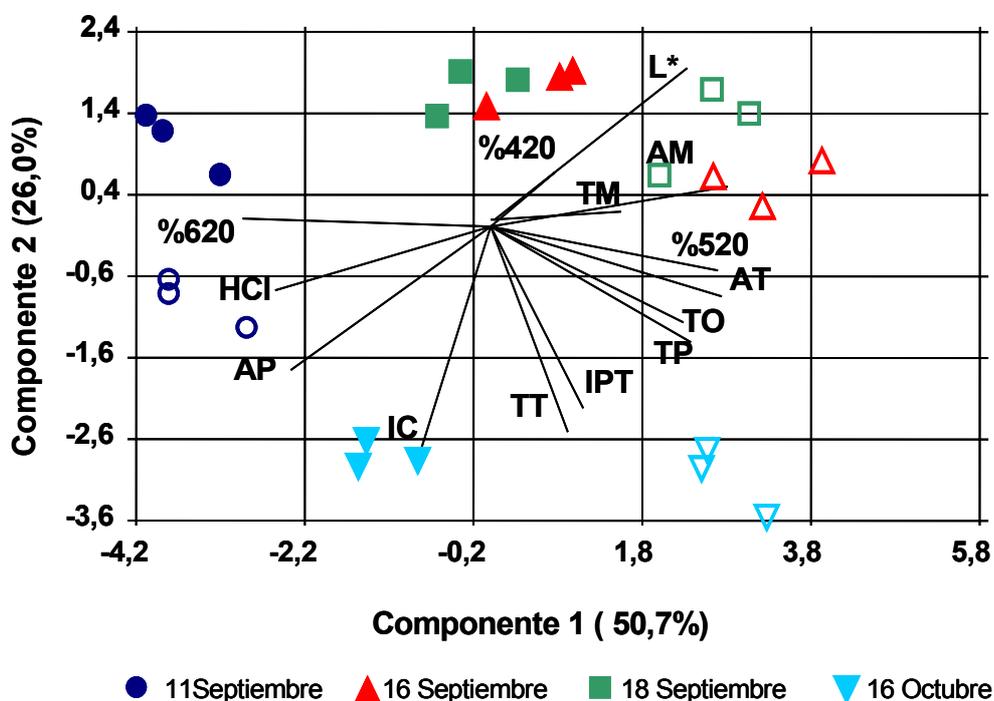
En el momento del embotellado, el vino de la uva vendimiada el 16 de octubre presenta el mayor contenido de antocianos e índice de polifenoles totales, esto nos hace pensar que puede ser el vino que mejor debería aguantar el envejecimiento. En este momento, el vino de la uva vendimiada el 11 de septiembre todavía muestra un alto contenido de antocianos polímeros y un alto nivel de polimerización de los taninos, como viene reflejado en el alto valor del índice HCl.

**Tabla IV.7** Cambios de los parámetros cromáticos de los vinos elaborados a partir de uva con distinto grado de maduración de 2002 en el momento de su embotellado y transcurridos 8 meses en botella. Letras diferentes en la misma columna y para periodo estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, %420: porcentaje de color rojo, %520: porcentaje de color azul, %620: porcentaje de color amarillo.

Fecha de vendimia	IC	Tono	%420	%520	%620	IPT	AM (mg/L)	AP (mg/L)	AT (mg/L)	L*	TM (mg/L)	TO (mg/L)	TP (mg/L)	TT (g/L)	Índice HCl
<b>t=0 meses botella</b>															
11 Septiembre	14,5 b	0,56 a	30,5 a	54,2 a	15,3 b	47,4 a	61,3 a	140,2 c	300,2 a	7,1 a	73,0 a	219,6 a	734,1 a	2,1 a	48,2 b
16 Septiembre	11,2 a	0,56 a	32,3 b	54,4 b	10,3 a	52,7 c	129,5 b	88,9 a	447,9 b	14,9 bc	73,0 a	266,9 bc	987,8 bc	2,5 b	30,3 ba
18 Septiembre	10,9 a	0,55 a	31,8 ab	57,9 c	10,3 a	50,3 b	121,4 b	89,1 a	425,5 b	15,4 c	75,0 a	259,9 b	828,7 ab	2,1 a	31,7 a
16 Octubre	15,6 b	0,56 a	32,3 b	57,4 c	10,3 a	61,6 c	125,3 b	116,0 b	456,0 b	10,0 ab	76,6 a	298,2 c	1102,8 c	3,7 c	33,3 a
<b>t=8 meses botella</b>															
11 Septiembre	12,4 b	0,61 a	32,1 a	53,0 a	53,0 a	47,6 a	70,5 a	133,7 b	247,3 a	8,8 a	61,8 a	157,2 a	522,5 a	1,8 a	39,5 c
16 Septiembre	10,6 a	0,63 b	34,2 c	54,1 b	54,1 b	52,8 c	127,8 c	101,1 a	314,1 bc	13,7 b	69,5 a	197,0 a	741,7 b	2,3 b	32,1 a
18 Septiembre	10,9 a	0,61 a	33,2 b	54,7 c	54,7 c	51,2 b	113,9 c	105,8 a	296,7 b	12,9 b	67,8 a	187,9 a	686,1 b	2,1 b	34,3 ab
16 Octubre	15,5 c	0,61 a	33,1 b	54,6 c	54,6 c	64,1 c	91,5 b	150,6 c	322,2 c	7,8 a	61,0 a	198,3 a	748,1 b	3,8 c	37,4 bc

Después de 8 meses de envejecimiento se observa una disminución en los compuestos polimerizados, siendo más acusada en el vino de la uva vendimiada el 11 de septiembre, quizás debido a la formación de polifenoles polímeros de gran tamaño que precipitan, como indica la caída del valor del índice HCl y de antocianos polímeros. Liu y Pilone (2000) también indicaron que el acetaldehído podría causar turbidez y depósitos, presumiblemente debido a las precipitaciones de grandes complejos antociano-tanino o la formación y precipitación de polímeros coloidales de catequina-acetaldehído.

**Gráfica IV.10** Distribución de los vinos elaborados en el 2002 durante su envejecimiento en botella en un sistema de coordenadas bidimensional definido por dos componentes principales (el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal es mostrado entre paréntesis). Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, HCl: índice de clorhídrico, %520: porcentaje de color rojo, %620: porcentaje de color azul, %420: porcentaje de color amarillo, símbolos blancos: t=0 meses, símbolos oscuros: t=8 meses.



El análisis de componentes principales de los 4 vinos durante el periodo de envejecimiento (Gráfica IV.10) mostró que todos los vinos disminuyeron sus valores principalmente a través de la componente 1 (decreciendo L\*, porcentaje de color rojo, taninos monómeros, oligómeros y polímeros, el índice de HCl y antocianos totales), excepto el vino de uva del 11 de septiembre, que mostró un incremento en los valores de la componente 2 durante el envejecimiento (decreciendo la intensidad de color, índice de polifenoles totales, y antocianos polímeros y aumentando el tono). El vino de la vendimia del 16 de octubre es el que presenta mayor intensidad de color, antocianos polímeros e índice de polifenoles totales.

#### IV.2.2.2.2 Compuestos fenólicos individuales

Las tablas IV.8 y IV.9 muestran el contenido de compuestos fenólicos mg/L medidos por HPLC de los vinos elaborados a partir de uva con distinto grado de maduración de 2002 en el momento de su embotellado y después de 8 meses en botella.

En el momento del embotellado, el vino elaborado a partir de la uva vendimiada el 16 de octubre es el que presentan mayor contenido de flavan-3-oles, de ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos, mientras que el contenido de ésteres hidroxicinámicos y de flavonoles es más bajo que el presentado por los vinos elaborados a partir de uvas menos maduras.

En la uva, los ácidos fenólicos se encuentran en forma de ésteres (Cravero, 1991) y sufren un descenso durante la maduración (Fernandez de Simon et al., 1993). Estos compuestos experimentan hidrólisis durante el proceso de elaboración y almacenamiento del vino por lo que los encontramos simultáneamente libres y combinados (Ruiz, 1990). El mayor contenido de etanol en el vino de la uva del 16 de octubre podría explicar la mayor formación de ácidos fenólicos respecto a los vinos obtenidos de la uva menos madura y también, la mayor extracción de flavan-3-oles al producir una mayor degradación de la pared celular del hollejo y de la cutícula de las semillas

(Amrani Joutei y Glories, 1995). Se observa que todos los vinos presentan un contenido de catequina similar mientras que es la epicatequina el compuesto que se incrementa en el vino al aumentar el estado de maduración de la uva, similar a lo encontrado por Pérez-Magariño y González-San José (2004), en vinos de Cabernet Sauvignon y de Tinto Fino donde observaron un descenso en los valores de catequina y un incremento en los de epicatequina al aumentar el estado de maduración de la uva.

McDonald et al. (1998), tras analizar 65 vinos de diferentes variedades y origen geográfico, indicaron que las concentraciones de flavonoles en los vinos están influenciadas por factores genéticos de la uva, por las condiciones climáticas durante la maduración, por el grado de maduración de la uva y por las técnicas de elaboración utilizadas. La producción de vinos ricos en flavonoles está ligada a la utilización de uvas maduras y de piel gruesa tales como Cabernet Sauvignon y desarrolladas bajo condiciones climáticas favorables para su maduración.

En nuestro caso el vino elaborado con la uva más madura presenta menor contenido de flavonoles libres lo cual puede ser debido a una mayor participación de estos compuestos en los procesos de copigmentación con los antocianos o también, a una mayor insolubilización al aumentar el contenido de etanol en el medio.

En el caso de los antocianos monoglucósidos totales, los vinos de la uva vendimiada el 16 y 18 de septiembre son los que presentan los valores más altos y el vino de la uva del 11 de septiembre los más bajos.

**Tabla IV.8** Compuestos fenólicos medidos en mg/L por HPLC de los vinos elaborados a partir de uva con distinto grado de maduración de 2002 en el momento de su embotellado. Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$

Compuestos fenólicos	11 Septiembre	16 Septiembre	18 Septiembre	16 Octubre
Ácido gálico	20,5 a	21,1 a	21,1 a	25,2 b
Ácido siríngico	2,3 a	2,5 a	2,3 a	5,5 b
Ácido protocatéquico	12,4 a	11,5 a	12,5 a	20,2 a
$\Sigma$ Ácidos hidroxibenzoicos	35,3 a	35,3 a	36,1 a	50,9 b
Ácido cafeico	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Ácido ferúlico	0,35 a	0,41 b	0,39 ab	0,62 c
Ácido p-cumárico	1,7 a	2,3 b	2,6 b	3,3 c
$\Sigma$ Ácidos hidroxicinámicos	2,0 a	2,8 b	3,0 b	3,9 c
Ácido caftárico	13,9 d	12,8 c	11,8 b	8,2 a
Ácido cutárico	4,1 c	3,5 b	3,3 b	1,6 a
$\Sigma$ Ésteres hidroxicinámicos	18,1 d	16,4 c	15,1 b	9,8 a
Catequina	14,7 a	16,4 a	15,4 a	15,5 a
Epicatequina	7,6 a	7,9 a	11,1 ab	17,4 b
$\Sigma$ Flavan-3-oles	22,4 a	24,3 a	26,5 ab	33,0 b
Rutina	2,3 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Quercitrina	0,49 c	0,29 b	0,31 b	0,0 a
Miricitina	4,4 a	9,5 c	8,5 c	7,0 b
Quercetina	7,0 c	8,6 c	4,0 b	1,1 a
Kampferol	0,20 d	0,13 c	0,07 b	0,0 a
$\Sigma$ Flavonoles	14,3 b	18,4 c	12,8 b	8,1 a
Delfinidina-3-Glucósido	3,6 a	11,9 b	15,2 c	17,6 c
Cianidina-3-Glucósido	1,0 a	4,7 c	3,8 b	3,4 b
Petunidina-3-Glucósido	5,5 a	28,4 c	24,5 c	19,0 b
Peonidina-3-Glucósido	2,3 a	10,5 b	9,4 b	10,6 b
Malvidina-3-Glucósido	20,7 a	96,0 c	84,8 c	65,4 b
$\Sigma$ Antocianos	33,3 a	157,4 c	137,8 c	110,5 b

**Tabla IV.9** Compuestos fenólicos medidos en mg/L por HPLC de los vinos elaborados a partir de uva con distinto grado de maduración de 2002 después de 8 meses en botella. Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ .

Compuestos fenólicos	11 Septiembre	16 Septiembre	18 Septiembre	16 Octubre
Ácido gálico	24,9 a	25,3 a	25,9 a	30,4 b
Ácido siríngico	2,4 a	3,1 a	2,4 a	5,2 b
Ácido protocatéquico	7,2 a	12,3 b	13,8 b	18,6 c
$\Sigma$ Ácidos hidroxibenzoicos	34,6 a	40,9 b	42,2 b	54,3 c
Ácido cafeico	1,1 a	1,5 b	1,6 b	4,4 c
Ácido ferúlico	0,43 a	0,52 b	0,51 b	0,76 c
Ácido p-cumárico	2,2 a	3,4 b	3,5 b	4,1 c
$\Sigma$ Ácidos hidroxicinámicos	3,8 a	5,5 b	5,6 b	9,3 c
Ácido caftárico	14,3 d	13,0 c	12,0 b	8,2 a
Ácido cutárico	4,4 c	3,7 b	3,5 b	1,5 a
$\Sigma$ Ésteres hidroxicinámicos	18,8 c	16,7 b	15,6 b	9,8 a
Catequina	27,1 b	20,1 a	22,4 a	18,7 a
Epicatequina	8,6 a	8,2 a	7,1 a	7,0 a
$\Sigma$ Flavan-3-oles	35,7 a	28,3 a	29,5 a	25,7 a
Rutina	0,3 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Quercitrina	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Miricitina	5,7 a	10,0 c	8,6 bc	6,2 ab
Quercetina	7,6 b	7,2 b	3,7 a	2,9 a
Kampferol	0,2 b	0,1 a	0,0 a	0,0 a
$\Sigma$ Flavonoles	13,9 bc	17,3 c	12,3 ab	9,2 a
Delfinidina-3-Glucósido	2,9 a	9,7 d	7,7 c	4,0 b
Cianidina-3-Glucósido	1,0 a	3,0 d	2,3 c	1,6 b
Petunidina-3-Glucósido	5,0 a	14,7 d	11,7 c	6,0 a
Peonidina-3-Glucósido	2,5 a	6,5 c	5,6 c	4,2 b
Malvidina-3-Glucósido	18,3 a	49,2 c	39,7 b	19,6 a
$\Sigma$ Antocianos	29,3 a	83,3 c	67,3 b	35,7 a

El contenido de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos se incrementa en los vinos tras el envejecimiento en botella como consecuencia principalmente del incremento en el contenido de ácido gálico y de ácido cafeico debido a la hidrólisis de sus correspondientes ésteres. Los ésteres hidroxicinámicos se mantienen prácticamente constantes, resultado observado también por Archier et al. (1993), mientras que los flavonoles disminuyen. Los procesos de copigmentación y la baja solubilidad en el medio justificarían la caída observada en los flavonoles. Según Esteves-Pinto (1971) la pérdida de flavonoles en un vino es paulatina llegando incluso a desaparecer.

Los antocianos monoglucósidos sufren en general una disminución acusada en todos los vinos, resultado también indicado por Zafrilla et al., (2003) y Pérez-Magariño y González-San José (2004), debido a los procesos de oxidación, polimerización y condensación, principalmente entre antocianos y taninos, y también, como se ha demostrado más recientemente, a la formación de una nueva clase de derivados de antocianos durante el proceso de elaboración y envejecimiento, llamada piroantocianos (Vivar-Quintana et al., 2002; Mateus et al., 2003; Brouillard et al., 2003), los cuales también son responsables de mantener y estabilizar el color del vino.

Se puede concluir que los análisis de los diferentes vinos mostraron que el vino de la uva vendimiada el 16 de octubre tiene las mejores características de color y es el vino más prometedor. La uva de partida presentaba un contenido de antocianos (medido por HPLC o espectrofotométricamente) más bajo y similar índice de madurez fenólica que la uva vendimiada en septiembre y este hecho muestra que el contenido de antocianos en la uva no es un parámetro que se correlacione con el color del vino. Es difícil proponer un criterio para decidir cuando la uva está lista para ser vendimiada. El resultado también muestra la conveniencia de esperar hasta que los antocianos de la uva empiezan a disminuir después de alcanzar la máxima concentración para obtener vinos altamente coloreados, ya que en ese momento las paredes celulares están más degradadas y facilitarán la extracción de estos compuestos. Sin embargo, los viticultores y los bodegueros tienen otros

problemas en regiones cálidas, donde la rápida acumulación de azúcares en años calurosos podría imponer una vendimia prematura, puesto que un retraso resultaría en altos niveles de alcohol. La decisión ha de ser tomada de un año a otro, intentando buscar una ligera sobremaduración, pero teniendo muy en cuenta el contenido de azúcares, para evitar un excesivo contenido de alcohol en el vino, el cual podría ser perjudicial para la calidad del vino.

También hemos demostrado como el color del vino puede verse influenciado por factores enológicos como el contenido de acetaldehído. El alto nivel de este compuesto en el vino de la uva vendimiada el 11 de septiembre incrementó la intensidad de color hasta alcanzar valores muy similares al vino de la uva vendimiada el 16 de octubre, pero con un contenido en compuestos fenólicos que no podría garantizar la estabilidad del color mostrada por el vino elaborado de la uva vendimiada el 16 de octubre.

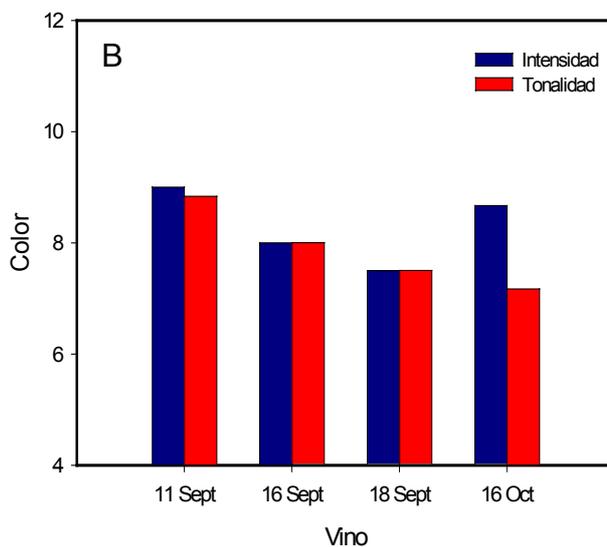
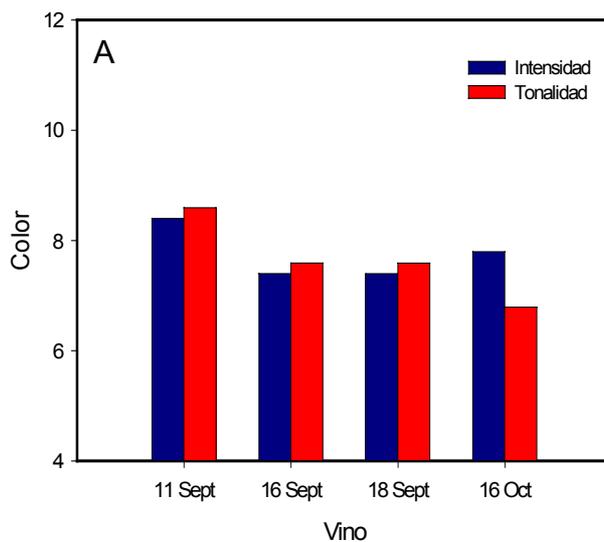
#### **IV.2.2.4 ANÁLISIS SENSORIAL**

En las gráficas IV.11, IV.12 y IV.13 se presentan los resultados del análisis sensorial de los vinos elaborados en la campaña 2002, en el momento de su embotellado (gráfica A) y transcurridos 8 meses en botella (gráfica B). En cada una de las gráficas podemos observar el análisis de fase visual, olfativa y gustativa de los diferentes vinos.

Tanto en el momento del embotellado como después de 8 meses en botella los vinos con mayor intensidad de color son los obtenidos de las uvas vendimiadas el 11 de septiembre y el 16 de octubre, siendo el vino del 11 de septiembre el que presenta mayor tonalidad violacea (como consecuencia de la mayor generación de acetaldehído). Los catadores no encontraron diferencias significativas entre los vinos de las uvas vendimiadas el 16 y el 18 de

septiembre, mostrando en ambos momentos una tonalidad mayor al vino de la vendimia del 16 de octubre.

**Gráfica IV.11** Evaluación sensorial de la intensidad y tonalidad del color de los vinos elaborados en el 2002, en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.



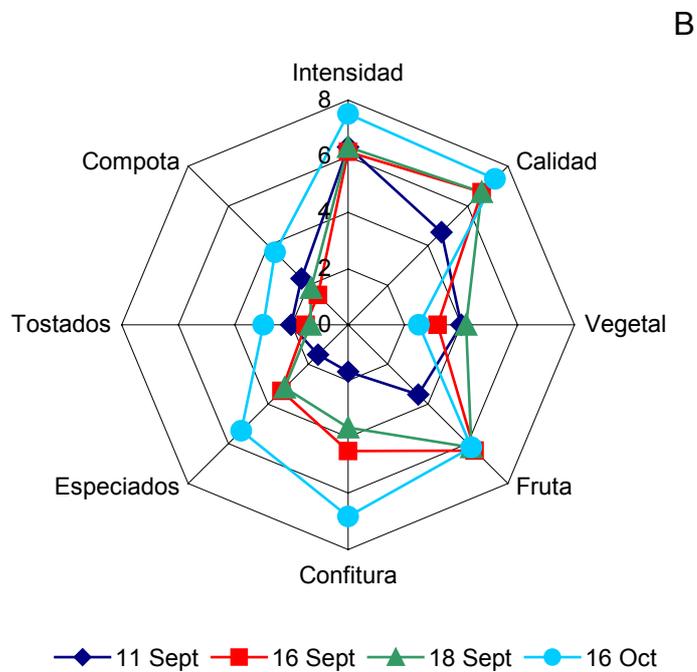
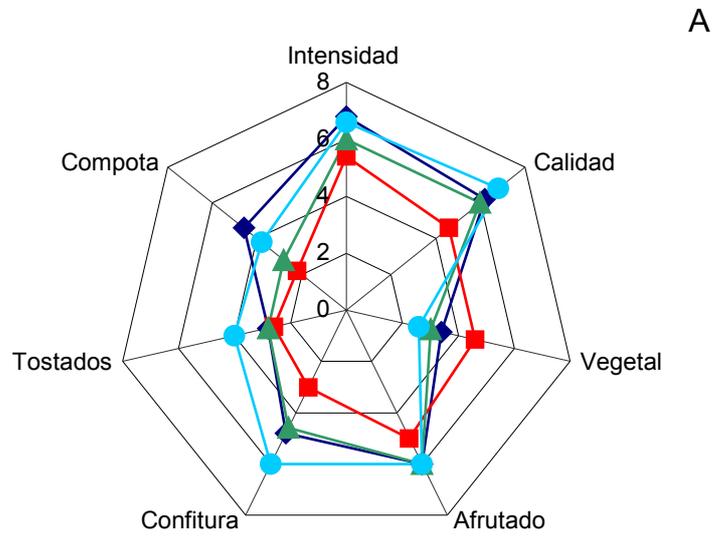
En el momento del embotellado, el vino de la vendimia del 16 de septiembre es el que presenta menor intensidad y calidad del aroma, con menos toques a fruta y confitura y más recuerdos a vegetal, mientras que los vinos de las vendimias del 11 de septiembre y 16 de octubre son mejor valorados en cuanto intensidad y calidad, mostrando el vino de la vendimia del 16 de octubre menos aromas a vegetal y más a confitura y tostados.

Después de 8 meses en botella, es el vino de la vendimia del 16 de octubre el de mayor intensidad y calidad aromática, diferenciándose del resto de los vinos por tener altos toques especiados (que antes no eran detectados), tostados, confitura y compota. El vino de la vendimia del 11 de septiembre es el menos valorado en cuanto calidad y percepción aromática.

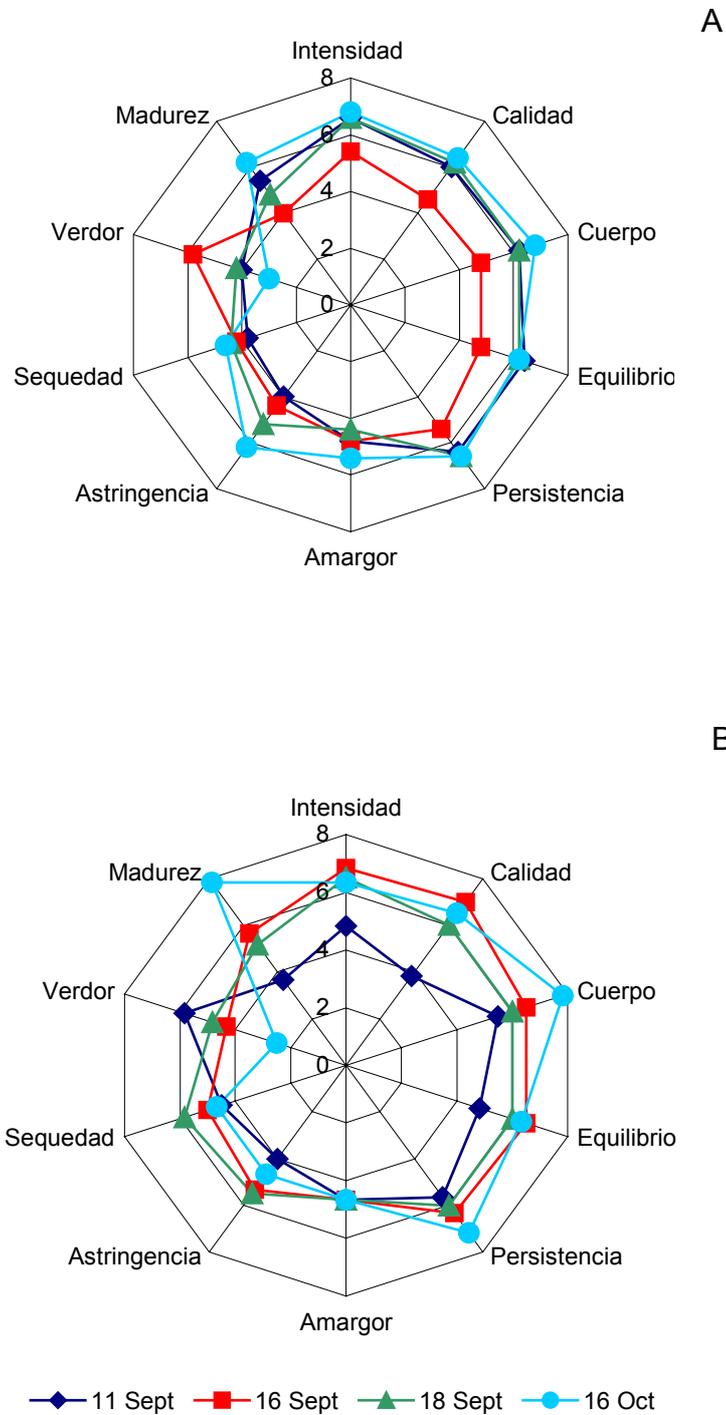
Por último, la valoración de la fase gustativa de los distintos vinos en el momento del embotellado es más baja en todos los aspectos para el vino de la vendimia del 16 de septiembre. Transcurridos ocho meses en botella, el vino de la vendimia del 11 de septiembre disminuye su percepción en cuanto a intensidad, calidad, equilibrio y madurez, presentando además la puntuación más baja. Sin embargo, el vino de la vendimia del 16 de septiembre mejora prácticamente en todos los aspectos, pero es el vino de la vendimia del 16 de octubre el que presenta mayor cuerpo, persistencia, madurez y baja astringencia.

El vino de la vendimia del 11 de septiembre, el cual mostraba una intensidad de color similar al vino de la vendimia del 16 de octubre, disminuye su calidad en cuanto al aroma y al gusto. Es por tanto el vino de la vendimia del 16 de octubre no sólo el más prometedor en cuanto a sus características de color sino también sensorialmente.

**Gráfica IV.12** Evaluación sensorial del aroma de los vinos elaborados en el 2002, en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.



**Gráfica IV.13** Evaluación sensorial del gusto de los vinos elaborados en el 2002, en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.





## **V. INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE ENZIMAS EN EL COLOR DEL VINO**



## **V.1 INTRODUCCIÓN**

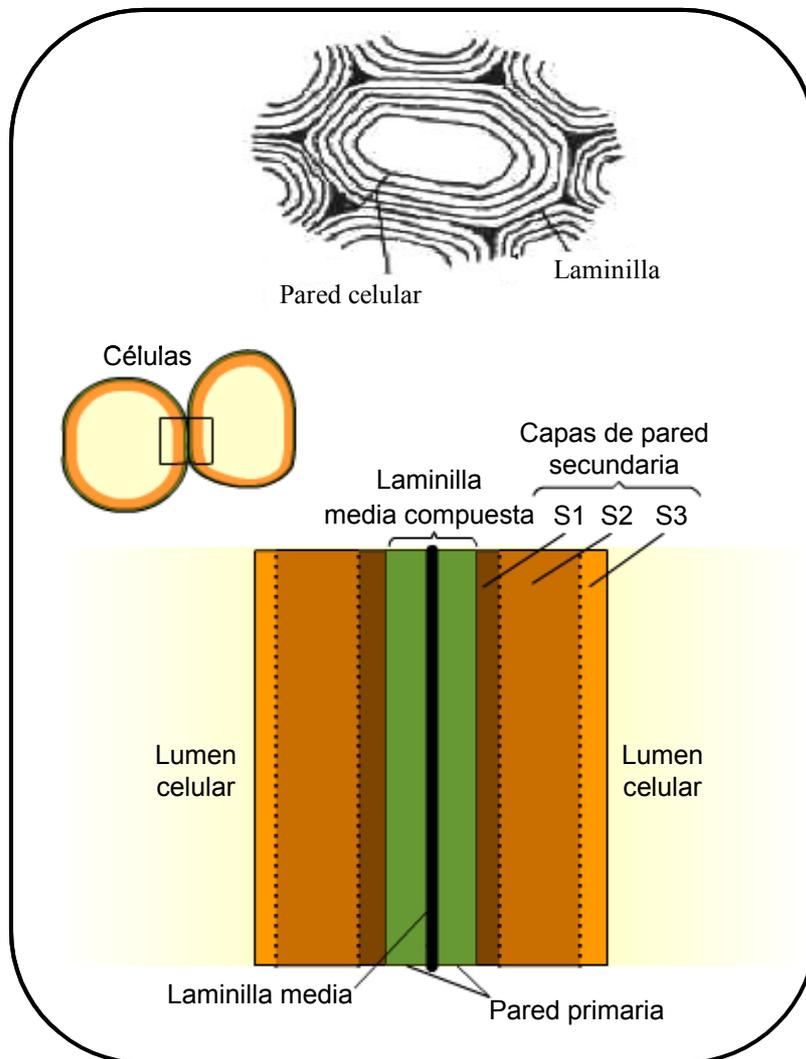
Los enzimas son proteínas naturales que poseen actividad catalítica en reacciones bioquímicas específicas. Modifican la velocidad de la reacción que catalizan y son frecuentemente específicos de un solo sustrato y de una sola dirección de la reacción. La mayoría de los enzimas tienen una temperatura y un pH óptimo de actuación y su acción puede ser frecuentemente inhibida o potenciada por otros compuestos o cofactores. Estas propiedades hacen a los enzimas efectivos en puntos de control de muchas reacciones bioquímicas en organismos. Los enzimas pueden ser separados y purificados para mejorar los procesos tecnológicos, especialmente para productos naturales, o para aplicaciones farmacéuticas.

Todas estas características hacen a los enzimas de interés enológico, integrantes de prácticas de elaboración de uvas, cada vez más extendidos e interesantes.

### **V.1.1 ESTRUCTURA CELULAR DE LA UVA**

Las células de los vegetales se encuentran protegidas por paredes celulares que les dan consistencia y rigidez (Figura V.1). Estas paredes están formadas por polisacáridos complejos (pectinas, celulosa y hemicelulosa) que proporcionan estructura y firmeza a las células y, por tanto, al fruto. En las células del hollejo de las uvas, es el citoplasma el que contiene el núcleo, plástidos y sistemas enzimáticos, mientras que las vacuolas poseen en disolución los azúcares, ácidos, sales, fenoles, antocianos y los compuestos que proporcionan aromas. En la membrana vacuolar se encuentran taninos (ligados a proteínas) y en la membrana celular también se localizan estos compuestos (unidos a polisacáridos de la pared celular).

Figura V.1 Estructura de la pared celular.



Las pectinas están concentradas fundamentalmente en la lámina media localizada entre las células y son frecuentemente polímeros de ácido galacturónico altamente metilados. La ramnosa, arabinanos, galactanos y arabinogalactanos también pueden formar parte de estos complejos llamados pectinas. Las paredes celulares tienen grandes cantidades de hemicelulosa y celulosa. La pared celular secundaria está constituida de pectina, con algo de lignina, mientras que la pared celular primaria está mayoritariamente

compuesta de fibras de celulosa, en una matriz de pectinas, hemicelulosa y proteínas. En la pared celular, las fibras de celulosa están unidas a las proteínas por xiloglucanos (hemicelulosa) y las pectinas están unidas a los arabinogalactanos por residuos de serina. La extracción del contenido vacuolar y su difusión en el mosto, obviamente requiere la degradación de la lámina media y la ruptura de la pared celular. Esto se puede conseguir con el uso de maceración mecánica, aumento de la temperatura, adición de SO<sub>2</sub> o con enzimas pécticos.

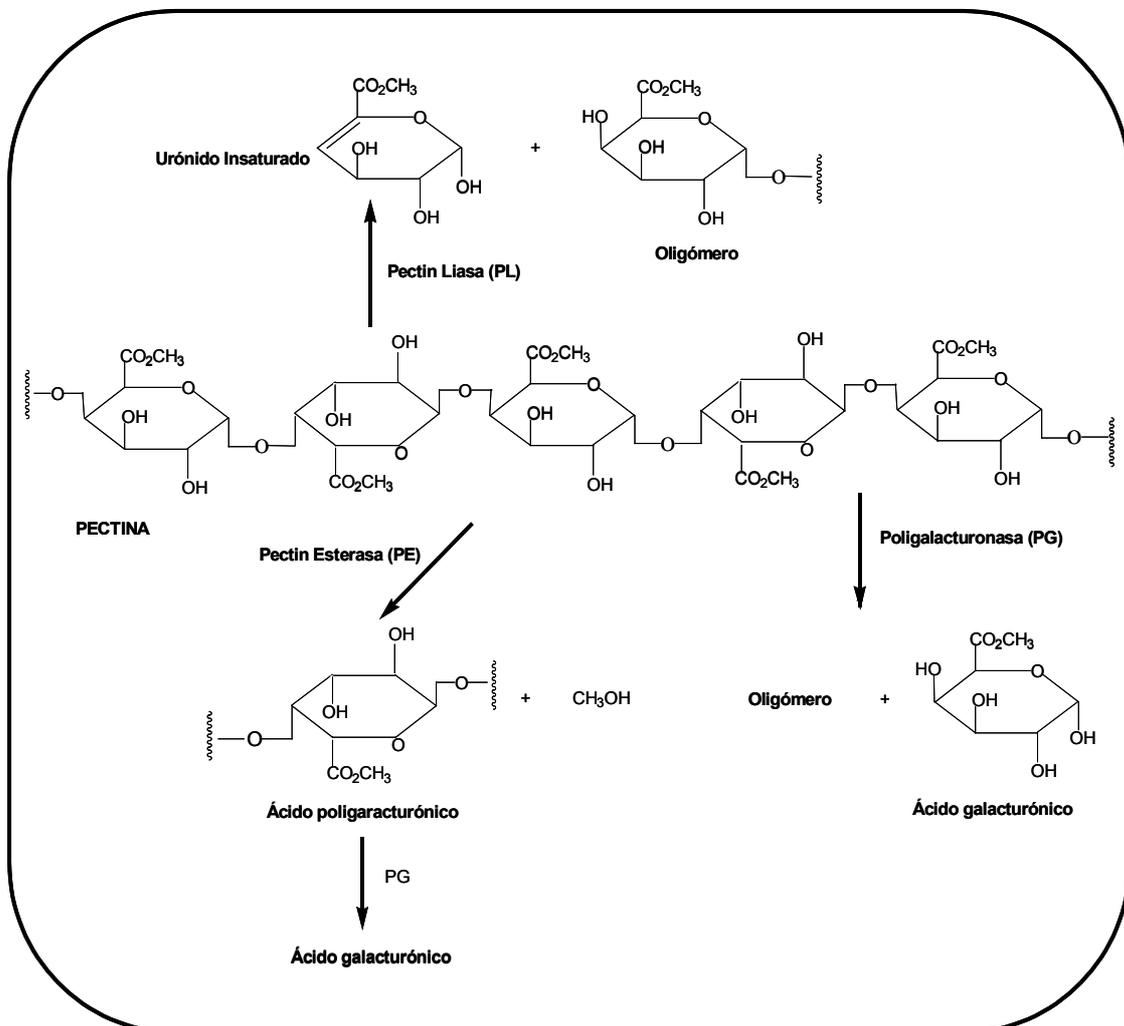
## **V.1.2 ACCIÓN DE LOS ENZIMAS SOBRE LOS SUSTRATOS**

Las moléculas que constituyen la lámina media y las paredes primaria y secundaria son muy diversas y varían por su grado de metilación, por las uniones con otros compuestos, por su estructura física y el medio donde se encuentran afectando a las propiedades de los sustratos y a su degradación por determinados enzimas.

### **V.1.2.1 PECTINAS Y PECTINASAS**

Las pectinas de la uva, como ya se ha comentado, son un polímero de ácido galacturónico con un 44-65% de los grupos carboxilo metilados (Lanzarini y Pifferi, 1989). Cuando el grado de metilación es superior al 50% se llaman pectinas altamente metoxiladas. La pectina de la lámina media de la pared es más soluble que la pectina de las paredes primaria y secundaria y puede ser degradada fácilmente por los enzimas.

Figura V.2 Sistema de acción de las enzimas pectolíticas.



Hay cuatro tipos de enzimas pécticas, los cuales pueden diferenciarse por su acción sobre varios tipos de sustratos pécticos (Figura V.2). La pectín esterasa (PE) elimina grupos metoxilo de pectinas altamente metoxiladas para dar metanol y pectinas menos metoxiladas. La PE de las plantas trabaja sistemáticamente a lo largo de la cadena, produciendo áreas desesterificadas en la pectina, mientras que la PE de origen fúngico actúa al azar. La poligalacturonasa (PG) es una despolimerasa y actúa rompiendo los enlaces en la cadena entre las unidades de ácido galacturónico no esterificado. La

endo-PG actúa al azar a lo largo de la cadena, pero la exo-PG, únicamente rompe los enlaces no reducidos al final de la cadena. La PE y la en-PG son frecuentemente utilizadas juntas en preparados enzimáticos para el procesado de la uva. La pectin liasa (PL) actúa al azar en la cadena para despolimerizar a los poligalacturanos de manera similar a la endo-PG, pero la PL actúa sobre enlaces entre moléculas metiladas. La pectato liasa (PAL) es menos utilizada en el procesado de la uva. Esta actúa al azar para romper uniones glicosídicas entre moléculas de ácido galacturónico no metiladas en pectina de baja metoxilación. Su funcionamiento es similar a la endo-PG, sin embargo la PAL requiere  $\text{Ca}^{+2}$  y un alto pH (8-9). PE y PG están presentes de forma natural en la uva a baja concentración, aunque durante la vinificación, la PE es inhibida por el etanol y los polifenoles.

#### **V.1.2.2 HEMICELULOSA Y HEMICELULASAS**

La hemicelulosa es un polisacárido estructuralmente análogo a la celulosa, porque el esqueleto está formado por 1-4- $\beta$ -D-hexosas. Normalmente, la principal hemicelulosa es el xiloglucano aunque también se encuentran arabinoxilanos, glucomananos y galactomananos.

Los arabinanos tienen un esqueleto de arabinofuranosil unidos por enlaces  $\alpha$ -1,5 y con ramificaciones adicionales de moléculas de arabinosil presentes aproximadamente cada tres unidades a lo largo de la cadena. Los galactanos tienen esqueletos de galactopiranosil que están unidos en  $\beta$ -1,4 ó  $\beta$ -1,3. Estas cadenas se pueden sustituir por grupos arabinofuranosil o arabinanos para formar arabinogalactanos.

Uno de los enzimas implicados en la degradación de la hemicelulosa es la arabinasa. Hay tres formas de enzimas arabinasa: la arabinosidasa A degrada los oligómeros de arabinanos a monómeros, la arabinosidasa B degrada el arabinano para dar una cadena lineal, la enzima endo-arabinosa

hidroliza al azar la cadena linear, rompiéndola en oligómeros para que la arabinasa A pueda actuar sobre ellos.

Dos galactanasas, endogalactanasa y galactanasa, también se pueden ver implicadas en la degradación de la hemicelulosa. La endogalactanasa actúa al azar sobre la cadena de galactano rompiendo uniones de tipo  $\beta$ -1,4, mientras que la galactanasa actúa al azar rompiendo uniones  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6.

### **V.1.2.3 CELULOSA Y CELULASAS**

La celulosa es abundante en las paredes primaria y secundaria. Es una cadena linear de moléculas de glucosa unidas por enlaces tipo  $\beta$ -1,4, estas cadenas pueden formar enlaces de hidrógeno para dar agregados llamados microfibras, con diferente grado de cristalización. Las propiedades de la celulosa pueden variar dependiendo del grado de polimerización y el grado de cristalización. La celulosa de bajo grado de cristalización es más fácilmente degradada por enzimas.

La celulasa es un sistema de enzimas que incluye endo-glucanasa, exo-glucanasa y celobiasa. La endo-glucanasa hidroliza al azar los enlaces de glucosa  $\beta$ -1,4 en la cadena, mientras que la exo-glucanasa solamente rompe enlaces no reducidos del final, para dar glucosa o su dímero, celobiosa. La celobiasa divide la celobiosa en dos moléculas de glucosa. La celobiosa inhibe fuertemente la actividad de la endo y la exo-glucanasa, así la celobiasa es necesaria en el complejo de celulasa.

### **V.1.3 UTILIZACIÓN DE ENZIMAS COMERCIALES EN LA ELABORACIÓN DEL VINO**

Desde comienzo de los años 1950, las pectinasas han sido utilizadas en el procesado de frutas para la obtención de zumo. Estas enzimas proporcionan mayor rendimiento en la extracción de zumo y otros compuestos deseables desde las células, con cortos y efectivos tiempos de prensado. También clarifican el zumo rápidamente mediante la ruptura de grandes unidades de polisacáridos, que de lo contrario, permanecerían en suspensión en la solución y reducen la viscosidad del zumo y mejora la filtración del producto. Los preparados enzimáticos de pectinasa también han sido comúnmente utilizados en la elaboración del vino desde comienzos de 1970, sobre todo para conseguir un mayor rendimiento del mosto en el estrujado de la uva y para facilitar la clarificación. La adición de pectinasas exógenas suele ser beneficiosa, porque aunque ellas están de forma natural en los frutos, se encuentran en cantidades más bajas que las necesarias para hidrolizar toda la pectina del mosto (Felix y Villettaz, 1983). La mayoría de las pectinasas propias de la uva y aquellas que se utilizan en la elaboración del vino, contienen actividad PE y endo-PG y podrían contener también PL y/o proteasa. Recientemente, las empresas que fabrican los enzimas han modificado los preparados de pectinasas, adicionando pequeñas cantidades de enzimas celulasa y hemicelulasa y poder conseguir así una mayor ruptura de las células y de la estructura del fruto (Plank y Zent, 1993). Estos sistemas enzimáticos de maceración han mejorado las propiedades para el procesado de la uva cuando se compara con pectinasas solamente (Harbord et al., 1990).

La aplicación de pectinasas en la uva blanca y en menor extensión en la uva tinta, tiene beneficios económicos al incrementar el rendimiento total de mosto, reduciendo el tiempo de prensado y de la clarificación y facilitando el proceso de filtración (Ough y Crowell, 1979; Felix y Villettaz, 1983; Capdeboscq et al., 1994).

Ya hace años que se observó que la aplicación de estos preparados comerciales enzimáticos ahora llamados también enzimas de maceración, en mostos tintos podría mejorar la extracción del color y los compuestos fenólicos de la uva tinta. Numerosos estudios han mostrado que los enzimas pectolíticos y los enzimas de maceración promueven la extracción del color y mejora la calidad del vino tinto (Ough y Berg, 1974; Ough y Crowell, 1979; Felix y Villettaz, 1983; Zent y Inama, 1992). En otro estudio con vinos tintos, se encontró que las pectinasas producen una rápida extracción de compuestos fenólicos y que se requiere un 20% menos de tiempo de contacto para alcanzar el mismo color que el control (Ough et al., 1975).

De todas formas, los resultados que se han encontrado referentes a la utilización de estos preparados comerciales para la extracción de color de las uvas no siempre han sido coincidentes. Haight y Gump (1994) encontraron un incremento en el color de los vinos tratados con enzimas pero sin mostrar diferencias significativas respecto el vino control. Otros han encontrado que la pectinasa y los enzimas de maceración pueden no producir ningún beneficio o incluso causar una disminución en el contenido de antocianos y en el color del vino (Wightman y Wrolstad, 1995; Wightman et al., 1997). Parte de los resultados negativos han sido atribuidos a la presencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa en los preparados comerciales. Esta actividad fue identificada en extractos enzimáticos de *Aspergillus* por Huang (1955), quien encontró que tenía un efecto de decoloración sobre los pigmentos extraídos de varios frutos, incluida la uva. La decoloración es debida a la hidrólisis enzimática de la glucosa de los antocianos. La  $\beta$ -glucosidasa ha sido encontrada en los preparados enzimáticos de pectinasa en numerosas ocasiones (McCleary y Harrington, 1988; Martino et al., 1994), siendo también identificada en preparados de pectinasas en la elaboración del zumo y del vino (Wightman y Wrolstad, 1995; Wightman y Wrolstad, 1996).

La actividad de los enzimas de maceración es menor en mostos con bajos valores de pH y a bajas temperaturas. También su actividad se ve afectada durante la vinificación, viéndose inhibidas por el incremento en el

contenido de etanol durante la fermentación y por el aumento de los niveles de los compuestos fenólicos. Los enzimas son proteínas y se pueden enlazar y precipitar con taninos extraídos durante el proceso de maceración. Otro factor a tener en cuenta cuando se utilizan estos enzimas es la concentración a la cual se aplican (Neubeek, 1975). Muestras de vinos de Bulgaria tratados con pectinasas al 0,3%, mostraron un 18% más de color que el vino control, pero los tratados con un 0,7% del mismo enzima, mostraron un 60% menos de color que el vino control (Neubeek, 1975).

#### **V.1.4 ACTIVIDADES DE LOS ENZIMAS DE MACERACIÓN DE PECTINASAS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DEL VINO**

Los preparados enzimáticos son comúnmente material extracelular producido en fermentaciones controladas, generalmente de *Aspergillus niger*. Aunque todas las enzimas son producidas por el mismo organismo, las preparaciones de enzimas de maceración disponibles actualmente en el mercado enológico son muy distintas. Tanto la concentración en pectinasas de dichas preparaciones como la naturaleza de su actividad dependen de la cepa de *Aspergillus*, de las condiciones de fermentación para la producción (medio sólido o líquido) y de la naturaleza del sustrato fermentado. La distinta naturaleza de los enzimas presentes en estas preparaciones y su nivel de actividad condicionan la eficacia de los productos. En la mayoría de los casos, la actividad enzimática de las preparaciones comerciales viene expresada en unidades propias de cada fabricante. Generalmente se trata de nomenclaturas globales que no hacen distinción entre las distintas pectinasas. Estos preparados, usualmente contienen otras actividades como: glicosidasa, esterases, proteasas, hemicelulasas y celulasas, que refuerzan la acción de las pectinasas en sentido estricto. Estas actividades presentes en los preparados comerciales enzimáticos pueden variar ampliamente entre los fabricantes

(Neubeek, 1975). La mejora en la purificación y especificidad de los preparados enzimáticos comerciales podrían ser obtenidos en el futuro por ingeniería genética al mejorar o inhibir la expresión de genes de enzimas particulares (Voragen y van den Broek, 1991).

Otra actividad que también puede estar presente en los enzimas de maceración es la fenol esterasa (Canal-Llaubères y Barbe, 1995). El efecto de esta actividad sobre el color del vino tinto ha recibido pequeña atención, pero podría ser importante. Su presencia es detectada normalmente por una disminución de los ésteres de los ácidos hidroxicinámicos con ácido tartárico de la uva, acompañado por el incremento de sus respectivos ácidos libres (Wightman et al., 1997). La conversión del ácido caftárico en ácido cafeico en el mosto podría influir en la pérdida de antocianos por oxidación (Sarni et al., 1995), ya que la desesterificación incrementa la actividad de la polifenol oxidasa (Gunata et al., 1987). Sin embargo, su presencia puede también tener un efecto inhibitorio sobre la actividad polifenol oxidasa (Madini et al., 1997). Un segundo efecto importante de la producción de ácidos hidroxicinámicos libres tales como el p-cumárico y ferúlico, es que son sustratos para la formación de etil y vinil-fenoles, los cuales pueden tener dos efectos contrapuestos. Por un lado pueden perjudicar el aroma de los vinos por ser sustratos para la formación de vinil-fenoles pero también pueden formar polímeros condensados con la malvidina, contribuyendo de esta manera a estabilizar el color del vino.

## V.2 RESULTADOS

Tal y como se ha descrito previamente, se llevaron a cabo tres vinificaciones: una vinificación testigo (T), una vinificación con el enzima Rapidase Excolor (DSM), (E1) y otra vinificación con el enzima Lallzyme (Lallemand), (E2). Las experiencias se realizaron con uvas de las vendimias de 2001 y 2002, en depósitos de 12 litros y por triplicado a partir de 10 kg de uva, con un tiempo de maceración de 15 días. La adición de estos enzimas se realizó al comienzo de la maceración y la dosis aplicada fue de 2 g/Hl.

La medida de intensidad de color en este capítulo se ha realizado de dos maneras diferentes: como la suma de las absorbancias a 420, 520 y 620 (IC) y también no teniendo en cuenta la componente azul (ICcorregida). Según Revilla y González-San José (2001 y 2003a) el vino elaborado sin adición de enzimas presenta mayor cantidad de coloides en suspensión que los vinos tratados con enzimas, los cuales incrementan la absorbancia a 620, dando lugar inicialmente a un vino aparentemente más oscuro. Con el tiempo esos coloides precipitan al adquirir un tamaño muy grande.

### V.2.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICO-FÍSICAS DE LA UVA EN EL MOMENTO DE VENDIMIA

La tabla V.1 muestra las características químico-físicas de la uva en el momento de vendimia ya que la evolución de la vinificación y el efecto de diferentes prácticas podrían verse influenciadas por éstas. Los antocianos y los taninos, compuestos que juegan un papel importante en el color y gusto de los vinos, varían como ya hemos visto en el capítulo IV con la madurez de la uva y por las condiciones climáticas durante su crecimiento.

En el 2002 tuvo lugar una inusual lluvia durante el verano que produjo un aumento del tamaño del grano de la uva. El índice de polifenoles totales es

mayor en el 2002, mientras que el contenido de antocianos totales es ligeramente superior en el 2001. El contenido de azúcar y la acidez fue mayor en el 2002, pero esta diferencia en la acidez no es detectada en los vinos, ya que la acidez del mosto es corregida durante la vinificación.

**Tabla V.1** Características químico-físicas de la uva en el momento de vendimia de los años 2001 y 2002.

Características	Año	
	2001	2002
Peso de 100 bayas (g)	124,0	209,2
°Be	13,2	13,7
Acidez Total (mg/L)	4,4	5,4
pH	3,8	3,7
IPT	27,4	29,4
Antocianos totales (mg/L mosto)	325,3	317,1
Antocianos totales Lamadon(mg/kg uva)	975,9	951,4
Antocianos totales HPLC (mg/kg uva)	770,4	708,8

## V.2.2 PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2001

La tabla V.2 muestra los parámetros de color de los diferentes tratamientos al finalizar la fermentación alcohólica en el año 2001.

La vinificación testigo muestra valores de IPT, %520, L\*, a\* y b\* más bajos que las vinificaciones tratadas con enzimas, mientras que los valores de %420 son mayores, proporcionándole al vino testigo un valor de tono más alto.

La mayor presencia de coloides en suspensión en el vino testigo explicaría la mayor oscuridad presentada por este vino (valor de L\* más bajo) (Revilla y González-San José, 2001 y 2003a). El contenido de antocianos y la intensidad de color (IC corregida) es mayor en el tratamiento E2, no encontrándose en cambio diferencias significativas en estos parámetros entre

el tratamiento E1 y el testigo. En los vinos tratados con enzimas el porcentaje de color rojo es superior. Valdés Sánchez y Regodón Mateos (1994) y Revilla y González-San José (2002a) también encontraron que en el vino tratado con enzima predominaba el color rojo debido a la presencia de una mayor cantidad de antocianos, mostrando, además, un valor de tono más bajo que el testigo.

**Tabla V.2** Parámetros de color de las diferentes vinificaciones al finalizar fermentación alcohólica en la elaboración del 2001. Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color, IC\*: intensidad de color corregida, AT: antocianos totales, IPT: índice de polifenoles totales, %520: porcentaje de color rojo, %420: porcentaje de color amarillo, %620: porcentaje de color azul.

Parámetros	T	E1	E2
IC	17,3 a	17,5 a	18,1 a
IC*	15,7 a	16,0 ab	16,5 b
Tono	0,47 b	0,43 a	0,42 a
%420	28,9 b	27,5 a	27,2 a
%520	61,8 a	63,9 b	64,4 b
%620	9,3 b	8,6 a	8,5 a
IPT	62,1 a	70,2 b	68,0 b
AT (mg/L)	547,1 a	560,4 a	570,1 b
L*	8,1 a	10,5 b	10,4 b
a*	37,7 a	41,9 b	41,8 b
b*	13,9 a	18,1 b	17,9 b

## **V.2.3 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2002**

### **V.2.3.1 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DURANTE LA VINIFICACIÓN**

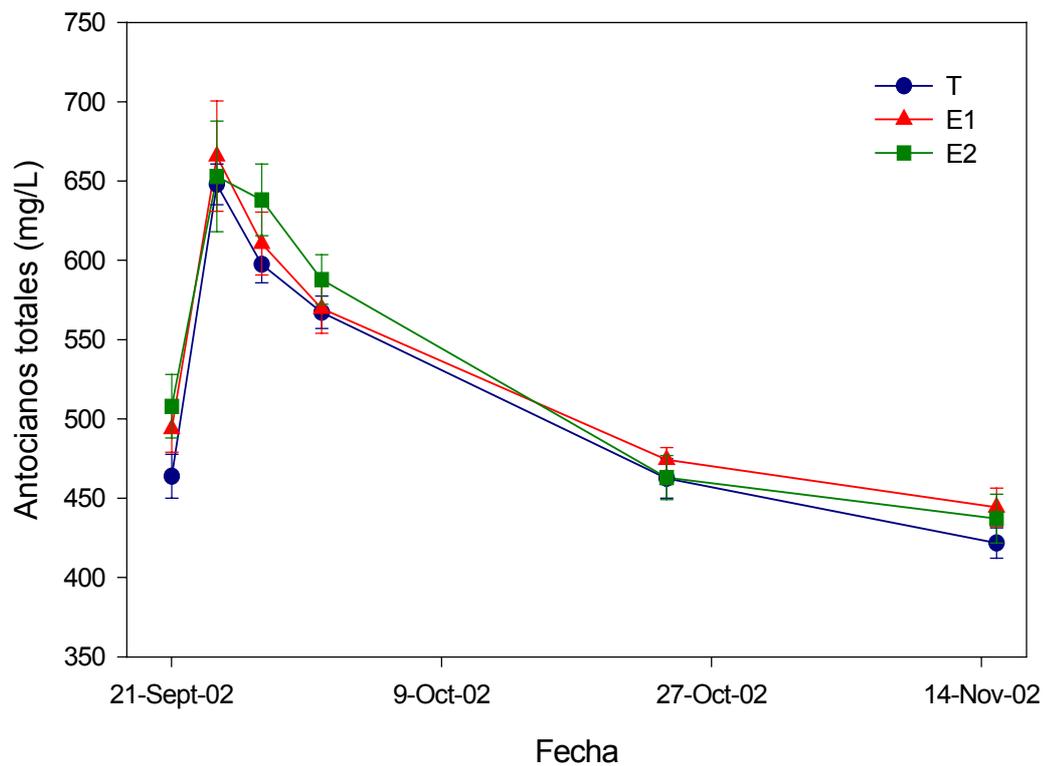
En las gráficas V.1, V.2 y V.3 y en la tabla V.3 se puede observar la evolución del contenido de antocianos totales, antocianos monómeros y polímeros, índice de polifenoles totales, intensidad de color y tono, L\*, a\* y b\* durante la maceración hasta fin de fermentación maloláctica del año 2002.

#### **V.2.3.1.1 Antocianos totales**

La máxima extracción de antocianos tiene lugar sobre el día 6 de maceración. Las diferencias en el contenido de antocianos entre las distintas vinificaciones son más bien pequeñas, aunque con las enzimas se consigue extraer más antocianos sobre el día 3 de maceración, mostrando en este momento los vinos tratados con enzimas las mayores diferencias respecto al testigo. Wightman et al. (1997) también encontraron las mayores diferencias entre los tratamientos con enzimas y el testigo en los dos primeros días de fermentación. En ese momento, los enzimas pectolíticos están disgregando las paredes celulares, produciéndose una mayor extracción de los antocianos presentes en las vacuolas. Después de la extracción máxima de antocianos, tiene lugar un descenso hasta fin de fermentación maloláctica, siendo éste más acusado para la vinificación testigo. En este momento, el contenido de antocianos es similar para las vinificaciones E1 y E2, mientras que el vino testigo presenta un valor de antocianos un poco más bajo. Pardo et al. (1999), al igual que nosotros, encontraron pequeñas diferencias en el contenido de antocianos en vinos tratados con Rapidaxe Excolor y el testigo. Tampoco

Palacios et al. (2003) obtuvieron mayor contenido de antocianos en vinos de Cabernet Sauvignon y Syrah tratados con tres preparados enzimáticos.

**Gráfica V.1** Evolución de los antocianos totales desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones del año 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Descubre: 1-Oct-02, Fin Fermentación Alcohólica: 24-Oct-02, Fin Fermentación Maloláctica: 15-Nov-02.

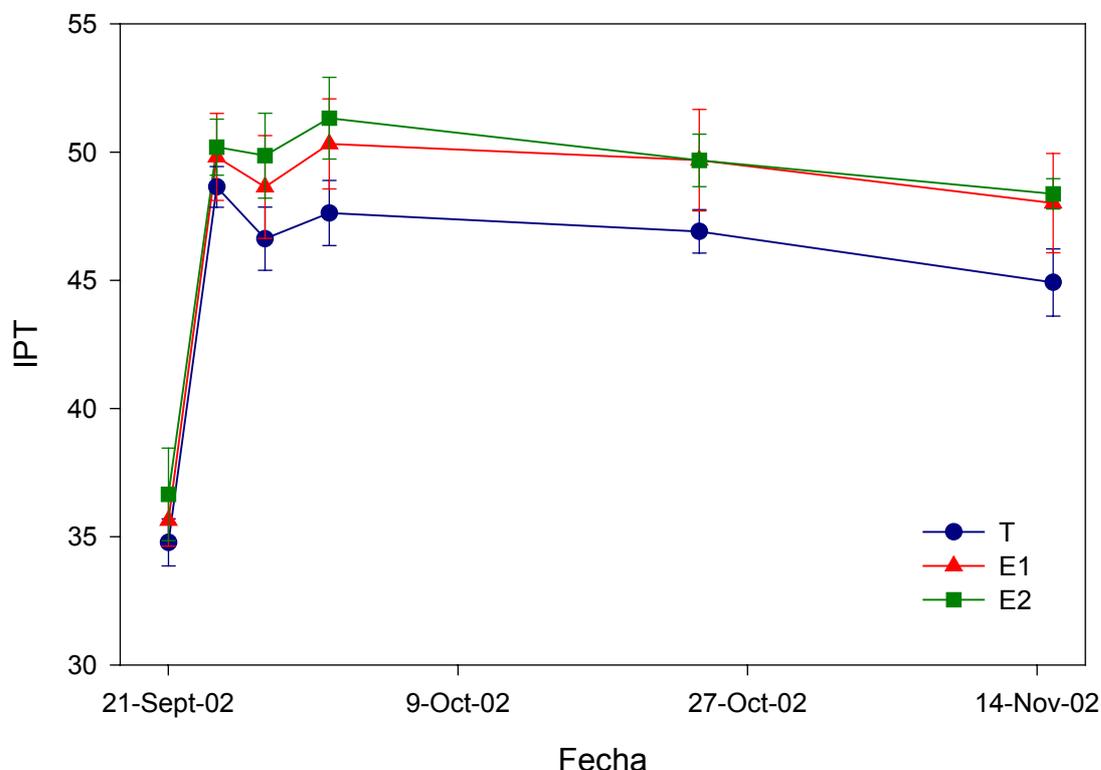


### V.2.3.1.2 Índice de polifenoles totales (IPT)

La extracción de fenoles totales es continua durante los 15 días de maceración, aunque esta extracción es más acusada durante los primeros días de fermentación. Con la adición de enzimas se consiguen valores del índice de polifenoles totales mayores que en el vino testigo, desde el comienzo de la fermentación hasta final de maceración, resultado encontrado también por Parley (1997). Pardo et al. (1999) indicaron que con la utilización enzimas se

extraen más fenoles de las partes sólidas de la uva. La disgregación de las paredes celulares provocada por los enzimas, favorece la degradación de los tejidos y la disolución del contenido de la pared celular, incluyendo antocianos y otros compuestos fenólicos, especialmente taninos condensados y ligados a polisacáridos. Cuando la maceración ya está más avanzada, el etanol y no los enzimas sería el responsable de la continua extracción de taninos. Según Valdés Sánchez y Regodón Mateos (1994) la mayor o menor rapidez con que se extraigan los compuestos fenólicos influye en gran medida en las diferentes combinaciones que puedan presentar estos compuestos y por consiguiente, en las características cromáticas que presente el vino.

**Gráfica V.2** Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones del año 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Descubre: 1-Oct-02, Fin Fermentación Alcohólica: 24-Oct-02, Fin Fermentación Maloláctica: 15-Nov-02.



Durante la maceración, las mayores diferencias en el contenido de fenoles totales entre los tratamientos con enzimas y el testigo son encontradas entre el día 9 y 15, mostrando además el vino elaborado con E2 mayores valores de estos compuestos que el elaborado con E1. Palacios et al. (2003), probando diferentes enzimas, obtuvieron una mayor liberación de taninos con la enzima más rica en proteasa ácida. Revilla y González-San José (2001) también observaron la actuación de los enzimas sobre otros compuestos fenólicos diferentes a los antocianos.

Después de maceración hasta final de fermentación maloláctica el contenido de fenoles totales sufre un ligero descenso, disminuyendo las diferencias entre los vinos tratados con enzimas, aunque siguen mostrando valores más altos que el testigo.

Se debe destacar que el contenido de fenoles y antocianos obtenidos en las vinificaciones del 2002 al final de fermentación alcohólica son más bajos que en el 2001, lo cual puede ser debido al mayor tamaño de grano presentado por la uva del 2002, ya que va a proporcionar una relación sólido/líquido más baja, dando lugar a vinos con menor intensidad de color y también, menos oscuros. Por otro lado, aunque los vinos tratados con enzimas presentan características de color prácticamente similares al final de fermentación alcohólica en los dos años de elaboración, los estudios del año 2002 muestran que durante la maceración se comportan de manera diferente, ya que con la adición del enzima E2 la extracción de compuestos fenólicos es más rápida que con E1, pero también sufre mayor pérdida de estos compuestos con el avance de la fermentación.

#### **V.2.3.1.3 Intensidad de color y tono**

Durante la maceración, la intensidad de color entre los tratamientos con enzimas y el control también presenta la mayor diferencia sobre el día 3. El valor máximo de intensidad de color es alcanzado sobre el día 6, como consecuencia de la mayor concentración de antocianos y también a un alto

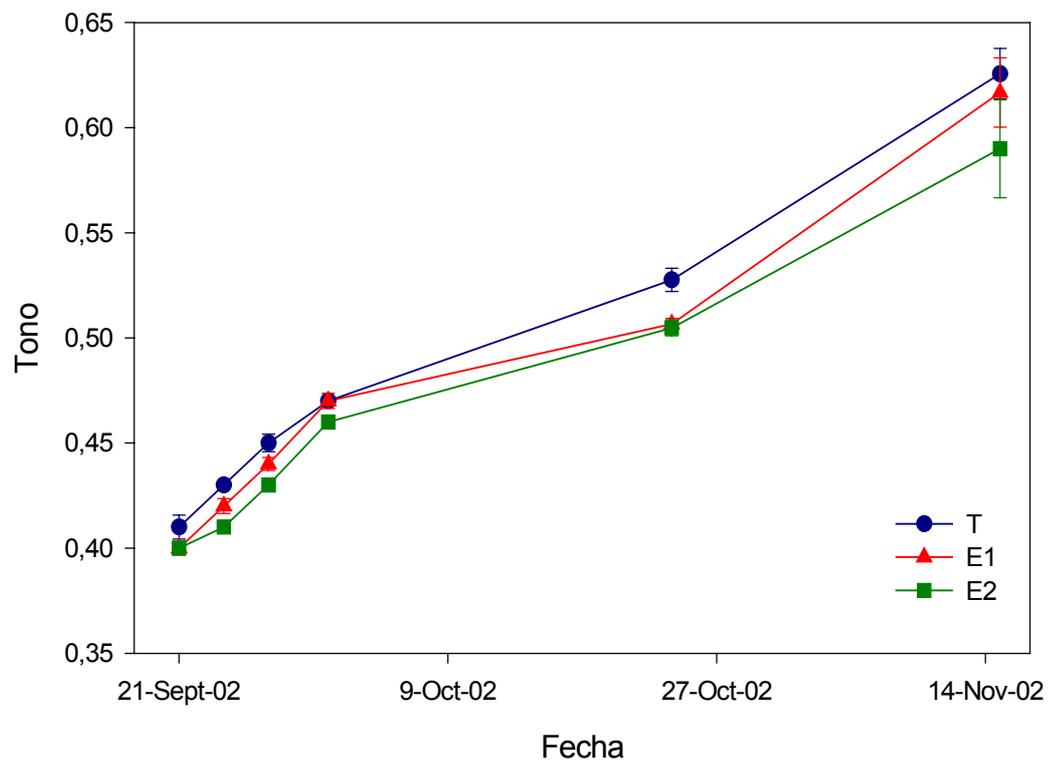
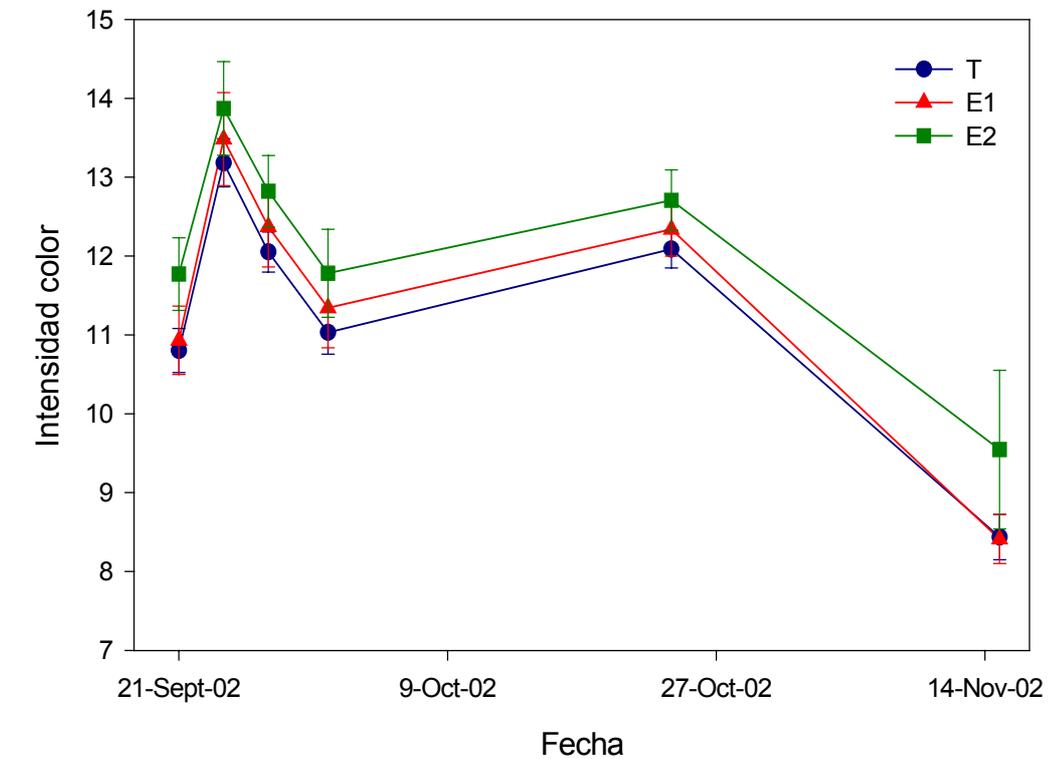
contenido de taninos en el medio. Después, tiene lugar un descenso en todas las vinificaciones hasta finalizar el tiempo de contacto. El tratamiento E2 muestra valores de intensidad de color superiores al tratamiento E1 y al testigo durante toda la maceración.

Otros autores, estudiando los efectos de la enzima Rapidase Excolor, también encontraron pequeños efectos de esta enzima sobre la intensidad de color (Wightman et al., 1997; Watson et al., 1999), aunque Clare et al. (2002) indicaron que la enzima Rapidase Excolor podría tener mayores efectos sobre las características de color del vino, cuando fuera aplicada a escala industrial.

Después de maceración hasta final de fermentación alcohólica, la intensidad de color se incrementa en todas las vinificaciones, debido posiblemente a la recuperación del color por parte de algunos antocianos incoloros al oxigenarse el vino, para volver a disminuir hasta final de fermentación maloláctica. En este momento, el vino E2 es el más coloreado, reduciéndose además las diferencias entre los vinos testigo y E1.

En cuanto al tono, se produce un incremento importante en los valores de este parámetro a lo largo de la vinificación como consecuencia de la continua extracción de los compuestos fenólicos de color amarillo durante la maceración y también a los procesos de oxidación y polimerización de estos compuestos. En general durante todo el proceso, los tratamientos con enzimas presentan un valor del tono más bajo que el testigo, resultado obtenido también por Pardo et al. (1999). Después de 15 días de maceración y al final de fermentación maloláctica, las diferencias en el valor del tono se reducen entre el tratamiento E1 y el testigo. El tratamiento E2 es el que muestra en todo momento, valores de tono más pequeños.

**Gráfica V.3** Evolución de la intensidad de color desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las vinificaciones del año 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Descubre: 1-Oct-02, Fin Fermentación Alcohólica: 24-Oct-02, Fin Fermentación Maloláctica: 15-Nov-02.



#### V.2.3.1.4 Parámetros L\*, a\* y b\*

Los parámetros L\*, a\* y b\* muestran una evolución similar en todos los vinos y alcanzan los valores más bajos al final de fermentación alcohólica coincidiendo con el incremento de la intensidad de color.

Una vez finalizada la fermentación alcohólica, al igual que ocurre después de maceración, no se observan grandes diferencias en los valores de estos parámetros entre los diferentes vinos. Al final de fermentación maloláctica, los valores de L\*, a\* y b\* se incrementan y además, también aumentan las diferencias entre los diferentes vinos, siendo E2 el vino más oscuro y con mayores tonalidades violetas (valores de L\* y b\* más bajos), no observándose en cambio, grandes diferencias entre los vinos testigo y E1.

**Tabla V.3** Cambios de los valores de L\*, a\* y b\* con sus desviaciones estándar de las distintas vinificaciones del año 2002 a los 15 días de maceración, fin de fermentación alcohólica (FFA) y fin de fermentación maloláctica (FFM).

Vinificación	Días	L*	a*	b*
T	15	17,9 ± 0,76	51,3 ± 0,85	30,3 ± 1,16
	FFA	14,4 ± 0,74	46,6 ± 0,97	24,6 ± 1,22
	FFM	19,7 ± 0,89	52,1 ± 0,9	32,1 ± 1,11
E1	15	17,9 ± 1,01	51,1 ± 1,13	30,3 ± 1,51
	FFA	14,5 ± 0,66	47,0 ± 0,78	24,9 ± 1,09
	FFM	20,0 ± 0,72	52,6 ± 0,7	32,6 ± 0,77
E2	15	17,1 ± 1,22	50,1 ± 1,46	29,2 ± 1,94
	FFA	14,4 ± 0,82	47,0 ± 1,00	24,7 ± 1,36
	FFM	18,1 ± 2,35	50,6 ± 2,39	29,9 ± 3,04

## **V.2.3.2 PARÁMETROS CROMÁTICOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS ELABORADOS EN EL 2002 DURANTE SU CONSERVACIÓN EN BOTELLA**

### **V.2.3.2.1 Parámetros de color espectrofotométricos**

La tabla V.4 muestra las características cromáticas de los vinos de 2002 en el momento del embotellado y a los 8 meses de envejecimiento en botella.

En el momento del embotellado, no se observan diferencias significativas en los parámetros de color entre los diferentes vinos, excepto en el contenido de taninos totales, que es mayor en los vinos tratados con enzimas. Todos los vinos experimentan un incremento en los valores de intensidad de color, debido posiblemente a la formación de compuestos de color violeta resultantes de la unión entre antocianos y taninos mediada por acetaldehído, haciendo por tanto a los vinos más oscuros (valores de  $L^*$  más bajos) que al final de fermentación maloláctica. En este momento, el vino E2 muestra una intensidad de color ligeramente mayor (aunque las diferencias no son significativas) que los vinos testigo y E1, lo cual puede ser debido a un estado de polimerización de los antocianos ligeramente mayor (Wightman et al., 1997). Todos los vinos presentan un elevado estado de polimerización de los taninos como indican los valores del índice de HCl y la fracción de taninos polímeros.

También fueron analizados el contenido de metanol y acidez total (datos no mostrados) de los diferentes vinos, siendo mayores en los vinos tratados con enzimas y estando por debajo del límite legal en el caso del metanol. Los preparados enzimáticos comerciales pueden contener actividad pectin-metil-esterasa que produce la liberación de metanol y también pueden generar una mayor extracción de los ácidos presentes en las vacuolas y la liberación del ácido galacturónico por degradación de las pectinas, dando lugar a aumentos en la acidez total (Revilla y González-San José, 1998 y 2002a; Pérez-Magariño y González-San José, 2000).

Después de ocho meses en botella, siguen produciéndose procesos de degradación de los compuestos fenólicos, como reflejan los descensos en la concentración de antocianos y sus respectivas fracciones, de los taninos polímeros y en los valores del índice de clorhídrico, dando lugar por tanto a vinos con menor intensidad de color y mayor tono. En este momento, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos con enzimas, aunque estos vinos muestran valores de IPT, taninos monómeros y taninos totales mayores que el vino testigo, y valores de tono ligeramente más bajos. Pardo et al. (1999) y Palacios et al. (2003) observaron, que tras un periodo largo de maduración, tenía lugar una pérdida en el contenido de compuestos fenólicos, dando vinos más claros, pero los vinos tratados con enzimas mostraban significativamente mayor contenido de antocianos, taninos y mayor de intensidad de color y un tono más bajo que el vino control, demostrando que el vino tratado con enzima evoluciona más lentamente que el control.

Revilla y González-San José (2001) indicaron que, aunque la presencia de enzimas modifique el proceso de extracción de los compuestos fenólicos, alterando el color desde el principio de maceración, esto no implica, que los vinos resultantes tengan siempre mayor intensidad de color. En algunas ocasiones se produce una gran extracción de antocianos durante la elaboración, que posteriormente se pierden si no son estabilizados por otros compuestos del vino. Pero también es posible el caso contrario, un incremento de color durante el almacenamiento si el enzima promueve la extracción de otros compuestos de la uva (procianidinas) que inducen la formación de compuestos coloreados estables.

**Tabla V.4** Cambios de los parámetros cromáticos de los vinos de 2002 en el momento de su embotellado y transcurridos 8 meses en botella. Letras diferentes en la misma fila y para cada periodo estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color, IC\*: intensidad de color corregida, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, TT: taninos totales, %520: porcentaje de color rojo, %420: porcentaje de color amarillo, %620: porcentaje de color azul.

Parámetros	T	E1	E2	T	E1	E2
	t=0 meses botella			t=8 meses botella		
IC	9,9 a	9,9 a	11,1 a	9,7 a	9,9 a	9,8 a
IC*	8,8 a	8,8 a	9,8 a	8,5 a	8,7 a	8,6 a
Tono	0,61 a	0,60 a	0,60 a	0,69 a	0,66 a	0,67 a
%420	37,7 a	37,5 a	37,3 a	40,6 a	39,8 a	40,2 a
%520	62,3 a	62,5 a	62,7 a	59,4 a	60,2 a	59,8 a
%620	11,0 a	10,5 a	11,3 a	13,1 a	12,4 a	12,4 a
IPT	44,1 a	47,8 b	47,4 ab	42,7 a	46,2 b	47,3 b
AM (mg/L)	99,0 a	109,0 a	97,4 a	90,7 a	93,7 a	98,2 a
AP (mg/L)	80,9 a	78,0 a	92,1 a	96,9 a	97,1 a	98,9 a
AT (mg/L)	364,2 a	389,1 a	369,5 a	255,3 a	255,4 a	272,8 a
L*	15,8 a	16,5 a	14,1 a	13,3 a	13,9 a	14,2 a
TM (mg/L)	54,3 a	78,8 a	75,2 a	63,3 a	78,1 ab	91,7 b
TO (mg/L)	203,0 a	180,0 a	174,9 a	126,4 a	116,8 a	126,1 a
TP (mg/L)	690,3 a	689,3 a	716,2 b	375,5 a	501,4 a	464,4 a
TT (g/L)	1,7 a	1,9 b	2,0 b	1,6 a	1,9 b	2,0 b
Índice HCl	32,9 a	28,9 a	35,6 a	32,1 a	31,3 a	27,0 a

Aunque nosotros no hemos encontrado diferencias significativas durante el periodo de conservación de los vinos, parece observarse una tendencia a que el vino tratado con el enzima E1 presente un color más estable, pues evoluciona muy poco en ocho meses en botella, mostrando además, los

valores más altos de %520 y los más bajos de %420. Tal vez esto pueda ser debido una mayor extracción por parte de este enzima de más taninos, los cuales bloqueen y estabilicen a los antocianos y al color. Además, éste vino junto con E2, poseen un valor del índice de polifenoles totales más alto que el testigo, confiriéndole al vino mayor sensación de cuerpo y estructura.

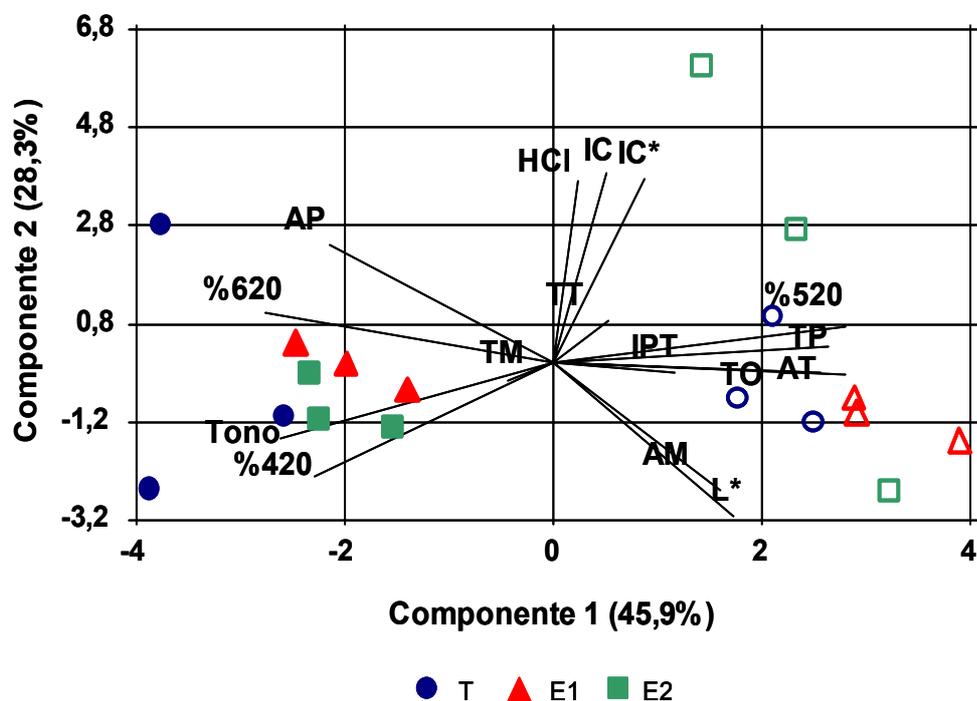
Zamora (2003a) citando a Canal-Llaubères (1990) y Alliata (1995), indica que con el empleo de tiempos de maceración cortos, los vinos tratados con enzimas presentan un claro incremento en el contenido de compuestos fenólicos, antocianos e intensidad de color. En cambio, en el caso de maceración prolongada, las diferencias, aunque también son favorables para el vino tratado con enzimas, son relativamente más pequeñas y esto coincide con nuestras observaciones. Los enzimas podrían ser más útiles en casos de vendimias no muy maduras, para acelerar la extracción del color y parte de los taninos de la piel en las primeras fases de la maceración. Así se obtienen vinos con suficiente color sin necesidad de forzar la maceración, evitando una fuerte extracción de los taninos de las semillas, los cuales le proporcionarían al vino mayor astringencia y dureza. En el caso de la uva madura, como los antocianos son más fácilmente extraíbles, se pueden utilizar maceraciones más largas sin riesgo de obtener un exceso de astringencia, pero en este caso la eficacia de la utilización de los enzimas resultaría más dudosa.

Tal vez para conseguir un efecto más importante con los enzimas en la elaboración de vinos tintos sería necesario incrementar la dosis aplicada como han comprobado otros autores (Revilla y González-San José, 2002a, 2003a y 2003b).

El análisis de componentes principales de los 3 vinos durante el periodo de envejecimiento (Gráfica V.4) mostró que todos los vinos disminuyeron sus valores principalmente a través de la componente 1 (decreciendo  $L^*$ , %520, taninos totales y sus respectivas fracciones, antocianos totales y monómeros y el índice de polifenoles totales e incrementando el contenido de antocianos polímeros y el %620) excepto E2 que lo hace también a través de la componente 2, sufriendo un gran descenso en los valores de intensidad de

color y un gran incremento en los valores del porcentaje de color amarillo y de tono, es decir, mostrando una evolución de su color mucho más rápida. En el momento del embotellado, el vino E2 muestra una separación clara respecto los vinos testigo y E1, presentando mayor intensidad de color. Después de 8 meses en botella, el vino testigo muestra peor perfil cromático que los vinos tratados con enzimas a pesar de tener valores más altos de %620, mientras que E1 es el vino con mayor intensidad de color y menor tono.

**Gráfica V.4** Distribución de los vinos elaborados en el 2002 durante su envejecimiento en botella en un sistema de coordenadas bidimensional definido por dos componentes principales (el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal es mostrado entre paréntesis). Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, HCl: índice de clorhídrico, %520: porcentaje de color rojo, %620: porcentaje de color azul, %420: porcentaje de color amarillo, símbolos blancos: t=0 meses, símbolos oscuros: t=8 meses.



### V.2.3.2.2 Compuestos fenólicos individuales

La tabla V.5 muestra los valores de compuestos fenólicos individuales en los vinos de 2002 en el momento del embotellado y después de 8 meses de envejecimiento en botella.

En el momento del embotellado, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos con enzimas respecto al vino control en el contenido total de antocianos monoglucósidos, ácidos hidroxibenzoicos, flavan-3-oles y flavonoles. Parley (1997) encontró que los vinos tratados con enzimas presentaban valores más altos de ácido gálico que el vino testigo, aunque las diferencias no eran significativas, resultado similar al observado por nosotros. El vino E1 presenta mayor contenido de cutárico y caftárico y bajo de cafeico, como también mostraron Revilla y González-San José (2003b) con esa misma enzima (Rapidase Excolor). La medida de la concentración de ácido cafeico puede dar una idea de un tipo de actividad presentada por las enzimas de maceración, ya que cuando estas enzimas muestran actividad fenol esterasa, los vinos tratados con enzimas presentan significativamente más ácido cafeico y menos ácido caftárico (Wightman et al., 1997).

Los vinos tratados con enzimas muestran una concentración en quercetina mayor que el vino testigo, resultados coincidentes con el trabajo de Watson et al. (1999), mientras que el ácido cafeico es mayor en el vino testigo.

También, los enzimas pueden presentar actividad  $\beta$ -glucosidasa, la cual actúa sobre el anillo B de la malvidina -3-glucosido generando ácido siríngico (Piffaut et al., 1994). El similar contenido de estos ácidos en los vinos tratados con enzimas respecto el vino control, es indicativo de la pequeña presencia de estos tipos de actividad.

Después de ocho meses en botella, se observa un descenso importante en el contenido de antocianos monoglucósidos, pero sin mostrar diferencias significativas entre los vinos tratados con enzimas y el testigo.

**Tabla V.5** Compuestos fenólicos medidos en mg/L por HPLC de los vinos de 2002 en el momento de su embotellado y después de 8 meses en botella. Letras diferentes en la misma fila y para cada periodo estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ .

Compuestos fenólicos	T	E1	E2	T	E1	E2
	t=0 meses botella			t=8 meses botella		
Ácido gálico	15,7 a	18,2 a	18,2 a	19,1 a	23,0 ab	23,3 b
Ácido siríngico	2,8 a	2,6 a	2,6 a	2,8 a	2,7 a	2,5 a
Ácido protocatéquico	10,3 b	9,5 ab	8,7 a	14,4 a	15,0 a	13,2 a
ΣÁcidos hidroxibenzoicos	28,9 a	30,0 a	29,5 a	36,3 a	40,7 b	39,1 ab
Ácido cafeico	2,3 b	2,1 a	2,1 a	1,9 a	2,1 ab	2,4 b
Ácido ferúlico	0,38 a	0,37 a	0,36 a	0,43 b	0,38 a	0,34 a
Ácido p-cumárico	2,9 a	2,6 a	2,9 a	3,9 a	3,5 a	3,6 a
ΣÁcidos hidroxicinámicos	5,6 b	5,1 a	5,4 a	6,2 a	6,0 a	6,4 a
Ácido caftárico	8,4 ab	8,8 b	8,0 a	8,3 a	8,7 a	7,9 a
Ácido cutárico	2,1 ab	2,4 b	2,0 a	2,3 ab	2,5 b	2,2 a
ΣÉsteres hidroxicinámicos	10,6 ab	11,2 b	10,0 a	10,6 a	11,2 a	10,1 a
Catequina	12,3 a	14,0 a	11,4 a	13,4 b	10,5 ab	7,2 a
Epicatequina	8,4 a	9,2 a	8,1 a	7,2 a	6,7 b	4,8 a
ΣFlavan-3-oles	20,7 a	23,2 a	19,5 a	20,6 b	17,2 ab	12,0 a
Rutina	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Quercitrina	0,32 a	0,33 a	0,35 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Miricitina	6,6 a	6,5 a	6,2 a	8,8 a	9,8 a	9,5 a
Quercetina	3,9 a	4,6 ab	6,5 b	5,3 a	6,5 ab	8,2 b
Kampferol	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
ΣFlavonoles	10,8 a	11,5 a	13,1 a	14,2 a	16,4 ab	17,8 b
Delfinidina-3-Glucósido	10,0 a	11,9 a	10,0 a	4,8 a	5,3 a	5,8 a
Cianidina-3-Glucósido	2,5 a	2,9 a	2,5 a	1,5 a	1,6 a	1,8 a
Petunidina-3-Glucósido	19,1 a	22,1 a	17,9 a	8,4 a	9,0 a	10,2 a
Peonidina-3-Glucósido	9,8 a	11,4 a	9,3 a	4,9 a	5,2 a	5,9 a
Malvidina-3-Glucósido	81,6 a	62,4 a	74,3 a	34,6 a	36,2 a	41,0 a
ΣAntocianos	123,0 a	140,7 a	114,0 a	54,3 a	57,3 a	64,8 a

En el caso de los flavan-3-oles, éstos descienden solamente para los vinos tratados con enzimas, mostrando el vino E2 valores más bajos que el testigo. Estos compuestos son altamente reactivos y están involucrados en procesos de condensación y polimerización entre ellos mismos y con los antocianos y también en reacciones de oxidación. La concentración de los ácidos hidroxibenzoicos se incrementa como consecuencia de la hidrólisis de sus correspondientes ésteres, siendo dicho incremento mayor para los vinos tratados con enzimas. Algunos flavonoles también aumentan debido a la hidrólisis de sus correspondientes formas glucosiladas, presentando de nuevo los vinos tratados con enzimas valores más altos que el testigo. Revilla y González-San José (2002b y 2003b) también encontraron mayores niveles de ácidos fenólicos y flavonoles en vinos tratados con enzimas tras doce meses de envejecimiento en botella. Los ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres prácticamente se mantienen constantes, siendo el vino E2 el que presenta el valor de ácido cafeico más alto. Un mayor contenido tanto de los ácidos fenólicos como de los flavonoles puede tener un efecto positivo sobre el color, al generar copigmentos con los antocianos (Darias-Martín et al., 2001), los cuales siguen formándose, aunque en menor proporción, durante el envejecimiento (Hermosin-Gutierrez, 2003).

### **V.2.3 ANÁLISIS SENSORIAL**

En las gráficas V.5, V.6 y V.7 se presentan los resultados de la cata descriptiva de los vinos elaborados en la campaña de 2002 en el momento de su embotellado y transcurridos 8 meses en botella. En cada una de las gráficas se puede observar el análisis de fase visual, olfativa y gustativa de los diferentes vinos.

La intensidad de cada uno de los atributos fue valorada en una escala de cero a diez, dando mayor puntuación a mayor sensación. Para facilitar la

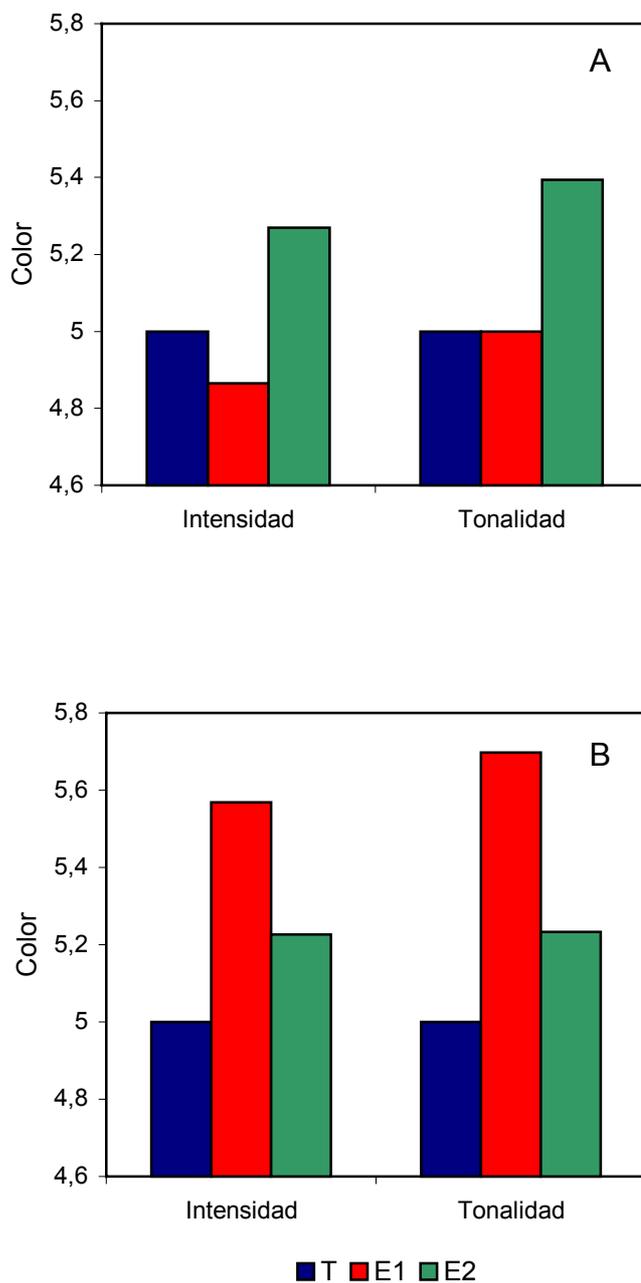
compresión de los resultados, las puntuaciones del vino testigo fueron normalizadas a un valor de cinco, comparando los vinos elaborados con enzimas comerciales con él.

Con respecto al color, en el momento del embotellado, E2 es el vino de mayor intensidad, con mayores tonalidades violetas, en cambio el vino E1, presenta una intensidad de color más baja que el testigo pero igual tonalidad. Después de ocho meses en botella, los tratamientos con enzimas muestran una intensidad y tonalidad superior al vino testigo, mostrando esta vez el vino E1 los valores más altos.

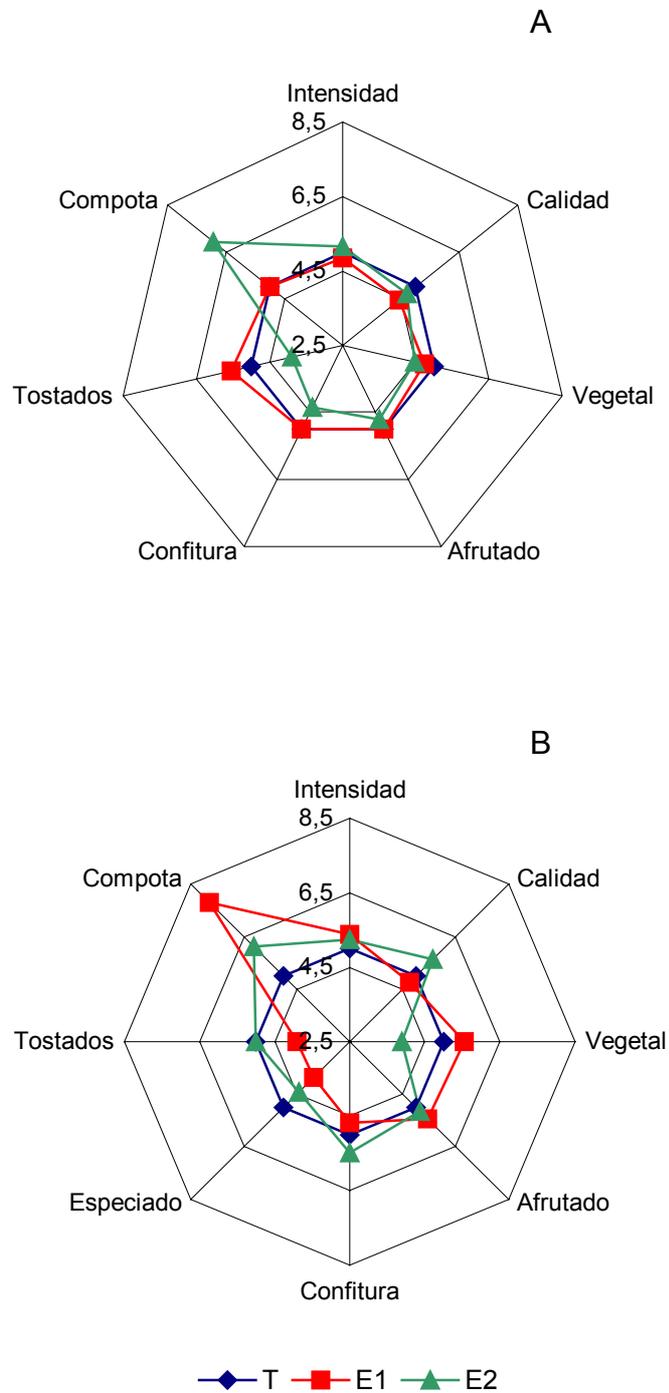
En cuanto al aroma, en el momento del embotellado, todos los vinos presentan una intensidad similar, mientras que la calidad es un poco inferior en los tratamientos con enzimas. El vino E2, muestra menor sensación a vegetal, fruta, confitura y a tostado, pero mayor sensación a compota. El vino E1 presentó características aromáticas muy similares al vino testigo, pero con mayor sensación a tostado. Después de ocho meses en botella, la intensidad aromática sigue siendo prácticamente similar para todos los vinos, pero es el vino E2 el de mayor calidad, con menores sensaciones a vegetal y a tostado que el vino testigo y más con recuerdos a confitura. El vino E1 muestra mayores sensaciones a vegetal y compota y menores recuerdos a confitura, tostados y especiados que el vino testigo y E2.

En boca, en el momento del embotellado, todos los vinos presentan similar intensidad y persistencia, pero el vino E1 muestra menor calidad y equilibrio, siendo el vino más amargo, astringente, de mayor sequedad y verdor y por tanto el menos maduro. Los vinos testigo y E2, muestran sensaciones muy similares en boca, pero el vino E2 tiene más cuerpo y es menos amargo y astringente. Después de ocho meses en botella, no se observan grandes diferencias en cuanto a la intensidad y calidad de los vinos. El vino E2 está menos equilibrado, más amargo, astringente y seco que en el momento de su embotellado. El vino E1 sigue siendo el menos equilibrado lo cual puede estar relacionado con la gran sequedad, astringencia y verdor que causa en boca pero incrementa su calidad.

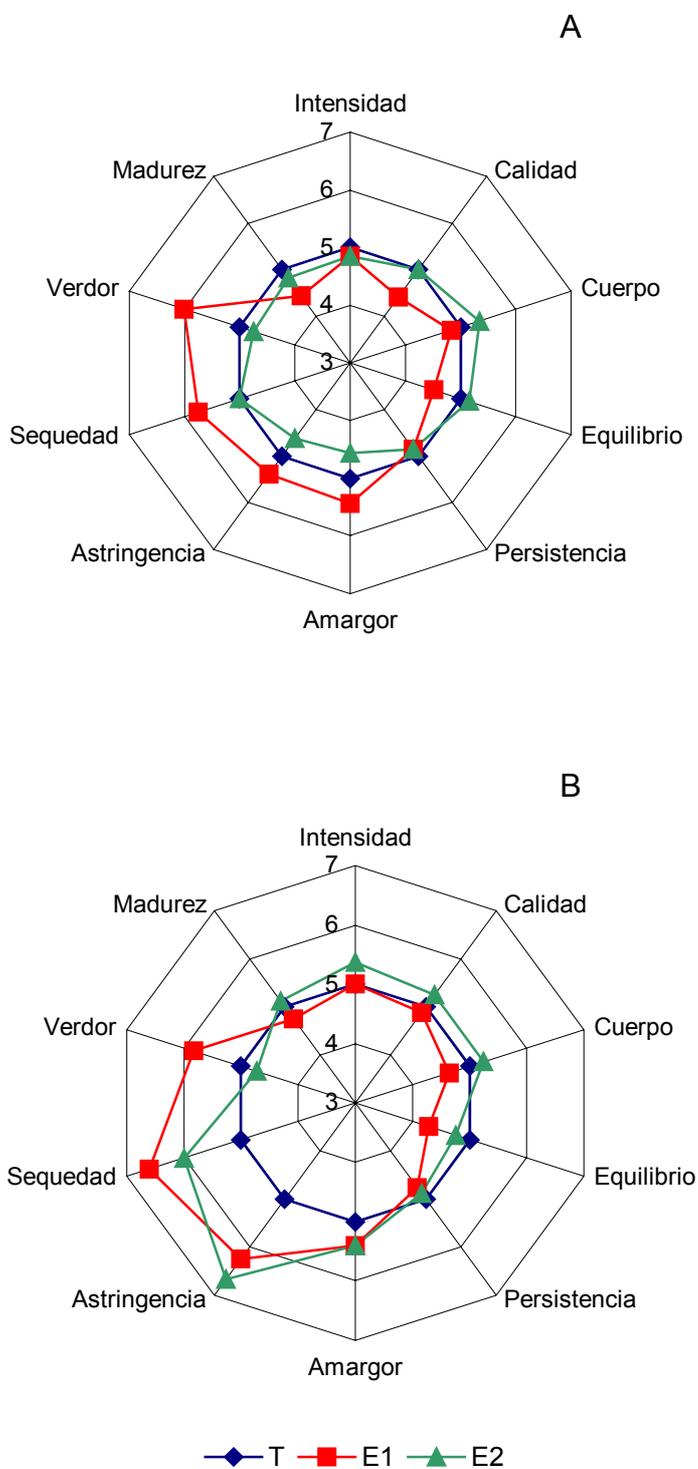
**Gráfica V.5** Evaluación sensorial de la intensidad y tonalidad del color de los vinos elaborados en el 2002 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.



**Gráfica V.6** Evaluación sensorial del aroma de los vinos elaborados en el 2002 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.



**Gráfica V.7** Evaluación sensorial del gusto de los vinos elaborados en el 2002 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.



Watson et al. (1999) encontraron que los vinos tratados con enzimas en general presentaban mayor intensidad de color y tonalidad violacea, con mayores sensaciones a fruta, vegetal, siendo vinos más amargos, ácidos, astringentes y mayor cuerpo. Nosotros también encontramos mejores características de color y mayor contenido de compuestos fenólicos en los vinos tratados con enzimas durante el proceso de vinificación, aspecto muy importante a tener en cuenta ya que son vinos que van a ser sometidos a procesos de envejecimiento en barrica. Pero también es muy importante en un vino tinto la estabilidad del color, la cual ha sido más notable con la aplicación del enzima Rapidase Excolor (E1). Tal vez sería necesario como proponen otros autores emplear una dosis más alta de enzima para obtener resultados más eficaces ya que en relación coste-efectividad es una herramienta segura para mejorar la calidad de los vinos tintos.



## **VI. INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE TANINOS ENOLÓGICOS EN EL COLOR DEL VINO**



## **VI.1 INTRODUCCIÓN**

El nombre genérico de taninos engloba una mezcla heterogénea de compuestos fenólicos con un peso molecular comprendido entre 500-3000 daltons y con variada composición química.

El término tanino procede muy probablemente del vocablo celta "Tan", que significa roble. Bajo este término genérico se incluyen muchas otras familias de moléculas cuya única característica común es la de presentar la capacidad de unirse a las proteínas.

La utilización de tanino enológico como coadyugante para la clarificación de los vinos blancos es una técnica muy antigua. Su utilidad para evitar el sobreencolado que genera el uso de la gelatina es indiscutible y por esta razón ha sido utilizado ampliamente en bodega para tal fin. No obstante, en los últimos tiempos su empleo estaba cayendo en desuso al verse desplazada la gelatina por otros clarificantes como la bentonita y el gel de sílice.

El tanino enológico ha cobrado una nueva utilidad, basada en su participación en la estabilización del color de los vinos tintos. Su uso en la vinificación en tinto es aconsejado por muchos profesionales y paralelamente a ello, la presencia de diferentes preparados a base de tanino enológico crece continuamente en los catálogos de las empresas suministradoras.

### **VI.1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS**

Los taninos enológicos pueden clasificarse en dos grandes grupos: taninos condensados o procianidinas y taninos hidrolizables. A su vez, los taninos hidrolizables se subdividen en taninos gálicos o galotaninos y en taninos elágicos o elagitaninos.

### VI.1.1.1 TANINOS CONDENSADOS O PROCIANIDINAS

Los taninos condensados son los taninos naturales de la uva y del vino. Ellos son, por tanto, los responsables de la astringencia, de parte del sabor amargo, del cuerpo o estructura y naturalmente de la estabilización del color del vino tinto, gracias a su capacidad para combinarse con los antocianos. Por tanto, la principal fuente de taninos condensados del vino es la propia uva. No obstante, existen otras fuentes vegetales de tanino condensado como el quebracho, aunque este último aporta también algo de tanino elágico.

La Figura VI.1 muestra la estructura química de los taninos condensados. En ella se puede comprobar que los taninos condensados son, en realidad, polímeros de la (+)-catequina y (-)-epicatequina. Algunas unidades del polímero pueden incluir un grupo OH suplementario (R1 en la Figura). En este caso se hablaría de galocatequina y/o epigalocatequina. Si la molécula incluye tan sólo unidades de catequina y/o epicatequina, se denomina procianidina, mientras que si se incluyen unidades de galocatequina y epigalocatequina se denomina prodelfinidina (Souquet et al., 1996; Cheynier et al., 2000b).

Asimismo, algunas unidades del polímero pueden incluir una molécula de ácido gálico esterificada en el carbono 3 (R2 en la Figura). En este caso hablaríamos de una unidad de catequina galoilada (Souquet et al., 1996; Cheynier et al., 2000b).

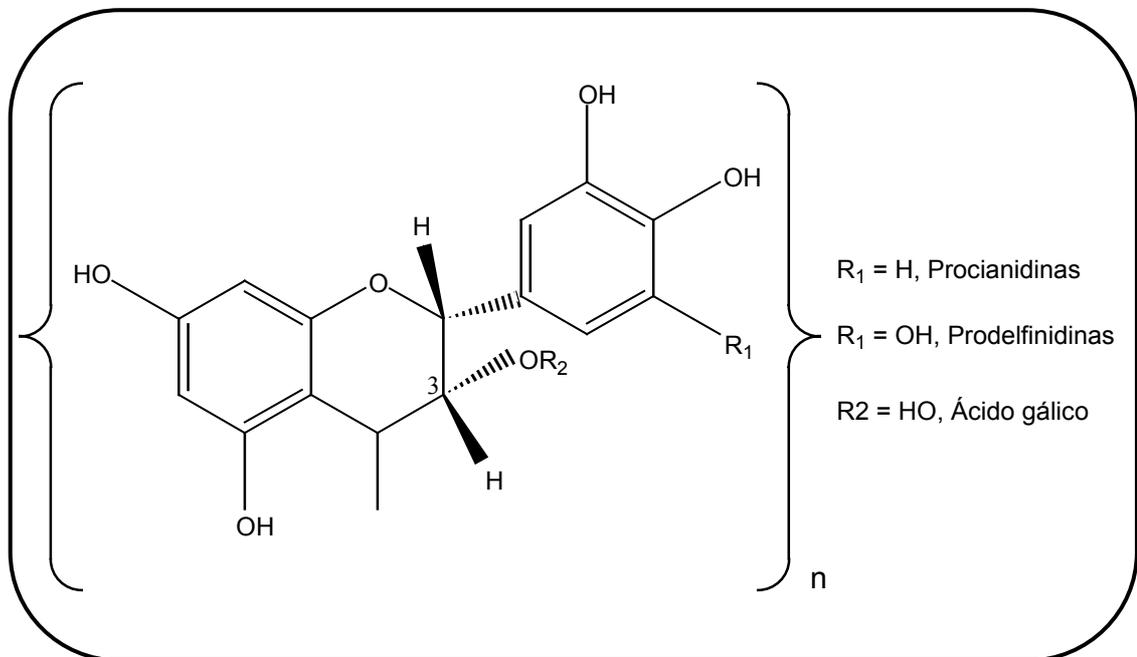
Estas moléculas pueden presentar un número muy elevado de unidades, ya que los grados de polimerización medios son del orden de 11 en las semillas (Poinsaut, 2000) y de 30 en los hollejos (Sarni Manchado et al., 1999), si bien el grado de polimerización medio en los vinos se sitúa alrededor de 7 (Ribéreau Gayon et al., 1998a).

Las semillas de la uva contienen exclusivamente procianidinas, mientras que los hollejos contienen procianidinas y también prodelfinidinas. A su vez, la procianidinas de las semillas contienen un cierto nivel de unidades galoiladas, mientras que las de la piel no (Cheynier et al., 2000b; Vivas, 2001).

Evidentemente, gran parte de las propiedades químicas, así como sus implicaciones sensoriales dependen de la estructura de estas moléculas.

El grado de polimerización, así como la presencia de unidades galoiladas parece ejercer una gran influencia sobre la astringencia. Así, ésta crece con el grado de polimerización y también con el porcentaje de unidades galoiladas (Cheynier et al., 2000b).

**Figura VI.1** Estructura química de los taninos condensados.

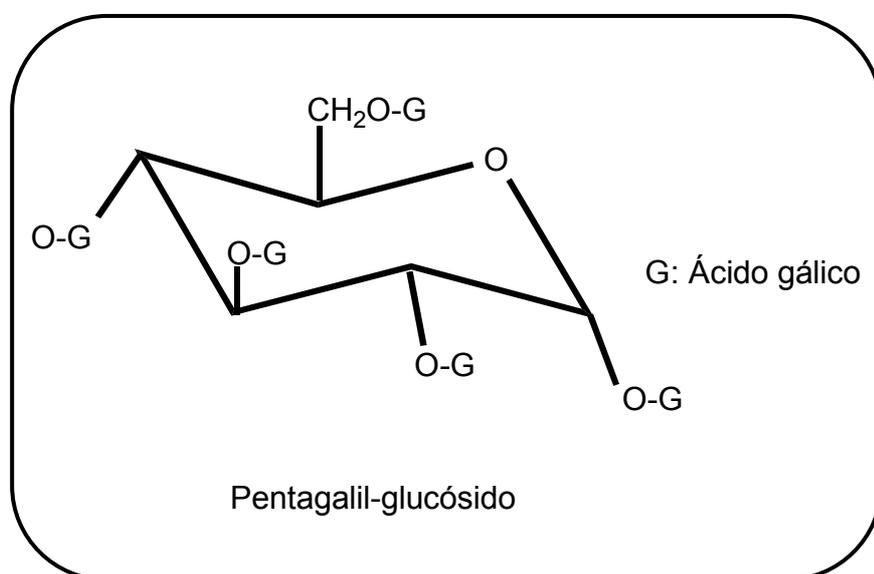


### VI.1.1.2 TANINOS HIDROLIZABLES

Los taninos hidrolizables no se encuentran de forma natural en la uva, si bien pueden estar presentes en el vino gracias al contacto del mismo con la madera de las barricas (Vivas, 2001). La Figura VI.2 muestra la estructura química de los taninos gálicos o galotaninos. En ella se puede ver que estas moléculas presentan una composición relativamente más simple que los

taninos condensados. Básicamente, consisten en una molécula de glucosa que tiene sus grupos OH esterificados en mayor o menor medida con el ácido gálico. Las principales fuentes de taninos gálicos son la nuez de agallas, la tara y el miribalano, aportando esta última fuente vegetal también algo de tanino elágico.

**Figura VI.2** Estructura química de los taninos gálicos o galotaninos.

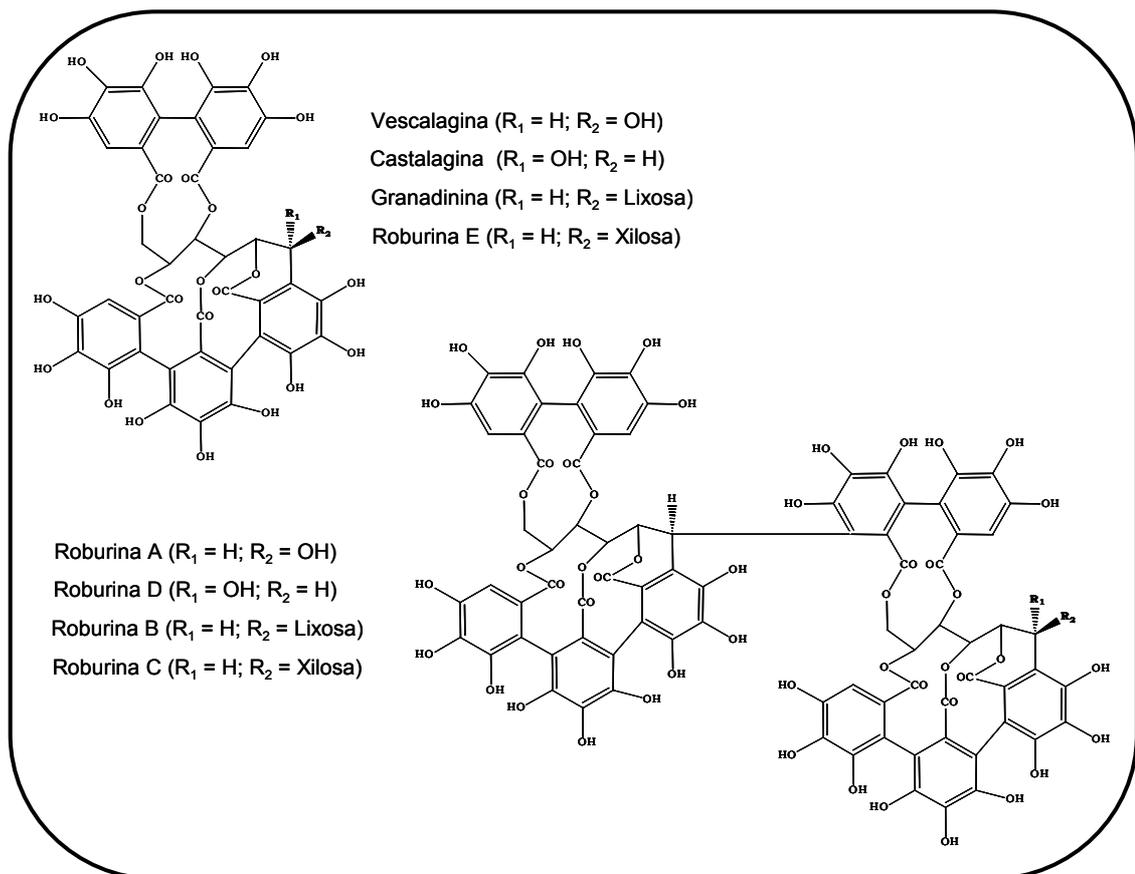


La Figura VI.3 muestra la estructura química de los taninos elágicos o elagitaninos. Como se puede ver, su estructura es más compleja. Las principales fuentes de estos taninos son la madera de roble y de castaño. Los preparados de tanino de quebracho y de mirobalano también aportan ciertas cantidades de tanino elágico

En cuanto a la contribución organoléptica, los taninos gálicos presentan sabor amargo y son ligeramente astringentes. Afortunadamente, la madera de roble no posee una gran cantidad de este tipo de taninos y por tanto su contribución al sabor del vino será mínima. Los taninos elágicos también

participan en la sensación de astringencia y añadido en exceso puede producir efectos negativos al marcar excesivamente el vino con lo que se denomina "sabor a tablón".

**Figura VI.3** Estructura química de ocho taninos elágicos o elagitaninos.



## VI.1.2 PROPIEDADES DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS

Las propiedades atribuidas a los taninos enológicos que pueden ser útiles en la elaboración del vino son múltiples. La propiedad más evidente de los taninos enológicos es la capacidad para unirse a las proteínas, razón por la

cual son utilizados en la industria del encurtido de las pieles y para la estabilización del vino blanco. El interés de su aplicación en vinos tintos sería fundamentalmente para estabilizar su color e incrementar su cuerpo, aunque también se ha sugerido otras aplicaciones como eliminación de los olores de reducción, limitación de la oxidación y efecto quelante.

#### **VI.1.2.1 EFECTO DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS SOBRE EL COLOR DEL VINO**

El efecto sobre el color del vino tinto depende del tipo de tanino utilizado. Los taninos condensados, al tener una naturaleza similar a las procianidinas naturales de la uva y del vino, pueden participar facilitando las combinaciones antociano-tanino y por tanto contribuir a la estabilización de su color. Sin embargo, los taninos gálicos y los taninos elágicos no pueden participar directamente en este tipo de proceso. Aun así, pueden contribuir a proteger a los antocianos de la oxidación, ya que son capaces de actuar regulando los fenómenos de oxidoreducción (Vivas, 1997) y también favoreciendo la condensación entre antocianos y taninos con acetaldehído. Al oxidarse ellos, protegerían a los antocianos de la oxidación, logrando de este modo que el vino tenga al final del proceso una mayor concentración de estos compuestos. Otro aspecto a considerar es la posibilidad de que estos taninos contribuyan a incrementar el color del vino gracias al fenómeno de la copigmentación (Lempereur et al., 2002).

La bibliografía existente sobre el efecto de la adición de taninos sobre el color del vino no es muy amplia y en ocasiones contradictoria. Algunos autores constatan un efecto claro sobre el color del vino (Celotti et al., 2000; Pardo, 2001), mientras que otros dudan abiertamente sobre su utilidad (Delteil, 2000).

### **VI.1.2.2 EFECTO DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS SOBRE EL CUERPO Y LA ESTRUCTURA DEL VINO**

El efecto de los taninos enológicos sobre el cuerpo y la estructura del vino parece ser evidente, ya que en la mayoría de los casos, al adicionar taninos al vino, si que se observa un aumento del índice de polifenoles totales (IPT), así como un incremento de la sensación de cuerpo y estructura (Pardo, 2001). Para conseguir estos efectos, los taninos condensados y los taninos elágicos parecen ser los más aconsejables (Vivas, 1997). Aun así, se recomienda prudencia en su aplicación, ya que la adición en exceso de producto pueden aportar al vino algo de dureza y un cierto sabor amargo (Delteil, 2000).

### **VI.1.2.3 EFECTO DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS SOBRE LOS OLORES A REDUCCIÓN**

Uno de los motivos de aparición a aromas a reducido durante la fermentación es debido a bajos niveles del potencial redox en los mostos. Los taninos son sustancias electroactivas que, añadidas al vino o al mosto, son capaces de provocar, en ausencia de oxígeno, variaciones de potencial de oxidoreducción. Por otra parte, también los taninos hidrolizables se transforman en quinonas, que van a formar peróxidos que oxidarán compuestos con grupos tiol como el disulfuro, etanotiol, metanotiol, disminuyendo o eliminando así los compuestos responsables del mal olor en el vino. Parece ser que los taninos hidrolizables son los más eficaces para eliminar estos olores a reducción (Vivas, 1997).

#### **VI.1.2.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS**

Los taninos enológicos presentan un elevado poder antioxidante ya que son capaces de reducir tanto la actividad tiroxinasa de la uva como las lacasas fúngicas. La actividad anti-lacasa de los taninos enológicos puede ser de gran utilidad en vendimias afectadas por *Botrytis cinerea*, en las que el riesgo de pérdida de color por la acción de la enzima lacasa es verdaderamente elevado (Leske, 1993).

Los taninos enológicos y especialmente los hidrolizables, sirven de antioxidantes naturales, reforzando la acción protectora de anhídrido sulfuroso y manteniendo su fracción libre por más tiempo en comparación con vinos donde no han sido adicionados.

#### **VI.1.2.5 EFECTO QUELANTE DE LOS TANINOS ENOLÓGICOS**

Los taninos enológicos poseen en sus estructuras grupos hidroxilo capaces de formar complejos con cationes metálicos como el  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ . Estos complejos precipitan, conduciendo así a la eliminación de parte de los metales presentes en los vinos. Los taninos hidrolizables tienen un efecto quelante mayor que los condensados.

## **VI.2 RESULTADOS**

Se llevaron a cabo tres vinificaciones, una vinificación testigo (T) y otras dos con dos taninos comerciales, uno del tipo galotanino, Gallo tanin B (Lamothe Abiet Pinosa), (T1) y otro del tipo proantociánico, Gallo tanin R (Lamothe Abiet Pinosa), (T2). Los vinos se elaboraron en la vendimia de 2002 en depósitos de 12 litros, por triplicado, a partir de 10 kg de uva, con un tiempo de maceración de 15 días. La adición de estos taninos se realizó al comienzo de la maceración y la dosis aplicada fue de 15 g/Hl para el Gallo tanin B y de 40 g/Hl para el Gallo tanin R (dosis recomendada por los suministradores).

### **VI.2.1 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DURANTE LA VINIFICACIÓN**

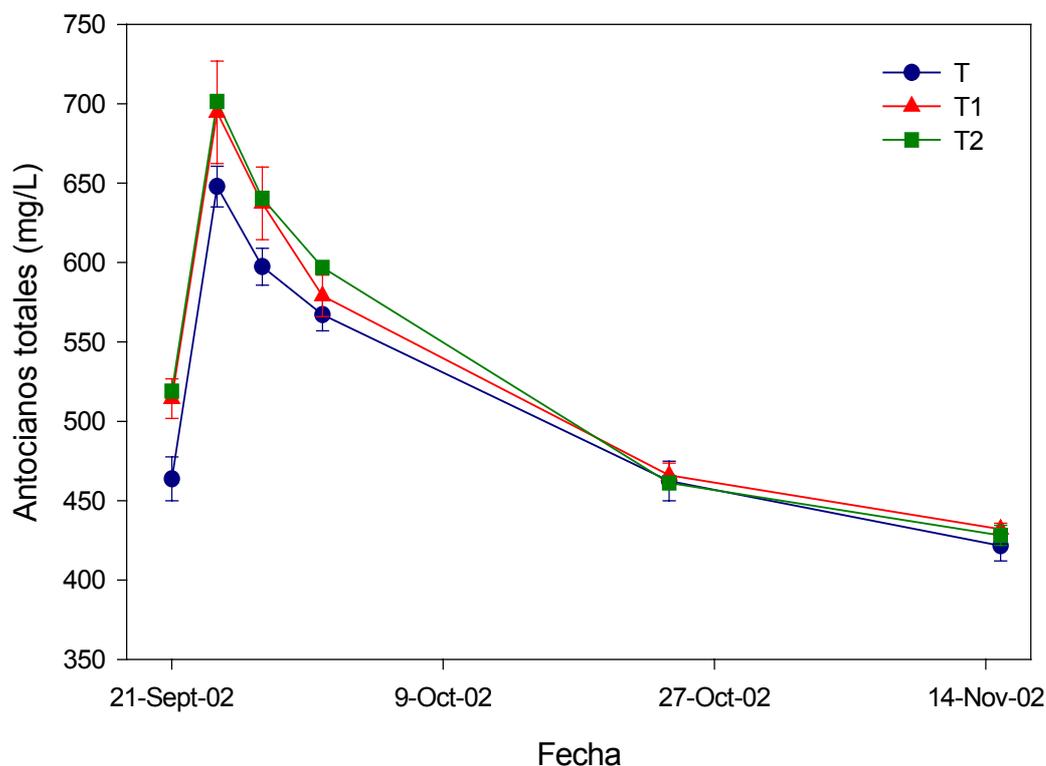
En las gráficas VI.1, VI.2 y VI.3 y en la tabla VI.1 se puede observar la evolución de los valores de antocianos totales, índice de polifenoles totales, intensidad de color y tono y  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  respectivamente durante la vinificación del año 2002.

#### **VI.2.1.1 ANTOCIANOS TOTALES**

Todas las vinificaciones presentan el máximo contenido de antocianos sobre el día seis de maceración, después el contenido de antocianos disminuye hasta final de fermentación maloláctica. Durante el proceso de maceración, los vinos tratados con taninos presentan mayor contenido de antocianos que la vinificación testigo, mostrando T2 los valores más altos, pero conforme avanza la fermentación las diferencias se reducen, a diferencia de lo observado por Martínez García et al. (2003) a final del proceso de vinificación, donde en todos

los ensayos con adición de taninos se detectó un incremento en el contenido de estos compuestos.

**Gráfica VI.1** Evolución de los antocianos totales desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones del año 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Descube: 1-Oct-02, Fin Fermentación Alcohólica: 24-Oct-02, Fin Fermentación Maloláctica: 15-Nov-02.

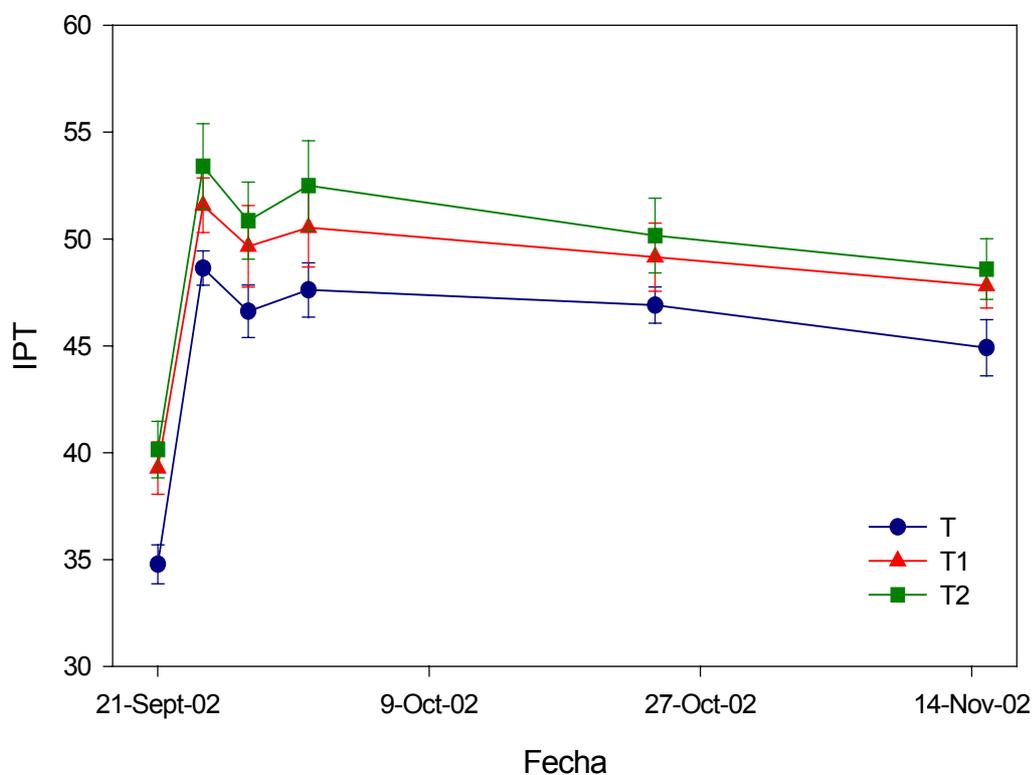


### VI.2.1.2 ÍNDICE DE POLIFENOLES TOTALES (IPT)

Desde el inicio de la maceración hasta final de fermentación maloláctica, los valores de IPT son mayores en los vinos tratados con taninos, hecho lógico, ya que ellos participan en la medida de este parámetro. Con el tratamiento T2, los valores de IPT alcanzados son más altos que con T1, al aportar mayor cantidad de compuestos que absorben a 280 nm. Martínez García et al. (2003)

también encontraron aumentos en los valores de absorbancia a 280 nm con la adición de tanino enológico.

**Gráfica VI.2** Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones del año 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Descube: 1-Oct-02, Fin Fermentación Alcohólica: 24-Oct-02, Fin Fermentación Maloláctica: 15-Nov-02.



### VI.2.1.3 INTENSIDAD DE COLOR Y TONO

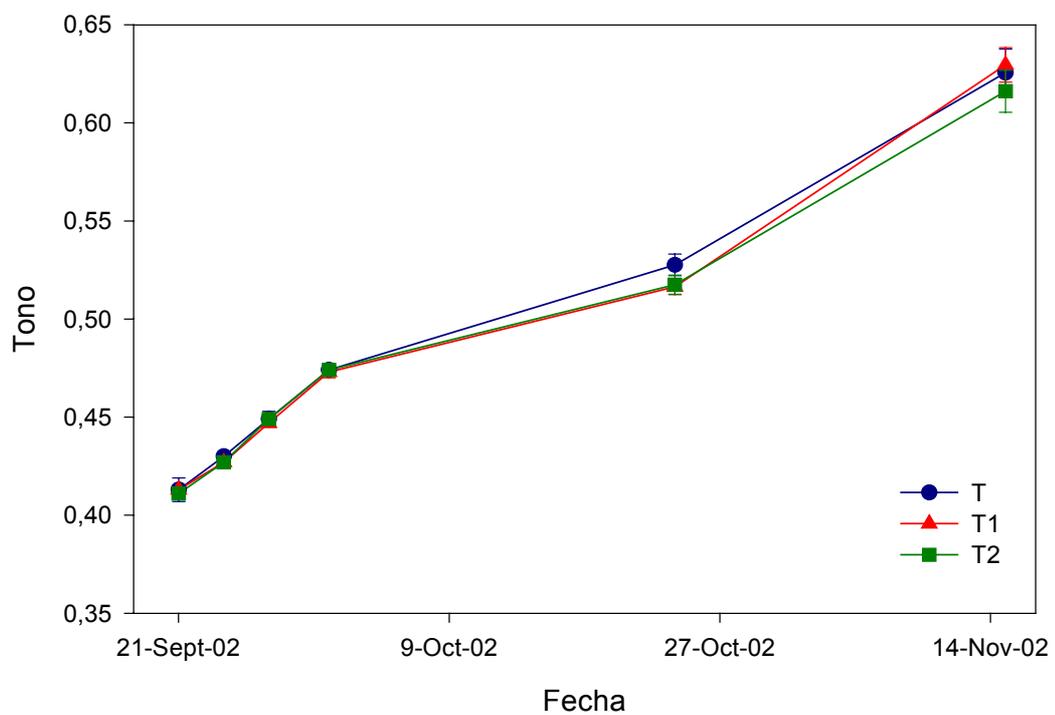
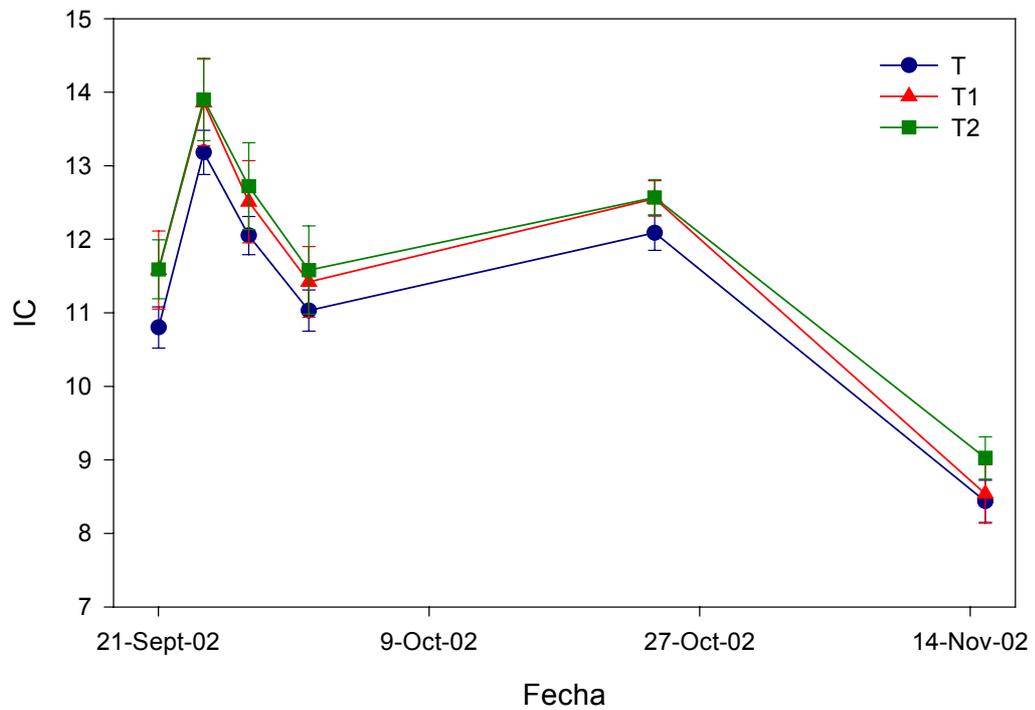
La máxima intensidad de color es alcanzada a los seis días de maceración, coincidiendo con la máxima extracción de antocianos. Desde el inicio de la maceración hasta final de fermentación alcohólica, no se observan diferencias en los valores de intensidad de color entre los tratamientos con

taninos, aunque estos muestran valores mayores que el testigo. Al final de fermentación maloláctica, T2 es el vino más coloreado, no observándose diferencias en el color entre el testigo y T1. Estos resultados son muy similares a los presentados por Zamora (2003b) que también encontró un incremento de intensidad de color al adicionar taninos, siendo dicho incremento respecto al control de un 10% con taninos condensados y un 3% con galotaninos. Oliva et al. (2001) y Lurton et al. (2002) por otro lado, no observaron diferencias en el color entre vinos tratados con diferentes tipos de taninos, mostrando en general, pequeñas diferencias respecto al testigo.

Las diferencias en la intensidad de color en los primeros días de maceración podrían ser debidas a procesos de copigmentación. Vivas et al. (2003) observaron dos efectos diferentes con la utilización de taninos enológicos durante la maceración: un efecto inicial de copigmentación que desaparece al aumentar el grado de alcohol en el mosto-vino, fenómeno que ocurre antes de que tenga lugar el segundo grupo de reacciones, las reacciones directas entre antocianos-taninos o mediadas por acetaldehído, que necesitan más tiempo. Los galotaninos no pueden reaccionar con los antocianos pero tienen un efecto protector de estos compuestos, limitando los procesos oxidativos. Otros autores (Celotti et al., 1999) defienden que el mayor color presentado inicialmente por los vinos tratados con taninos enológicos podría ser debido más bien a una inhibición temporal de la oxidación que a un mayor estado de polimerización de los compuestos fenólicos.

Todas las vinificaciones sufren un incremento en los valores de tono durante el proceso de elaboración. En el transcurso de la maceración, no se observan diferencias en este parámetro entre las diferentes vinificaciones.

**Gráfica VI.3** Evolución de la intensidad de color y del tono desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones del año 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Descubre: 1-Oct-02, Fin Fermentación Alcohólica: 24-Oct-02, Fin Fermentación Maloláctica: 15-Nov-02.



Al finalizar la fermentación alcohólica los tratamientos con taninos muestran valores de tono ligeramente más bajos que el testigo, mientras que al finalizar la fermentación maloláctica el tratamiento T2 es el vino menos evolucionado al presentar un valor de tono ligeramente más bajo que las vinificaciones testigo y T1. Crespy (2003), al igual que nosotros, también encontró valores de tono más bajos en los vinos tratados con taninos condensados que en el testigo. En cambio, Oliva et al. (2001), midiendo el tono justo antes del embotellado de los vinos, obtuvieron valores más bajos de tono para el vino testigo que para los vinos tratados con taninos condensados e hidrolizables, datos que ellos atribuyen a un mayor contenido de compuestos fenólicos que en general aportan mayor color amarillo y por la formación de combinaciones entre antocianos y taninos de color rojo menos intenso que los antocianos libres.

#### **VI.2.1.4 PARÁMETROS $L^*$ , $a^*$ Y $b^*$**

Los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  muestran una evolución similar en todos los vinos y alcanzan los valores más bajos al final de fermentación alcohólica coincidiendo con el incremento de la intensidad de color.

Durante el proceso de elaboración, los tratamientos con taninos muestran valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  ligeramente más bajos que el testigo, observándose las mayores diferencias al final de fermentación maloláctica. En este momento, T2 es el vino más oscuro y con mayores tonalidades violetas (valores de  $L^*$  y  $b^*$  más bajos), mientras que el vino testigo muestra valores de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  menos favorables.

**Tabla VI.1** Cambios de los valores de L\*, a\* y b\* con sus desviaciones estándar de las distintas vinificaciones del año 2002 a los 15 días de maceración, fin de fermentación alcohólica (FFA) y fin de fermentación maloláctica (FFM).

Vinificación	Días	L*	a*	b*
T	15	17,9 ± 0,76	50,9 ± 0,85	30,3 ± 1,16
	FFA	14,4 ± 0,74	46,6 ± 0,98	24,6 ± 1,22
	FFM	19,7 ± 0,89	52,1 ± 0,90	32,1 ± 1,12
T1	15	17,0 ± 0,94	49,9 ± 1,08	28,9 ± 1,41
	FFA	13,9 ± 1,05	46,2 ± 1,28	23,8 ± 1,73
	FFM	19,2 ± 1,18	51,6 ± 1,08	31,3 ± 1,41
T2	15	17,0 ± 1,27	49,8 ± 1,49	28,8 ± 2,00
	FFA	13,8 ± 1,34	46,0 ± 1,69	23,7 ± 2,22
	FFM	18,6 ± 2,08	51,0 ± 2,16	30,7 ± 2,80

## VI.2.2 PARÁMETROS CROMÁTICOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS DURANTE SU CONSERVACIÓN EN BOTELLA

### VI.2.2.1 PARÁMETROS DE COLOR ESPECTROFOTOMÉTRICOS

La tabla VI.2 muestra los cambios de los parámetros de color de los diferentes vinos en el momento del embotellado y a los 8 meses de envejecimiento en botella.

En el momento del embotellado, las características cromáticas de los vinos son muy similares, resultados que coinciden con Celotti et al. (2000), que

también encontraron que solamente se detectaban diferencias entre testigo y taninos durante la maceración. Los vinos tienen más color y son más oscuros que después de fermentación maloláctica. Las únicas diferencias encontradas entre el testigo y los vinos con taninos son en los valores de IPT, antocianos totales y en las fracciones de los taninos, mostrando los vinos tratados con taninos valores de IPT y taninos monómeros superiores al testigo, pero menor contenido de la fracción oligomérica. El vino T2 presenta mayor concentración de antocianos totales que el testigo y un contenido en taninos polímeros más bajo que T1. Los bajos resultados de las fracciones más polimerizadas de taninos en los vinos T1 y T2 pueden ser debidos, como indicaron Celotti et al. (1999), a que parte de los taninos adicionados pueden ser adsorbidos en los hollejos y separados del vino durante los trasiegos, mientras que otra fracción reacciona con proteínas para formar complejos. Delteil (2000) también encontró que solo una pequeña parte de los taninos enológicos adicionados es capaz realmente de pasar al vino.

Parece que con la utilización del tanino condensado (T2) se obtienen mayores diferencias con respecto al testigo, al mostrar un alto contenido de compuestos fenólicos totales, mayor concentración de antocianos y un color ligeramente mayor, mientras que el vino tratado con el tanino hidrolizable (T1) muestra un comportamiento muy similar al testigo. Poinssaut y Gerland (1993) y Gerland y Poinssaut (2002) observaron mayor reactividad con taninos condensados que con galotaninos.

Después de ocho meses en botella, hay un descenso en el contenido polifenólico de los vinos lo cual hace que los vinos sean menos coloreados. T1 y T2 siguen mostrando los valores más altos de IPT, en cambio la intensidad de color es ligeramente menor y el tono y L\* ligeramente mayores que en el vino testigo, aunque las diferencias no son significativas. Lurton et al. (2002) al igual que nosotros encontramos mayor contenido de fenoles totales en los vinos tratados con taninos tras su envejecimiento en botella, y Guilloux-Benatier y Chassagne (2003) encontraron que tras un periodo de maduración el contenido de polifenoles totales en los vinos tratados con taninos se mantenía superior al

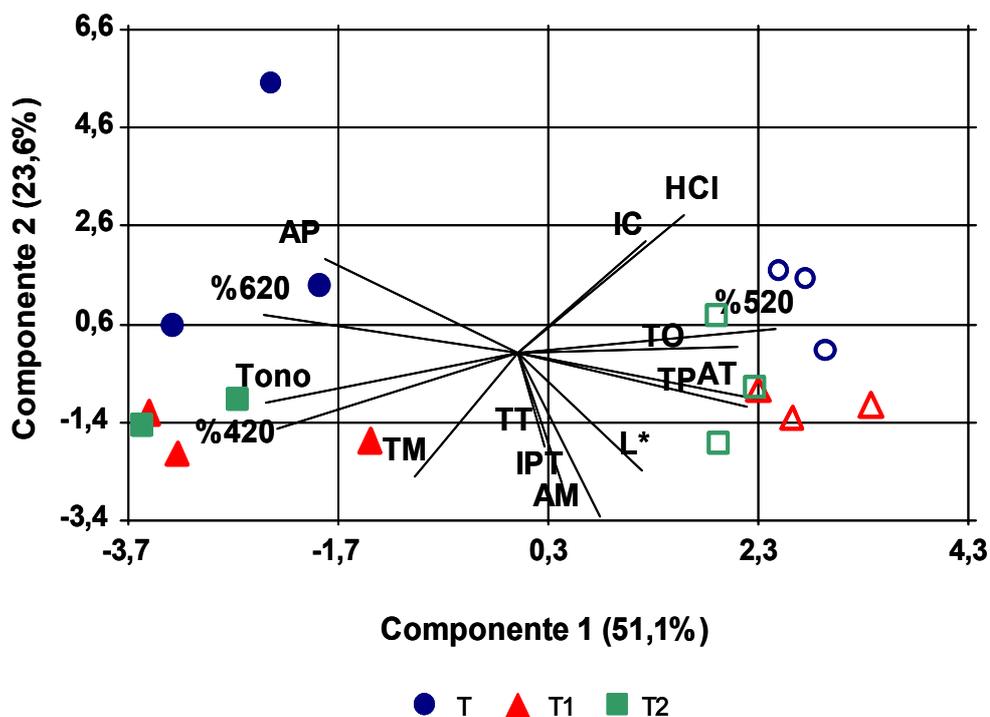
testigo, pero las diferencias encontradas en otros parámetros de color (intensidad de color y antocianos totales) eran muy pequeñas.

**Tabla VI.2** Cambios de los parámetros cromáticos de los vinos de 2002 en el momento de su embotellado y transcurridos 8 meses en botella. Letras diferentes en la misma fila y para cada periodo estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, TT: taninos totales, %520: porcentaje de color rojo, %420: porcentaje de color amarillo, %620: porcentaje de color azul.

Parámetros	T	T1	T2	T	T1	T2
	t=0 meses botella			t=8 meses botella		
IC	9,9 a	9,8 a	10,1 a	9,7 a	8,7 a	8,9 a
Tono	0,61 a	0,61 a	0,61 a	0,69 a	0,72 a	0,72 a
%420	33,6 a	34,0 a	33,9 a	35,3 a	36,5 a	36,5 a
%520	55,4 a	55,3 a	55,2 a	51,6 a	50,6 a	50,8 a
%620	11,0 a	10,8 a	10,9 a	13,1 a	12,9 a	12,8 a
IPT	44,1 a	47,3 b	48,5 b	42,7 a	46,4 b	47,4 b
AM (mg/L)	99,0 a	110,9 a	102,9 a	90,7 a	107,2 a	96,6 a
AP (mg/L)	80,7 a	75,2 a	80,4 a	96,9 a	90,2 a	91,6 a
AT (mg/L)	364,2 a	379,8 ab	384,8 b	255,4 a	274,3 a	265,0 a
L*	15,8 a	16,3 a	15,7 a	13,3 a	15,3 a	15,0 a
TM (mg/L)	54,3 a	69,0 b	82,8 b	63,3 a	79,8 ab	84,9 b
TO (mg/L)	203,0 b	174,2 a	157,0 a	63,3 a	79,8 ab	84,9 b
TP (mg/L)	590,3 ab	612,0 b	545,5 a	375,6 a	455,4 a	456,1 a
TT (g/L)	1,7 a	1,8 a	1,8 a	1,6 a	1,7 ab	1,8 b
Índice HCl	33,0 a	31,5 a	33,0 a	32,1 b	23,6 a	23,8 a

En este momento, no se observan grandes diferencias entre los tratamientos con taninos, pero el vino tratado con T2 presenta un contenido en taninos totales, monómeros y oligómeros superiores al testigo y además, junto con T1 presenta mayor contenido de antocianos totales. Probablemente, el mayor incremento en los valores de tono en los vinos tratados con taninos puede estar relacionado con el mayor contenido de taninos polímeros. La adición de taninos condensados puede desequilibrar la relación antociano/tanino (A/T) y favorecer la polimerización de los taninos, teniendo lugar por tanto un incremento en el color amarillo y en los valores de tono (Vivas et al., 2003).

**Gráfica VI.4** Distribución de los vinos elaborados en el 2002 durante su envejecimiento en botella en un sistema de coordenadas bidimensional definido por dos componentes principales (el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal es mostrado entre paréntesis). Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, HCI: índice de clorhídrico, %520: porcentaje de color rojo, %620: porcentaje de color azul, %420: porcentaje de color amarillo, símbolos blancos: t=0 meses, símbolos oscuros: t=8 meses.



El análisis de componentes principales de los 3 vinos durante el periodo de envejecimiento (Gráfica VI.4) mostró que todos los vinos disminuyeron sus valores principalmente a través de la componente 1, sufriendo mayores descensos en los valores de intensidad de color,  $L^*$ , %520, taninos polímeros y oligómeros, índice de clorhídrico y antocianos totales e incrementando el contenido de antocianos polímeros, taninos monómeros, el %620, el tono y el %420. El vino testigo es el vino menos evolucionado (valores más bajos de tono y %420) y muestra mejores características de color que los vinos tratados con taninos, debido a una mayor formación de polímeros antocianos-tanino de color más intenso y estable (valores más altos de antocianos polímeros y %620).

#### **VI.2.2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES**

La tabla VI.3 muestra los valores de compuestos fenólicos individuales de los vinos de 2002 en el momento del embotellado y después de 8 meses de envejecimiento en botella.

En el momento del embotellado, se observan diferencias entre los vinos en el contenido de ácido gálico, ácido cutárico, catequina, quercitina y quercitrina. El vino T1 muestra mayor concentración de quercitrina y ácido gálico (debido a su aporte de ácido gálico, ya que es un galotanino), mientras que T2 presenta mayor contenido de quercetina, ácido cutárico y catequina (debido a su procianidina natural).

Después de ocho meses en botella, en todos los vinos tiene lugar un incremento en el contenido del ácido gálico y catequina siendo los valores de estos compuestos más altos en los vinos tratados con taninos que en el testigo. El incremento de catequina no es de extrañar porque puede provenir de sus precursores galoilados (Singleton y Trouslade, 1983), como muestra el incremento del ácido gálico para todos los vinos.

**Tabla VI.3** Compuestos fenólicos medidos en mg/L por HPLC de los vinos de 2002 en el momento de su embotellado y después de 8 meses en botella. Letras diferentes en la misma fila y para cada periodo estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ .

Compuestos fenólicos	T	T1	T2	T	T1	T2
	t=0 meses botella			t=8 meses botella		
Ácido gálico	15,7 a	22,3 c	19,0 b	19,1 a	27,2 b	23,8 b
Ácido siríngico	2,8 a	2,9 a	2,7 a	2,8 a	2,9 a	2,9 a
Ácido protocatéquico	10,4 a	9,9 a	9,4 a	14,4 a	14,9 a	13,9 a
ΣÁcidos hidroxibenzoicos	28,9 a	35,2 b	31,2 a	36,3 a	45,7 c	40,7 b
Ácido cafeico	2,3 b	2,1 a	1,9 a	1,9 a	2,0 a	1,8 a
Ácido ferúlico	0,38 a	0,35 a	0,35 a	0,43 a	0,44 a	0,43 a
Ácido p-cumárico	2,9 a	2,7 a	2,6 a	3,9 a	4,2 a	3,8 a
ΣÁcidos hidroxicinámicos	5,6 b	5,2 ab	4,8 a	6,2 a	6,7 a	6,0 a
Ácido caftárico	8,4 a	8,2 a	8,6 a	8,3 a	8,5 a	8,7 a
Ácido cutárico	2,2 a	2,1 a	2,3 b	2,3 a	2,3 a	2,5 b
ΣÉsteres hidroxicinámicos	10,6 a	10,3 a	11,0 a	10,6 a	10,8 a	11,3 a
Catequina	12,3 ab	11,3 a	12,9 b	13,4 a	15,6 ab	17,7 b
Epicatequina	8,5 a	10,0 a	9,5 a	7,2 a	9,2 b	9,8 b
ΣFlavan-3-oles	20,7 a	21,3 a	22,4 a	20,6 a	24,8 ab	27,6 b
Rutina	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Quercitrina	0,32 b	0,31 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Miricitina	6,6 a	7,4 b	7,3 b	8,8 a	10,0 a	10,1 a
Quercetina	3,9 a	4,6 a	6,1 b	5,3 a	6,1 a	6,6 a
Kampferol	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,14 a	0,16 ab	0,19 b
ΣFlavonoles	10,8 a	12,3 ab	13,4 b	14,2 a	16,3 a	16,9 b
Delfinidina-3-Glucósido	10,0 a	10,7 a	11,4 a	4,8 a	6,4 a	5,8 a
Cianidina-3-Glucósido	2,5 a	2,4 a	2,7 a	1,5 a	2,0 b	1,9 ab
Petunidina-3-Glucósido	19,1 a	18,5 a	20,5 a	8,4 a	11,5 a	10,2 a
Peonidina-3-Glucósido	9,8 a	9,3 a	11,1 a	4,9 a	6,6 b	6,0 ab
Malvidina-3-Glucósido	81,6 a	75,1 a	85,1 a	34,6 a	46,9 a	39,7 a
ΣAntocianos	123,0 a	116,0 a	130,8 a	54,3 a	73,4 a	63,6 a

Oliva et al. (2001) a diferencia de nosotros, observaron un descenso en la concentración de catequina en los vinos después de seis meses en botella, aunque los ensayos con taninos mostraban mayores niveles de catequina que el vino testigo. Gómez-Plaza et al. (1999) obtuvieron durante la maduración del vino de Monastrell que la conservación del color se correlacionaba positivamente con la concentración de catequina y de ácido cutárico, resultado no observado por nosotros.

El contenido de flavonoles no glucosilados también se incrementa ligeramente después de ocho meses en botella, como consecuencia posiblemente de la hidrólisis de sus correspondientes formas hidroxiladas reduciéndose las diferencias en el contenido de estos compuestos entre las distintas vinificaciones.

La vinificación testigo sufre una disminución en el contenido del ácido cafeico, mostrando cantidades similares a la de los vinos tratados con taninos. El ácido cafeico puede participar en los procesos de copigmentación (Darias-Martín et al., 2001), los cuales siguen afectando, aunque en menor proporción en la intensidad de color de vino después de nueve meses de envejecimiento en botella (Hermosín-Gutiérrez et al., 2004). Esto, junto con la mayor formación de polímeros de color más intenso podría justificar la menor pérdida de color de la vinificación testigo.

Como conclusión a la experiencia realizada en el 2002 podemos decir que la aplicación de taninos enológicos, tanto condensados como hidrolizables, en vinos de variedad Monastrell, no ha supuesto una mejora en el color, al presentar éstos valores de intensidad de color un poco más bajos que el vino testigo durante el periodo de conservación. Tal vez sólo sean de gran utilidad para vendimias afectadas por *Botrytis cinerea*, en las que el riesgo de pérdida de color por acción de la lacasa podría ser prevenida por el efecto de inhibidor competitivo que pueden ejercer los taninos, aunque también parece ser, que la influencia de estos compuestos en los parámetros de color del vino también depende de las características de la uva de partida (Guilloux-Benatier y Chassagne, 2003), por lo que tal vez sería necesario repetir esta experiencia

en varias vendimias más para confirmar realmente su efecto en el color y estructura del vino o modificar las dosis o el momento de adición.

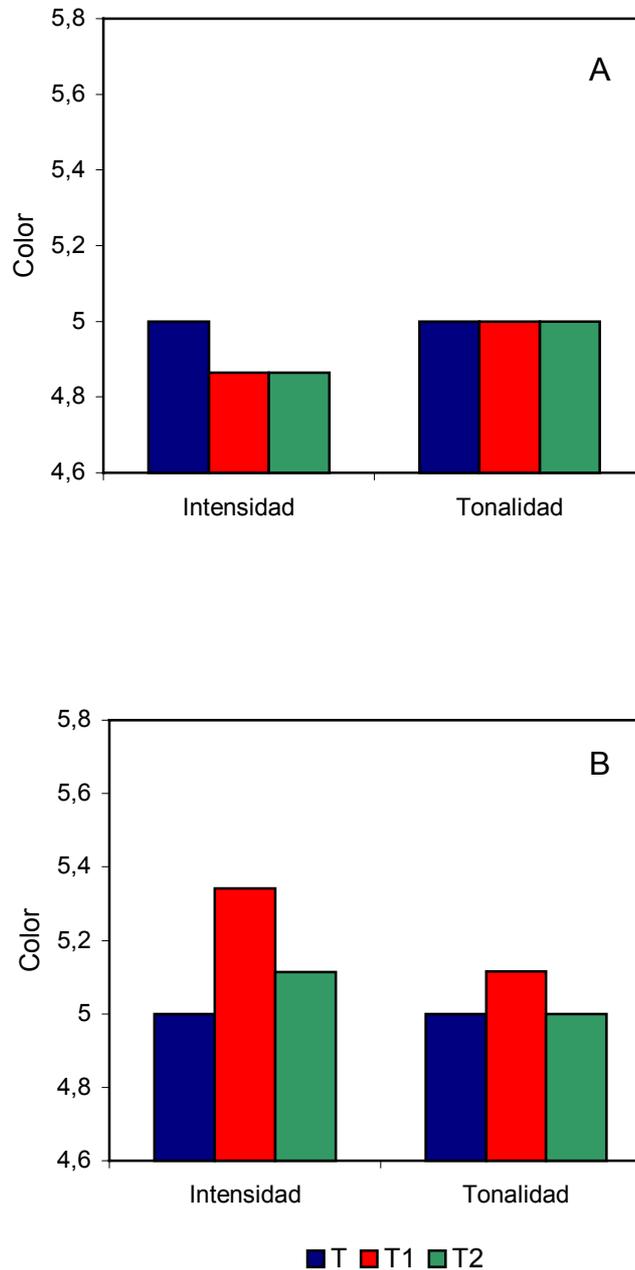
### **VI.2.3 ANÁLISIS SENSORIAL**

En las gráficas VI.5, VI.6 y VI.7 se presentan los resultados de la cata descriptiva de los vinos elaborados en la campaña de 2002 en el momento de su embotellado y transcurridos 8 meses en botella. En cada una de las gráficas se puede observar el análisis de fase visual, olfativa y gustativa de los diferentes vinos.

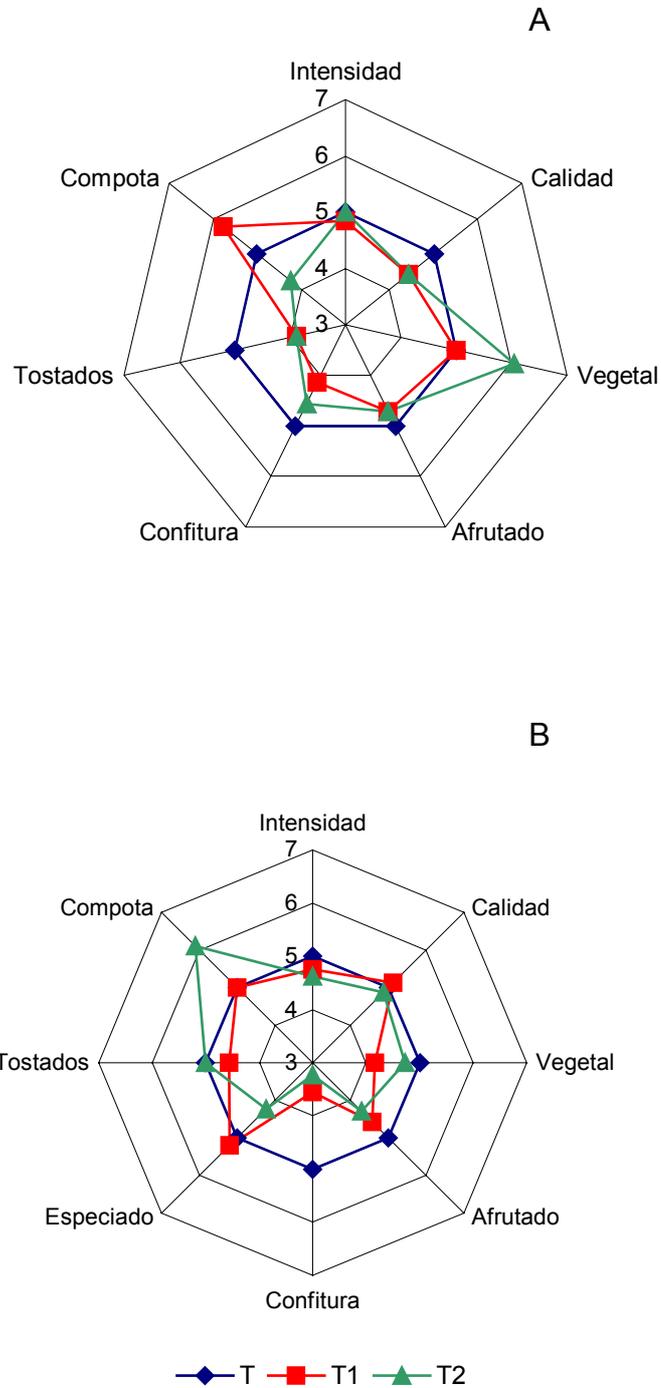
La intensidad de cada uno de los atributos fue valorada en una escala de cero a diez, dando mayor puntuación a mayor sensación. Para facilitar la comprensión de los resultados, las puntuaciones del vino testigo fueron normalizadas a un valor de cinco, comparando los vinos elaborados con taninos comerciales con él.

En el momento de su embotellado, no hay diferencias en la fase visual entre los vinos tratados con taninos. Ambos muestran una intensidad de color inferior y una tonalidad similar al vino testigo. Después de ocho meses en botella, se incrementan las diferencias entre las diferentes vinificaciones. En este momento los vinos tratados con taninos presentan mayor tonalidad e intensidad de color que el vino testigo, mostrando el vino T1 los valores más altos.

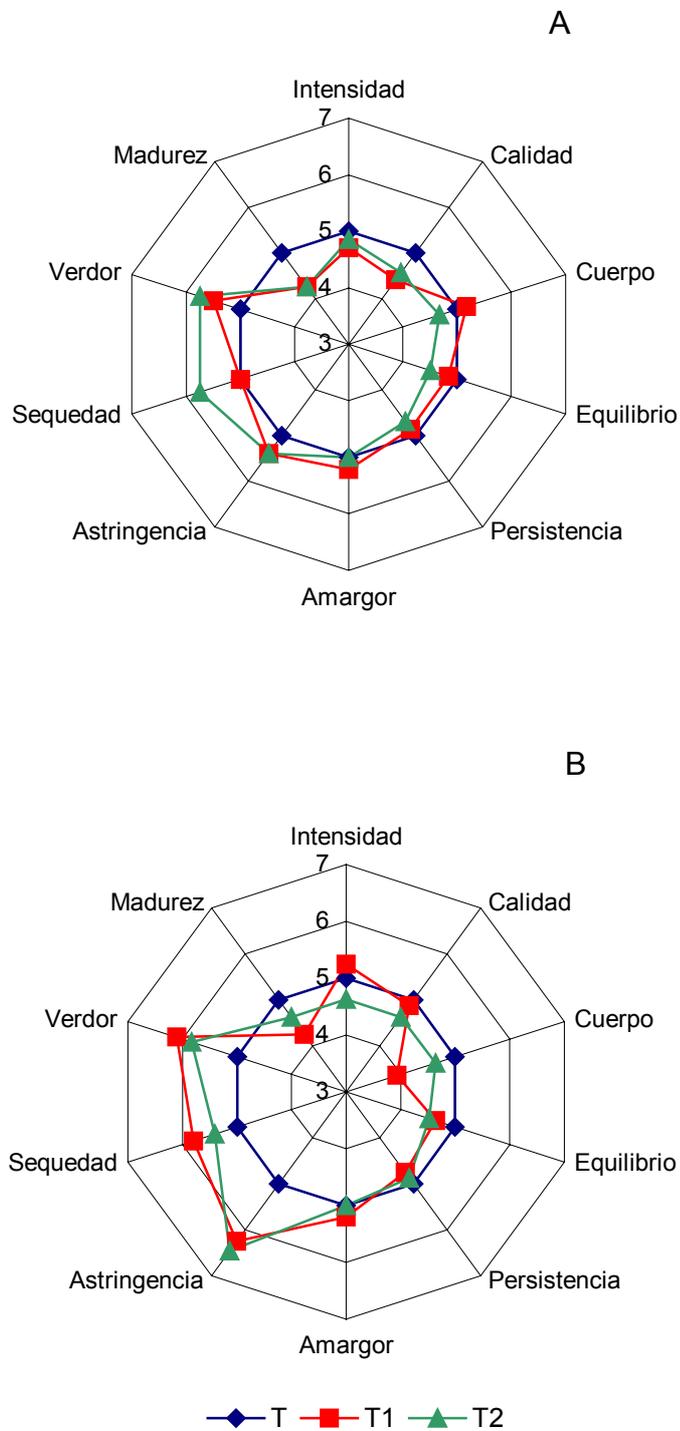
**Gráfica VI.5** Evaluación sensorial de la intensidad y tonalidad del color de los vinos elaborados en el 2002 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.



**Gráfica VI.6** Evaluación sensorial del aroma de los vinos elaborados en el 2002 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.



**Gráfica VI.7** Evaluación sensorial del gusto de los vinos elaborados en el 2002 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores



En cuanto al aroma, en el momento de su embotellado todos los vinos presentan una intensidad aromática similar, aunque la calidad es inferior en los vinos tratados con taninos, mostrando además menos sensaciones a fruta, confitura y tostado que el vino testigo. Con T2 hay mayores recuerdos a vegetal, mientras que con T1 hay más recuerdos a compota. Después de ocho meses en botella, los vinos tratados con taninos incrementan su calidad, mostrando menos sensaciones a vegetal y confitura y más a tostado.

En boca, en el momento de su embotellado los vinos tratados con taninos muestran una calidad inferior al vino testigo, siendo además más astringentes y verdes y menos maduros. No se observan diferencias entre los vinos testigo y T1 en cuanto al cuerpo, equilibrio, persistencia y sequedad, en cambio, T2 presenta valores más bajos de estas sensaciones, excepto en la sequedad, la cual es mayor. Después de ocho meses en botella la intensidad en T2 disminuye, mientras que en T1 aumenta, siendo mayor que la presentada por el vino testigo. La calidad incrementa para los vinos tratados con taninos, pero esta vez T1 posee menos cuerpo, persistencia, sequedad y verdor que T2.

Crespy (2002) indicó que los taninos pueden incrementar las sensaciones a amargo y que aunque los taninos participen en la estructura del vino, algunas veces no tienen una buena integración y el vino pierde equilibrio resultando en un endurecimiento de éste. Al igual que nosotros, Delteil (2000) encontró en los vinos tratados con diferentes taninos un aumento en las sensaciones de astringencia, sequedad y amargor.

Los resultados obtenidos muestran que, aunque sensorialmente el color y la calidad aromática y gustativa de los vinos tratados con taninos mejora con la conservación, no hay una buena integración de estos compuestos en los vinos al presentar menos cuerpo y equilibrio que el vino testigo, generando además una gran astringencia y sequedad.

## **VII. INFLUENCIA DE LAS LEVADURAS EN EL COLOR DEL VINO**



## VII.1 INTRODUCCIÓN

Durante muchos años, la fermentación en los vinos se realizaba de forma espontánea, y en ella estaba involucrada la participación de varias especies microbianas, particularmente levaduras provenientes de la uva y del material de bodega. Estas levaduras son las responsables de la transformación del azúcar en etanol, produciendo, además, gran cantidad de alcoholes y ésteres, con una fuerte influencia en las propiedades sensoriales del vino resultante (Plata et al., 2003). Durante el proceso de fermentación alcohólica, hay una sucesión de especies de levaduras. Primero se desarrollan levaduras de baja actividad fermentativa (*Picchia*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*), posteriormente aparecen levaduras de actividad intermedia (*Kloeckera*, *Torulaspota*), para terminar con cepas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales muestran una alta capacidad fermentativa. Esta sucesión de especies ocurre como respuesta a los factores genéticos y a las condiciones del medio, concretamente a su requerimiento de oxígeno y su tolerancia a las sustancias tóxicas producidas, particularmente etanol (Fleet, 2003).

Hoy en día el uso de levaduras seleccionadas en la fermentación de los mostos presenta importantes ventajas con respecto a la fermentación espontánea tradicional. Entre estas se pueden citar (Farris, 2003) :

- Mayor velocidad de fermentación y reproducibilidad sensorial de los vinos.
- Máximo consumo de azúcares reductores.
- Reducción de los problemas causados por levaduras extrañas silvestres.
- Mayor flexibilidad en el control sensorial del vino.

Básicamente, las levaduras seleccionadas han de ser capaces de producir vinos de calidad, la cual ha de mantenerse para un mismo tipo de mosto y procedimiento de elaboración. Existen también ciertas especificaciones objetivas que permiten determinar si una levadura puede ser adecuada para vinificación, como son: producción mínima de acidez volátil, producción de etanol en cantidades adecuadas a la riqueza azucarada de los mostos, adecuada velocidad de fermentación del mosto, rápida imposición después de

la inoculación, baja productividad de SO<sub>2</sub> y resistencia al mismo, baja productividad de SH<sub>2</sub>, tolerancia a temperaturas extremas, alta velocidad de sedimentación y capacidad de flocular, baja formación de espuma, presencia de fenotipo matador (killer) y producción adecuada de acetaldehído, glicerol, acetato de etilo y alcoholes superiores (Regodón et al., 1999).

Además, utilizando técnicas de biología molecular se ha demostrado la existencia de cepas autóctonas de *S. cerevisiae* representativas de una determinada región (Guillamón et al., 1996), confirmando que las cepas de levaduras están totalmente adaptadas a determinadas características climáticas y sustratos. Así, algunos enólogos admiten que pueden obtenerse mejores resultados si se utilizan levaduras seleccionadas procedentes de la microzona donde van a ser utilizadas.

## **VII.1.1 LEVADURAS Y COLOR DEL VINO**

### **VII.1.1.1 ADSORCIÓN DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS SOBRE LAS LEVADURAS**

El comienzo del estudio de la adsorción de los compuestos fenólicos sobre las paredes de las levaduras tiene lugar con algunas experiencias realizadas con variedades que presentan problemas de color. Loiseau et al. (1994) encontraron, después de la fermentación de un mismo mosto con diferentes cepas de levadura, que los vinos mostraban diferente color y composición polifenólica, y que al mismo tiempo, los colores de las lías eran también distintos. Estas diferencias observadas son debidas a la diferente adsorción de los compuestos fenólicos sobre la pared de la levadura. Este fenómeno de adsorción recibe el nombre de "efecto esponja".

Las paredes celulares de las levaduras tienen diferente polaridad y la naturaleza hidrofílica e hidrofóbica de los constituyentes de la pared, polisacáridos, define la capacidad de las levaduras de retener o adsorber diferentes moléculas del vino tales, como compuestos volátiles, ácidos grasos o pigmentos (Vasserot et al., 1997; Morata et al., 2003a).

La porosidad de la pared de las levaduras también influye en la adsorción (Boivin et al., 1998). Un incremento del área de la superficie debida al espacio intersticial favorece la adsorción. El área de la superficie de las células de las levaduras durante la fermentación del vino es mayor de 10 m<sup>2</sup>/L de mosto, y la cantidad de antocianos adsorbidos durante la fermentación por diferentes generaciones de levaduras puede ser muy grande.

La adsorción de los antocianos se incrementa con la esterificación (acil y p-cumaril derivados) y con el grado de metoxilación (malvidina y peonidina), sugiriendo que en la adsorción está involucrada una interacción hidrofóbica (Morata et al., 2003a). La peonidina y sus derivados presentan una adsorción ligeramente mayor que la malvidina y sus derivados, a pesar que los primeros sean menos apolares, pudiendo ser que debido a diferencias estéricas se vea favorecida la adsorción de la peonidina (Morata et al., 2003a).

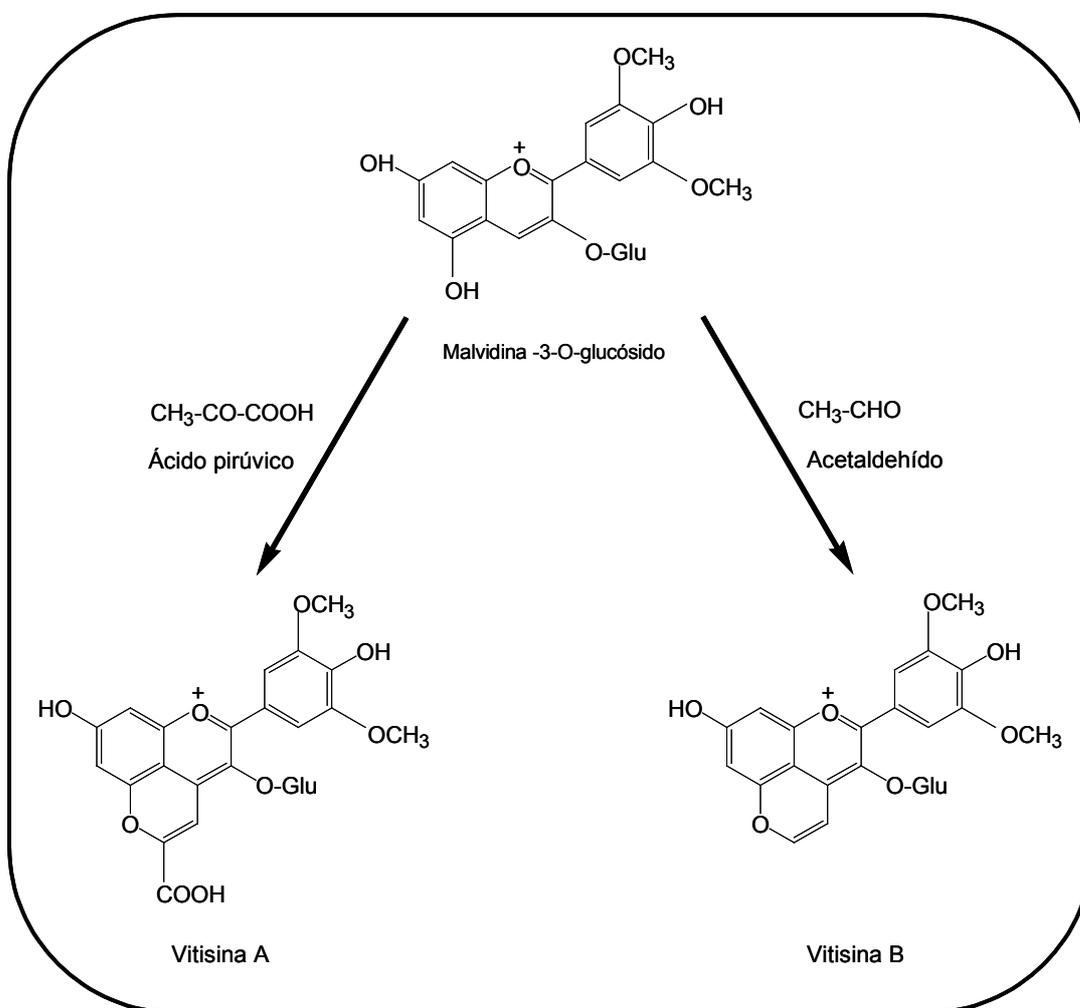
La adsorción de los antocianos en las paredes de las levaduras depende también de otros factores tales como la temperatura, contenido de alcohol y contenido de SO<sub>2</sub> presente en el mosto-vino (Vasserot et al., 1997).

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* también expresan actividades enzimáticas del tipo β-glucosidasas, incluso en presencia de glucosa y fructosa en el mosto. Estas actividades, localizadas en su mayoría en el espacio periplasmático, no son inhibidas por los azúcares. La presencia de estas actividades transforma los antocianos libres en su correspondiente forma aglicona que es más inestable y ello se traduce en una pérdida del color del vino. Estas actividades enzimáticas sólo están presentes en algunas cepas de levadura (Hernández et al., 2003).

### VII.1.1.2 FORMACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS: PIRANOANTOCIANOS

Las levaduras, durante el proceso de fermentación, producen intermediarios metabólicos que pueden tener un importante papel en el color de los vinos. Estos metabolitos son acetaldehído y ácido pirúvico y mediante condensación con los antocianos dan lugar a los piranoantocianos o vitisinas (Fulcrand et al., 1996; Francia-Aricha et al., 1997) (Figura VII.1).

Figura VII.1 Estructura de los piranoantocianos.



La cantidad de metabolitos liberados por las levaduras depende de la cepa utilizada, existiendo además una importante correlación entre la cantidad de precursor liberado y el contenido de piranoantocianos en los vinos (Morata et al., 2003b).

Los piranoantocianos presentan unas características muy particulares, que los convierte en candidatos perfectos para ser una componente importante de los vinos añejos. Estos compuestos presentan un color rojo anaranjado, son muy poco sensibles a los cambios de pH y a la decoloración con SO<sub>2</sub>, son químicamente muy estables y también son pigmentos poco adsorbidos por paredes celulares durante la fermentación (Morata et al., 2003b).

La concentración de los piranoantocianos en el vino es mucho menor que la de otros pigmentos, lo que hace difícil adjudicarles un papel preponderante. Sin embargo, los piranoantocianos presentan muy poca dependencia del pH, por lo que al pH del vino (entre 3 y 4) prácticamente la totalidad de los piranoantocianos presentes participan en el color, mientras que sólo una pequeña parte de otros pigmentos lo harán. Por ello, su contribución real podría ser mayor que la que resulta de la comparación directa entre sus concentraciones (Zamora, 2003).

### **VII.1.2 MANOPROTEÍNAS DE LEVADURA**

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* tienen un efecto determinante sobre la composición polisacárida de los vinos. La mayor parte de la fracción de polisacáridos liberados durante la fermentación y durante el proceso de autólisis de las levaduras está compuesta por manosa, lo cual confirma que estos polisacáridos son principalmente manoproteínas (Rosi et al., 1999).

Las manoproteínas constituye una familia de moléculas bastante abundante en los vinos (100 a 150 mg/L), bastante homogénea desde el punto

de vista de su composición y con un peso molecular variable que oscila entre 10-450 kDa.

La estructura de las manoproteínas es tridimensional y está basada en un núcleo proteico con dos tipos de cadenas glicánicas (Waters et al., 1994):

- Cadenas cortas lineales de manosa unida en  $\alpha$ -(1, 3) o  $\alpha$ -(1, 6), enlazadas a la parte proteica a nivel de residuos de serina o treonina.
- Cadenas polimanosídicas unidas en  $\alpha$ -(1, 6), que están ramificadas con cadenas laterales de manosa unida en  $\alpha$ -(1, 3) o en  $\alpha$ -(1, 2), y se enlazan a la parte peptídica por intermediación de una N-acetil-quitobiosa unida a un residuo de asparragina.

Existen dos tipos de manoproteínas en los vinos:

- manoproteínas liberadas durante la primera fase de crecimiento exponencial de las levaduras, que se acumulan durante la fermentación (Laubères, 1987; Doco et al., 1996), siendo la cantidad liberada dependiente del tipo de cepa de levadura utilizada (Laubères, 1987).
- manoproteínas liberadas durante la autólisis celular de las levaduras, proceso que se produce durante el almacenamiento del vino sobre lías por la actuación de la enzima  $\beta$ -1,3 glucanasa liberada por las levaduras (Leroy et al., 1990; Ledoux et al., 1992). El proceso de autólisis ocurre en varias etapas (Charpentier y Feuillat, 1993). Las primeras están basadas en la activación de la enzima hidrolítica, mientras que las siguientes etapas están centradas en la degradación enzimática de las macromoléculas intracelulares, el incremento de porosidad de la pared y la degradación de compuestos liberados al medio.

La importancia de las manoproteínas en el proceso de elaboración de los vinos es debido a su participación en procesos tales como:

- **Estabilidad tartárica:** las manoproteínas tienen un efecto positivo en la estabilidad tartárica (Lubbers et al., 1993), al inhibir la formación de cristales de bitartrato potásico (Ribéreau Gayon et al., 1998a). Estos resultados se ven confirmados con el hecho que al dejar el vino blanco sobre las lías durante

algunos meses, el tartrato se vuelve relativamente estable y no requiere por tanto de la estabilización por frío (Ribéreau Gayon et al., 1998a).

- **Estabilidad proteica:** algunas manoproteínas tienen una influencia notable en la estabilidad proteica de vinos blancos y rosados (Ledoux et al., 1992). No está claro el mecanismo implicado en favorecer la estabilidad proteica, pero hay trabajos que establecen que las manoproteínas no evitan la precipitación de las proteínas en el vino, pero si que disminuyen el tamaño de las partículas responsables de la turbidez (Waters et al., 1993), siendo además las manoproteínas liberadas durante la fermentación las que mayor efecto protector tienen (Dupin et al., 2002). La presencia y/o la adición de manoproteínas hace que sea necesaria una menor adición de bentonita para la estabilización de estos vinos, consiguiendo de esta manera una menor pérdida de moléculas aromáticas.

- **Interacciones con compuestos aromáticos:** parece ser que la estabilización del aroma del vino por las manoproteínas depende del carácter hidrofóbico de los compuestos aromáticos, siendo el componente proteico de la fracción de manoproteína de gran importancia para la estabilización global del aroma (Lubbers et al., 1994). Tales interacciones entre manoproteínas y compuestos aromáticos pueden modificar la volatilidad y la intensidad aromática de los vinos. Cuando el vino es envejecido sobre sus lías sin clarificar, las manoproteínas están presentes y libres para interaccionar y reforzar los componentes aromáticos. Cuando los vinos son clarificados antes de su envejecimiento, las manoproteínas son eliminadas y por tanto no contribuirán en el aroma. Feuillat et al. (1987) también observaron que la clarificación del vino y los procesos de estabilización ejercen una influencia negativa en las propiedades sensoriales cuando la proporción de macromoléculas eliminadas está próxima al 30%.

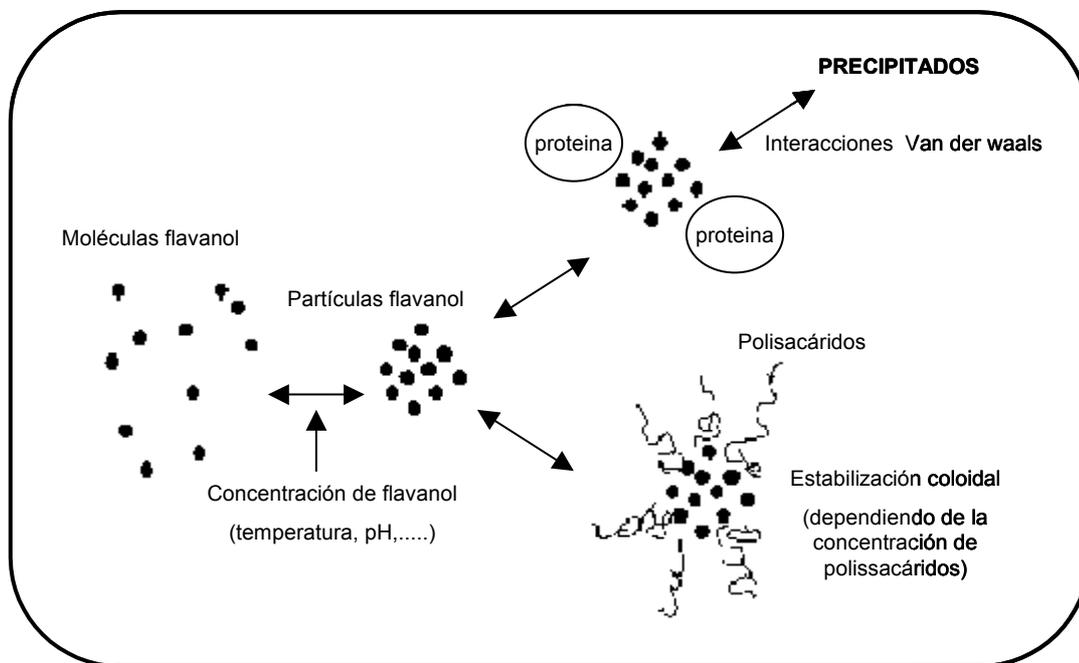
- **Interacciones con compuestos fenólicos:** Las manoproteínas liberadas durante la fermentación por las levaduras tienen capacidad para ligarse con antocianos y taninos (Escot et al., 2001). Parece ser que en función de la cepa y del momento de liberación, las manoproteínas tienen diferentes capacidades

para ligarse con los diferentes compuestos polifenólicos del vino (Escot et al., 2001). En general, las manoproteínas liberadas durante la autólisis provenientes de cualquier cepa, pueden formar un complejo con los taninos, pero solamente algunas manoproteínas liberadas por cepas específicas durante la fermentación alcohólica y después de la muerte de la célula, permite una combinación con antocianos y taninos.

Saucier et al. (1998) propusieron un modelo hipotético de interacción entre polisacáridos y taninos, donde primero hay una asociación entre los polifenoles, uniéndose después a otros polímeros (Figura VII.2). En las asociaciones entre taninos y biopolímeros como los polisacáridos y las proteínas están implicadas interacciones hidrofóbicas, no específicas y de tipo Van der Waals. Trabajos más recientes realizados por Riou et al. (2002) estudiando los efectos de los polisacáridos del vino en soluciones modelo conteniendo taninos de semillas, encontraron que sólo las fracciones de polisacáridos de elevado peso molecular (manoproteínas) tienen habilidad para prevenir la agregación de taninos. Los mecanismos implicados en el efecto protector no están claros, pero estos autores propusieron dos posibles hipótesis: una primera basada en la asociación molecular entre polisacáridos y polifenoles compitiendo con la agregación de taninos y una segunda basada en la adsorción de los polisacáridos sobre las partículas formadas por los taninos, previniendo el incremento del tamaño de la partícula, siendo esta segunda hipótesis más probable ya que observaron que los polisacáridos limitaban el aumento de las partículas de tanino y no su formación.

La formación de los complejos manoproteína-tanino disminuye la reactividad de los taninos, impidiendo de esta manera su polimerización y posterior precipitación. Esto se traduce en una disminución de la astringencia, un aumento de la redondez, volumen en boca y de la estabilidad del color del vino.

Figura VII.2 Modelo de interacción entre taninos y polisacáridos.



### VII.1.3 PAPEL DE LAS LEVADURAS SOBRE LOS AROMAS

La levadura puede actuar sobre el perfil aromático de un vino tinto con la producción de aromas fermentativos, pero también gracias a la liberación de aromas varietales de uvas aromáticas a partir de precursores sin olor. La producción de aromas fermentativos depende de la cepa de levadura utilizada (Pueyo et al., 1999), de la temperatura de fermentación y de la concentración de nitrógeno fácilmente asimilable del mosto. La levadura, gracias a su metabolismo, puede, a partir de una fuente de aminoácidos y de azúcares, producir cetoácidos a través de una vía de transaminación. Estos cetoácidos pasan después por una vía de descarboxilación y reducción y son transformados en alcoholes superiores. Gracias a algunas actividades enzimáticas del tipo esterasas, la levadura puede combinar estos alcoholes con

ácidos grasos para producir ésteres de ácidos grasos que participan en el perfil aromático de los vinos.

El papel de la levadura sobre la liberación de los aromas varietales ha sido más estudiado en las variedades de vinos blancos que en los vinos tintos. Los precursores de aromas se encuentran en el mosto ligados a una fracción glicosídica y la levadura, gracias a su potencial enzimático en glicosidasas, puede actuar sobre los precursores hidrolizando la fracción de azúcar y liberando la parte volátil de la molécula que aparece ya como aromática. El potencial enzimático varía de una cepa de levadura a otra, lo que significa que en función de la cepa de levadura utilizada, el potencial aromático varietal del mosto será más o menos revelado (Antonelli et al., 1999; Estévez et al., 2004).

La crianza sobre lías, técnica de envejecimiento tradicional para la crianza de vinos blancos fermentados en barrica en Borgoña y en el envejecimiento de los vinos espumosos, también aporta a los vinos características peculiares que tienen su origen en la autólisis de las levaduras y la cesión de compuestos de estructuras celulares durante el tiempo de crianza. La autólisis de las levaduras es un proceso que sucede tras la muerte de estas y que consiste en la ruptura y degradación de las estructuras celulares por su propia dotación enzimática. Como consecuencia de esta ruptura y fragmentación del material celular, son liberados al vino moléculas de distinta naturaleza (Dupin et al., 2002; Charpentier et al., 2004) y que afectan de manera importante al perfil aromático, con importante repercusiones organolépticas (Chassagne et al., 2005).

## VII.2 RESULTADOS

Se llevaron a cabo tres vinificaciones, una vinificación testigo (L1) con una levadura comercial ampliamente utilizada en la zona de Jumilla, Fermirouge (Gist-Brocades), (L1, testigo) y otras dos con otras dos levaduras comerciales, Fermicrú VR5 (DSM), (L2) y Rhône 2323 (Uvaferm), (L3). Todas las vinificaciones se elaboraron por triplicado. En la vendimia de 2001 la experiencia se llevó a cabo en depósitos de 12 litros (10 kg de uva) y en la vendimia del 2002 en depósitos de 100 litros (90 kg de uva). El tiempo de maceración fue de 15 días y la dosis aplicada de las tres levaduras fue de 25 g/Hl.

### VII.2.1 PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2001

La tabla VII.1 muestra los parámetros de color de las diferentes vinificaciones al finalizar la fermentación alcohólica.

En este año, después de fermentación alcohólica, son muy pocas las diferencias observadas en los parámetros de color entre las distintas vinificaciones. Todos los tratamientos muestran valores similares de intensidad de color, sin embargo la contribución de cada una de las componentes en el color presentada por el vino testigo (L1) es diferente al mostrado por los demás vinos. En el vino testigo es mayor la contribución de la componente azul y amarilla y menor la de la componente roja, presentando por tanto mayor valor de tono. Esto puede ser debido a un menor contenido de antocianos y de IPT, a pesar de no mostrar diferencias significativas respecto a los otros tratamientos (L2 y L3). Dfáz et al. (1999) si encontraron diferencias en los parámetros de color en los vinos elaborados con diferentes levaduras, al final de fermentación alcohólica, especialmente en los valores de intensidad de color, absorbancia a 420 nm y concentración de antocianos. La velocidad de

fermentación de las levaduras puede afectar al contenido de compuestos fenólicos del vino (Zhore y Erten, 2002; Karna et al., 2004), y también hay que considerar que las levaduras presentan diferente capacidad para retener o adsorber los compuestos fenólicos durante el proceso de maceración (Morata et al., 2003a), debido a las distintas polaridades y a la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica de los polímeros presentes en su pared celular.

**Tabla VII.1** Parámetros de color de las diferentes vinificaciones al finalizar fermentación alcohólica en la elaboración del 2001. Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, IPT: índice de polifenoles totales, %520: porcentaje de color rojo, %420: porcentaje de color amarillo, %620: porcentaje de color azul.

<b>Parámetros</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>
<b>IC</b>	17,3 a	17,5 a	17,7 a
<b>Tono</b>	0,47 b	0,44 a	0,44 a
<b>%420</b>	28,9 b	27,7 a	27,8 a
<b>%520</b>	61,8 a	63,5 b	63,5 b
<b>%620</b>	9,3 b	8,7 a	8,8 a
<b>IPT</b>	62,1 a	62,4 a	64,8 a
<b>AT (mg/L)</b>	547,1 a	574,5 a	581,0 a
<b>L*</b>	8,1 a	9,9 a	9,4 a
<b>a*</b>	37,7 a	40,9 a	40,1 a
<b>b*</b>	13,9 a	17,0 a	16,2 a

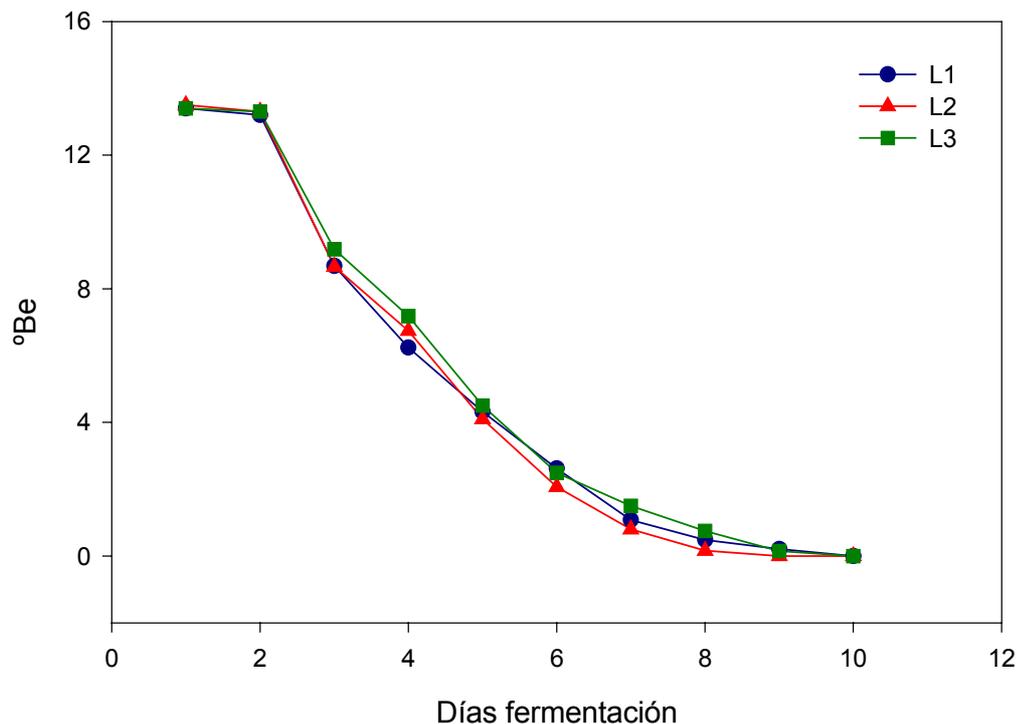
## VII.2.2 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2002

### VII.2.2.1 EVOLUCIÓN DE LA FERMENTACIÓN DE LAS DIFERENTES VINIFICACIONES

La gráfica VII.1 muestra la evolución del °Be durante la fermentación de las diferentes vinificaciones del 2002.

Las levaduras utilizadas muestran una velocidad de fermentación muy similar, generando vinos con un grado de alcohol de 14,2%. En estos vinos, al final de fermentación alcohólica, no se observan diferencias significativas en el contenido de glicerina (10,3, 10,6 y 10,7 g/L) ni en el contenido de etanal (32,4, 29,2 y 28,2 mg/L).

**Gráfica VII.1** Evolución del °Be durante la fermentación de las diferentes vinificaciones del 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras.



## **VII.2.2.2 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DE 2002 DURANTE LA VINIFICACIÓN**

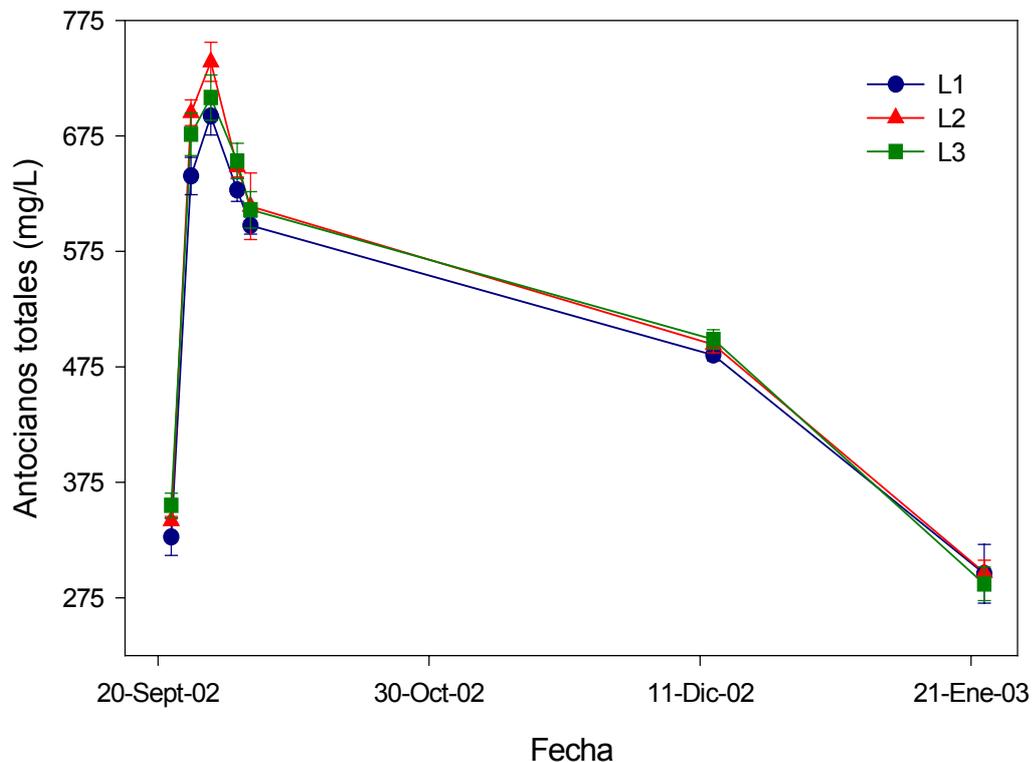
En las gráficas VII.2, VII.3 y VII.4 y en la tabla VII.2 se puede observar la evolución del contenido de antocianos totales, índice de polifenoles totales, intensidad de color, tono y  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  respectivamente durante la vinificación del año 2002.

### **VII.2.2.2.1 Antocianos totales**

Todas las vinificaciones presentan el máximo de antocianos sobre el día ocho de maceración, disminuyendo a continuación hasta final de fermentación maloláctica.

Las mayores diferencias entre los diferentes tratamientos son observadas durante el proceso de maceración, consiguiéndose mayor concentración de estos compuestos en L2 (Fermicrú) y menor concentración en L1 (Fermirouge, testigo). Las diferencias observadas en este momento en el contenido de antocianos pueden ser debidas a la diferente capacidad de adsorción de las distintas cepas de levadura, como indicaron Morata et al. (2003a). Vasserot et al. (1997) encontraron que las interacciones entre antocianos y las lías de las levaduras eran débiles y reversibles, produciendo la liberación de los antocianos en el medio, aunque también indicaron que durante la fermentación la adsorción de estos compuestos es mayor debido a que los antocianos pueden ser fijados por ambos lados de la pared celular de la levadura, mientras que en las lías los antocianos solamente puede ser fijados por la cara externa de la pared.

**Gráfica VII.2** Evolución de los antocianos totales desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones del año 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Descube: 2-Oct-02, Fin Fermentación Alcohólica: 30-Oct-02, Fin Fermentación Maloláctica: 21-Ene-03.

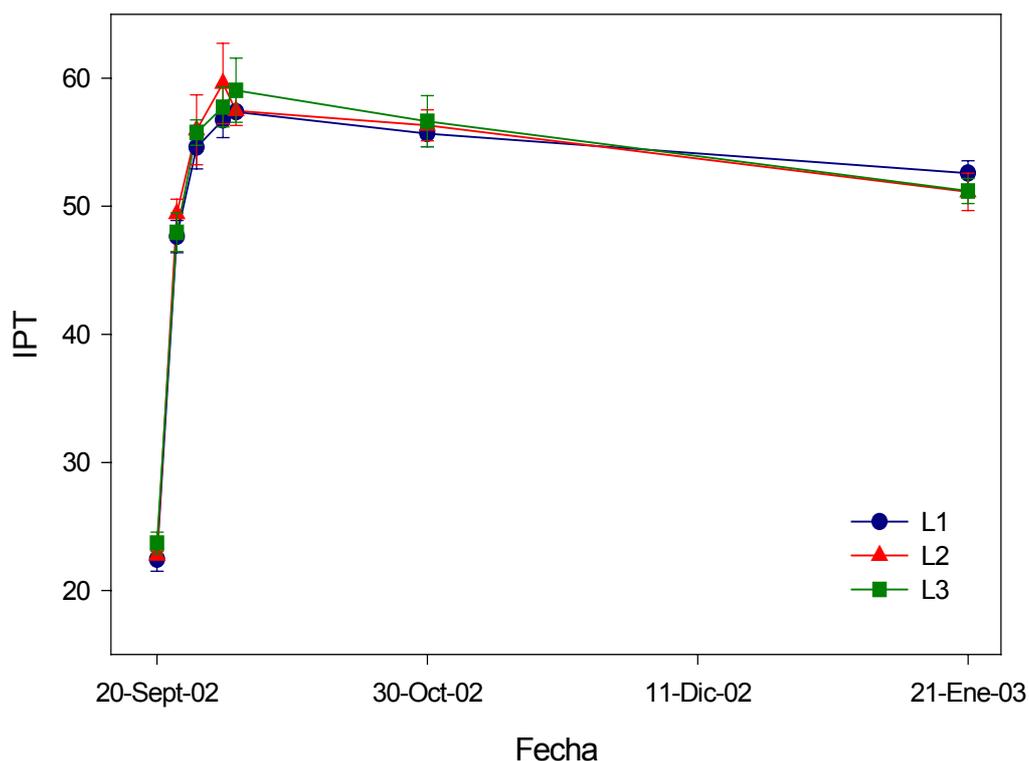


#### VII.2.2.2.2 Índice de polifenoles totales (IPT)

Desde el inicio de la maceración hasta final de fermentación maloláctica, no hay grandes diferencias en los valores de IPT entre las vinificaciones. En el momento de máxima extracción de compuestos fenólicos (día 12 de maceración), L2 muestra mayores valores de estos compuestos, mientras que al final de maceración, el máximo valor es encontrado en L3. Caridi et al. (2004) después 18 días de maceración, obtuvieron menor contenido de compuestos fenólicos en el vino elaborado con la cepa Sc1483, la cual había presentado una fermentación más lenta. Mazza et al. (2003) también encontraron menor velocidad de fermentación con la cepa Wädenswil 27 usada en la fermentación de mosto de Pinor Noir, aunque ellos concluyeron que la

velocidad de fermentación de la levadura utilizada tenía un efecto mínimo sobre el color del vino. Algunos autores (Bonilla et al., 2001) han observado que las levaduras tienen preferencia en la retención de compuestos que absorben a 420 nm, y asimismo, Razmkhab et al. (2002) observaron cierta especificidad de las levaduras hacia algunos compuestos como flavonoles, flavan-3-oles y sus derivados.

**Gráfica VII.3** Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones del año 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Descubre: 2-Oct-02, Fin Fermentación Alcohólica: 30-Oct-02, Fin Fermentación Maloláctica: 21-Ene-03.



Después de fermentación maloláctica el vino L1 (testigo) es el que posee ligeramente un contenido de IPT más alto. Cuinier (1988) encontró grandes diferencias en el contenido de polifenoles totales en vinos elaborados con

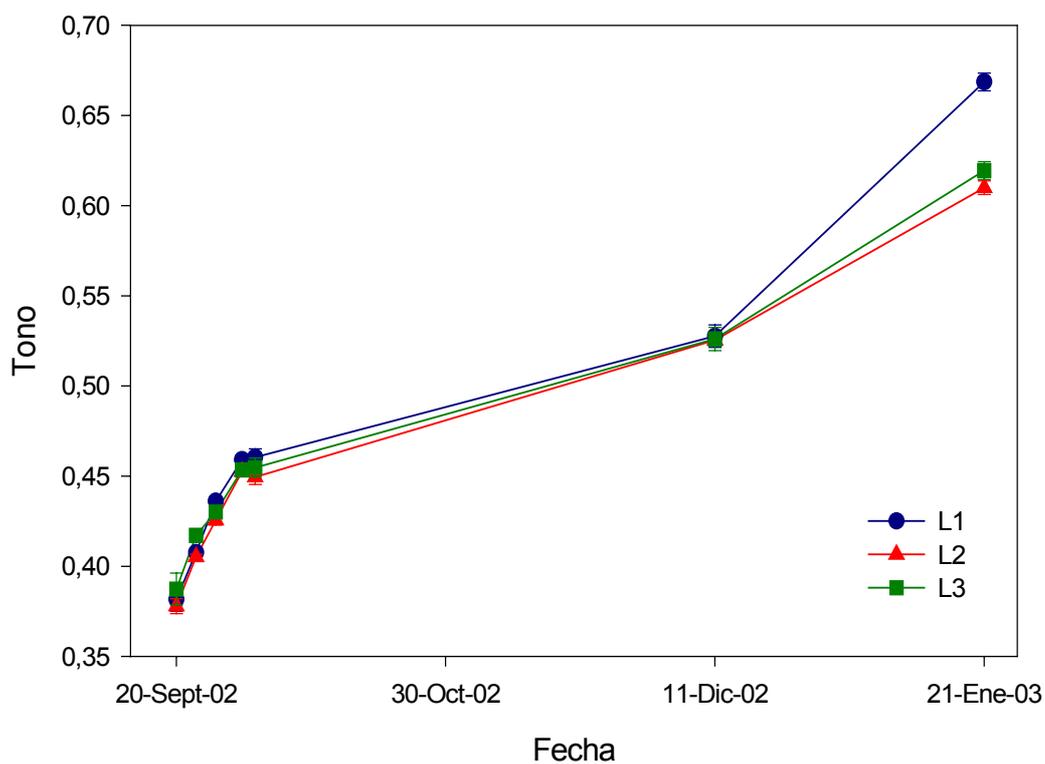
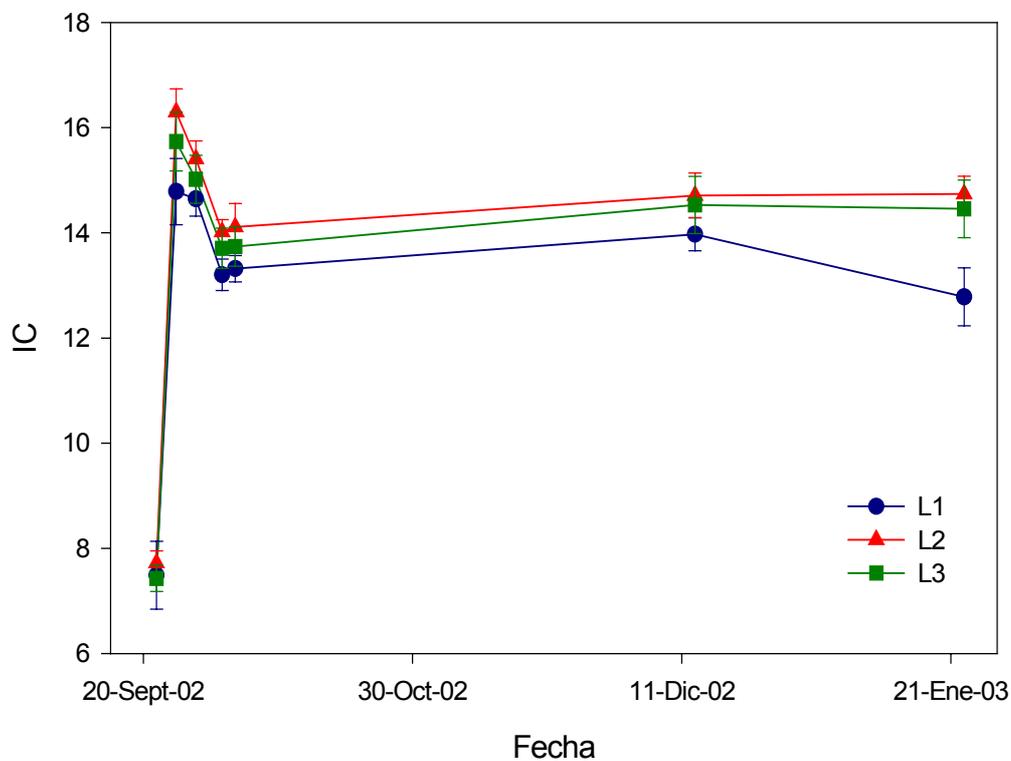
diferentes levaduras, presentado mayor color el vino con un valor más elevado de este índice.

### **VII.2.2.2.3 Intensidad de color y tono**

La máxima intensidad de color es alcanzada a los cinco días de maceración y aunque ésta desciende durante el progreso de la maceración al disminuir el contenido de antocianos totales, vuelve a incrementarse conforme avanza la vinificación debido posiblemente a la formación de antocianos polímeros de color más intenso. Durante todo el proceso de elaboración, el tratamiento L2 muestra los valores más altos de intensidad de color, mientras que L1 (testigo) es el tratamiento menos coloreado. Desde fin de fermentación alcohólica hasta final de fermentación maloláctica, la vinificación testigo sufre un descenso acusado en la intensidad de color, el cual no es observado con las levaduras L2 y L3. Las levaduras también pueden presentar actividad  $\beta$ -glucosidasa (Hernández et al., 2003), la cual puede contribuir a disminuir la intensidad de color del vino. Bartowsky et al. (2004), en un ensayo realizado con 17 cepas de *S. cerevisiae*, encontraron diferencias en el color de los vinos tanto a pequeña escala como a nivel industrial. Morata et al. (2004) obtuvieron los vinos más coloreados los fermentados con levaduras que presentaban menor adsorción de los antocianos en su pared celular.

En cuanto al tono, todas las vinificaciones sufren un incremento durante el proceso de elaboración. En el transcurso de la maceración y al finalizar la fermentación alcohólica, no se observan diferencias en este parámetro entre las diferentes vinificaciones. Al finalizar la fermentación maloláctica L2 y L3 son los vinos menos evolucionados al presentar un valor de tono más bajo que el testigo. Bartowsky et al. (2004) al igual que nosotros, obtuvo los valores más bajos de tono en los vinos que presentaron mayor intensidad de color.

**Gráfica VII.4** Evolución de la intensidad de color y el tono desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones del año 2002. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Descubre: 20-Oct-02, Fin Fermentación Alcohólica: 30-Oct-02, Fin Fermentación Maloláctica: 21-Ene-03.



#### VII.2.2.2.4 Parámetros L\*, a\* y b\*

Los parámetros L\*, a\* y b\* muestran una evolución similar y alcanzan los valores más bajos al final de fermentación maloláctica. En este momento, aunque no se observan diferencias significativas en los valores de estos parámetros entre los vinos, L2 y L3 son más oscuros y con mayores tonalidades violáceas (b\* más bajo) que el testigo.

**Tabla VII.2** Cambios de los valores de L\*, a\* y b\* con sus desviaciones estándar de las distintas vinificaciones del año 2002 a los 15 días de maceración, fin de fermentación alcohólica (FFA) y fin de fermentación maloláctica (FFM).

Vinificación	Días	L*	a*	b*
L1	15	14,9 ± 0,21	47,5 ± 0,22	25,5 ± 0,33
	FFA	12,1 ± 0,95	44,1 ± 1,28	20,9 ± 1,62
	FFM	8,3 ± 0,96	38,5 ± 1,28	14,2 ± 1,62
L2	15	14,5 ± 0,27	47,0 ± 0,32	24,9 ± 0,45
	FFA	11,5 ± 0,57	43,0 ± 0,73	19,8 ± 0,98
	FFM	6,4 ± 0,70	35,8 ± 1,11	11,1 ± 1,41
L3	15	14,6 ± 0,21	47,2 ± 0,47	25,1 ± 0,36
	FFA	11,9 ± 0,26	43,4 ± 0,36	20,1 ± 0,44
	FFM	6,5 ± 0,09	38,5 ± 0,14	11,2 ± 0,15

Durante la maceración, la extracción de compuestos fenólicos, da lugar a la disminución de los valores de L\*, a\* y b\*, pero conforme avanza la vinificación, son los procesos de polimerización entre estos compuestos los responsables de que los vinos sean más oscuros y con mayores tonalidades violetas que al principio.

### VII.2.2.3 PARÁMETROS CROMÁTICOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS DE 2002 DURANTE SU CONSERVACIÓN EN BOTELLA

#### VII.2.2.3.1 Parámetros de color espectrofotométricos

La tabla VII.3 muestra las características cromáticas de los vinos de 2002 en el momento de su embotellado y a los 8 meses de envejecimiento en botella.

En el momento de su embotellado, hay un descenso en el contenido polifenólico de los vinos, lo cual hace que los vinos sean menos coloreados que al final de fermentación maloláctica. En este momento, L1 (testigo) es el vino con menor intensidad de color, mostrando mayores tonalidades amarillas (mayor %420) y menos rojas (%520), lo cual hace que sea el vino más evolucionado (mayor tono). Junto con L2, son los vinos menos oscuros (mayores valores de L\*). L3 es el vino con mejores características cromáticas, mayor intensidad de color, menor valor del parámetro L\* y mayor estabilización de los antocianos, como indica la mayor concentración de antocianos polímeros presente en este vino. Watson et al. (1996) también encontraron diferentes concentraciones de antocianos polímeros al analizar vinos elaborados con diferentes cepas de *S. cerevisiae*. No se observan diferencias significativas en las distintas fracciones de taninos, aunque el vino testigo muestra un contenido ligeramente superior de la fracción más polimerizada respecto a L2 y L3, lo cual puede ser debido a una menor estabilización de los taninos de menor peso molecular como consecuencia posiblemente de una menor liberación de polisacáridos por Fermirouge (levadura testigo), ya que dicha liberación parece ser específica de cada cepa de levadura (Rosi et al., 1998; Rosi et al., 1999).

Después de ocho meses en botella, hay un ligero descenso en el contenido polifenólico de los vinos, siendo un poco más acentuado en L1. En este momento, los vinos L2 y L3 siguen mostrando menor tono que el testigo, debido a una menor contribución de la componente amarilla y una mayor

contribución de la componente roja y una mayor concentración de antocianos monómeros. Los vinos L2 y L3 únicamente se diferencian en la contribución de la componente azul en el color, siendo más alta en el vino L3. Morata et al. (2005) indicaron que la estabilidad del color tras el proceso de envejecimiento podía estar más garantizado si existe una mayor formación de vitisina A y vitisina B durante el proceso de fermentación, sugiriendo la selección de levaduras con adecuadas producciones de ácido pirúvico y acetaldehído. Concretamente, la mayor formación de éstos compuestos tiene lugar a mitad de fermentación, vitisina A y en las últimas etapas del proceso fermentativo, vitisina B, siendo además débilmente adsorbidas por las paredes de las levaduras (Morata et al., 2004). Nosotros hemos encontrado mayor concentración de estos compuestos en los vinos L2 y L3 y concretamente mayor contenido de la vitisina A en el vino L2 y de la vitisina B en el vino L3 (los valores de vitisinas cuantificados como malvidina-3-glucósido en los vinos L1, L2 y L3 fueron respectivamente de 0,49, 0,64 y 0,59 mg/L para la vitisina A y 0,70, 0,72 y 0,78 mg/L para la vitisina B).

Bartowsky et al. (2004) observaron que las diferencias de intensidad de color de los vinos elaborados con diferentes cepas de *S. cerevisie* se mantenían después de ocho meses, de tal manera que la intensidad de color relativa de los vinos jóvenes podría indicar las propiedades del vino envejecido, excepto cuando el envejecimiento tuviera lugar en barrica o con aplicación de la microoxigenación, ya que pueden confundir el efecto. Riou et al. (2002) indicaron que también pueden haber otros mecanismos implicados en la estabilización de los compuestos fenólicos en el tiempo por parte de las levaduras, principalmente debido a la adsorción de los polisacáridos sobre las partículas formadas por los taninos, previniendo el incremento del tamaño de la partícula y por tanto su precipitación.

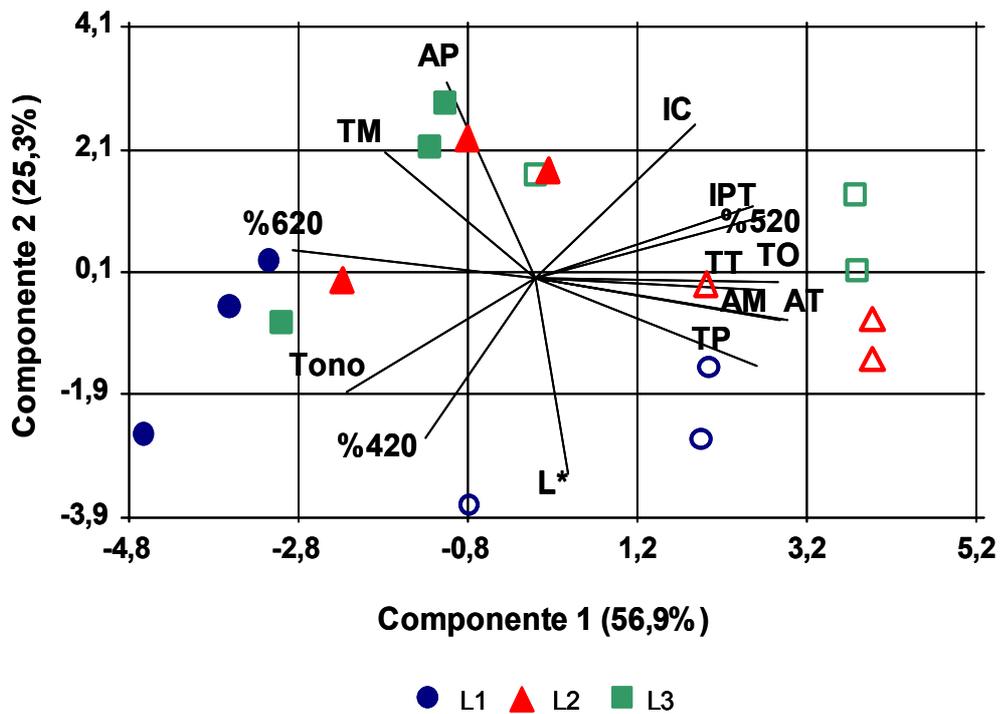
**VII.3** Cambios de los parámetros cromáticos de los vinos de 2002 en el momento de su embotellado y transcurridos 8 meses en botella. Letras diferentes en la misma fila y para cada periodo estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, TT: taninos totales, %520: porcentaje de color rojo, %420: porcentaje de color amarillo, %620: porcentaje de azul.

Parámetros	L1	L2	L3	L1	L2	L3
	t=0 meses botella			t=8 meses botella		
<b>IC</b>	12,2 a	12,7 ab	13,0 b	11,9 a	12,5 a	12,6 a
<b>Tono</b>	0,68 b	0,64 a	0,64 a	0,68 b	0,65 a	0,66 a
<b>%420</b>	34,1 b	33,2 a	33,0 a	34,1 b	33,3 a	33,4 a
<b>%520</b>	50,4 a	52,1 b	51,5 b	49,4 a	50,9 b	50,1 b
<b>%620</b>	15,6 a	14,7 a	15,5 a	16,5 c	15,8 a	16,2 b
<b>IPT</b>	47,2 a	48,4 a	48,5 a	45,4 a	47,0 a	47,0 a
<b>AM</b>	50,9 a	54,5 a	50,4 a	33,5 a	41,6 b	39,8 b
<b>AP</b>	113,5 a	116,4 a	127,7 b	128,3 a	134,0 a	132,4 a
<b>AT</b>	252,3 a	262,8 a	270,9 a	192,2 a	206,9 a	205,0 a
<b>L*</b>	8,3 b	8,3 b	7,3 a	7,7 a	7,4 a	7,2 a
<b>TM</b>	93,6 a	93,3 a	101,1 a	107,6 a	112,0 a	115,4 a
<b>TO</b>	188,9 a	194,1 a	202,4 a	150,6 a	166,3 a	164,5 a
<b>TP</b>	651,6 a	596,0 a	590,3 a	399,2 a	414,5 a	366,0 a
<b>TT</b>	1,8 a	1,7 a	1,8 a	1,5 a	1,6 a	1,6 a

El análisis de componentes principales de los 3 vinos durante el periodo de envejecimiento (Gráfica VII.5) mostró que todos los vinos disminuyeron sus valores a través de la componente 1 y de la componente 2, decreciendo %520, la intensidad de color, L\*, taninos totales y sus fracciones más polimerizadas, antocianos totales y monómeros y el índice de polifenoles totales y produciéndose incrementos en los valores de tono, %620, antocianos polímeros y taninos monómeros. Tanto en el momento del embotellado como

después de 8 meses en botella, el vino L1 (testigo) muestra una separación clara respecto L2 y L3, presentando además las peores características de color (mayor L\*, menor IC), no observándose en cambio grandes diferencias en el perfil cromático de los vinos L2 y L3.

**Gráfica VII.5** Distribución de los vinos elaborados en el 2002 durante su envejecimiento en botella en un sistema de coordenadas bidimensional definido por dos componentes principales (el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal es mostrado entre paréntesis). Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, %520: porcentaje de color rojo, %620: porcentaje de color azul, %420: porcentaje de color amarillo, símbolos blancos: t=0 meses, símbolos oscuros: t=8 meses.



### VII.2.2.3.2 Compuestos fenólicos individuales

La tabla VII.4 muestra los valores de compuestos fenólicos individuales en los vinos de 2002 en el momento del embotellado y después de 8 meses de envejecimiento en botella.

En el momento de su embotellado, el vino testigo (L1) muestra mayor cantidad de ácidos hidroxicinámicos y flavonoles que L2 y L3. Al igual que nosotros, Barcenila et al. (1989) también encontraron diferencias en la concentración de estos compuestos en vinos fermentados con diferentes levaduras. El vino L1 presenta mayor concentración de malvidina-3-glucósido que L2, en cambio su contenido en cianidina y peonidina es más bajo que en los otros tratamientos, poniendo de manifiesto la mayor naturaleza hidrofílica de los constituyentes parietales en la levadura Fermirouge (L1) (Vasserot et al., 1997). Los vinos L2 y L3 sólo se diferencian en la concentración de ácidos hidroxicinámicos, siendo mayor en L2. Almela et al. (1991) indicaron que la menor presencia de ácido ferúlico y cafeico en el vino podía estar ligado a procesos de  $\beta$ -oxidación, los cuales están favorecidos por algunas levaduras (Hernández et al., 2003). En cuanto a los ácidos hidroxibenzoicos y flavan-3-oles, todos los vinos muestran una concentración similar. A diferencia de nosotros, Watson et al. (1996) obtuvieron vinos más ricos en catequina, epicatequina y ácido gálico con algunas de las cepas ensayadas y Lázaro et al. (1990) y Almela et al. (1991) encontraron valores de ácidos hidroxibenzoicos ligeramente más bajos en el vino con la levadura mejor adaptada a las condiciones de la zona (levadura autóctona) que con levaduras comerciales.

Después de ocho meses en botella, disminuye el contenido de flavonoles, antocianos, ésteres hidroxicinámicos y flavan-3-oles y se incrementan los ácidos hidroxibenzoicos y los hidroxicinámicos en todos los vinos como consecuencia de la hidrólisis de sus correspondientes derivados (Monagas et al., 2005).

**Tabla VII.4** Compuestos fenólicos medidos en mg/L por HPLC de los vinos de 2002 en el momento de su embotellado y después de 8 meses en botella. Letras diferentes en la misma fila y para cada periodo estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ .

Compuestos fenólicos	L1	L2	L3	L1	L2	L3
	t=0 meses botella			t=8 meses botella		
Ácido gálico	19,5 a	19,2 a	20,2 a	27,6 a	27,5 a	28,1 a
Ácido siríngico	2,4 a	2,6 a	2,3 a	2,9 a	3,0 a	2,8 a
Ácido protocatéquico	6,4 a	6,3 a	6,1 a	14,3 a	14,4 a	12,8 a
ΣÁcidos hidroxibenzoicos	28,3 a	28,2 a	28,6 a	44,8 a	44,8 a	43,7 a
Ácido cafeico	1,4 b	1,3 ab	1,1 a	1,2 b	0,8 a	0,8 a
Ácido ferúlico	0,58 c	0,18 b	0,11 a	0,44 c	0,17 b	0,10 a
Ácido p-cumárico	3,6 c	0,59 b	0,32 a	4,6 b	1,5 a	1,2 a
ΣÁcidos hidroxicinámicos	5,6 c	2,0 b	1,5 a	6,2 b	2,4 a	2,1 a
Ácido caftárico	10,0 a	9,8 a	9,9 a	9,7 a	9,8 a	9,8 a
Ácido cutárico	3,3 a	3,3 a	3,3 a	2,8 a	3,3 a	3,2 a
ΣÉsteres hidroxicinámicos	13,3 a	13,1 a	13,1 a	12,6 a	13,0 a	13,0 a
Catequina	33,5 a	33,4 a	33,5 a	11,8 a	13,2 a	12,3 a
Epicatequina	15,4 a	14,9 a	15,6 a	4,8 a	5,7 a	5,6 a
ΣFlavan-3-oles	49,0 a	48,3 a	49,1 a	16,6 a	18,9 a	17,9 a
Rutina	4,0 b	3,5 ab	3,2 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Quercitrina	0,30 a	0,28 a	0,30 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Miricitina	2,9 a	3,1 a	3,2 a	4,9 a	5,6 a	4,7 a
Quercetina	7,2 b	5,8 a	6,4 ab	3,1 a	3,2 a	3,3 a
Kampferol	0,40 b	0,13 a	0,19 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
ΣFlavonoles	14,8 b	12,9 a	13,3 ab	8,0 a	8,8 a	8,0 a
Delfinidina-3-Glucósido	9,7 a	9,8 a	10,1 a	0,77 a	0,94 a	0,86 a
Cianidina-3-Glucósido	2,3 a	3,6 b	3,5 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Petunidina-3-Glucósido	18,2 a	17,1 a	17,5 a	1,1 a	1,5 a	1,3 a
Peonidina-3-Glucósido	12,1 a	14,2 b	14,3 b	0,8 a	1,3 b	1,1 ab
Malvidina-3-Glucósido	79,9 b	75,1 a	76,8 ab	2,7 a	4,0 b	4,0 b
ΣAntocianos	122,9 a	119,9 a	122,2 a	5,4 a	7,8 b	7,2 ab

En este momento, la concentración de los ácidos hidróxicinámicos sigue siendo mayor en el vino L1, no encontrándose diferencias entre L2 y L3. El contenido de antocianos monoglucósidos es más alto en los vinos L2 y L3. También, aunque no se observan diferencias significativas en el contenido de flavan-3-oles, los vinos L2 y L3 muestran valores ligeramente más altos que L1. Por un lado, los taninos durante el envejecimiento, están sometidos a procesos de polimerización y despolimerización dando lugar a aumentos en las fracciones menos polimerizadas, y por otro lado, la estabilización de estos compuestos por parte de las manoproteínas puede evitar su mayor polimerización.

Estos resultados ponen de manifiesto que el tipo de levadura utilizada puede afectar al perfil cromático de los vinos y que no siempre se obtienen vinos de mejor calidad con las levaduras tradicionalmente utilizadas en el proceso de vinificación en una determinada zona de producción, al mostrar el vino elaborado con Rhône 2323 mejores características de color durante el proceso de vinificación en los dos años de elaboración e incluso después de ocho meses de envejecimiento en botella.

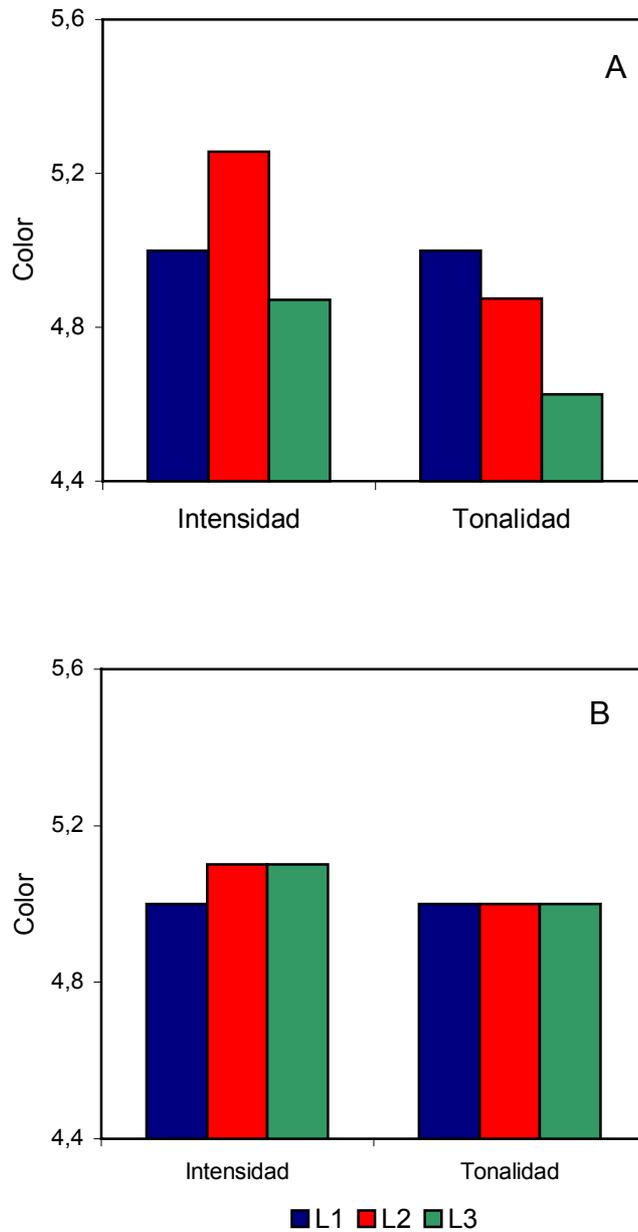
### **VII.2.3 ANÁLISIS SENSORIAL**

En las gráficas VII.6, VII.7 y VII.8 se presentan los resultados de la cata descriptiva de los vinos elaborados en la campaña de 2002 en el momento de su embotellado y transcurridos 8 meses en botella. En cada una de las gráficas se puede observar el análisis de la fase visual, olfativa y gustativa de los diferentes vinos.

La intensidad de cada uno de los atributos fue valorada en una escala de cero a diez, dando mayor puntuación a mayor sensación. Para facilitar la comprensión de los resultados, las puntuaciones del vino testigo fueron

normalizadas a un valor de cinco, comparando los vinos elaborados con las otras levaduras con él.

**Gráfica VII.6** Evaluación sensorial de la intensidad y tonalidad del color de los vinos elaborados en el 2002 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.

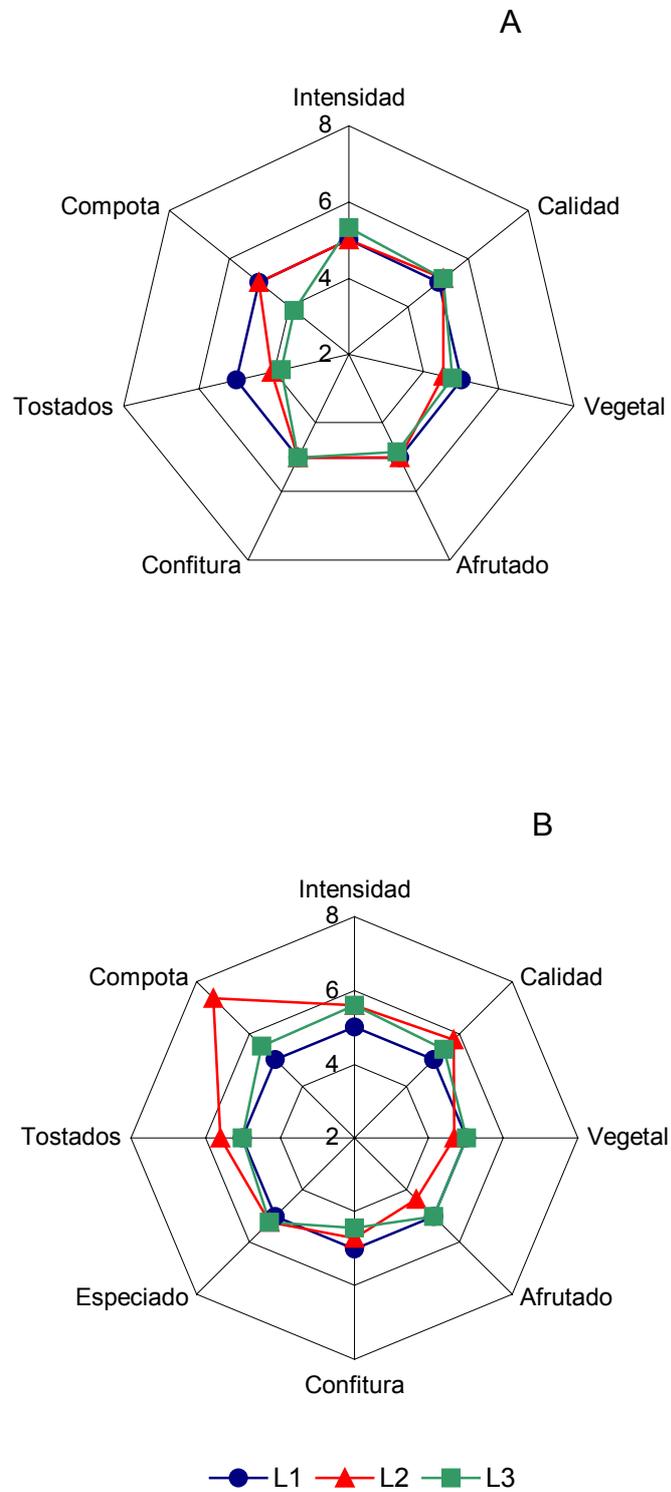


En la fase visual, tras el embotellado el vino L3 es el que presenta menor intensidad de color y tonalidad, mientras que L2 es el vino más intenso pero con menor tonalidad violeta que el vino testigo. Después de ocho meses en botella, se incrementa la intensidad y la tonalidad en el vino L3, mostrando valores similares a L2. En este momento, el vino testigo muestra una intensidad de color menor que L2 y L3, no observándose en cambio diferencias en la tonalidad.

En cuanto al aroma, tras el embotellado, todos los vinos muestran una intensidad y calidad similar, encontrándose únicamente diferencias en las sensaciones a vegetal, a tostado y compota. Los vinos L2 y L3 presentan menos recuerdos a tostado y ligeramente a vegetal que el vino testigo y se diferencian en la sensación a compota, la cual es menor en L2. Después de ocho meses en botella, se incrementa la intensidad y calidad aromática en los vinos L2 y L3. En este momento, el vino L3 muestra menos recuerdos a afrutado, pero más a tostado y a compota que los vinos L2 y L1. En cambio el vino L2 muestra un perfil aromático un poco más similar a L1, aunque con menores sensaciones a confitura y más a compota.

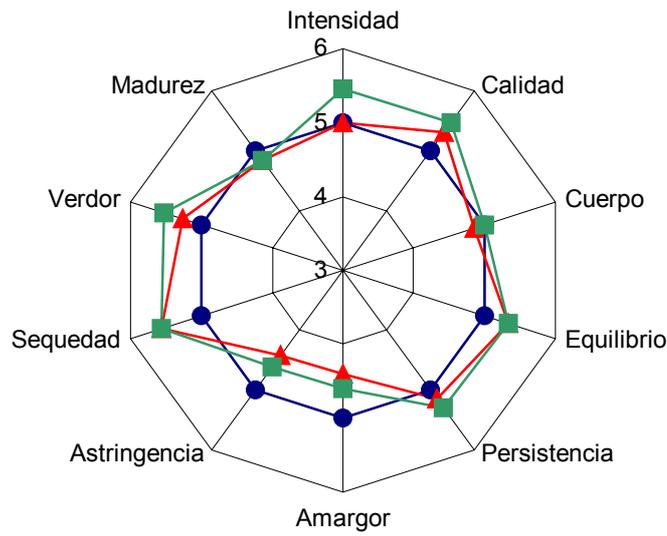
En boca, tras el embotellado, L2 y L3 son los vinos con mayor calidad, equilibrio y persistencia. Además, muestran menor sensación de astringencia y amargor, pero son más secos y un poco más verdes que el vino testigo. Estos vinos causan prácticamente las mismas sensaciones, aunque L2 es un poco más intenso. Después de ocho meses en botella, el vino L2 muestra sensaciones similares al testigo. En cambio, el vino L3 es más intenso y con mayor calidad, cuerpo, equilibrio y menor astringencia, sequedad y verdor que L1 y L2. Esta menor astringencia puede ser debido a una mayor estabilización de los taninos en este vino, al reducir los polisacáridos la reactividad de estas moléculas con las proteínas de la saliva.

**Gráfica VII.7** Evaluación sensorial del aroma de los vinos elaborados en el 2002 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.



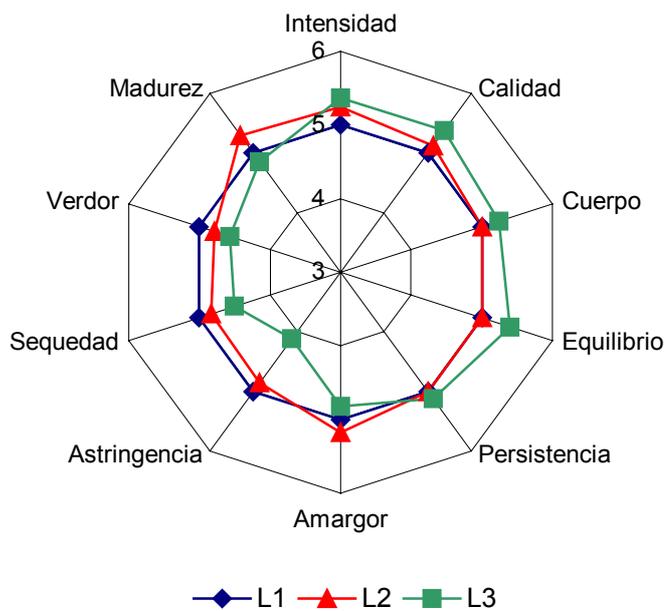
**Gráfica VII.8** Evaluación sensorial del gusto de los vinos elaborados en el 2002 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.

A



A

B



Majdak et al. (2002) encontraron diferencias en la calidad y aroma de los vinos con diferentes cepas de levaduras después de seis meses en botella, siendo el vino más intenso el de menor concentración de alcoholes mayoritarios, suponiendo que la concentración de estos compuestos podía ser la responsable de dichas diferencias.

Estos resultados ponen de manifiesto que con Rhône 2323 se consigue un vino con mejores características tanto en la fase visual, como en la fase aromática y gustativa. Esto unido también a un mejor perfil cromático del vino en los dos años de elaboración, implica la selección de esta levadura para la obtención de vinos de Monastrell de mayor calidad.



**VIII. INFLUENCIA DEL TIEMPO  
DE MACERACIÓN Y LA  
APLICACIÓN DE SANGRADOS  
PARCIALES DEL MOSTO EN  
EL COLOR DEL VINO**



## VIII.1 INTRODUCCIÓN

El vino tinto es un vino de maceración, y esta constituye una extracción fraccionada de la uva (Peynaud, 1984). El grado de extracción influye en la cantidad y estabilidad del color, la astringencia y la estructura tánica del vino, en el gusto y aroma y en el potencial del vino para envejecer (Zoecklein, 1991). Los compuestos polifenoles están localizados en diferentes partes de la uva y tienen diferente solubilidad y capacidad de difusión con respecto a la fase acuosa o alcohólica, y con respecto a la temperatura y condiciones químicas del mosto. Solamente una tercera parte de los compuestos fenólicos presentes en la uva son extraídos en el vino (Singleton y Draper, 1964) y estos proceden de la pulpa, hollejos y semillas. Por esta razón, el tamaño de la baya (relación hollejo/mosto) y el número de semillas por baya son muy importantes en el proceso de maceración

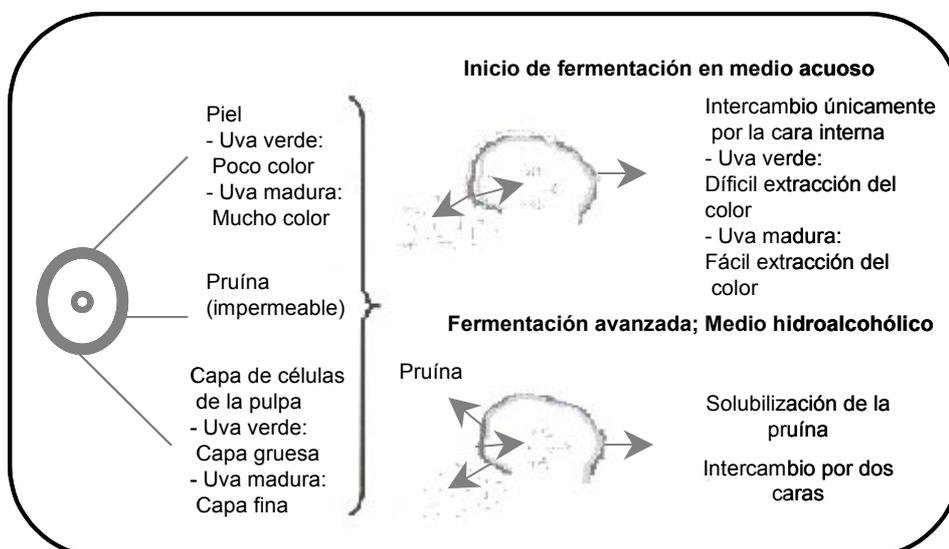
### VIII.1.1 FENÓMENOS QUE OCURREN DURANTE LA MACERACIÓN

Durante la maceración, los compuestos que se encuentran en las vacuolas de las células de los hollejos (azúcares, ácidos, sales, polifenoles, antocianos y los compuestos que proporcionan gusto/aroma) y los taninos de las semillas son extraídos al mosto-vino. Obviamente, esta extracción requiere la degradación de la pared celular y la ruptura de la cutícula por lo que se ve favorecida con el incremento del alcohol y la temperatura durante la fermentación y por la adición de SO<sub>2</sub> (Oszmanski et al., 1986).

La liberación de los constituyentes de la uva en el mosto-vino es esencialmente un proceso de extracción-difusión y la extensión de la misma está influenciada por la naturaleza del compuesto, de su concentración y de su localización en la baya. El estado de maduración de la uva también va a influir

de manera muy acusada en el proceso de extracción como puede ser apreciado en la Figura VIII.1 (Zamora, 2003a). También la difusión se puede ver afectada por la temperatura, la solubilidad del compuesto en el medio agua/alcohol, el gradiente de concentración entre los “sólidos” de la uva y el mosto-vino, por el equilibrio químico y por las reacciones que ocurran en el medio.

**Figura VIII.1** Influencia del estado de maduración de la uva en los procesos de extracción de los compuestos fenólicos durante la maceración.



Tanto la extracción como la difusión de los compuestos fenólicos aumenta con la renovación del mosto-vino que impregna las partes sólidas lo cual se consigue mediante la realización de remontados o por hundimiento del sombrero.

De los distintos compuestos que van a ser extraídos, los ácidos hidroxibenzoicos y los hidroxicinámicos son solubles en la fase acuosa y se les

encuentra desde el principio de la maceración (Lázaro et al., 1990). Los antocianos son también solubles en agua y el máximo de extracción es obtenido frecuentemente en los primeros días de contacto con los hollejos. Los flavanoles, sus oligómeros y las procianidinas son más solubles en alcohol y están localizados mayormente en las semillas, por ello el contenido de polifenoles totales y taninos debido a estos compuestos se incrementa más lentamente durante la maceración. Muchos cultívars también tienen cantidades significantes de estos flavonoides en los hollejos, excepto Pinot noir, ya que carece de flavanoles monómeros y procianidinas en los hollejos (Thorngate et al., 1992). El potasio es encontrado mayormente en los hollejos y tiene un importante efecto sobre el pH del vino. Los compuestos de la uva que proporcionan gusto y aroma son un grupo grande y complejo, solubles en agua, y son encontrados en forma volátil libre o bien glucosídicamente enlazados a precursores en las vacuolas del mesocarpio y del pericarpio bajo el hollejo (Brander et al., 1980). La extracción de polisacáridos y compuestos nitrogenados (ácidos amino y proteínas) también es importante en la maceración y para la evolución del vino.

### **VIII.1.2 EVOLUCIÓN DE ANTOCIANOS Y TANINOS DURANTE LA MACERACIÓN**

La evolución de los compuestos polifenólicos durante la maceración generalmente muestra una curva exponencial simple, aunque para los antocianos se ha descrito un modelo exponencial en dos fases, una creciente y otra decreciente (Boulton, 1995). El comportamiento de la extracción de los compuestos fenólicos en el mosto-vino muestra que aunque la difusión es un mecanismo importante en el proceso y un modelo de difusión puede describir generalmente la extracción, el proceso total es algo más complejo (Boulton, 1995). El modelo de difusión general puede ser descrito como:

$$d[\text{flavonoides}]/dt = k \times ([F]_e - [F])$$

$[F]_e$  = concentración de flavonoides

$[F]$  = concentración instantánea de los flavonoides en el mosto-vino

$K$  = constante

Esencialmente, la velocidad de extracción es proporcional al gradiente de concentración entre los sólidos y el mosto-vino. Cuando se integra la ecuación da la siguiente expresión:

$$[F] = [F]_0 + [F]_e \times (1 - e^{-Kt})$$

$[F]$  = concentración de flavonoides

$[F]_0$  = concentración inicial de flavonoides en el mosto

Los antocianos son extraídos a una velocidad relativamente rápida y la concentración de antocianos monómeros alcanza su máximo normalmente en los primeros días de la fermentación. Después de este momento decrecen. La disminución de los antocianos monómeros puede ser debida a la adsorción en las paredes de las levaduras (Morata et al., 2003a) y partes sólidas de la uva (Bourzteix et al., 1970), por degradación y por inclusión en cristales de bitartrato potásico, los cuales se incrementan durante la fermentación al disminuir su solubilidad en alcohol. Pero también los antocianos son reactivos y forman parte fácilmente de las reacciones de polimerización, especialmente con procianidinas de la uva y con el acetaldehído formado del metabolismo de las levaduras y/o bien por oxidación del etanol. La polimerización entre

antocianos y taninos es importante para la estabilidad del color del vino, protegiendo en parte a los antocianos de la degradación (Sims y Bates, 1994), así las especies resultantes son más resistentes a las reacciones de hidratación y decoloración con SO<sub>2</sub> (Cheynier, 2003). Se ha observado que la presencia de antocianos en un vino tinto es vital para la extracción y retención en solución de grandes cantidades de taninos oligómeros y polímeros y también de flavonoles (Kantz y Singleton, 1991). La forma general de la curva de extracción para antocianos y fenoles se muestra en la Figura VIII.2.

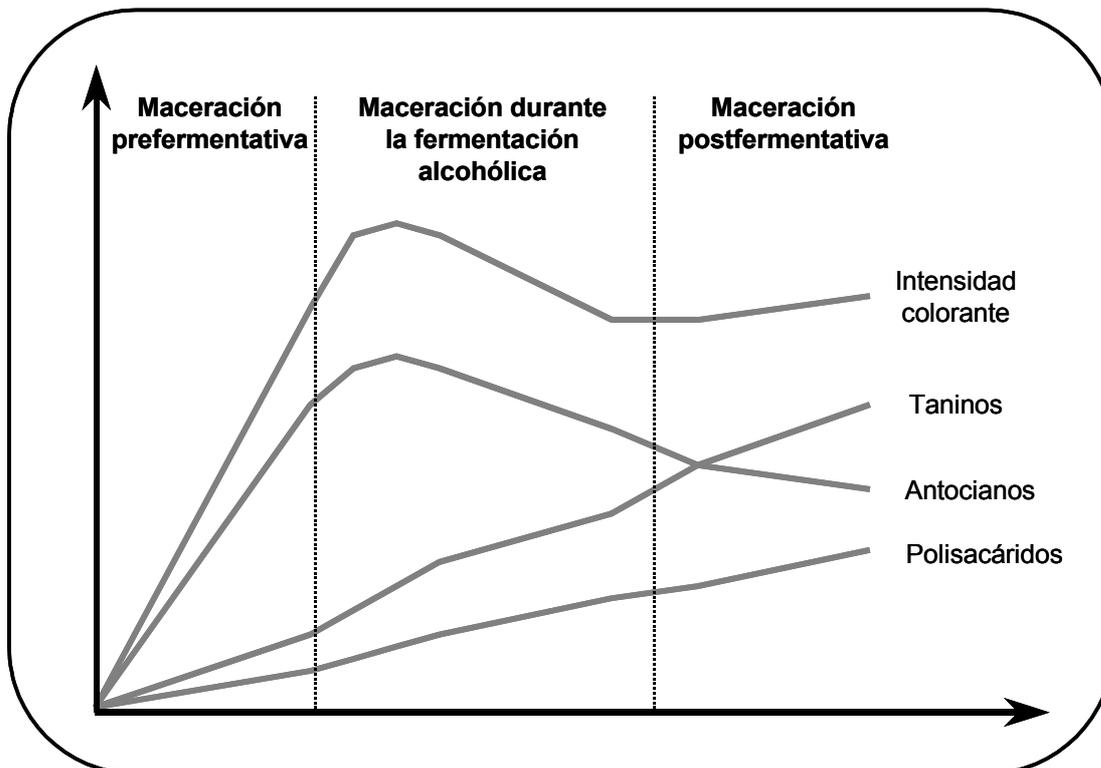
Los taninos de los hollejos y semillas se solubilizan más lentamente que los antocianos. De hecho, en la maceración prefermentativa, al no haber etanol en el medio y al ser las temperaturas moderadas, su extracción es muy limitada (Figura VIII.2). La extracción de los taninos puede ser descrita como una difusión (Boulton, 1995), que incluye los flavan-3-oles y sus oligómeros de 2 a 8, polímeros de mayor número de unidades y también algunas formas galoiladas de ellos. Los taninos de los hollejos y de las semillas poseen diferentes cinéticas de extracción. Los taninos de los hollejos comienzan a solubilizarse conjuntamente con los antocianos, si bien su extracción se prolonga mucho más en el tiempo. Por el contrario, los taninos de las semillas no se solubilizarán hasta la mitad de la fermentación, cuando el alcohol haya disuelto la cutícula. Por tanto, la extracción de los flavanoles y procianidinas desde las semillas al mosto-vino es un aspecto importante al considerar la extensión del tiempo de maceración (Singleton y Draper, 1964; Boulton, 1995).

La concentración de los taninos en los vinos se incrementa hacia un máximo y después se mantiene constante y no disminuye como se observa en el caso de los antocianos. Esto es así a pesar del hecho que estos fenoles también están involucrados en reacciones similares a la de los antocianos, con la excepción de la degradación de los antocianos monómeros. En el primer año de maduración, la disminución de catequina es solamente un cuarto de la disminución de los antocianos (Nagel y Wulf, 1979).

Los taninos son también especies reactivas y la formación y la ruptura de enlaces entre flavanoles ocurre continuamente al pH del vino (Cheynier et

al., 2000a). Con el tiempo, la proporción de enlaces de formación excede a los de ruptura, así las procianidinas oligómeras reaccionan para incrementar el tamaño del polímero (Vidal et al., 2002). También las procianidinas se enlazan y precipitan con proteínas y son sustratos de reacciones de oxidación enzimática y no enzimática (Cheynier et al., 2000a). Esto significa que ellos juegan un papel importante en el potencial redox y el estado de oxidación del vino.

**Figura VIII.2** Evolución de los compuestos fenólicos durante la maceración (Zamora, 2003a).

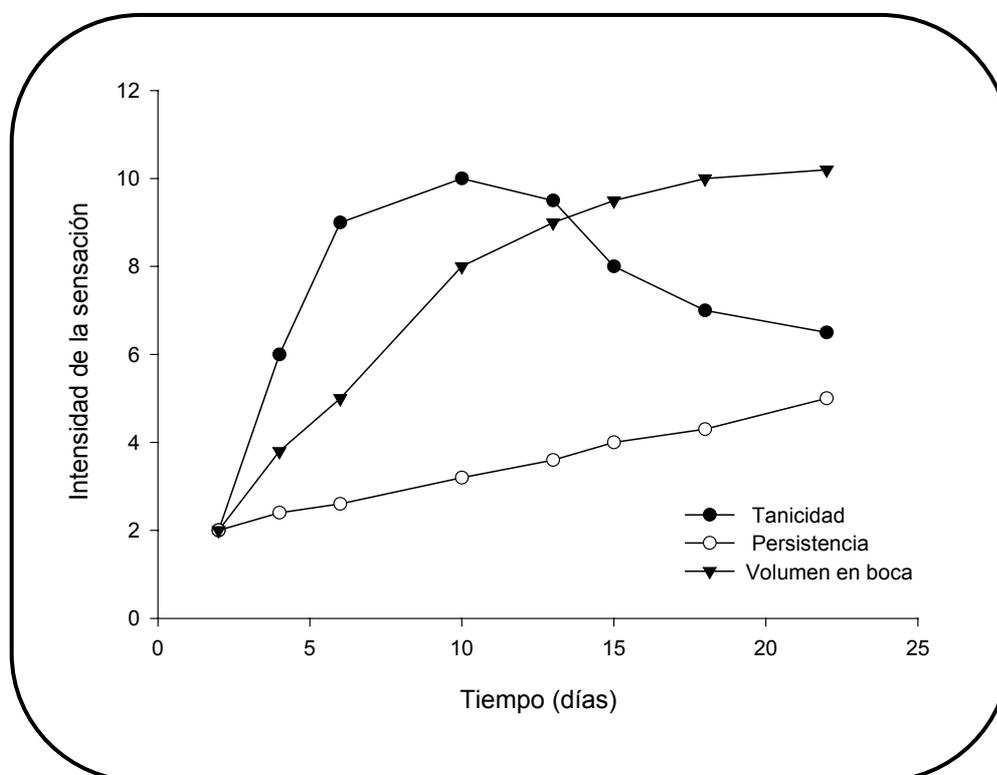


### VIII.1.3 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE MACERACIÓN EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y EL COLOR DEL VINO

El tiempo de contacto del mosto con los hollejos y semillas, junto con la variedad de uva utilizada, está considerado como el principal factor que contribuirá al estilo del vino tinto.

La maceración corta es empleada para obtener vinos jóvenes, ya que con unos pocos días de maceración se consigue una correcta extracción del color y de los aromas afrutados y se evita obtener vinos muy tánicos (Gil-Muñoz et al., 1999; Gómez-Plaza et al., 2001; Zamora, 2003a) (Figura VIII.3).

**Figura VIII.3** Influencia del tiempo de maceración en las sensaciones tánicas de los vinos (Zamora, 2003a).



Un tiempo de maceración largo es utilizado para obtener vinos destinados a crianza, ya que de este modo se consigue incrementar el color, el contenido de compuestos fenólicos, polisacáridos, proteínas y pigmentos polímeros y así dar al vino la estructura necesaria y poder garantizar la estabilidad del color (Auw et al., 1996). Los vinos pueden hacerse más astringentes, con mayor intensidad aromática pero con menos aroma a fruta. La astringencia generalmente no se hace excesiva, o esta podría incluso disminuir (Scudamore-Smith et al., 1990; Sims y Bates, 1994).

La maceración también puede influir en el aroma del vino. Estudios de interacciones de aromas en soluciones modelos han mostrado que la concentración del benzoato de etilo disminuye conforme incrementa la concentración de catequina, así el mayor contenido de compuestos fenólicos en el vino puede disminuir la volatilidad de algunos compuestos que proporcionan gusto/aroma (Rounsavill et al., 1996).

La extracción y/o retención de compuestos fenólicos monómeros y polímeros generalmente se incrementa al aumentar el tiempo de maceración (Kantz y Singleton, 1991). Comparando con las uvas blancas que podrían tener concentraciones comparables en los hollejos y semillas de procianidinas, parece ser que se extraen mayores cantidades de polifenoles polímeros en vinos tintos (Kantz y Singleton, 1991; Singleton y Trouslade, 1992) y esto es debido a la formación de aductos antociano-tanino.

#### **VIII.1.4 LA TÉCNICA DEL SANGRADO**

Esta técnica consiste en modificar la proporción sólido/líquido en el mosto, retirando parte de éste justamente después del extrujado o bien adicionando más hollejo. Así, se podrán obtener distintos estilos de vino, que se van a diferenciar en el contenido de compuestos fenólicos extraídos de las

partes sólidas de la uva (Cuinier, 1988). Un incremento en esta relación podría dar lugar a vinos con mayor contenido de compuestos fenólicos, color y aroma (Gawel et al., 2001), siendo, por tanto, una técnica muy útil para aquellos años en que la uva presente un nivel de madurez insuficiente y también para aquellas variedades pobres en compuestos fenólicos.

Con la técnica del sangrado, no sólo el color y el aroma de los vinos se verá afectado sino también otras propiedades de éstos, ya que al aumentar la proporción de los hollejos respecto del mosto, disminuye la acidez y se incrementa el pH del vino.

En un estudio realizado por Siegrist y Leglise (1982), los mostos de Pinot noir fueron ajustados a un 20, 30, 40, y 50% de sólidos y después fermentaron con las partes sólidas durante siete días. Los vinos con mas cuerpo y más valorados resultaron ser aquellos elaborados con una mayor proporción sólidos/mosto. Estos resultados fueron similares a los de Singleton (1972) y Gawel et al. (2001) siendo, además, el color y el contenido de fenoles totales de los vinos al finalizar la fermentación proporcionales a la cantidad de sólidos en fermentación. El vino elaborado con un 40% de sólidos y un 60% de mosto fue considerado el mejor, mientras que el vino con solo un 20% de sólidos fue el más ligero y de insuficiente calidad. Sin embargo, el vino elaborado con una relación sólido/líquido de 1:1 fue considerado como demasiado concentrado. Esto pone de manifiesto que la utilización de esta técnica es limitada y debe realizarse con precaución.

Kovac et al. (1995), adicionando el doble o el triple de semillas que la cantidad usual presente en las fermentaciones, obtuvieron un incremento en el contenido de polifenoles totales, catequinas y procianidinas, en la estabilidad del color y en el carácter varietal, siendo ese incremento más importante para catequina y procianidinas. Estos resultados fueron paralelos a un ensayo similar, donde se encontró que la adición de semillas tuvo mayor impacto sobre el contenido de flavanoles y de procianidinas que el tiempo de maceración (Kovac et al., 1992).



## **VIII.2 RESULTADOS**

Tal y como se comentó en Materiales y Métodos, para el estudio del efecto del tiempo de maceración y sangrado sobre las características de los vinos se llevaron a cabo cinco vinificaciones, tres con diferente tiempo de maceración: 15 días (vino testigo, T), 25 días (M1), y 35 días (M2), y dos con diferente sangrado parcial del mosto: 7,5% (S1) y 15% (S2). Todas las vinificaciones se realizaron en el 2001 y 2002 en depósitos de 100 litros y por triplicado.

### **VIII.2.1 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DURANTE LA VINIFICACIÓN**

#### **VIII.2.1.1 PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS**

En las gráficas VIII.1, VIII.2, VIII.3, VIII.4 y en la tabla VIII.1 se puede observar la evolución del contenido de antocianos totales, índice de polifenoles totales, intensidad de color, tono y L\*, a\* y b\* respectivamente durante la maceración hasta fin de fermentación maloláctica de los años 2001 y 2002.

La tabla VIII.2 muestra las fechas correspondientes al descube, fin de fermentación alcohólica (FFA) y fin de fermentación maloláctica (FFM) para las diferentes vinificaciones en las elaboraciones de 2001 y 2002.

**Tabla VIII.2** Fechas correspondientes al descube, fin de fermentación alcohólica (FFA) y fin de fermentación maloláctica (FFM) para las diferentes vinificaciones en las elaboraciones de 2001 y 2002.

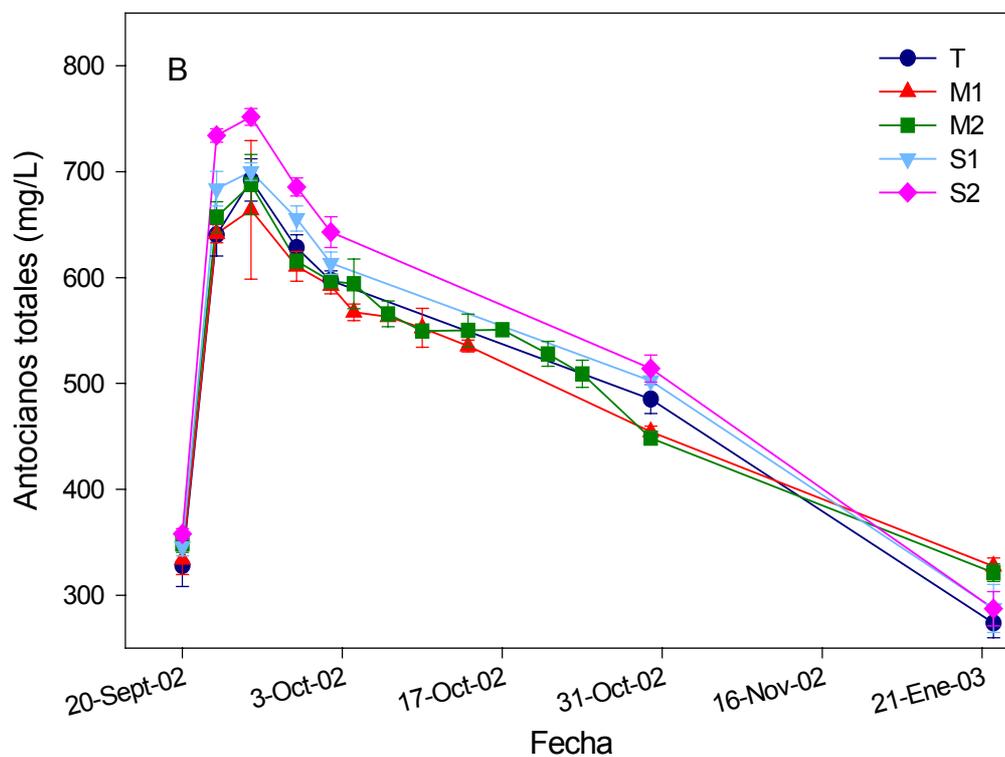
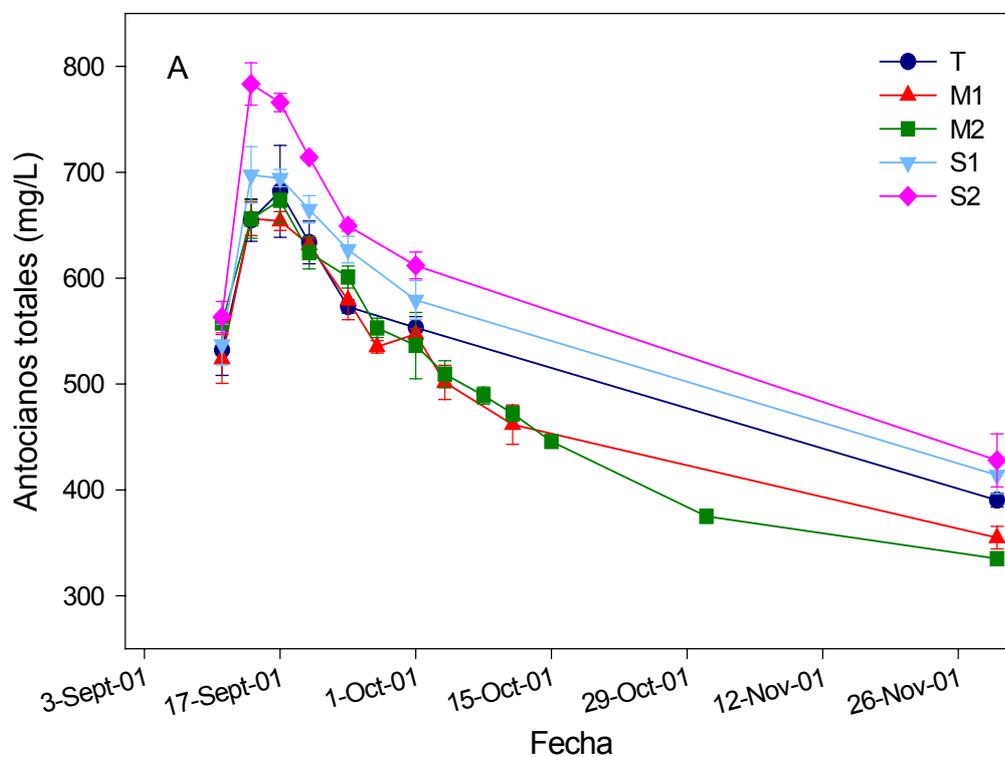
<b>Año</b>	<b>Vinificación</b>	<b>Descube</b>	<b>FFA</b>	<b>FFM</b>
<b>2001</b>	<b>T-S1-S2</b>	24-Sep-01	02-Oct-01	28-Nov-01
	<b>M1</b>	04-Oct-01	11-Oct-01	28-Nov-01
	<b>M2</b>	15-Oct-01	31-Oct-01	28-Nov-01
<b>2002</b>	<b>T-S1-S2</b>	02-Oct-02	30-Oct-02	22-En-03
	<b>M1</b>	14-Oct-02	30-Oct-02	22-En-03
	<b>M2</b>	24-Oct-02	30-Oct-02	22-En-03

#### **VIII.2.1.1.1 Antocianos totales**

Los niveles de antocianos fueron mucho más altos para los vinos S2 y las diferencias fueron más pronunciadas en el primer año del experimento. El mayor tamaño de la baya en el 2002 ocasionó un efecto menos pronunciado del tratamiento del sangrado parcial. Quizás la cantidad de mosto eliminado debería haber sido mayor este año para obtener resultados similares a los del año anterior. Como Gawel et al. (2001) indicaron, el beneficio de los tratamientos del sangrado parcial parece ser muy dependiente del tipo de fruta; el grado de sangrado del mosto requerido para conseguir mejorar la calidad del vino debe ser determinado caso a caso en base a las características de la vendimia cada año.

En el 2001, el máximo nivel de antocianos se detectó alrededor del día 9, excepto en el vino S2 el cual mostró el máximo sobre el día 6. En el 2002, el máximo se encontró alrededor del día 8 en todas las vinificaciones. Estos resultados son similares a estudios de otros autores, los cuales también encontraron que los antocianos usualmente alcanzan la máxima concentración durante los primeros días de vinificación (Gil-Muñoz et al., 1999).

**Gráfica VIII.1** Evolución de los antocianos totales desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones de los años 2001 (gráfica A) y 2002 (gráfica B). Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media.

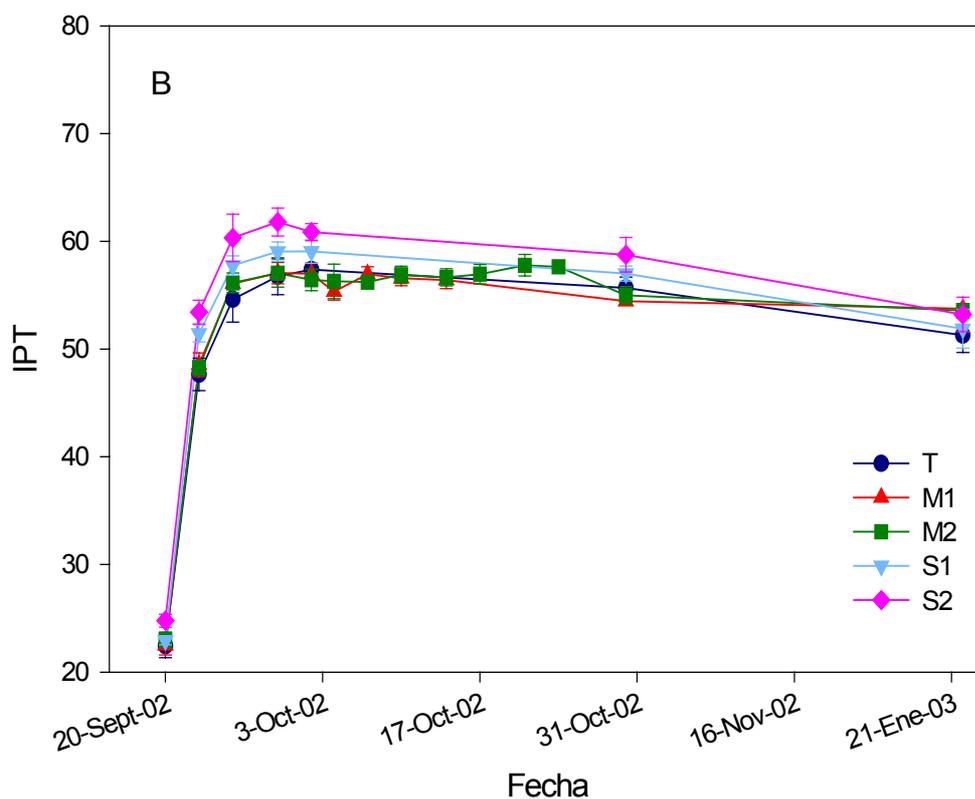
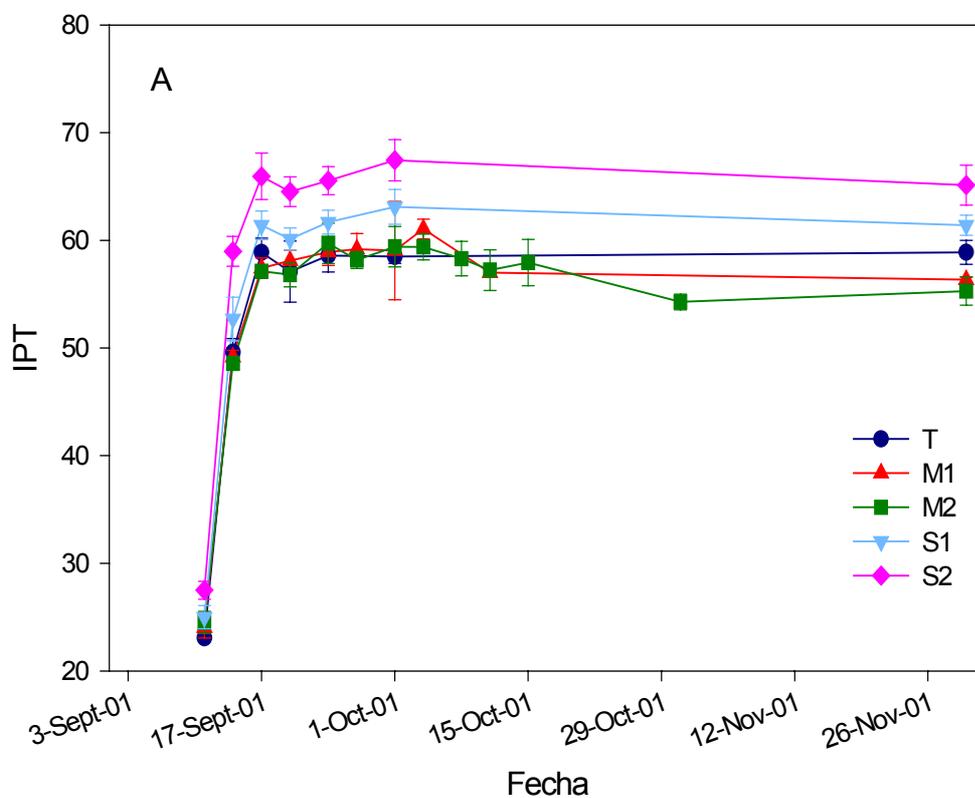


Con la aplicación de tiempos de maceración muy largos los vinos M1 y M2 sufren un descenso acusado en la concentración de antocianos. Por el contrario, Klenar et al. (2004) obtuvieron un incremento en el contenido de estos compuestos para la variedad Cabernet Sauvignon durante 18 días de maceración, aunque si observaron que la extracción de estos compuestos era más pronunciada en la fase prefermentativa y más lenta en la fase postfermentativa. Una vez alcanzado el máximo, el contenido de antocianos disminuye para todas las vinificaciones hasta fin de fermentación maloláctica. Este descenso puede ser atribuido, como ya se ha comentado, a las reacciones de polimerización y oxidación de antocianos y a la fijación de estos compuestos sobre las levaduras y sobre las partes sólidas de la uva (Bourzteix et al., 1970). Al final de la fermentación maloláctica (fin de noviembre de 2001 y fin de enero de 2003 para la vendimia del 2002) sólo se observan pequeñas diferencias en el contenido de antocianos totales entre las vinificaciones.

#### **VIII.2.1.1.2 Índice de polifenoles totales (IPT)**

Los valores del índice de polifenoles totales alcanzan su máximo más tarde que los antocianos, como también observaron Klenar et al. (2004). Como las semillas están protegidas por una capa lipídica que necesita de la presencia de etanol para ser degradada, los taninos de las semillas son extraídos al final de la fermentación alcohólica, siendo los responsables de que sigan creciendo los valores de IPT. Las vinificaciones con tiempo de maceración más largo (M1 y M2) no mostraron mayores valores del índice de polifenoles totales que el vino control, hecho también observado por Spranger et al. (2004). El máximo valor es obtenido para todos los vinos antes de 15 días de maceración. Este resultado no coincide al encontrado por Yokotsuka et al. (2000), los cuales observaron que al aumentar el tiempo de maceración (por encima de 64 días) se incrementaba el contenido de fenoles totales en el vino. El contenido de fenoles totales de los vinos M2, después de alcanzar su máximo, disminuyó, probablemente debido a precipitaciones y a fenómenos de adsorción.

**Gráfica VIII.2** Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) totales desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones de los años 2001 (gráfica A) y 2002 (gráfica B). Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media.



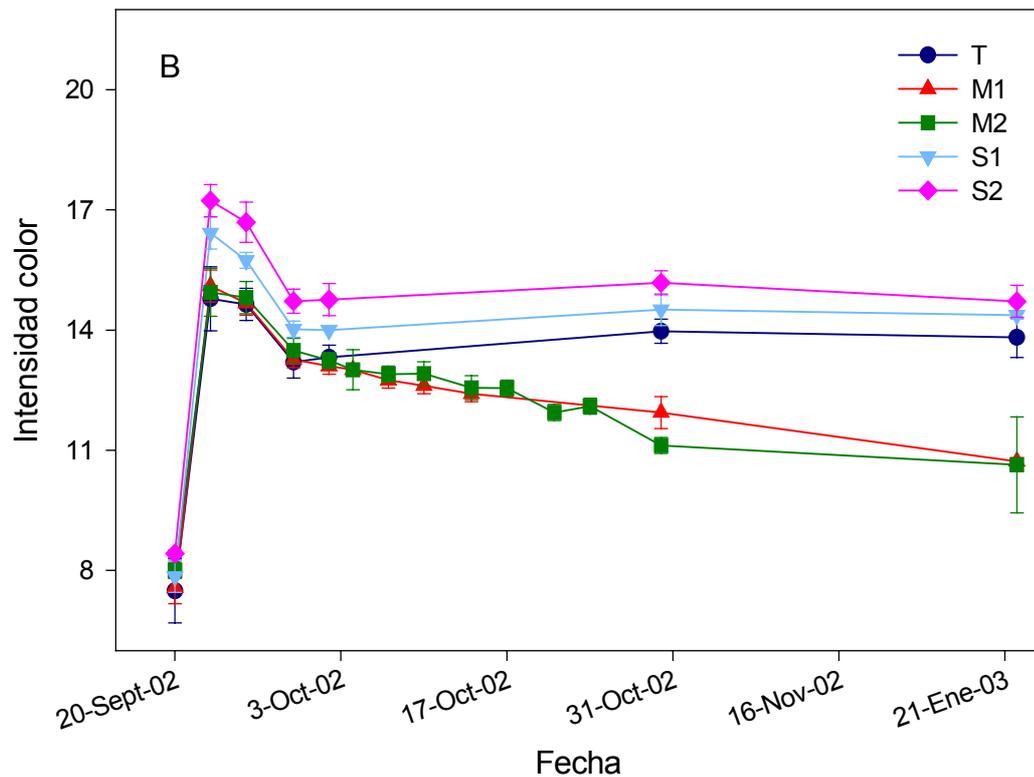
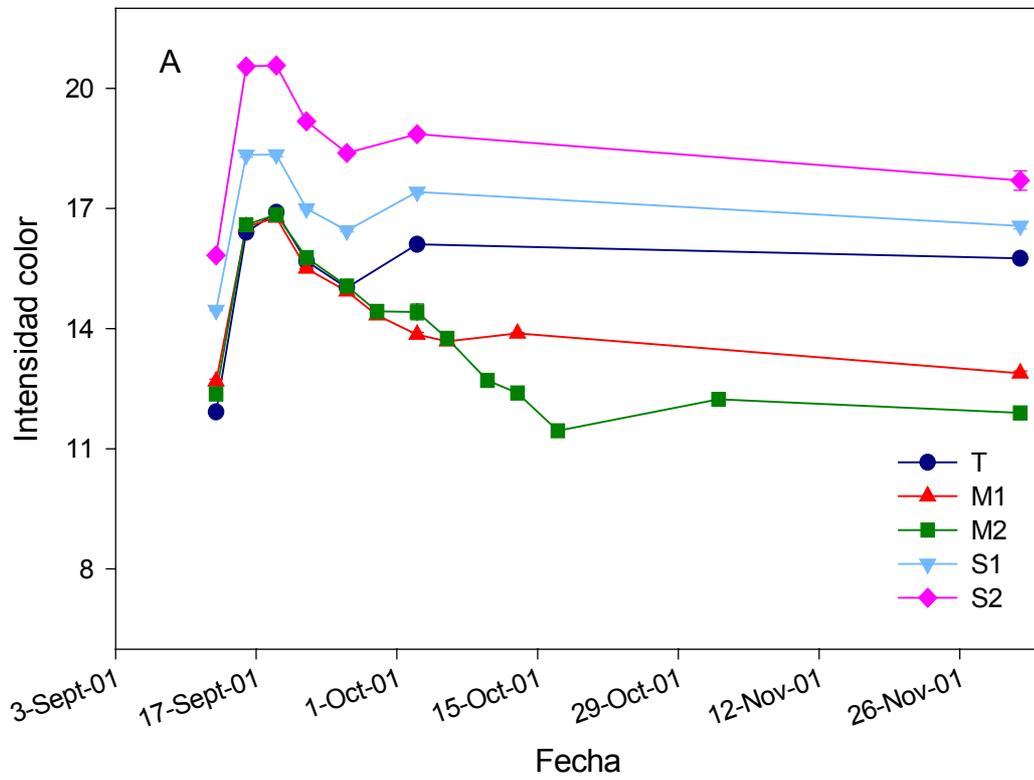
Un tiempo de maceración prolongado se acompaña frecuentemente de polimerización oxidativa de antocianos monómeros y su complejación con otros fenoles para producir pigmentos oligómeros y polímeros, resultando en la precipitación de pigmentos, que va seguido de una disminución en el color rojo y un incremento del pardeamiento (Yokotsuka et al., 2000).

Los valores más altos del índice de polifenoles totales se obtuvieron en las vinificaciones con sangrado parcial del mosto, aunque las diferencias fueron menos apreciables para los diferentes tratamientos en el 2002. Este resultado coincide con el obtenido por Gawel et al. (2001). Singleton (1972) encontró que los vinos elaborados con mayor proporción hollejo/mosto tenían una concentración significativamente mayor de flavonoides, mientras que los compuestos no flavonoides no se veían afectados, ya que estos están principalmente en la pulpa. Gerbaux (1993) indicó también que en vinificaciones con un sangrado del 15 y del 20% se encontró un mayor contenido de fenoles totales respecto el vino control.

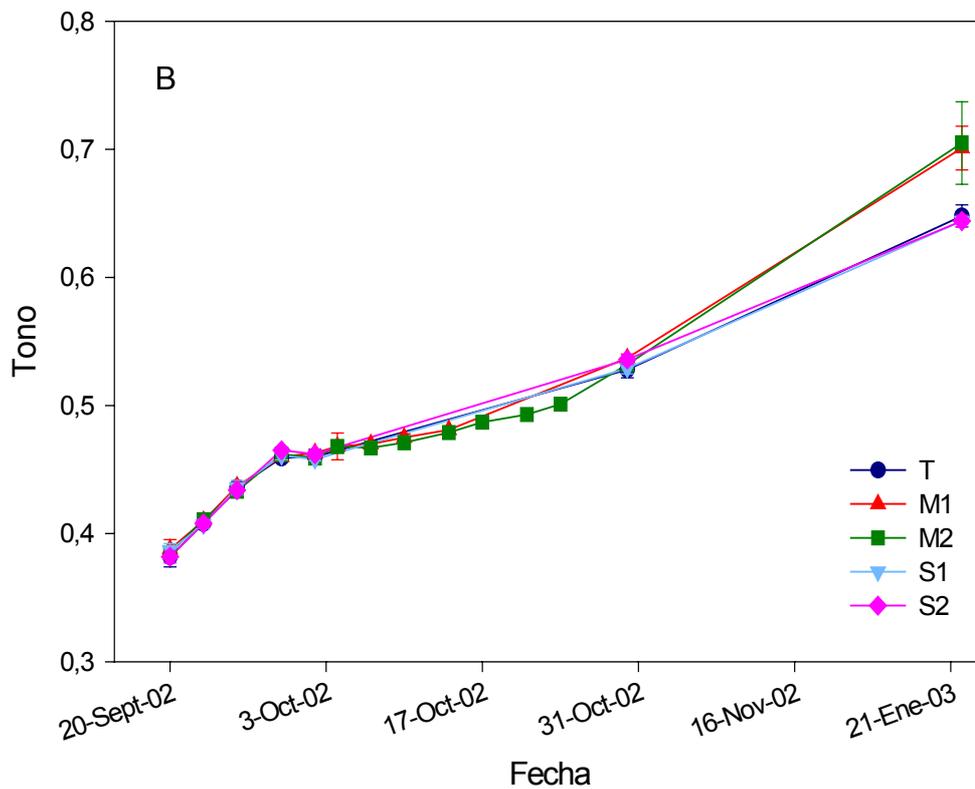
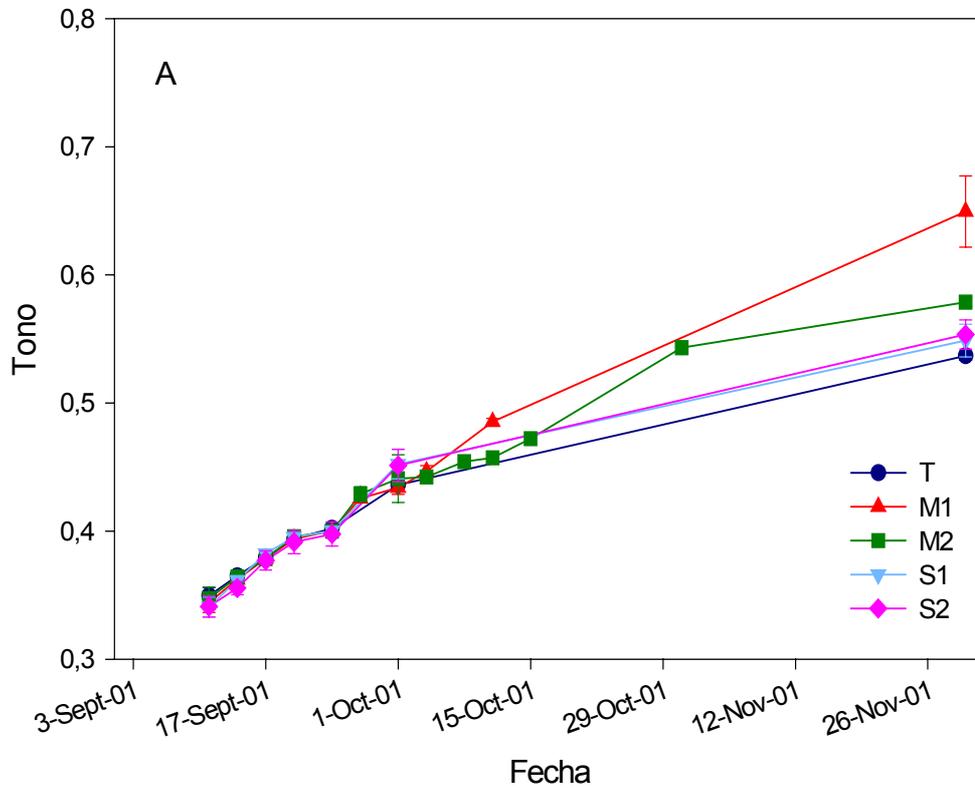
#### **VIII.2.1.1.3 Intensidad de color y tono**

Los máximos valores de intensidad de color fueron alcanzados al mismo tiempo que el contenido máximo de antocianos. Después tiene lugar una disminución, siendo ésta más pronunciada en las vinificaciones de tiempo de maceración más largo. Hay que destacar que la disminución observada en la intensidad de color es menos acusada que la obtenida en la concentración de antocianos totales. Está claro que los antocianos monómeros no son los únicos compuestos responsables del color de los vinos, sino que también intervienen en la formación de nuevos compuestos, principalmente productos de condensación entre antocianos y taninos. El vino control y las vinificaciones con sangrado mantuvieron los valores más altos de intensidad de color hasta fin de fermentación maloláctica. La intensidad de color fue mucho mayor en el 2001, siendo el color en el los vinos S1 Y S2 significativamente mayor que los vinos M1 y M2 durante todo el tiempo.

**Gráfica VIII.3** Evolución de la intensidad de color desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de los distintos tratamientos de los años 2001 (gráfica A) y 2002 (gráfica B). Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media.



**Gráfica VIII.4** Evolución del tono desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones de los años 2001 (gráfica A) y 2002 (gráfica B). Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media.



Es muy importante señalar que los vinos T, S1 y S2 mantuvieron su color desde el prensado hasta fin de fermentación maloláctica, mientras que en los vinos M1 y M2, la intensidad de color sufrió una disminución, mayor cuanto más largo el tiempo de contacto, y por tanto especialmente en M2. Pardo y Navarro (1993) también encontraron que en vinos de Monastrell elaborados con 20 días de maceración la intensidad de color fue más baja que los elaborados con 10 días de maceración. Parte de esta disminución podría ser debida a la adsorción de los compuestos fenólicos, principalmente antocianos, sobre las levaduras (Vasserot et al., 1997) o debido a la precipitación del material polimérico. Borzi et al. (1993) determinaron que cuando el vino está más estructurado, la intensidad de color es más estable. Esta observación nos permite concluir que probablemente los vinos con sangrado, los cuales poseen mayor intensidad de color y esta se mantiene en el tiempo, son los más estables.

En cuanto al tono, este se incrementa con el avance del proceso de vinificación, no observándose diferencias significativas en los valores de este parámetro entre las distintas vinificaciones durante la maceración y al final de fermentación alcohólica. Con el empleo de tiempos largos de maceración los valores de tono se incrementan debido posiblemente a una mayor pérdida de pigmentos rojos por adsorción, a procesos de polimerización y oxidación de los compuestos fenólicos dando lugar a la formación de compuestos de color menos intenso e incluso a pérdidas de estos compuestos por precipitación. Klenar et al. (2004) no observaron un incremento en el tono en los vinos durante la maceración con el empleo de tiempos de contacto prolongados, como consecuencia de la continua extracción de antocianos. Al final de fermentación maloláctica los vinos de mayor tiempo de maceración son los que muestran los valores de tono más altos, al igual que indicaron Budic-Leto et al. (2003). Borzi et al. (1992) también encontraron diferencias poco significativas en el tono entre el vino testigo y los vinos con una relación sólido/líquido mayor.

**Tabla VIII.1** Cambios de los valores de L\*, a\* y b\* con sus desviaciones estándar de las distintas vinificaciones de los años 2001 y 2002 a los 15 días de maceración, fin de fermentación alcohólica (FFA) y fin de fermentación maloláctica (FFM).

Vinificación	Días	2001			2002		
		L*	a*	b*	L*	a*	b*
<b>T</b>	15	14,7 ± 0,46	47,4 ± 0,62	25,2 ± 0,79	14,9 ± 0,21	47,5 ± 0,22	25,5 ± 0,33
	FFA	11,3 ± 0,18	42,6 ± 0,19	19,5 ± 0,30	12,1 ± 0,27	44,1 ± 0,32	20,9 ± 0,45
	FFM	6,8 ± 0,60	36,4 ± 1,34	11,7 ± 1,04	6,7 ± 0,21	36,4 ± 0,47	11,5 ± 0,36
<b>M1</b>	15	14,7 ± 0,12	47,5 ± 0,16	25,3 ± 0,20	15,2 ± 0,34	47,9 ± 0,46	26,0 ± 0,55
	25	13,6 ± 0,16	45,5 ± 0,28	23,3 ± 0,28	15,2 ± 0,17	48,0 ± 0,20	26,0 ± 0,27
	FFA	11,8 ± 0,23	42,9 ± 0,33	20,2 ± 0,39	14,7 ± 0,19	47,2 ± 0,22	25,1 ± 0,31
	FFM	9,4 ± 0,35	40,3 ± 0,50	16,1 ± 0,60	11,0 ± 0,62	42,3 ± 0,85	18,8 ± 1,0
<b>M2</b>	15	14,6 ± 0,30	47,4 ± 0,37	25,2 ± 0,51	15,3 ± 0,37	48,0 ± 0,47	26,2 ± 0,62
	25	13,7 ± 0,36	45,7 ± 0,47	23,5 ± 0,59	15,0 ± 0,42	47,7 ± 0,50	25,6 ± 0,67
	35	16,2 ± 0,23	48,8 ± 0,39	27,5 ± 0,40	15,4 ± 0,36	48,3 ± 0,46	26,4 ± 0,59
	FFA	11,6 ± 0,33	42,5 ± 0,49	19,9 ± 0,57	15,7 ± 0,38	48,4 ± 0,44	26,7 ± 0,58
	FFM	9,7 ± 0,83	40,2 ± 1,22	16,6 ± 1,40	11,1 ± 1,75	42,6 ± 2,12	18,9 ± 2,85
<b>S1</b>	15	13,1 ± 0,35	45,5 ± 0,44	22,5 ± 0,61	14,3 ± 0,25	46,8 ± 0,37	24,5 ± 0,43
	FFA	8,4 ± 1,12	38,3 ± 1,95	14,4 ± 1,92	11,4 ± 0,27	43,2 ± 0,41	19,7 ± 0,47
	FFM	5,6 ± 0,49	33,4 ± 1,51	9,7 ± 0,84	6,1 ± 0,26	35,1 ± 0,66	10,6 ± 0,45
<b>S2</b>	15	11,3 ± 0,12	43,1 ± 0,21	19,5 ± 0,21	13,1 ± 0,55	45,2 ± 0,75	22,4 ± 0,92
	FFA	7,2 ± 0,50	36,7 ± 1,03	12,4 ± 0,86	10,5 ± 0,30	41,8 ± 0,48	18,0 ± 0,52
	FFM	4,7 ± 0,74	30,1 ± 2,90	8,12 ± 1,27	5,8 ± 0,12	34,2 ± 0,34	10,0 ± 0,20

#### **VIII.2.1.1.4 Parámetros L\*, a\* y b\***

Los valores de L\*, a\* y b\* disminuyen para todas las vinificaciones con el avance del proceso de vinificación. Al finalizar la fermentación maloláctica, los vinos presentan los valores más bajos de estos parámetros, como consecuencia de aumentos en la componente azul (valores de b\* más bajos) al formarse compuestos de color violeta, resultantes de las uniones entre antocianos y taninos mediadas por puente acetaldehído. Con el empleo de tiempos de maceración superiores a 15 días los valores de L\*, a\* y b\* se incrementan posiblemente debido a procesos de oxidación, precipitación y fijación que van a sufrir los compuestos fenólicos, mientras que con aplicación de sangrados parciales los vinos son más oscuros y con mayores tonalidades violetas, mostrando mejor perfil cromático al incrementar el sangrado parcial del mosto.

### **VIII.2.2 PARÁMETROS CROMÁTICOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS DE 2002 DURANTE SU CONSERVACIÓN EN BOTELLA**

#### **VIII.2.2.1 PARÁMETROS DE COLOR ESPECTROFOTOMÉTRICOS**

La tabla VIII.3 muestra las características cromáticas de los vinos de 2002 en el momento de su embotellado y a los 8 meses de envejecimiento en botella.

En el momento del embotellado, los parámetros intensidad de color, antocianos totales y el índice de polifenoles totales son más bajos que al comienzo del proceso de vinificación, resultado también obtenido por Gawel et

al. (2001), observando en los vinos una clara disminución en los valores de estos parámetros después de su estabilización por frío y embotellado, posiblemente debido a la polimerización y precipitación de los compuestos fenólicos y a su adsorción sobre las proteínas y tartratos (Lubbers et al., 1994). Los vinos M1 y M2 presentan la intensidad de color más baja y sus antocianos están además menos polimerizados. Esto dio como resultado vinos con mayor porcentaje de color amarillo. El valor del índice de HCl, el cual representa el nivel de polimerización de los taninos, es muy bajo para los vinos de mayor tiempo de maceración (M1 y M2) como consecuencia posiblemente de previas precipitaciones de polímeros inestables. Los vinos con sangrado parcial del mosto junto con el testigo son los más coloreados, mostrando ligeramente mayor intensidad de color el vino S2.

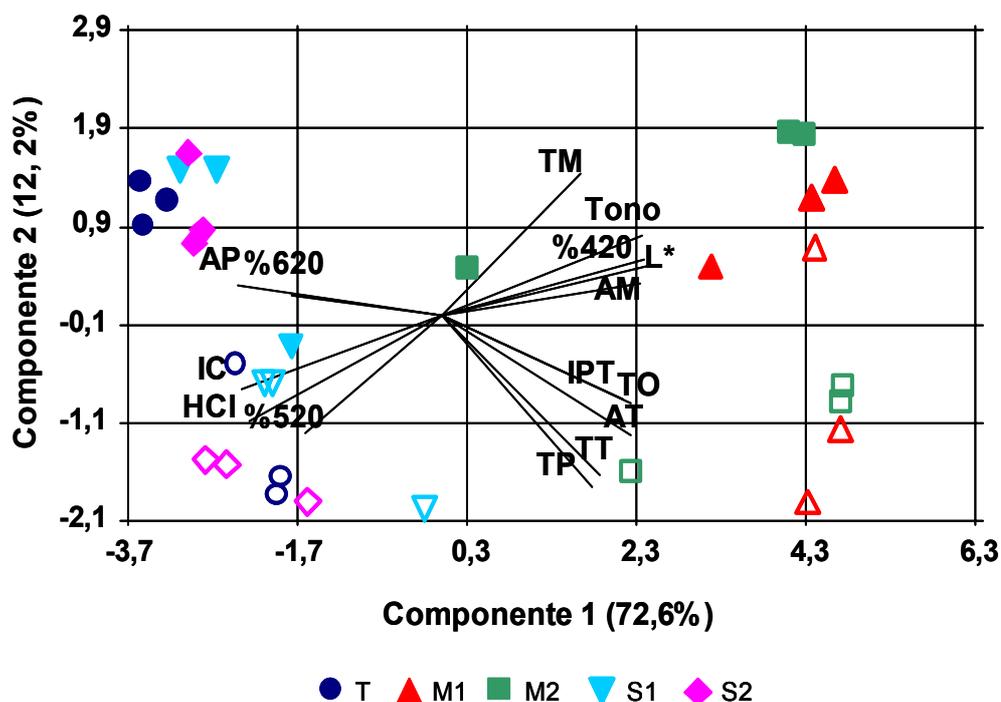
Después de 8 meses en botella, en general se observa un descenso para todos los vinos en el contenido de antocianos totales, taninos totales, taninos oligómeros, taninos polímeros y el índice de HCl, indicando la precipitación de compuestos fenólicos de alto peso molecular (Ribereau-Gayon y Glories, 1996). La poca variación en los valores de la intensidad de color en todos los vinos respecto a los valores presentados en el momento de su embotellado, junto con la disminución en el contenido de antocianos monómeros y el aumento de antocianos polímeros pone de manifiesto la formación de polímeros antociano-tanino de color intenso como pueden ser las uniones antociano-tanino. Los compuestos que derivan de esta combinación son más coloreados que los propios antocianos (Glories, 1988). En este momento los vinos de mayor tiempo de maceración (M1 y M2) siguen siendo los de menor intensidad de color, menor índice HCl, mayor porcentaje de color amarillo, menor contenido de antocianos polímeros y mayor contenido de antocianos monómeros, los cuales son más susceptibles de ser oxidados.

**Tabla VIII.3** Parámetros cromáticos de los vinos de 2002 en el momento de su embotellado y transcurridos 8 meses en botella. Letras diferentes en la misma fila y para cada período estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, %520: porcentaje de color rojo, %620: porcentaje de color azul, %420: porcentaje de color amarillo.

Parámetros	T	M1	M2	S1	S2	T	M1	M2	S1	S2
IC	12,2 b	8,0 a	8,3 a	11,8 b	12,7 b	11,9 b	8,1 a	8,6 a	11,5 b	11,9 b
Tono	0,68 a	0,82 b	0,78 b	0,68 a	0,67 a	0,69 a	0,82 b	0,79 b	0,69 a	0,70 a
%420	34,0 a	38,1 b	37,9 b	34,2 a	33,7 a	34,0 a	39,5 b	38,2 b	34,4 a	34,2 a
%520	50,3 b	46,7 a	48,6 ab	50,4 b	50,2 b	49,4 bc	48,2 a	48,6 ab	49,6 c	49,1 bc
%620	15,5 a	15,1 a	13,3 a	15,3 a	16,0 a	16,5 b	12,2 a	13,0 a	15,9 b	16,5 b
IPT	47,2 a	52,9 c	52,6 bc	47,8 a	49,2 ab	45,4 a	51,4 a	51,5 a	46,5 a	47,2 a
AM (mg/L)	50,8 a	90,8 c	78,1 b	47,8 a	44,5 a	33,5 a	112,7 b	114,3 b	36,2 a	35,6 a
AP (mg/L)	113,4 bc	76,4 a	80,4 a	108,8 b	116,1 c	128,3 b	88,1 a	88,6 a	119,2 b	126,5 b
AT (mg/L)	252,2 a	349,6 b	338,1 b	251,9 a	247,9 a	192,2 a	270,9 b	287,7 b	203,7 a	192,8 a
L*	8,3 a	17,6 b	16,0 b	8,9 a	7,2 a	7,7 a	17,2 b	15,6 b	8,4 a	7,7 a
TM (mg/L)	93,5 a	106,1 abc	124,7 c	122,4 bc	101,0 ab	107,6 a	138,8 b	146,2 b	112,6 a	108,5 a
TO (mg/L)	188,9 a	239,4 bc	247,0 c	199,1 abc	197,2 ab	150,5 a	229,3 b	222,9 b	51,4 a	153,1 a
TP (mg/L)	651,6 a	847,8 bc	990,9 c	743,6 ab	589,6 a	399,2 a	596,0 b	583,2 b	410,7 a	427,3 a
TT (g/L)	1,8 ab	2,1c	2,0 c	1,9 bc	1,7 a	1,5 a	2,0 c	1,7 b	1,6 ab	1,5 a
Índice HCI	55,6 b	24,6 a	27,8 a	54,1 b	59,3 b	50,7 b	24,2 a	24,8 a	43,6 b	44,2 b

Estos resultados muestran que las mejores características de color son obtenidas para el vino control y los sangrados, al presentar la mayor intensidad de color, mayor contenido de antocianos polímeros, mayor porcentaje de rojo y azul y menor de amarillo.

**Gráfica VIII.5** Distribución de los vinos elaborados en el 2002 durante su envejecimiento en botella en un sistema de coordenadas bidimensional definido por dos componentes principales (el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal es mostrado entre paréntesis). Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, %520: porcentaje de color rojo, %620: porcentaje de color azul, %420: porcentaje de color amarillo, símbolos blancos: t=0 meses, símbolos oscuros: t=8 meses.



El análisis de componentes principales de los 5 vinos durante el periodo de envejecimiento (Gráfica VIII.5) mostró que todos los vinos disminuyeron sus valores a través de la componente 2, produciéndose incrementos en el estado de polimerización de los antocianos, el %620 y descensos en el color al

disminuir el contenido de antocianos totales y taninos. También se observa una clara separación de los vinos de mayor tiempo de maceración respecto a los vinos testigo y con sangrado parcial del mosto a través de la componente 1, mostrando en todo momento M1 y M2 las peores características de color a pesar de tener mayor contenido de polifenoles totales, antocianos totales y taninos, lo cual puede ser debido a una menor estabilidad de los antocianos. No hay una gran separación entre los vinos testigo y con sangrado parcial del mosto, aunque S2 junto con el testigo muestran mejor perfil cromático que S1.

#### **VIII.2.2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES**

Las tablas VIII.4 y VIII.5 muestran respectivamente los valores de compuestos fenólicos individuales en los vinos de 2002 en el momento del embotellado y después de 8 meses de envejecimiento en botella.

En el momento del embotellado, y en el caso de los ácidos hidroxicinámicos, el ácido gálico es el mayoritario. Este ácido puede proceder de la hidrólisis de la epicatequín-galato, compuesto que es extraído de las partes sólidas de uva durante el proceso de maceración (Singleton y Trouslade, 1983), aunque también puede proceder de la hidrólisis de heterósidos. El ácido siríngico, que se encuentra en cantidades más pequeñas que el ácido gálico, puede derivar de la alcoholisis y oxidación de estructuras lignificadas, aunque también puede proceder de la transformación de los compuestos fenólicos como los antocianos por las levaduras. Las vinificaciones con sangrado parcial del mosto presentan valores de ácidos hidroxibenzoicos mayores que la vinificación testigo, siendo estos valores más altos al aumentar el porcentaje de sangrado parcial del mosto, pero con la aplicación de tiempos de maceración prolongados se obtienen valores superiores a los obtenidos en las vinificaciones con sangrado parcial. Esto puede ser debido a una mayor hidrólisis de sus ésteres al aumentar el tiempo de maceración.

En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos, éstos se incrementan en el vino con la utilización de tiempos de maceración prolongados debido a una mayor hidrólisis de sus correspondientes formas esterificadas al aumentar el tiempo de contacto, ya que estos ácidos no se encuentran en la uva en estado libre (Somers et al., 1987).

En el caso de los flavan-3-oles, se observa que las concentraciones de catequina son superiores a las de epicatequina, igual que encontraron Mayen (1993), Gil-Muñoz (1997), Gil-Muñoz et al. (1999) y Burns et al. (2001). Con el aumento del tiempo de maceración (M1 y M2) y con la aplicación de sangrados parciales se consiguen mayores valores de estos compuestos respecto al vino testigo, siendo la prolongación del tiempo de maceración la técnica más eficaz en extracción de estos compuestos. Vrhovsek et al. (2002) y Spranger et al. (2004) también obtuvieron un mayor contenido de flavan-3-oles en vinos de mayor tiempo de maceración, ya que las semillas son fuente de éstos compuestos y la prolongación del tiempo de maceración en un medio con etanol produce una mayor de gradación de las semillas y por tanto una mayor extracción de flavan-3-oles.

Los flavonoles se incrementan con la aplicación de sangrados parciales del mosto, resultado obtenido también por McDonald et al. (1998). Con la utilización de tiempos de maceración prolongados el contenido de estos compuestos es menor que en vino testigo, lo cual puede ser atribuido más bien a procesos de oxidación que de copigmentación de los flavonoles al mostrar M1 y M2 una intensidad de color inferior a la vinificación testigo.

En el caso de antocianos monoglucósidos es el vino con mayor sangrado parcial del mosto el que muestra menor concentración de estos compuestos lo cual puede ser debido a una mayor polimerización de estos pigmentos resultando en una mayor intensidad de color.

**Tabla VIII.4** Compuestos fenólicos medidos en mg/L por HPLC de los vinos de 2002 en el momento de su embotellado. Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ .

Compuestos fenólicos	T	M1	M2	S1	S2
Ácido gálico	19,5 a	23,9 c	25,9 d	19,7 a	21,6 b
Ácido siríngico	2,4 a	2,7 ab	2,6 a	3,1 b	2,7 ab
Ácido protocatéquico	6,4 b	6,8 c	5,9 a	7,0 d	6,3 b
$\Sigma$ Ácidos hidroxibenzoicos	28,3 a	33,4 c	34,5 d	29,2 b	30,6 b
Ácido cafeico	1,4 a	1,6 ab	1,7 b	1,7 b	1,7 b
Ácido ferúlico	0,58 ab	0,57 a	0,61 b	0,56 a	0,57 ab
Ácido p-cumárico	3,6 a	4,2 b	4,5 c	3,5 a	3,6 a
$\Sigma$ Ácidos hidroxicinámicos	5,6 a	6,3 b	6,8 c	5,8 a	5,9 a
Ácido caftárico	10,0 c	9,4 b	8,5 a	9,8 bc	9,6 bc
Ácido cutárico	3,3 b	3,2 b	2,7 a	3,2 b	3,2 b
$\Sigma$ Ésteres hidroxicinámicos	13,3 c	12,5 b	11,1 a	13,0 bc	12,9 bc
Catequina	33,5 a	43,8 c	50,5 d	37,3 ab	38,2 b
Epicatequina	15,4 a	22,3 b	25,0 c	15,5 a	17,1 a
$\Sigma$ Flavan-3-oles	49,0 a	66,1 c	75,5 d	52,8 ab	55,3 b
Rutina	4,0 b	3,4 a	3,1 a	5,4 c	4,3 b
Quercitrina	0,30 a	0,30 a	0,27 a	0,38 b	0,28 a
Miricitina	2,9 a	3,2 a	3,3 a	2,9 a	3,4 a
Quercetina	7,2 a	6,9 a	7,1 a	7,5 a	7,4 a
Kampferol	0,40 ab	0,43 b	0,51 b	0,45 b	0,30 a
$\Sigma$ Flavonoles	14,8 ab	14,3 a	14,2 a	16,5 b	15,6 ab
Delfinidina-3-Glucósido	9,7 a	9,3 a	9,2 a	9,2 a	9,0 a
Cianidina-3-Glucósido	3,0 d	2,7 b	2,5 a	2,9 cd	2,8 bc
Petunidina-3-Glucósido	18,2 bc	18,0 bc	18,4 c	17,2 ab	16,7 a
Peonidina-3-Glucósido	12,1 b	11,2 a	10,7 a	12,1 b	11,4 ab
Malvidina-3-Glucósido	79,9 bc	82,3 cd	85,1 d	77,7 ab	75,2 a
$\Sigma$ Antocianos	122,8 bc	123,5 bc	125,9 c	119,1 ab	115,2 a

**Tabla VIII.5** Compuestos fenólicos medidos en mg/L por HPLC de los vinos de 2002 después de 8 meses en botella. Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ .

Compuestos fenólicos	T	M1	M2	S1	S2
Ácido gálico	27,6 a	38,1 c	41,8 d	29,2 ab	30,6 b
Ácido siríngico	2,9 a	3,3 b	3,0 a	2,9 a	3,3 b
Ácido protocatéquico	14,3 a	17,4 c	16,5 bc	15,3 ab	14,3 a
$\Sigma$ Ácidos hidroxibenzoicos	44,8 a	58,9 b	61,3 b	47,4 a	48,3 a
Ácido cafeico	1,2 a	2,0 b	2,1 b	2,4 b	1,8 ab
Ácido ferúlico	0,43 c	0,38 b	0,34 a	0,31 a	0,41 bc
Ácido p-cumárico	4,6 a	5,5 c	5,9 b	4,4 a	4,3 a
$\Sigma$ Ácidos hidroxicinámicos	6,2 a	7,9 bc	8,3 c	7,1 ab	6,5 a
Ácido caftárico	9,7 b	9,5 b	8,7 a	9,6 b	9,5 b
Ácido cutárico	2,8 a	3,3 a	3,1 a	3,3 a	3,2 a
$\Sigma$ Ésteres hidroxicinámicos	12,6 ab	12,8 b	11,7 a	12,9 b	12,8 b
Catequina	11,8 a	22,0 b	20,2 b	9,1 a	12,0 a
Epicatequina	4,8 a	24,6 b	25,5 b	6,2 a	5,3 a
$\Sigma$ Flavan-3-oles	16,6 a	46,6 b	45,7 b	15,3 a	17,2 a
Rutina	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Quercitrina	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Miricitina	4,9 a	11,0 b	9,3 b	6,3 a	4,1 a
Quercetina	3,0 a	3,1 a	3,6 a	4,0 a	4,6 a
Kampferol	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
$\Sigma$ Flavonoles	8,0 a	14,7 b	13,9 b	10,3 ab	7,2 a
Delfinidina-3-Glucósido	0,8 a	6,9 b	5,6 b	1,4 a	0,8 a
Cianidina-3-Glucósido	0,0 a	2,1 b	1,7 b	0,0 a	0,0 a
Petunidina-3-Glucósido	1,1 a	12,7 b	10,7 b	1,9 a	1,2 a
Peonidina-3-Glucósido	0,8 a	6,8 b	5,4 b	1,4 a	1,0 a
Malvidina-3-Glucósido	2,7 a	53,0 b	44,7 b	7,2 a	3,4 a
$\Sigma$ Antocianos	5,4 a	81,5 b	68,1 b	11,9 a	6,5 a

Tras su envejecimiento en botella se siguen manteniendo las diferencias observadas inicialmente entre los distintos vinos, pero todos ellos sufren un incremento en el contenido total de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos como consecuencia principalmente del aumento en el contenido de ácido gálico, siríngico, cafeico y ácido p-cumárico, debido a la hidrólisis de sus correspondientes ésteres. Los flavonoles, flavan-3-oles y los antocianos monoglucósidos disminuyen en todos los vinos, siendo esta disminución más acusada en los vinos testigo y con sangrado parcial del mosto, lo cual puede ser debido a una mayor copigmentación, polimerización y oxidación de estos compuestos en estos vinos.

### **VIII.2.3 ENSAYOS DE OXIDACIÓN ACELERADA**

Los ensayos de oxidación acelerada nos permiten prever, en un corto espacio de tiempo, la estabilidad del color de los vinos sometidos a condiciones más severas que las de su conservación. Para realizar esta experiencia los vinos fueron almacenados a 35°C durante 3 meses en botellines de 125 mL, en atmósfera normal y atmósfera inerte (N<sub>2</sub>).

Las tablas VIII.6 y VIII.7 muestran respectivamente los valores de los parámetros de color de los vinos tras su maduración en el proceso de envejecimiento acelerado de las diferentes vinificaciones en los dos años de elaboración.

En el 2001, los resultados del proceso de envejecimiento acelerado mostraron que los vinos S2 en atmósfera inerte mantienen la mayor intensidad de color y la mayor concentración de antocianos polímeros. Borzi et al. (1992) también constataron que los vinos obtenidos de mostos macerados con mayor proporción de orujo no sólo tienen mayor intensidad colorante sino que, además no la pierden tan fácilmente como el testigo. Estos vinos también

tienen mayor contenido de compuestos fenólicos y de taninos. En los vinos M2, el índice de HCl es muy bajo, probablemente debido a las precipitaciones. Cuando el oxígeno no es desplazado del espacio de cabeza, la densidad de color es muy baja para todas las vinificaciones. Los valores de fenoles totales y taninos polímeros también son muy bajos, indicando la precipitación de compuestos condensados, pero sorprendentemente, el valor del índice de HCl es alto. Nosotros observamos que el índice de HCl alcanzó los valores más altos después de 4-6 semanas de almacenamiento a 35°C, después tuvo lugar una disminución muy importante (dato no mostrado), indicando que se había producido una importante precipitación de taninos condensados. Después de esto, el valor comenzó a incrementarse de nuevo hasta alcanzar los valores mostrados en la tabla VIII.6. En los vinos pueden tener lugar fases alternadas de precipitación y formación de nuevos taninos condensados, aunque la velocidad de estas fases es más baja en los vinos más estables.

En el 2002, los resultados encontrados fueron similares, los vinos con sangrado parcial de mosto y almacenados bajo atmósfera inerte también se comportaron mejor, mostrando mayor intensidad de color y mayor contenido de antocianos polímeros que los otros vinos.

**Tabla VIII.6** Cambios de los parámetros cromáticos de los vinos tras su maduración en el proceso de envejecimiento acelerado en la elaboración del 2001. Letras diferentes en la misma fila y para cada medio muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, %520: porcentaje de color rojo, %620: porcentaje de color azul, %420: porcentaje de color amarillo.

Parámetros	T	M1	M2	S1	S2	T	M1	M2	S1	S2
IC	12,9 b	12,3 ab	10,4 a	13,0 b	14,5 b	7,9 a	6,8 a	6,6 a	7,0 a	8,4 a
Tono	0,74 a	0,74 a	0,79 b	0,74 a	0,73 a	1,24 a	1,32 bc	1,39 c	1,30 ab	1,28 ab
%420	35,8 a	35,5 a	37,9 b	35,5 a	35,9 a	48,5 a	49,9 b	51,3 c	49,7 b	49,5 b
%520	48,2 a	48,3 a	48,3 a	47,9 a	48,8 a	38,9 b	37,7 ab	36,9 a	38,3 b	38,7 b
%620	15,9 ab	16,0 ab	13,6 a	16,5 b	15,2 ab	12,4 c	12,3 bc	11,8 ab	11,9 abc	11,7 a
IPT	51,2 a	51,4 a	49,0 a	45,5 a	56,9 a	38,1 a	35,4 a	36,1 a	34,0 a	40,8 a
AM (mg/L)	34,1 b	26,3 ab	27,0 ab	23,8 a	34,9 b	12,2 b	11,5 b	11,1 ab	10,0 a	11,3 ab
AP (mg/L)	113,5 b	101,2 b	80,2 a	105,9 b	112,0 b	44,9 b	29,2 a	29,4 a	35,8 a	37,0 a
AT (mg/L)	208,5 b	175,1 a	175,9 a	190,3 ab	219,2 b	114,3 b	84,2 a	90,0 a	87,7 a	100,7 ab
TM (mg/L)	34,5 ab	33,0 a	58,2 b	24,8 a	41,5 ab	15,8 a	12,7 a	15,8 a	13,6 a	13,8 a
TO (mg/L)	130,2 abc	108,2 ab	166,8 c	97,8 a	144,2 bc	36,7 b	22,2 a	23,0 a	22,2 a	30,7 ab
TP (mg/L)	621,0 bc	461,4 ab	714,5 c	373,4 a	700,9 c	104,2 b	61,4 a	87,8 ab	62,6 a	113,3 b
TT (g/L)	2,29 bc	1,89 a	2,33 bc	2,02 ab	2,49 c	0,96 ab	0,84 a	0,94 ab	1,00 ab	1,03 b
índice HCI	44,5 ab	49,4 ab	35,7 a	56,5 b	43,8 ab	53,7 b	48,9 a	49,0 a	50,3 a	53,1 b

**Tabla VIII.7** Cambios de los parámetros cromáticos de los vinos tras su maduración en el proceso de envejecimiento acelerado en la elaboración del 2002. Letras diferentes en la misma fila y para cada medio muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, %520: porcentaje de color rojo, %620: porcentaje de color azul, %420: porcentaje de color amarillo.

Parámetros	T	M1	M2	S1	S2	T	M1	M2	S1	S2
IC	12,4 b	9,7 a	10,0 a	12,1 b	13,1 c	7,8 b	7,6 b	6,3 a	6,0 a	5,9 a
Tono	0,83 a	0,97 b	0,96 b	0,85 a	0,82 a	1,28 a	1,46 c	1,53 d	1,38 b	1,36 b
%420	38,6 ab	43,6 c	43,1 c	39,3 b	38,6 ab	51,2 a	54,8 c	55,5 c	52,4 b	51,7 b
%520	46,5 b	45,0 a	44,9 a	46,3 b	46,5 b	39,1 c	37,1 ab	36,2 a	37,9 b	38,0 b
%620	14,7 b	11,2 a	11,8 a	14,3 b	15,4 b	10,5 c	8,4 a	8,1 a	9,6 b	10,0 bc
IPT	49,9 a	54,8 b	55,7 b	52,9 ab	54,0 b	40,8 a	47,2 b	48,0 c	44,4 b	44,3 ab
AM (mg/L)	19,6 a	50,0 b	39,5 b	20,0 a	18,2 a	4,7 ab	5,7 c	5,4 bc	4,9 ab	4,6 a
AP (mg/L)	121,1 b	85,8 a	91,4 a	115,7 b	126,4 b	45,0 a	46,0 a	42,9 a	44,0 a	43,8 a
AT (mg/L)	179,1 ab	194,7 c	172,9 ab	174,1 a	188,1 bc	107,3 a	112,9 a	117,5 a	118,2 a	115,4 a
TM (mg/L)	75,4 a	111,8 e	104,3 d	87,5 b	97,4 c	67,0 a	75,8 b	78,3 bc	81,4 c	85,9 d
TO (mg/L)	108,6 a	172,3 c	133,3 b	116,7 a	109,0 a	66,3 a	77,3 bc	73,0 b	73,5 b	81,8 c
TP (mg/L)	295,6 a	458,6 b	449,0 b	312,2 a	270,1 a	101,1 a	114,8 a	110,0 a	96,0 a	98,8 a
TT (g/L)	0,99 a	1,32 b	1,19 ab	0,95 a	0,99 a	0,31 a	0,41 b	0,44 b	0,30 a	0,29 a
índice HCl	54,7 b	25,1 a	29,5 a	53,6 b	58,4 b	56,4 a	56,9 a	55,6 a	55,9 a	56,0 a

Los resultados ponen de manifiesto la importancia de las combinaciones antociano-tanino para mantener la estabilidad del color del vino. Fue realizado un análisis de regresión múltiple para ver si la intensidad de color de los vinos podía ser predicha a partir de la composición fenólica de los vinos y determinar que variables tienen mayor peso en la predicción. Todos los datos de los diferentes vinos fueron utilizados para construir el modelo, el cual puede ser resumido de la siguiente forma:

$$\text{INTENSIDAD COLOR} = 1,49 - 0,042 \times [\text{antocianos monómeros}] + 0,065 \times [\text{antocianos polímeros}] + 0,051 \times [\text{IPT}] + 1,49 \times [\text{taninos totales}]$$

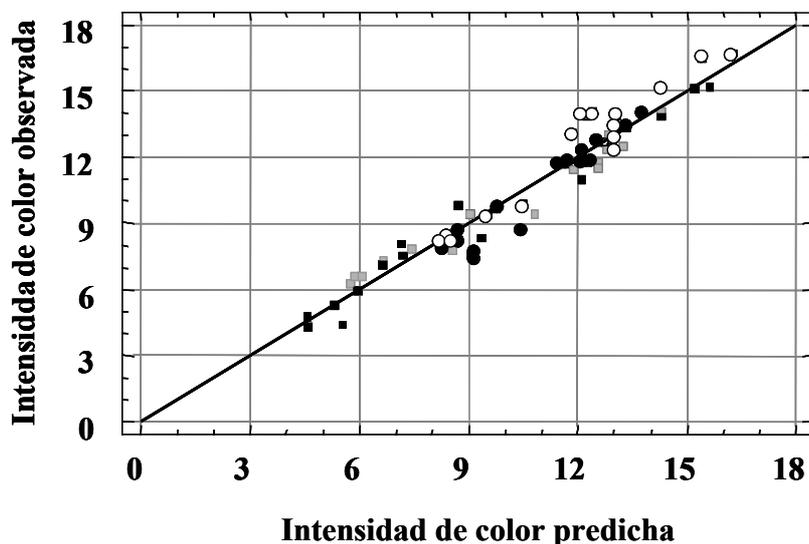
( $r^2 = 0,93$ ,  $p < 0,05$ , variables no estandarizadas)

$$\text{INTENSIDAD COLOR} = -0,32 \times [\text{antocianos monómeros}] + 0,75 \times [\text{antocianos polímeros}] + 0,13 \times [\text{IPT}] + 0,37 \times [\text{taninos totales}]$$

( $r^2 = 0,93$ ,  $p < 0,05$ , variables estandarizadas)

La intensidad de color depende negativamente de los antocianos monómeros y positivamente de los antocianos polímeros, del índice de polifenoles totales y de los taninos totales. La Figura VIII.4 muestra como los valores observados y pronosticados guardan una relación muy estrecha.

**Figura VIII.4** Relación entre los valores observados de intensidad de color y los valores pronosticados.



Como conclusión podemos decir que para obtener vinos tintos de Monastrell con un color alto y estable, los sangrados parciales antes de fermentación parece ser una práctica prometedora, aunque la extensión del tratamiento debe ser decidido en función de la calidad de la uva de cada año para obtener siempre las mejores características en los vinos. Está claro que en el caso de la uva Monastrell, los periodos de maceración más largos de 15 días produce vinos con características de color pobres e inestables, insuficientes tanto para vinos jóvenes como para vinos maduros.

## VIII.2.4 ANÁLISIS SENSORIAL

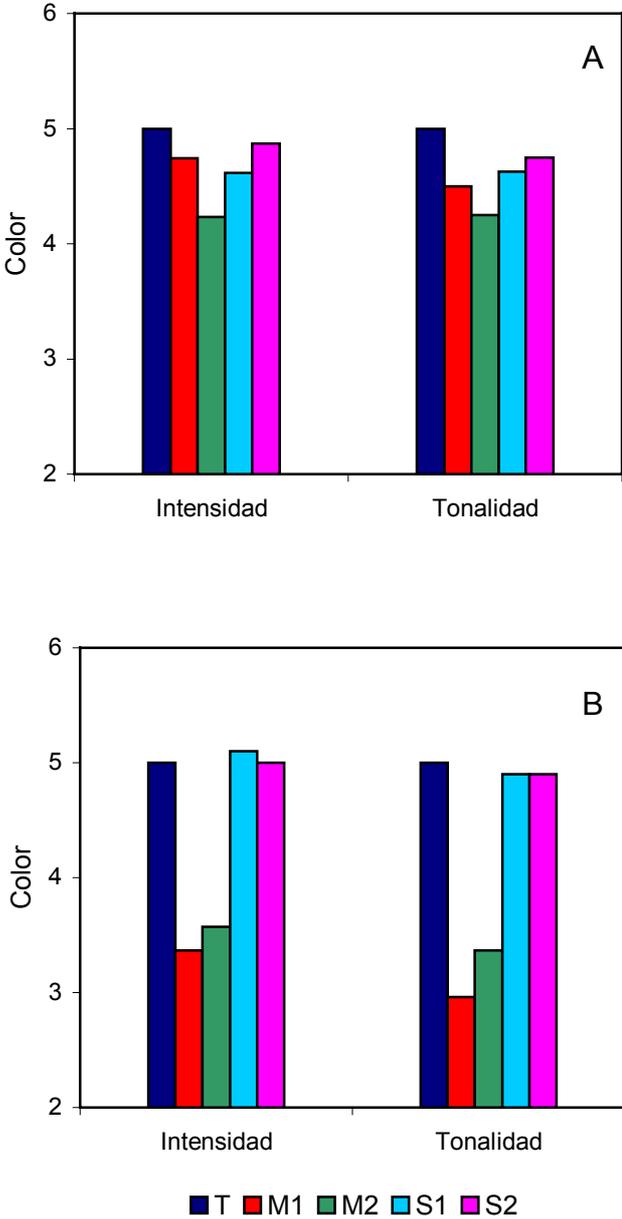
En las gráficas VIII.6, VIII.7 y VIII.8 se presentan los resultados de la cata descriptiva de los vinos elaborados en la campaña de 2002 en el momento de su embotellado y transcurridos 8 meses en botella. En cada una de las gráficas podemos observar el análisis de fase visual, olfativa y gustativa de los diferentes vinos.

La intensidad de cada uno de los atributos fue valorada en una escala de cero a diez, dando mayor puntuación a mayor sensación. Para facilitar la comprensión de los resultados, las puntuaciones del vino testigo fueron normalizadas a un valor de cinco, comparando los vinos elaborados con levaduras comerciales con él.

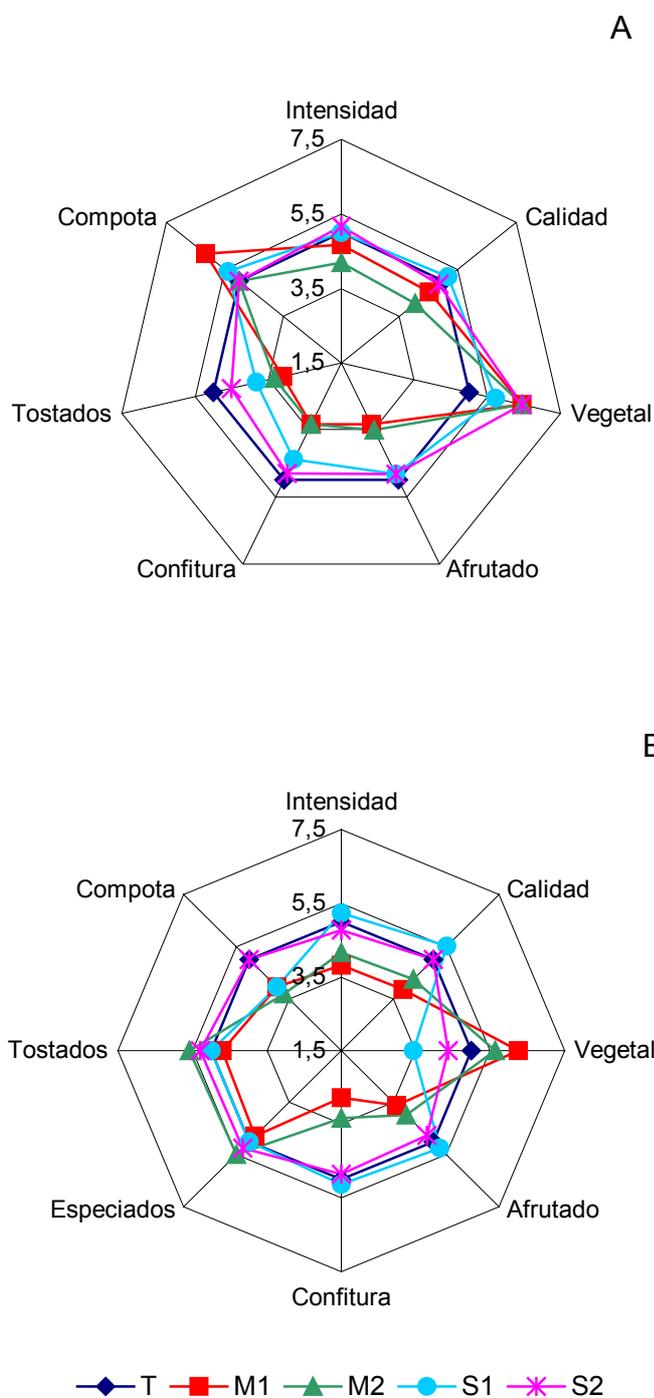
En cuanto al color, en el momento del embotellado, en general todos los tratamientos presentan valores de intensidad de color inferiores al testigo, siendo M2 el tratamiento menos intenso. También la tonalidad violacea es más baja en todos los tratamientos que en el vino testigo, siendo estas tonalidades más altas en los tratamientos con sangrado parcial del mosto que en los de tiempo de maceración muy prolongado.

Después de 8 meses de maduración en botella, los vinos de mayor tiempo de maceración sufren un descenso acusado en los valores de intensidad y tonalidad respecto el testigo, no observándose en cambio diferencias significativas en ambos parámetros entre los vinos testigo y los sangrados. Esto puede ser debido a una mayor precipitación de compuestos fenólicos de alto peso molecular en los vinos de mayor tiempo de maceración, sufriendo por tanto un descenso en el color y en la componente azul.

**Gráfica VIII.6** Evaluación sensorial de la intensidad y tonalidad del color de los vinos elaborados en el 2002 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.



**Gráfica VIII.7** Evaluación sensorial del aroma de los vinos elaborados en el 2002 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.

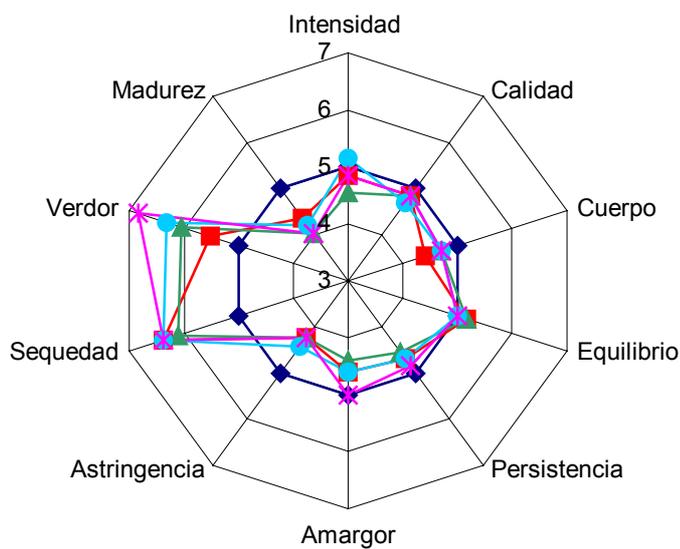


En cuanto al aroma, en el momento del embotellado, los vinos de maceración más prolongada son los que presentan menos sensaciones a fruta, confitura, tostado y mayor sensación a vegetal, calificados además, como los de peor calidad y menor intensidad aromática. El vino testigo es el que presenta menor sensación a vegetal, posiblemente debido a un menor contenido de taninos, encontrándose además los taninos que aportan las sensaciones más a verde más diluidos que en el caso de los sangrados. Los vinos testigo y los sangrados presentan una calidad e intensidad del aroma similar, mostrando el vino testigo mayores sensaciones a confitura y tostados. Después de ocho meses en botella, los vinos de tiempo de maceración más largo siguen siendo los de menor intensidad y calidad, con bajas sensaciones a fruta y confitura y mayores sensaciones a vegetal. Los vinos sangrados presentan sensaciones a vegetal más bajas que el testigo, en cambio, las sensaciones a fruta y confitura, son similares y siguen mostrando junto con el vino testigo la mayor calidad e intensidad aromática.

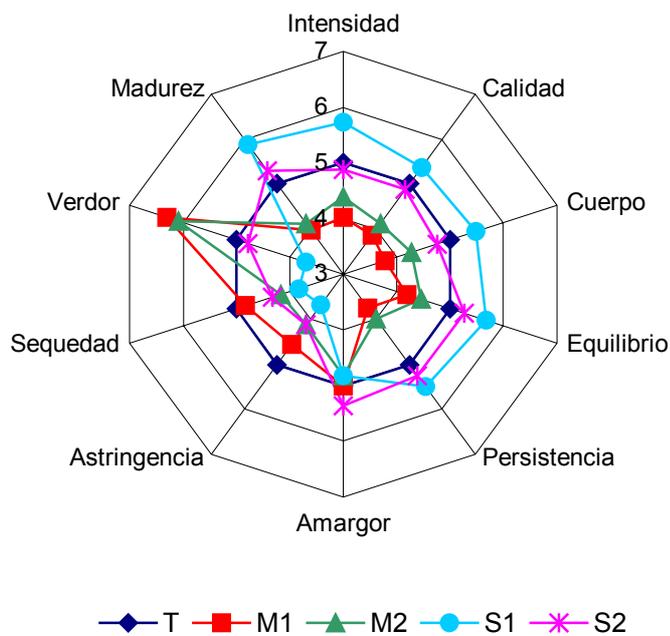
En boca, en el momento de su embotellado, el vino testigo es el que presenta mayor cuerpo, madurez, astringencia, con menores sensaciones a verde y el de menor sequedad. Después de ocho meses en botella, el vino del sangrado del 7,5 % es el que mejores sensaciones aporta en boca, mientras que los vinos con tiempo de maceración más prolongado (M1 y M2) son los de menor intensidad, calidad, cuerpo, equilibrio y persistencia, con mayores sensaciones a verdes.

**Gráfica VIII.8** Evaluación sensorial del gusto de los vinos elaborados en el 2002 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.

A



B



Spranger et al. (2004) encontraron que el tipo de elaboración afectaba significativamente a las propiedades sensoriales de los vinos, obteniendo una correlación entre el análisis sensorial del color con la intensidad de color medida en los vinos, resultado obtenido también por nosotros en los vinos del 2002 después de 8 meses. Además, con el empleo de tiempos de maceración prolongados los vinos presentaban mayor astringencia debida al mayor contenido de taninos. Esto no coincide con nuestros resultados, ya que los vinos de mayor tiempo de maceración presentan una astringencia menor que el testigo, lo cual puede ser debido a un mayor estado de polimerización de los taninos.

Gawel et al. (2001) también indicaron la existencia de diferencias sensoriales por efecto del sangrado, produciéndose en general una tendencia a una mayor percepción de todos los atributos sensoriales (color, aroma y gusto) al incrementar el sangrado parcial del mosto.

Con estos resultados podemos indicar, que el empleo de tiempos de maceración muy prolongados afecta significativamente al color, aroma y al gusto del vino, mientras que los sangrados parecen afectar más al gusto y al aroma.

**IX. TRATAMIENTOS  
SELECCIONADOS Y CALIDAD  
DEL VINO**



## IX.1 RESULTADOS

En la vendimia de 2003, se elaboraron vinos utilizando los tratamientos que habían mostrado mejores resultados en los años anteriores. En todas las elaboraciones se aplicaron como criterios generales:

- Partir de uva con un grado de maduración entorno a 14° Be: con este estado de maduración se obtenían vinos con mayor color, contenido de compuestos fenólicos y mayor estabilidad.
- Adicionar como levadura de fermentación Rhône 2323 (Uvaferm, Alemania): con ella se obtenían vinos con mejores características cromáticas y mayor estabilidad en el tiempo.
- Aplicación de un tiempo de maceración de 15 días: con tiempos de contacto mayores el vino sufría grandes pérdidas de color.

Con los criterios anteriores se elaboraron:

- Vinificación testigo (T)
- Vinificación con aplicación de un sangrado parcial del mosto del 15% (S): da vinos con mayor contenido de compuestos fenólicos, color y estabilidad
- Vinificación con el enzima Rapidase Excolor (DSM, Alemania), (E): con la aplicación de este enzima el color evoluciona menos en el tiempo.
- Vinificaciones con los taninos enológicos ensayados en la vendimia del 2002, Gallo tanin B (Lamothe Abiet Pinosa, Francia, tanino hidrolizable), (T1) y Gallo tanin R (Lamothe Abiet Pinosa, Francia, tanino condensado), (T2), para comprobar de nuevo su comportamiento en el color del vino.

Todas las vinificaciones se elaboraron por triplicado en depósitos de 100 litros a partir de 90 kg de uva. La dosis aplicada de levadura, enzima y taninos fue similar a las vendimias anteriores.

### IX.1.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICO-FÍSICAS DE LA UVA EN EL MOMENTO DE VENDIMIA

La tabla IX.1 muestra las características químico-físicas de la uva en el momento de vendimia.

En la vendimia del 2003, la uva presenta un tamaño de grano inferior a al mostrado en el 2001 y 2002, con mayor cantidad de polifenoles totales y antocianos medidos por HPLC y según Lamadon y esto unido a un mayor estado de madurez va a dar vinos con mayor contenido de compuestos fenólicos y color que en las dos vendimias anteriores.

**Tabla IX.1** Características químico-físicas de la uva en el momento de vendimia de 2003.

<b>Características</b>	
<b>Peso de 100 bayas (g)</b>	108,4
<b>°Be</b>	14,1
<b>Acidez Total (mg/L)</b>	3,8
<b>pH</b>	3,7
<b>IPT</b>	36,5
<b>Antocianos totales (mg/L mosto)</b>	244,0
<b>Antocianos totales Lamadon (mg/kg uva)</b>	1054,2
<b>Antocianos totales HPLC (mg/kg uva)</b>	1018,8

## **IX.1.2 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOR DE LOS VINOS DURANTE LA VINIFICACIÓN**

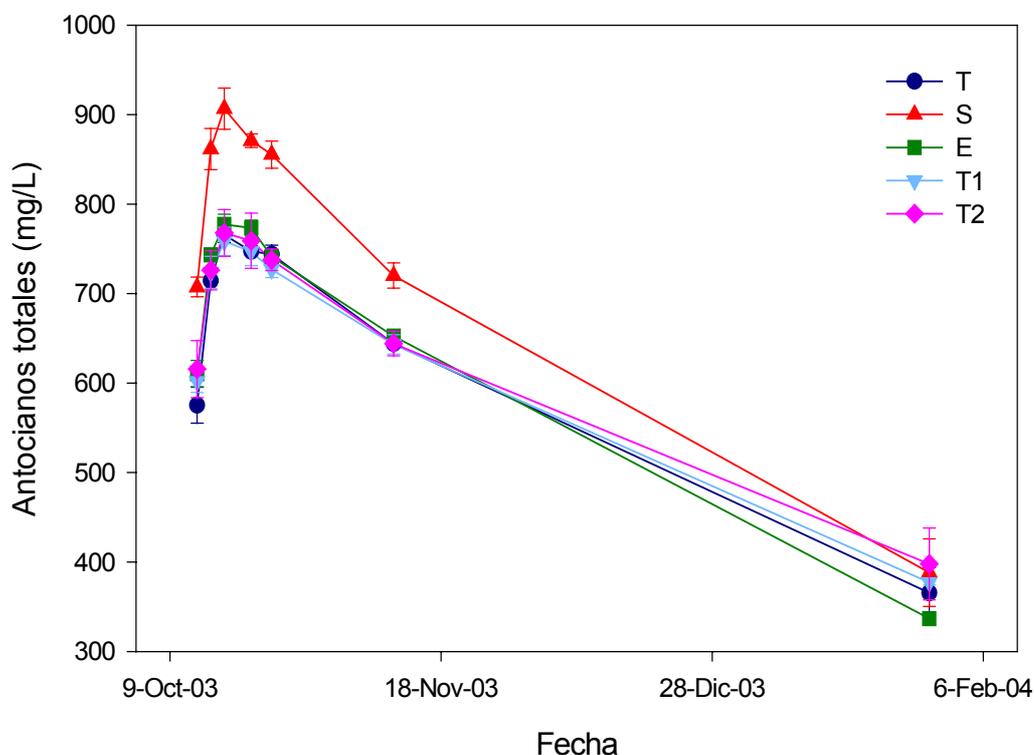
En las gráficas IX.1, IX.2, IX.3 y IX.4 y en la tabla IX.2 se puede observar la evolución del contenido de antocianos totales, índice de polifenoles totales, intensidad de color y tono y los valores de L\*, a\* y b\* respectivamente durante la vinificación del año 2003

### **IX.1.2.1 ANTOCIANOS TOTALES**

Todas las vinificaciones muestran el máximo de antocianos totales sobre el día ocho de maceración. Durante la maceración y tras la fermentación alcohólica, S es la vinificación con mayores valores de antocianos, sobre un 18% más que las demás vinificaciones, pero también es la vinificación que sufre la mayor pérdida de estos compuestos tras la fermentación maloláctica, debido posiblemente a una menor estabilización de los antocianos y a un mayor peso en este vino de los procesos de oxidación y precipitación.

Las mayores diferencias entre la vinificación testigo y el resto de los tratamientos (E, T1 y T2) son observadas a los cuatro días de maceración y al final de fermentación maloláctica, donde el testigo y el tratamiento con el enzima presentan menor contenido de antocianos totales respectivamente. Al inicio de la maceración es normal que el tratamiento con enzima muestre mayor contenido de antocianos, ya que este ayuda a disgregar las paredes celulares, produciéndose una mayor extracción de los pigmentos presentes en las vacuolas. Al final de fermentación maloláctica, T2 es el vino que muestra una concentración de antocianos ligeramente mayor, debido posiblemente a una mayor estabilización de estos compuestos (Vivas, 1997).

**Gráfica IX.1** Evolución de los antocianos totales desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones del año 2003. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Descube: 24-Oct-03, Fin Fermentación Alcohólica: 11-Nov-03, Fin Fermentación Maloláctica: 29-En-04.

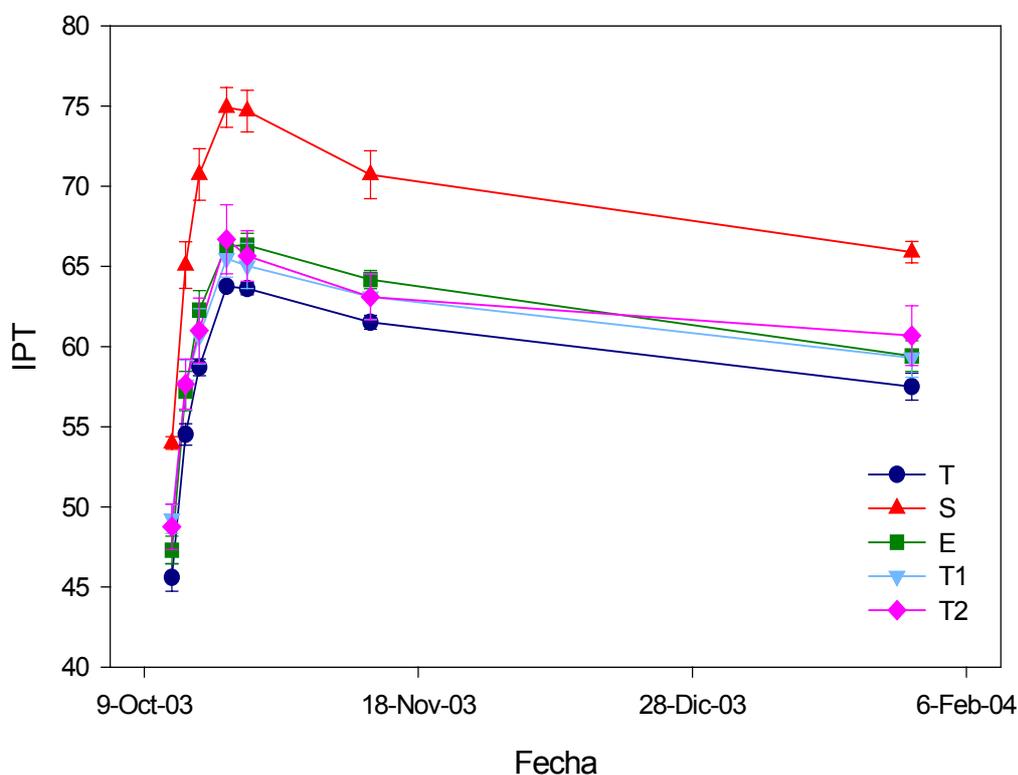


### IX.1.2.2 ÍNDICE DE POLIFENOLES TOTALES (IPT)

Todas las vinificaciones alcanzan el máximo contenido de polifenoles totales posteriormente al máximo de los antocianos como también observaron Klenar et al. (2004), ya que los taninos de los hollejos comienzan a solubilizarse conjuntamente con los antocianos, prolongándose su extracción mucho más en el tiempo, pero por el contrario, los taninos de las semillas no se solubilizarán hasta mitad de la fermentación, cuando el alcohol haya disuelto la cutícula (Amrani Joutei y Glories, 1995). El vino elaborado con un sangrado parcial, es el vino con valores más altos de IPT durante la maceración y al final de fermentación alcohólica y maloláctica. Al incrementar la proporción hollejo/mosto los vinos presentan una mayor cantidad de compuestos fenólicos

(Singleton, 1972; Gawel et al., 2001). Con la adición del enzima y de taninos también se consiguen mayores valores de estos compuestos que en el vino testigo durante todo el proceso de vinificación, ya que los enzimas favorecen la extracción de antocianos y de taninos presentes en el hollejo de la uva (Pardo et al., 1999) al generar una mayor disgregación de las paredes celulares, mientras que los taninos aportan compuestos que absorben a 280 nm (Martínez García et al., 2003). No se observan, en general, grandes diferencias entre el vino tratado con enzima y taninos, pero tras la fermentación maloláctica, T2 muestra un valor ligeramente mayor que los vinos E y T1. Tal vez la participación del Gallo tanin B (T1) en proteger a los antocianos de la oxidación (Vivas, 1997), podría dar lugar al menor contenido de compuestos fenólicos en el vino T1.

**Gráfica IX.2** Evolución del índice de polifenoles totales (IPT) desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones del año 2003. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Descubre: 24-Oct-03, Fin Fermentación Alcohólica: 11-Nov-03, Fin Fermentación Maloláctica: 29-En-04.



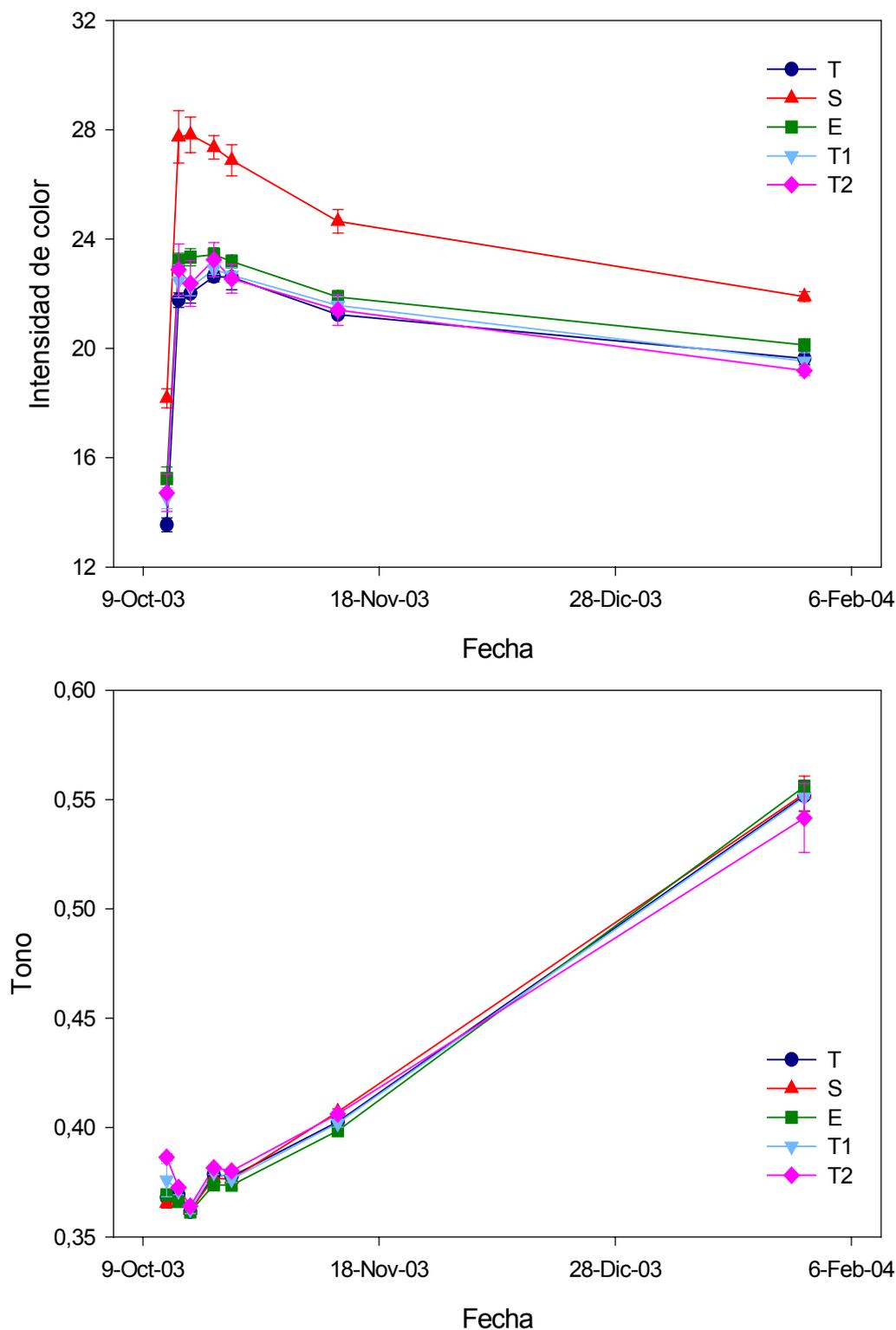
### **IX.1.2.3 INTENSIDAD DE COLOR Y TONO**

La máxima intensidad de color es alcanzada a mitad del periodo de maceración, disminuyendo ligeramente a continuación hasta final de fermentación maloláctica al descender el contenido de antocianos totales. Las uniones entre los antocianos con otros compuestos fenólicos dando nuevos derivados coloreados contribuyen a que esa pérdida de color no sea muy grande. Durante todo el proceso de vinificación, el vino S muestra la mayor intensidad de color, al presentar un alto contenido de antocianos y también mayor valor de IPT.

Con la adición del enzima y taninos, sólo se consigue mayor color respecto al testigo en los primeros días de maceración al presentar mayor contenido de compuestos fenólicos, no observándose además grandes diferencias entre ellos.

El tono disminuye inicialmente en los primeros días de maceración, alcanzando los valores más bajos con la máxima extracción de antocianos, incrementándose a continuación hasta final de fermentación maloláctica, debido a la extracción de compuestos fenólicos de color amarillo y también, a los procesos de polimerización y oxidación que sufren éstos compuestos. Las mayores diferencias en los valores de tono entre las vinificaciones son observadas al principio de maceración, mostrando T1 y T2 los valores más altos y al final de fermentación maloláctica, siendo en este momento, T2 el vino menos evolucionado (menor tono) al mostrar ligeramente mayor contenido de antocianos y por tanto, mayor contribución de la componente roja.

**Gráfica IX.3** Evolución de la intensidad de color y el tono desde el estrujado hasta fin de fermentación maloláctica de las distintas vinificaciones del año 2003. Cada punto corresponde a la media de tres muestras y las barras de error indican el error estándar de la media. Descubre: 24-Oct-03, Fin Fermentación Alcohólica: 11-Nov-03, Fin Fermentación Maloláctica: 29-En-04.



**IX.1.2.4 PARÁMETROS L\*, a\* Y b\***

Los valores más bajos de L\*, a\* y b\* son observados al final de fermentación maloláctica. En este momento, las vinificaciones S y E, son las más oscuras y con mayores tonalidades violáceas, lo cual puede ser atribuido a un mayor contenido de antocianos polímeros de color más intenso. En cambio, T2 muestra los valores más altos de L\*, a\* y b\*, siendo por tanto la vinificación más clara y con mayores tonalidades rojas y menos violetas, indicando una menor formación de pigmentos polímeros de color violeta. El vino T1 presenta valores de estos parámetros más similares al testigo.

**Tabla IX.2** Cambios de los valores de L\*, a\* y b\* con sus desviaciones estándar de las distintas vinificaciones del año 2003 a los 15 días de maceración, fin de fermentación alcohólica (FFA) y fin de fermentación maloláctica (FFM).

Vinificación	Días	L*	a*	b*
T	15	9,4 ± 0,33	40,6 ± 0,46	16,2 ± 0,58
	FFA	9,6 ± 0,53	40,8 ± 0,75	16,5 ± 0,91
	FFM	5,2 ± 0,39	32,5 ± 1,33	8,9 ± 0,68
S	15	8,8 ± 0,20	36,5 ± 0,30	16,2 ± 0,34
	FFA	6,7 ± 0,39	36,2 ± 1,33	11,5 ± 0,68
	FFM	4,1 ± 0,39	28,2 ± 1,73	7,1 ± 0,67
E	15	9,4 ± 0,28	40,7 ± 0,63	16,2 ± 0,50
	FFA	9,1 ± 0,39	40,1 ± 1,73	15,6 ± 0,67
	FFM	4,4 ± 0,17	29,4 ± 0,76	7,5 ± 0,29
T1	15	9,6 ± 0,20	40,8 ± 0,27	16,5 ± 0,34
	FFA	9,0 ± 0,17	40,1 ± 0,76	15,6 ± 0,29
	FFM	5,3 ± 0,23	33,0 ± 0,73	9,2 ± 0,39
T2	15	9,4 ± 0,34	40,7 ± 0,50	16,3 ± 0,60
	FFA	8,9 ± 0,23	39,9 ± 0,73	15,4 ± 0,40
	FFM	6,0 ± 0,51	34,9 ± 1,26	10,4 ± 0,88

### **IX.1.3 PARÁMETROS CROMÁTICOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS DURANTE SU CONSERVACIÓN EN BOTELLA**

#### **IX.1.3.1 PARÁMETROS DE COLOR ESPECTROFOTOMÉTRICOS**

La tabla IX.3 muestra los cambios de los parámetros espectrofotométricos de los vinos de 2003 durante su conservación en botella.

En el momento de su embotellado, hay un descenso en el contenido polifenólico de los vinos, lo cual hace que los vinos sean menos coloreados que al final de fermentación maloláctica. En este momento, los vinos tratados con taninos muestran mayor intensidad de color, menor valor de  $L^*$  (más oscuros), mayor contenido de polifenoles totales, antocianos totales y taninos y también, una mayor estabilización de los pigmentos como indica la mayor concentración de antocianos polímeros. Entre los tratamientos con taninos, el vino T2 (tanino condensado) presenta mejores características cromáticas que el T1 (tanino hidrolizable) como también encontraron Poinssaut y Gerland (1993) y Gerland y Poinssaut (2002) y una mayor estabilidad de los taninos, al mostrar los valores más altos de taninos polímeros. El vino tratado con enzima junto con el vino con aplicación del sangrado parcial son los menos coloreados y los más evolucionados, al mostrar mayores valores de tono. La gran pérdida de color presentada por el vino con sangrado parcial puede estar relacionada por un lado con un desequilibrio en la relación antociano/tanino (A/T), debido posiblemente a una mayor concentración de antocianos en el vino que taninos que los estabilicen, viéndose favorecidas las reacciones de oxidación de estos pigmentos. La disminución de la intensidad de color también ha podido verse favorecida por la formación de importantes cantidades de acetaldehído en este vino respecto a los demás (la concentración de acetaldehído medido por test enzimático para los vinos T, S, E, T1 y T2 fueron 102, 135, 107, 91 y 88 mg/L respectivamente), ya que como indicaron Liu y Piloni (2000) el acetaldehído

podría causar turbidez y depósitos debido a las precipitaciones de grandes complejos antociano-tanino o la formación y precipitación de polímeros coloidales de catequina-acetaldehído al acelerar las combinaciones entre estos compuestos (Cheynier et al., 2000a).

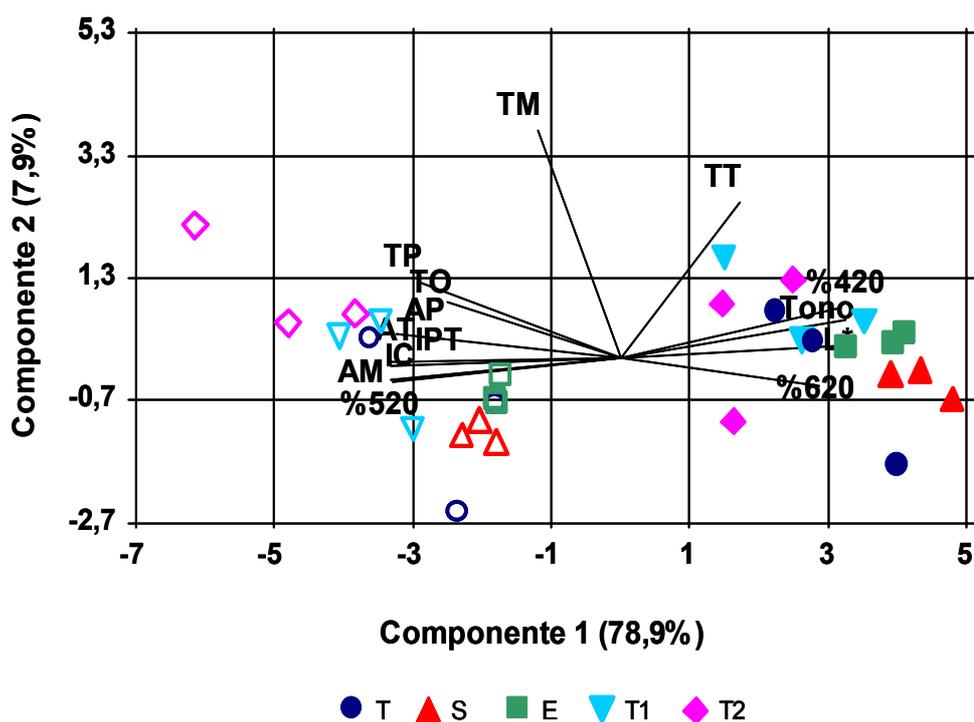
Después de ocho meses en botella, continua la disminución de compuestos fenólicos, produciéndose más pérdidas de color en los vinos. En este momento, el vino T2 sigue mostrando las mejores características de color al presentar mayor intensidad de color, menor tono y menor valor de  $L^*$  y también, mayor contenido de polifenoles totales, antocianos y taninos. El vino tratado con el tanino hidrolizable (T1) muestra un perfil cromático más similar al vino testigo aunque con una mayor estabilidad de los antocianos (mayor valor de los antocianos polímeros). Los vinos S y E siguen siendo los más evolucionados, con menos color y también, con menos cuerpo al presentar menor valor del índice de polifenoles totales.

El análisis de componentes principales de los 5 vinos durante el periodo de envejecimiento (Gráfica IX.5) mostró que todos los vinos disminuyeron sus valores a través de la componente 1, produciéndose descensos en contenido de compuestos fenólicos y en el color e incrementando las tonalidades amarillas y la claridad a pesar de aumentar la componente azul (%620). Tanto en el momento del embotellado como después de 8 meses en botella, los vinos tratados con taninos presentan mejores características de color que los vinos testigo, S y E, al mostrar mayor contenido de IPT, antocianos y mayor intensidad de color, siendo los vinos menos evolucionados (menor tono), los más oscuros y los de mayor estabilidad.

**IX.3** Cambios de los parámetros cromáticos de los vinos de 2003 en el momento de su embotellado y transcurridos 8 meses en botella. Letras diferentes en la misma fila y para cada periodo estudiado muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ . Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, TT: taninos totales, %520: porcentaje de color rojo, %620: porcentaje de color azul, %420: porcentaje de amarillo.

Parámetros	t=0 meses botella						t=8 meses botella								
	T	S	E	T1	T2	T	S	E	T1	T2	T	S	E	T1	T2
<b>IC</b>	15,1 bc	14,5 ab	13,8 a	16,0 cd	16,8 d	9,2 ab	7,6 a	8,4 ab	9,9 bc	11,1 c					
<b>Tono</b>	0,57 ab	0,58 b	0,58 b	0,57 ab	0,56 a	0,67 ab	0,68 b	0,67 ab	0,66 ab	0,65 a					
<b>%420</b>	31,1 a	31,1 a	31,1 a	31,1 a	31,1 a	33,7 a	33,9 a	33,7 a	33,4 a	33,2 a					
<b>%520</b>	54,1 abc	53,5 ab	53,4 a	54,2 bc	54,8 c	50,6 ab	50,1 a	50,3 ab	50,7 ab	50,9 b					
<b>%620</b>	14,7 ab	15,4 bc	15,5 c	14,7 ab	14,1 a	15,7 a	16,0 a	16,0 a	15,9 a	15,9 a					
<b>IPT</b>	49,9 ab	51,5 bc	48,4 a	53,4 cd	56,3 d	36,6 ab	34,9 a	35,9 a	39,9 cb	42,9 c					
<b>AM (mg/L)</b>	55,4 ab	44,7 a	43,7 a	62,2 b	76,7 c	20,5 ab	16,6 a	18,4 ab	23,9 bc	26,7 c					
<b>AP (mg/L)</b>	153,3 b	148,2 ab	141,6 a	163,9 c	168,9 c	85,1 ab	70,6 a	75,1 a	92,1 bc	101,7 c					
<b>AT (mg/L)</b>	244,2 ab	227,4 a	215,9 a	262,2 bc	288,0 c	121,6 ab	100,2 a	111,0 ab	135,3 bc	150,6 c					
<b>L*</b>	6,9 bc	6,8 b	7,3 c	6,2 a	6,2 a	12,7 abc	15,4 c	13,8 bc	11,3 ab	9,7 a					
<b>TM (mg/L)</b>	18,7 a	20,7 ab	22,6 ab	24,8 ab	28,4 b	20,6 a	19,1 a	21,9 a	24,2 a	18,6 a					
<b>TO (mg/L)</b>	92,6 a	130,7 ab	129,6 ab	124,1 ab	159,0 b	86,0 ab	61,0 a	61,0 a	81,6 ab	94,9 b					
<b>TP (mg/L)</b>	369,2 b	284,2 a	327,0 ab	378,1 b	482,9 c	236,2 ab	194,7 a	234,3 ab	269,5 bc	316,8 c					
<b>TT (g/L)</b>	1,7 a	1,9 ab	2,0 ab	2,1 ab	2,4 b	1,5 ab	1,3 a	1,3 ab	1,5 ab	1,6 b					

**Gráfica IX.5** Distribución de los vinos elaborados en el 2003 durante su envejecimiento en botella en un sistema de coordenadas bidimensional definido por dos componentes principales (el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal es mostrado entre paréntesis). Abreviaciones: IC: intensidad de color, AT: antocianos totales, AM: antocianos monómeros, AP: antocianos polímeros, IPT: índice de polifenoles totales, TM: taninos monómeros, TO: taninos oligómeros, TP: taninos polímeros, TT: taninos totales, %520: porcentaje de color rojo, %620: porcentaje de azul, %420: porcentaje de color amarillo, símbolos blancos: t=0 meses, símbolos oscuros: t=8 meses.



Con estos resultados podemos concluir, que la utilización de diferentes técnicas de elaboración da lugar a vinos con características cromáticas diferentes, no consiguiéndose mejorar siempre el color del vino. A partir de uva madura (14 °Be) y rica en antocianos:

- La aplicación del sangrado parcial no mejora las características cromáticas del vino, ya que va a producir desequilibrios en la relación A/T donde se van a ver favorecidas principalmente reacciones de oxidación de los pigmentos y que

se van a traducir en grandes pérdidas de color del vino, no siendo apto para ser sometido a condiciones de envejecimiento en barrica

- La aplicación del enzima inicialmente mejora el perfil cromático del vino al producir una mayor disgregación de las paredes celulares y favorecer la extracción de antocianos y de otros compuestos fenólicos presentes en las vacuolas, pero tras su embotellado y envejecimiento las diferencias respecto al testigo se reducen y además muestra una intensidad de color menor.

- La utilización de taninos enológicos, principalmente el tanino condensado, incrementa la estabilidad de la materia colorante al favorecer directamente las combinaciones antociano-tanino, dando lugar a vinos con mejores características cromáticas que el vino testigo, poniendo de manifiesto que su comportamiento es dependiente de las características de la uva de partida.

### **IX.1.3.2 COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES**

Las tablas IX.4 y IX.5 muestran respectivamente el contenido de compuestos fenólicos individuales de los vinos en el momento del embotellado y después de 8 meses de envejecimiento en botella.

En el momento del embotellado, el contenido de ácidos hidroxibenzoicos es mayor en los vinos S y T1, mostrando S los valores más altos. Esto no coincide con las observaciones de Singleton (1972), quien encontró que con una mayor proporción hollejo/mosto los compuestos no flavonoides no se veían afectados, ya que éstos están principalmente en la pulpa, pero el ácido gálico, el cual se encuentra en mayor concentración, también puede proceder de la hidrólisis de la epicatequín-galato y éste compuesto es extraído de las partes sólidas de uva durante el proceso de maceración (Singleton y Trouslade, 1983) y por tanto, su concentración si que puede verse incrementada con la aplicación de sangrados parciales del mosto. Por otro lado, el Gallo tanin B puede incrementar los valores de ácidos hidroxibenzoicos en el vino debido a su aporte de ácido gálico, ya que es un galotanino. Con la aplicación del

enzima el contenido de estos ácidos en el vino es menor que en el vino testigo, en cambio con el tanino condensado (T2) se consigue una mayor concentración. No se observan diferencias significativas en los valores de ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres entre los distintos tratamientos y el vino testigo. En cuanto al contenido de flavan-3-oles, flavonoles y antocianos monoglucósidos es mayor en los vinos tratados con taninos debido a su prociandina natural y a la actuación de estos compuestos en evitar la oxidación de los antocianos y menor en los vinos con aplicación del sangrado parcial y tratado con enzima, lo cual puede estar asociado a reacciones de oxidación de los antocianos y a procesos de precipitación de materia colorante debido a la formación en poco tiempo de compuestos polifenólicos de elevado peso molecular.

Después de ocho meses en botella, el contenido de ácidos hidroxibenzoicos sufre un ligero descenso, manteniendo de nuevo los valores más altos los vinos S y T1. Los ésteres de los ácidos hidroxicinámicos también disminuyen pero dicho descenso no provoca aumentos en la concentración de sus formas ácidas al mantenerse prácticamente constantes, lo cual puede ser debido a pérdidas de estos compuestos por oxidación y también a su participación en los procesos de copigmentación, los cuales todavía siguen teniendo lugar aunque en menor proporción, después de nueve meses en botella (Hermosín-Gutiérrez et al., 2004). Los flavan-3-oles, los flavonoles y los antocianos también disminuyen debido a su participación en los procesos de polimerización y copigmentación, mostrando de nuevo mayor concentración de estos compuestos los vinos tratados con taninos y menor contenido en los vinos S y E.

El mayor contenido en los vinos tratados con taninos de copigmentos junto con la mayor concentración de antocianos monoglucósidos (debido a una menor oxidación) y también la menor formación de acetaldehído, podría justificar la mayor estabilidad de la materia colorante en dichos vinos.

**Tabla IX.4** Compuestos fenólicos medidos en mg/L por HPLC de los vinos de 2003 en el momento de su embotellado. Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ .

Compuestos fenólicos	T	S	E	T1	T2
Ácido gálico	22,5 a	27,9 c	22,4 a	27,4 c	24,9 b
Ácido siríngico	4,4 a	5,1 b	4,2 a	4,4 a	4,6 a
Ácido protocatéquico	6,0 ab	6,5 c	5,7 a	6,2 bc	6,4 c
$\Sigma$ Ácidos hidroxibenzoicos	32,9 a	39,6 d	32,0 a	38,0 c	35,9 b
Ácido cafeico	4,4 a	3,9 a	4,0 a	4,6 a	4,1 a
Ácido ferúlico	0,22 a	0,23 ab	0,26 ab	0,27 ab	0,28 b
Ácido p-cumárico	1,0 a	0,9 a	0,9 a	0,8 a	0,8 a
$\Sigma$ Ácidos hidroxicinámicos	5,6 a	5,1 a	5,2 a	5,7 a	5,2 a
Ácido caftárico	4,9 a	5,5 a	5,1 a	4,8 a	5,0 a
Ácido cutárico	1,9 ab	1,9 ab	2,1 b	1,8 a	1,9 ab
$\Sigma$ Ésteres hidroxicinámicos	6,8 a	7,4 a	7,2 a	6,5 a	6,8 a
Catequina	15,8 a	16,8 a	13,6 a	20,4 b	23,9 c
Epicatequina	1,8 a	2,3 ab	2,4 abc	3,3 bc	3,7 c
$\Sigma$ Flavan-3-oles	17,6 a	19,2 a	16,0 a	23,7 b	27,5 b
Rutina	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Quercitrina	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Miricitina	12,1 c	10,2 b	7,5 a	12,7 cd	13,8 d
Quercetina	11,8 bc	10,7 b	8,4 a	12,5 cd	13,5 d
Kampferol	1,0 c	0,9 b	0,6 a	1,1 c	1,2 c
$\Sigma$ Flavonoles	24,9 c	21,8 b	16,5 a	26,3 cd	28,5 d
Delfinidina-3-Glucósido	4,3 a	3,7 a	2,2 a	5,2 ab	7,7 b
Cianidina-3-Glucósido	0,9 ab	0,7 a	0,3 a	1,1 ab	1,6 b
Petunidina-3-Glucósido	6,2 a	5,1 a	2,8 a	7,5 ab	11,7 b
Peonidina-3-Glucósido	2,3 ab	1,5 a	0,3 a	2,5 ab	4,7 b
Malvidina-3-Glucósido	28,0 a	23,5 a	11,7 a	33,9 ab	54,8 b
$\Sigma$ Antocianos	41,8 a	34,4 a	17,4 a	50,2 ab	80,4 b

Tratamientos seleccionados y calidad del vino

**Tabla IX.5** Compuestos fenólicos medidos en mg/L por HPLC de los vinos de 2003 después de 8 meses en botella. Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según el test LSD ( $p > 95\%$ ),  $n=3$ .

Compuestos fenólicos	T	S	E	T1	T2
Ácido gálico	22,9 b	27,8 d	21,6 a	28,2 d	25,0 c
Ácido siríngico	5,4 a	6,4 b	5,2 a	5,2 a	5,4 a
Ácido protocatéquico	3,2 c	3,9 d	2,4 ab	2,2 a	2,8 b
ΣÁcidos hidroxibenzoicos	31,4 b	38,1 e	29,2 a	35,7 d	33,2 c
Ácido cafeico	4,4 a	5,1 a	4,5 a	4,4 a	4,5 a
Ácido ferúlico	0,0 a	1,5 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Ácido p-cumárico	1,1 a	1,3 a	1,3 a	1,1 a	1,2 a
ΣÁcidos hidroxicinámicos	5,6 a	7,9 b	5,9 a	5,5 a	5,7 a
Ácido caftárico	0,0 a	1,0 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Ácido cutárico	0,11 a	0,13 ab	0,15 ab	0,15 ab	0,17 b
ΣÉsteres hidroxicinámicos	0,11 a	1,13 b	0,15 a	0,15 a	0,17 a
Catequina	15,5 b	8,7 a	11,2 a	15,7 b	16,7 b
Epicatequina	1,9 a	2,1 a	2,5 ab	2,9 bc	3,2 c
ΣFlavan-3-oles	17,4 bc	10,7 a	13,7 ab	18,6 c	19,9 c
Rutina	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Quercitrina	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Miricitina	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Quercetina	4,6 b	2,5 a	2,3 a	4,0 b	4,6 b
Kampferol	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
ΣFlavonoles	4,6 b	2,5 a	2,3 a	4,0 b	4,6 b
Delfinidina-3-Glucósido	1,4 ab	0,7 a	0,8 a	1,7 bc	2,3 c
Cianidina-3-Glucósido	0,74 b	0,60 ab	0,55 a	0,67 ab	0,76 b
Petunidina-3-Glucósido	1,9 ab	0,89 a	0,89 a	2,1 bc	3,1 c
Peonidina-3-Glucósido	0,5 b	0,0 a	0,0 a	0,3 b	1,2 c
Malvidina-3-Glucósido	7,2 ab	3,0 a	3,1 a	8,0 bc	12,3 c
ΣAntocianos	11,8 ab	5,2 a	5,4 a	12,7 bc	19,6 c

## **IX.1.4 ANÁLISIS SENSORIAL**

### **IX.1.4.1 CATA DESCRIPTIVA**

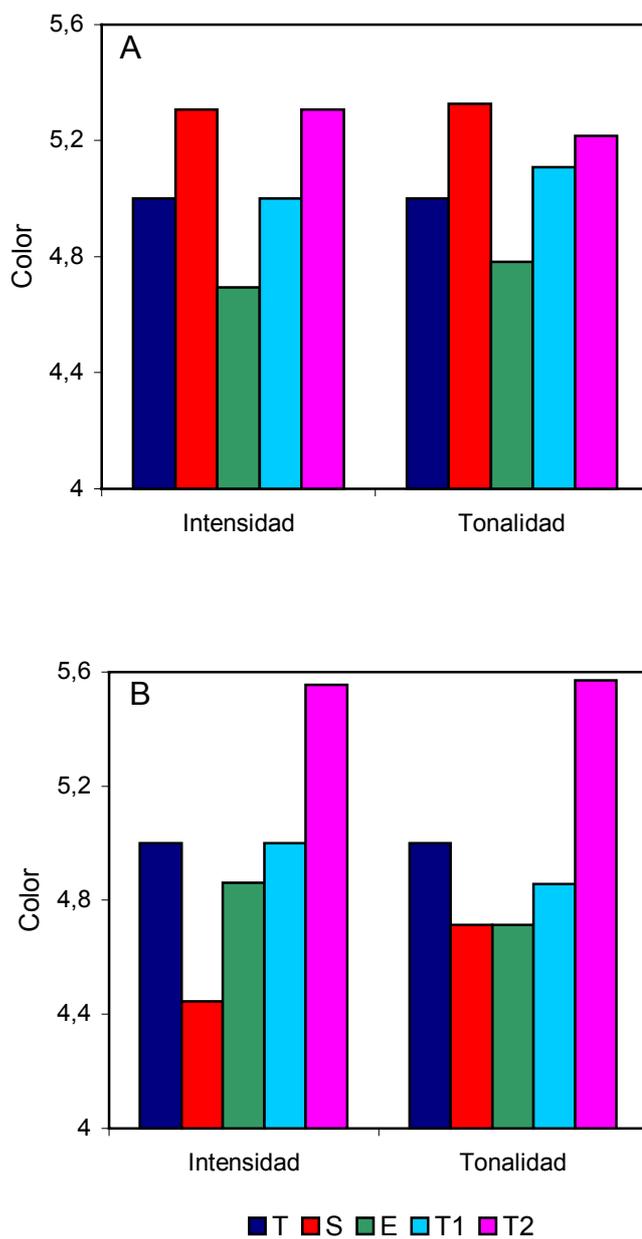
En las gráficas IX.6, IX.7 y IX.8 se presentan los resultados de la cata descriptiva de los vinos elaborados en la campaña de 2003 en el momento de su embotellado (gráfica A) y transcurridos 8 meses en botella (gráfica B). En cada una de las gráficas se puede observar el análisis de fase visual, olfativa y gustativa de los diferentes vinos.

La intensidad de cada uno de los atributos fue valorada en una escala de cero a diez, dando mayor puntuación a mayor sensación. Para facilitar la comprensión de los resultados, las puntuaciones del vino testigo fueron normalizadas a un valor de cinco, comparando los vinos elaborados con los diferentes tratamientos con él.

En cuanto a la fase visual, en el momento del embotellado, los vinos con aplicación del sangrado parcial y el tratado con el tanino condensado son los más intensos y también los de mayor tonalidad violacea, siendo dicha tonalidad un poco mayor en S. El vino tratado con el enzima es el menos coloreado, mientras que T1 muestra una intensidad similar al testigo pero con mayores tonalidades violetas. Estos resultados sólo se correlacionan en parte con los parámetros de color medidos en los vinos, ya que analíticamente T1 y T2 eran los vinos con mayor intensidad de color, pero con menor tonalidad violacea (menor valor de %620) al igual que el vino testigo, mientras que el vino con sangrado parcial presentaba menor intensidad que los vinos tratados con taninos y junto con el vino tratado con el enzima, el cual era el menos coloreado de todos, mayor contenido de tonos violetas.

## Tratamientos seleccionados y calidad del vino

**Gráfica IX.6** Evaluación sensorial de la intensidad y tonalidad del color de los vinos elaborados en el 2003 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.



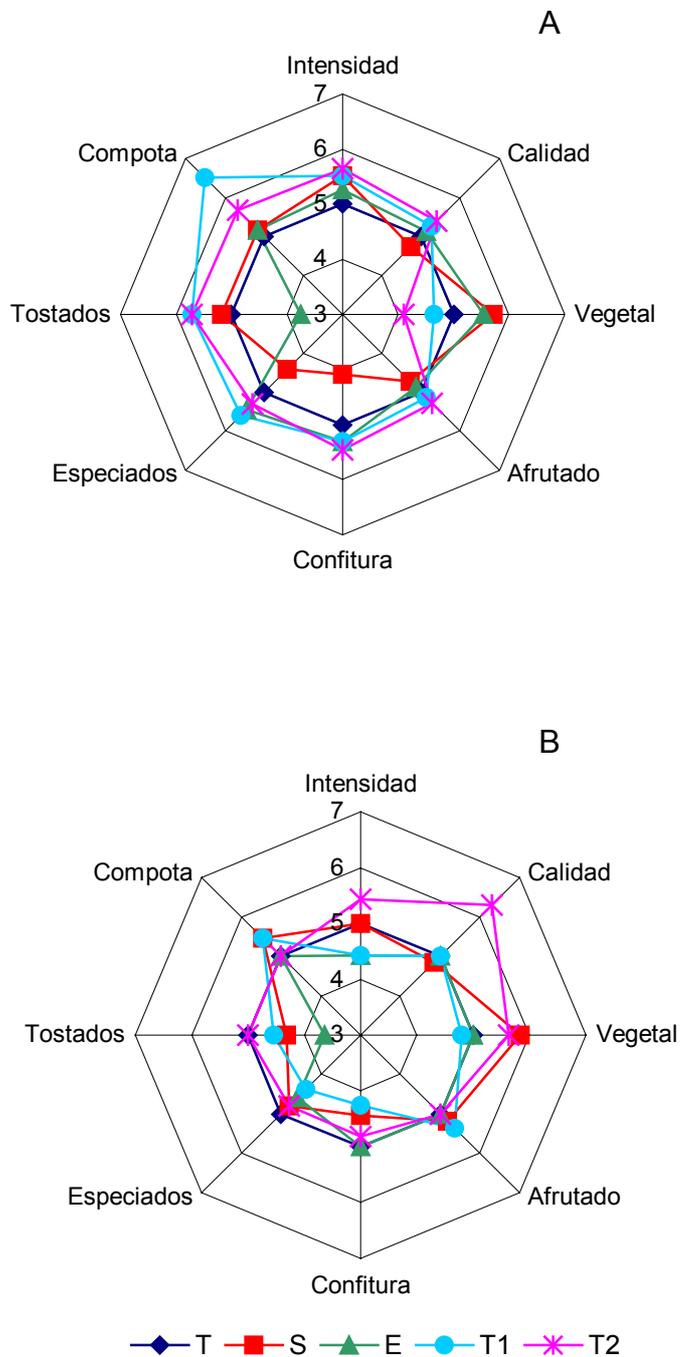
Después de ocho meses en botella, T2 (tanino condensado) es el vino con mayor intensidad y tonalidad violacea seguido de los vinos T1 y testigo, mientras que el vino con sangrado parcial es el de menor intensidad y con una tonalidad violeta similar al vino tratado con el enzima. Estos resultados son muy similares a los obtenidos analíticamente.

En cuanto al aroma, el vino testigo es el menos intenso. El vino con sangrado parcial muestra una calidad ligeramente inferior al testigo, lo cual puede ser debido a una menor percepción de aromas más agradables como son los recuerdos a fruta, confitura y especiado y más a vegetal, debido posiblemente a una mayor concentración de los taninos que aportan sensaciones más a verde. Con la adición del enzima, la calidad del vino es similar al testigo, pero presenta mayor sensación a vegetal, confitura, especiados, y menos a tostados. Con los taninos, la calidad aromática aumenta y muestran menos recuerdos a vegetal y más a confitura, afrutado, especiados, tostados y compota. Después de ocho meses en botella, tiene lugar una disminución en la apreciación de todos los aromas, siendo el vino T2 el de mayor intensidad y calidad aromática y también con mayores sensaciones a vegetal. Los demás vinos muestran una calidad aromática similar, aunque son más intensos los vinos testigo y S.

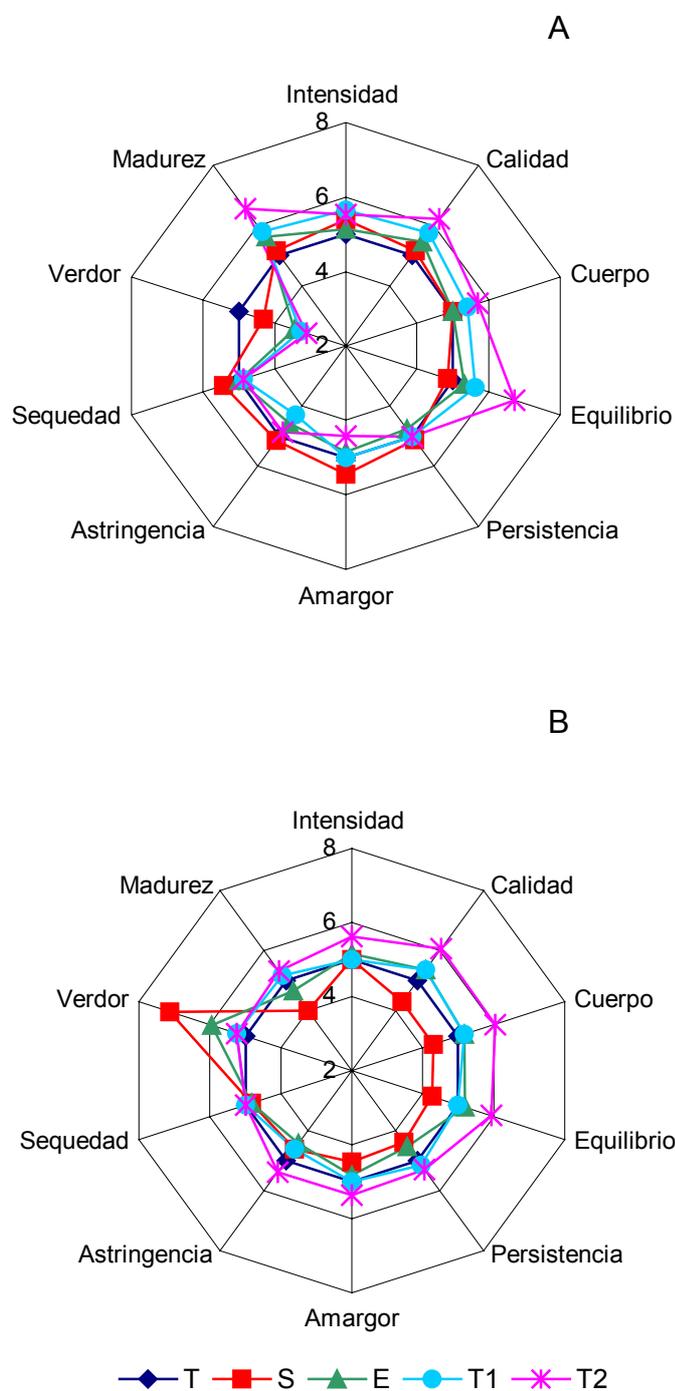
En boca, en el momento del embotellado, los vinos con adición de taninos muestran mayor calidad, cuerpo, equilibrio y ligeramente más intensos, siendo también, vinos más maduros que el vino testigo y mostrando T1 menor astringencia y T2 menor sensación amargo. Con la adición del enzima, mejora un poco la calidad y disminuye la astringencia y el verdor, mientras que con a aplicación del sangrado, el vino muestra mayor intensidad, amargor y sequedad, pero es menos verde. Después de ocho meses en botella, el vino T2 es el que mejores sensaciones causa en boca al ser el vino de mayor intensidad, calidad, cuerpo y equilibrio. Los vinos E y T1 muestran en general sensaciones más similares al testigo, mientras que S, es el vino de menor calidad, cuerpo, equilibrio, menos persistente al igual que el vino E y el de menor madurez.

Tratamientos seleccionados y calidad del vino

**Gráfica IX.7** Evaluación sensorial del aroma de los vinos elaborados en el 2003 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores.



**Gráfica IX.8** Evaluación sensorial del gusto de los vinos elaborados en el 2003 en el momento de su embotellado (gráfica A) y después de 8 meses en botella (gráfica B). Cada punto es la media de la evaluación de cinco catadores



Con estos resultados podemos concluir que el tratamiento aplicado va a afectar al perfil organoléptico de los vinos, pero dicho perfil también puede verse muy afectado si no se controlan muy bien los procesos de oxidación durante el proceso de elaboración. Parece que con la aplicación de taninos enológicos los vinos son inicialmente más intensos en nariz y en boca, mostrando también un color bastante intenso, pero éstas características son mejoradas durante el proceso de envejecimiento por el vino tratado con el tanino condensado.

#### **IX.1.4.2 CATA TRIANGULAR**

La tabla IX.6 muestra los resultados de la cata triangular de los vinos elaborados en la campaña de 2003 en el momento de su embotellado y después de 8 meses en botella.

En el momento del embotellado, sólo el enfrentamiento TS es significativo, mostrando preferencia por el vino sangrado respecto al testigo, presentando además, las mayores diferencias en la fase visual, aromática y gustativa. Tal vez la elección del vino con sangrado parcial frente al testigo puede ser debido en parte a la percepción del aroma a acetaldehído por los catadores el cual es valorado positivamente debido a su sensación a dulce. Con la adición del enzima y taninos, las mayores diferencias son encontradas en la fase olfativa y gustativa, mostrando preferencia por el vino E frente al testigo, y al testigo frente a T1 y T2.

Después de ocho meses en botella sólo es significativo el enfrentamiento TT2, mostrando las mayores diferencias en la fase visual y gustativa y eligiendo como muestra preferida a T2. El resto de los enfrentamientos presentan mayores diferencias respecto al vino control en la fase olfativa y gustativa.

Se debe destacar que este tipo de cata es realizada por catadores no expertos con diferentes paladares y gustos, pero que se asemeja al tipo de vino preferido por el consumidor.

También es importante indicar, que el color es sin lugar a dudas uno de los aspectos organolépticos más importantes de un vino tinto y cuya estabilidad, bajo condiciones oxidativas, está más favorecida con altas concentraciones de antocianos y taninos en el vino de partida y que en nuestra experiencia son presentadas principalmente por los vinos tratados con taninos.

**Tabla IX.6** Resultados de la cata triangular realizada por ocho catadores de los vinos elaborados en la campaña de 2003 en el momento de su embotellado y después de 8 meses en botella. (\* Diferencias significativas  $p < 0,05$ ; \*\* Diferencias significativas  $p < 0,01$ , \*\*\* Diferencias significativas  $p < 0,001$ ).

Muestras	Número aciertos	Muestra preferida	Promedio visual	Promedio olfativa	Promedio gustativa
<b>t=0 meses botella</b>					
TS	7**	3 (T) 5 (S)	2,0	2,0	2,6
TE	4	2 (T) 6 (E)	1,8	2,0	2,5
TT1	2	5 (T) 3 (T1)	1,8	2,1	2,1
TT2	2	5 (T) 3 (T2)	1,5	1,6	2,1
<b>t=8 meses botella</b>					
TS	4	6 (T) 2 (S)	1,8	2,9	2,4
TE	2	2 (T) 6 (E)	1,5	2,5	2,1
TT1	2	2 (T) 6 (T1)	2,0	3,0	2,4
TT2	8**	2 (T) 6 (T2)	2,8	2,3	2,4



## **X. CONCLUSIONES**



**I.** Las características físico-químicas de la uva, y especialmente el contenido de compuestos polifenólicos, son muy dependientes de las condiciones climáticas, viéndose más favorecidas con menores precipitaciones durante el proceso de maduración.

**II.** La uva que alcanzó, en el momento de la vendimia, la mayor concentración de antocianos en sus hollejos no dio lugar a vinos de mayor intensidad de color. Esta alta intensidad de color en los vinos se consigue cuando las uvas sufren una ligera sobremaduración.

**III.** No se ha encontrado una correlación entre el índice de madurez celular de la uva y los parámetros de color del vino. El efecto extractante de la mayor cantidad de etanol en vinos elaborados de uvas más maduras no es evaluado con este método. El método para la determinación de antocianos extraíbles debería ser modificado para tener en cuenta el efecto del etanol.

**IV.** Con la aplicación de enzimas comerciales durante el proceso de vinificación se consigue una extracción más rápida de antocianos y polifenoles totales. Los valores finales de IPT son superiores en los vinos tratados con enzimas, probablemente porque facilita la extracción de taninos de las pieles. Una mayor cantidad de estos compuestos permite estabilizar el color en el vino y ello se observa principalmente en el vino tratado con Rapidase Excolor durante la evolución en botella. El efecto del enzima se ve reducido al aumentar el grado de maduración de la uva como se observó en la experiencia del año 2003.

**V.** Con la adición de taninos enológicos se consiguen valores más altos del índice polifenoles totales durante el proceso de vinificación, se incrementa el contenido de antocianos y la intensidad de color, aunque las diferencias de estos parámetros respecto a los valores presentados por el vino testigo se

reducen con el transcurso de la vinificación y durante el almacenamiento. En el ensayo realizado el año 2002, los vinos tratados con taninos mostraron menor intensidad de color y mayor tono que el vino testigo, lo cual puede ser debido a desequilibrios en la relación antociano/tanino (A/T) tras la adición de estos compuestos, viéndose más favorecidas las reacciones de polimerización entre taninos que las de estabilización de los antocianos. En cambio, cuando se parte de uva con 14 °Be y rica en antocianos, como es el caso de la uva de la vendimia del 2003, la adición de estos compuestos, y principalmente el tanino condensado, incrementó notablemente la estabilidad de la materia colorante, consiguiéndose valores de intensidad de color superiores a las presentadas por el vino testigo y siendo los vinos preferidos organolépticamente.

**VI.** El tipo de levadura utilizada en la elaboración afecta al perfil cromático de los vinos y a la estabilidad de los compuestos coloreados, debido a su diferente capacidad para retener pigmentos en su pared celular y para liberar compuestos que contribuyen a estabilizar el color, tales como manoproteínas, ácido pirúvico y acetaldehído. El vino elaborado con Rhône 2323 fue el que presentó mejores características de color durante el proceso de vinificación en los dos años de elaboración, incluso después de 8 meses de envejecimiento en botella.

**VII.** Maceraciones de 15 días son suficientes para conseguir una extracción máxima y equilibrada de compuestos fenólicos y antocianos y también para conseguir una buena estabilidad del color. La aplicación tiempos mas largos de maceración no es una buena técnica para mejorar el color del vino, ya que produce vinos con características de color pobres e inestables, insuficientes tanto para vinos jóvenes como para vinos maduros.

**VIII.** La aplicación de sangrados parciales antes de fermentación puede ser una práctica aconsejable para mejorar el color de los vinos de Monastrell, aunque la

extensión del tratamiento debe ser decidido en función de las características de la uva de partida. Así, el sangrado deberá ser mayor cuando la uva de partida sea pobre en antocianos (vendimia del 2002) y menor cuando la uva sea rica en ellos (vendimia del 2003), salvo si empleamos alguna forma de estabilizar estos compuestos (adición de tanino enológico), ya que puede producir desequilibrios de la relación antociano-tanino (A/T), al no conseguirse extraer suficiente contenido de taninos que estabilicen a los antocianos. Esta situación favorece principalmente las reacciones de oxidación de estos pigmentos, lo cual da lugar a grandes pérdidas de color.

**IX.** Los resultados muestran que el enólogo dispone de un abanico muy amplio de diferentes técnicas de elaboración que puede aplicar a la uva Monastrell, bien para compensar deficiencias o para potenciar las bondades de esta variedad. La elección de cada técnica vendrá muy determinada con las características de la uva en el momento de vendimia.



## **XI. BIBLIOGRAFÍA**



- Alliata, P. (1995). Enzimi estrattivi e polifenoli nei vini rossi. *Vignevini*, **7**, 54-56.
- Almela, L.; Lázaro, I. y López Roca, J. M. (1991). Influencia de las levaduras sobre el contenido de ácidos fenólicos de los vinos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, **31**, 393-399.
- Amrani Joutei, K. y Glories, Y. (1994). Etude en conditions modèles de l'extractibilité des composés phenoliques des pellicules et des pepins de raisin rouges. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **28**, 303-317.
- Amrani Joutei, K.; Glories, Y. y Mercier, M. (1994). Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis*, **33**, 133-138.
- Amrani Joutei, K. y Glories, Y. (1995). Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Revue Francaise d' OEnologie*, **153**, 28-31.
- Andrades, M. S. (1990). Fisiología de la maduración de la uva. *Viticultura y Enología Profesional*, **9**, 21-30.
- Antonelli, A.; Castellari, L.; Zambonelli, C. y Carnacini, A. (1999). Yeast influence on volatile composition of wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **47**, 1139-1144.
- Archier, P.; Coen, S. y Roggero, J. P. (1993). Changes in the phenolic content of single-variety wines after nine months of storage. *Science des Aliments*, **13**, 483-490.
- Arozarena, I.; Ayestaran, B.; Cantalejo, M. J.; Navarro, M.; Vera, M.; Abril, I. y Casp, A. (2002). Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyards over two years. *European Food Research and Technology*, **214**, 303-309.
- Asen, S.; Stewart, R. N. y Norris, K. H. (1972). Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, **11**, 1139-1144.
- Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V. y Moutounet, M. (2002). Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Letters*, **43**, 6151-6153.

## Bibliografía

Auw, J. M.; Blanco, V.; O'Keefe, S. F. y Sims, C. A. (1996). Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin and Noble wines and juices. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47**, 279-286.

Bakker, J. y Timberlake, C. F. (1985). The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **36**, 1315-1324.

Barcenila, J.; Estrella, C.; Gómez-Cordovés, C.; Hernández, T. y Hernández, L. (1989). The influence of yeasts on certain non-volatile components of wine. *Food Chemistry*, **31**, 177-187.

Bartowsky, E. J.; Markides, A. J.; Dillon, S. J.; Dumont, A.; Pretorius, I. S.; Henschke, P. A.; Ortiz-Julien, A. y Herderich, M. (2004). The potencial of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast to improve red wine colour. *Australian Grapegrower and Winemaker*, **490**, 83-85.

Bergqvist, J.; Dokoozlian, N. y Ebisuda, N. (2001). Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture*, **52**, 1-7.

Boivin, S.; Feuillat, M.; Alexandre, H. y Charpentier, C. (1998). Effect of must turbidity on cell wall porosity and macromolecule excretion of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated on grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture*, **49**, 325-331.

Bonilla, F.; Mayen, J.; Merida, J. y Medina, M. (2001). Yeast used as fining treatment to correct browning in white wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**, 1928-1933.

Borzi, A.; Rodríguez Villa, J. C.; Richardi, B.; Lozano, M. A. y Melero, J. (1993). Influencia de la relación sólido / líquido en la obtención de vinos tintos de carácter. Experiencia 1991. *Viticultura y Enología Profesional*, **27**, 37-47.

Borzi, A.; Rodríguez Villa, J. C.; Richardi, B.; Lozano, M. A. y Ruffo, R. (1992). Influencia de la relación sólido / líquido en la obtención de vinos tintos de carácter. *Viticultura y Enología Profesional*, **18**, 46-57.

Boulton, R. (1995). Red wines. En: *Fermented Beverage Production*, Lea, A. y Piggott, J. (Eds.), Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall, London, pp. 121-158.

Boulton, R. (1996). A Method for the assesment of copigmentation in red wines. En: *The ASEV 47th Annual Meeting*, Waterhouse, A. L. y Rantz, J. (Eds.), ASEV, Reno, Nevada, pp. 346.

Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, **52**, 67-87.

Bourzteix, M.; Mourges, J. y Aubert, S. (1970). Influence de la duree de maceration sur la constitution en polyphenols et sur la degustation des vins rouges. *Connaissance Vigne Vin*, **4**, 447-460.

Brander, C. F.; Kepner, R. E. y Webb, D. A. (1980). Identification of some volatile compounds of wine of *Vitis vinifera* cultivar Pinot noir. *American Journal of Enology and Viticulture*, **31**, 69-75.

Bravdo, B. A.; Hepner, Y.; Loigner, C.; Cohen, S. y Tabacman, H. (1985). Effect of irrigation and crop level on growth, yield, and wine quality of Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, **36**, 132-139.

Bravdo, B. A. y Hepner, Y. (1986). Water management and effect on fruit quality in grapevines. En: *The Sixth Australian Wine Industry Technical Conference*, Lee, T. H. (Ed.) , ASOV, Adelaide, pp. 150-158.

Brouillard, R.; Chassaing, S. y Fougerousse, A. (2003). Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? *Phytochemistry*, **64**, 1179-1186.

Budic-Leto, I.; Lovric, T. y Vrhovsek, U. (2003). Influence of different maceration techniques and ageing on proanthocyanidins and anthocyanins of red wine cv. Babic (*Vitis vinifera*, L.). *Food Technology and Biochnology*, **41**, 299-303.

Burns, J.; Gardner, P. T.; Matthews, D.; Duthie, G. y Lean, M. E. J. (2001). Extraction of phenolic and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**, 5797-5808.

Cacho, J.; Fernandez, P.; Ferreira, V. y Castells, J. E. (1992). Evolutions of five anthocyanidin-3-glucosides in the skin of the Tepranillo, Moristel and Garnacha grapes varieties and influence of climatological variables. *American Journal of Enology and Viticulture*, **43**, 244-248.

## Bibliografía

Calo, A.; Tomasi, D.; Crespan, M. y Costacurta, A. (1997). Relationship between environmental factors and the dynamics of growth and composition of the grapevine. *Acta Horticulturae*, **427**, 217-232.

Canal-Llaubères, R. M. (1990). Utilisation des enzymes dans les procédés d'extraction en œnologie. *Revue Française d'Œnologie*, (Nº **122**), 28-3.

Canal-Llaubères, R. M. y Barbe, C. (1995). The use of purified pectolytic enzyme preparations for limiting the formation of volatile phenols in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **46**, 416.

Cantos, E.; Espín, J. C.; Fernández, M. J.; Oliva, J. y Tomás-Barberán, A. (2003). Postharvest UV-C-Irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 1208-1214.

Capdeboscq, V.; Leske, P. y Bruer, N. (1994). An evaluation of some winemaking characteristics of commercial pectic enzyme preparations. *Australian Grapegrower and Winemaker*, **366A**, 146-150.

Caridi, A.; Cufari, A.; Lovino, R.; Palumbo, R. y Tedesco, I. (2004). Influence of yeast on polyphenol composition of wine. *Food Technology and Biotechnology*, **42**, 37-40.

Catalina, L.; Marzuelos, C.; Romero, R. y Sarmiento, R. (1982). Cambios metabólicos durante el proceso de maduración de la uva (*Vitis vinífera*, L. Var. Palomino) en la zona del marco de Jerez de la Frontera (Cádiz). *Anales de Edafología y Agrobiología*, **41**, 1503-1517.

Cayla, L.; Cottureau, P. y Renard, R. (2002). Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V. standard. *Revue des Oenologues*, **193**, 84-87.

Celotti, E.; Battistutta, F.; Comuzzo, P.; Poinssaut, P. y Zironi, R. (1999). Impieghi di tannini enologici commerciali. *Vignevini*, **26**, 67-74.

Celotti, E.; Battistutta, F.; Comuzzo, P.; Scotti, B.; Poinssaut, P. y Zironi, R. (2000). Emploi des tannins oenologiques: experience sur Cabernet Sauvignon. *Revue des Oenologues*, **27**, 14-18.

Charpentier, C. y Feuillat, M. (1993). Yeast autolysis. En: *Wine microbiology and biotechnology*, Fleet, G. H. (Ed.), Chur, Switzerland, pp. 225-242.

- Charpentier, C.; Dos Santos, A. M. y Feuillat, M. (2004). Release of macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* during ageing of French flor sherry wine "Vin jaune". *International Journal of Food Microbiology*, **96**, 253-262.
- Chassagne, D.; Guilloux-Benatier, M.; Aleixandre, H. y Voilley, A. (2005). Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chemistry*, **91**, 39-44.
- Cheyrier, V.; Remy, S. y Fulcrand, H. (2000a). Mechanisms of anthocyanin and tannin changes during winemaking and aging. En: *The ASEV 50<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting*, Rautz, J. (Ed.), ASEV, Davis, CA, pp. 337-344.
- Cheyrier, V.; Moutounet, M. y Sarni Manchado, P. (2000b). Los compuestos fenólicos. En: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*, Flancy, C. (Ed.), AMV Ediciones, Madrid, pp. 114-136.
- Cheyrier, V. (2003). El color de los vinos tintos. *Wine Internet Technical Journal*, **4**, 1-9.
- Chirivella, C.; Haba, M. y Perez, A. (1992). Evolución de los ácidos orgánicos durante el período de maduración de la uva. *Vitivinicultura*, **7-8**, 52-55.
- Clare, S.; Skurray, G. y Theaud, L. (2002). Effect of a pectolytic enzyme on the colour of red wine. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, **456**, 29-35.
- Coombe, B. G. y Iland, P. (1986). Grape berry development. En: *The Sixth Australian Wine Industry Technical Conference*, Lee, T. H. (Ed.), ASOV, Adelaida, pp. 50-54.
- Cravero, M. C. y Di Stefano, R. (1990). I composti fenolici l'origine varietale delle uve. *Rivista de Viticoltura y Enologia*, **1**, 33-44.
- Cravero, M. C. (1991). Gli acidi idrossicinamamiltartarici dell'uva del vino. *Vini d'Italia*, **5**, 33-44.
- Crespy, A. (2002). Les tannins oenologiques: origins, propriétés. Le cas des tannins de raisin. *Revue des Oenologues*, **104**, 17-19.
- Crespy, A. (2003). Etude de l'élimination de composés soufrés par tanisage avec des tannins de pépins de raisin. *Revue des Oenologues*, **108**, 38-39.

## Bibliografía

Cresy, A. (2001). El agua y la viña. *Viticultura y Enología Profesional*, **74**, 17-22.

Crippen, D. y Morrison, J. (1986). The effects of sun exposure on the phenolic content of cabernet sauvignon berries during development. *American Journal of Enology and Viticulture*, **37**, 243-247.

Cuinier, C. (1988). Influence des levures sur les composés phénoliques du vin. *Bulletin de la O.I.V.*, **689-690**, 596-601.

D'Agostino, S. (1986). La determinazione dei polifenoli totali nei mosti, mosti muti, mosti concentrati, mosti concentrati rettificati. *Vignevini*, **10**, 47-50.

Dallas, C. y Laureano, O. (1994). Effects of pH, sulphur dioxide, alcohol content, temperature and storage time on colour composition of a young Portuguese red table wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **65**, 477-485.

Dallas, C.; Ricardo da Silva, J. M. y Laureano, O. (1996). Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2 and acetaldehyde. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **44**, 2402-2407.

Darias-Martín, J.; Carrillo, M.; Díaz, E. y Boulton, R. (2001). Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chemistry*, **73**, 217-220.

Darias Martín, J.; Martín Galarza, F.; Pomar García, M.; Miguel Tabares, J. A. y Martín Luis, B. (2003). Madurez fenólica de clones de variedades de uva tradicionalmente cultivadas en Tenerife. Influencia de la virosis. *Viticultura y Enología Profesional*, **84**, 15-21.

De la Hera, M. L.; Pérez Prieto, L. J.; Fernández, J. I.; Martínez Cutillas, A.; López Roca, J. M. y Gómez Plaza, E. (2002). Partial rootzone drying. Una experiencia española para la variedad *Monastrell*. *Viticultura y Enología Profesional*, **83**, 70-76.

Delteil, D. (2000). Utilisation de tannins oenologiques sur les raisins et les vins rouges méditerranéens et rhodaniens. *Revue Française d'Œnologie*, **181**, 20-22.

Díaz, M. J.; Rodríguez, P.; Herrera, P.; Arteaga, C.; Suberviola, J.; Armani, J.; Santamaría, P.; López, R.; Gutiérrez, A. R.; Martínez, J. y Palacios, A. (1999). Influencia de las levaduras en el color del vino tinto. Elaboraciones a escala piloto con levaduras seleccionadas en España. En: *V Jornadas Científicas Grupos de Investigación Enológica*, Zaragoza.

Doco, T.; Lecas, M.; Pellerin, P.; Brillouet, J. M. y Moutounet, M. (1995). Pectic polysaccharides of grape pulp and skin and changes during the prefermentative stage. *Revue Francaise d' OEnologie*, **153**, 16-23.

Doco, T.; Brillouet, J. M. y Moutounet, M. (1996). Evolution of grape (Carignan noir cv.) and yeast polysaccharides during fermentation and post-maceration. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47**, 108-110.

Downey, M.; Harvey, J. y Robinson, S. (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **9**, 15-27.

Dry, P. R. y Loveys, B. R. (1998). Factors influencing grapevine vigour and the potential for control with partial rootzone drying. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **4**, 140-148.

Dupin, I. V. S.; Stockdale, V. J.; Williams, P. J.; Jones, G. P.; Markides, A. J. y Waters, E. J. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: evaluation of extraction methods and immunolocalization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**, 1086-1095.

Es-Safi, N.; Le Guernevé, C.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. y Moutounet, M. (1999). New polyphenolic compounds with xanthylum skeletons formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **47**, 5211-5217.

Es-Safi, N.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V. y Moutounet, M. (2000). New phenolic compounds formed by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic solution and their implication in color changes of grape-derived foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**, 4233-4240.

Escot, S.; Feuillat, M.; Dulau, L. y Charpentier, C. (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **7**, 153-159.

Esteban, M. A.; Villanueva, M. J. y Lissarrague, J. R. (1999). Effect of irrigation on changes in berry composition of Tempranillo during maturation. Sugars, organic acids and mineral elements. *American Journal of Enology and Viticulture*, **50**, 418-434.

## Bibliografía

Esteban, M. A.; Villanueva, M. J. y Lissarrague, J. R. (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 409-420.

Esteban, M. A.; Villanueva, M. J. y Lissarrague, J. R. (2002). Relationships between different berry components in Tempranillo (*Vitis Vinifera* L) grapes from irrigated and non-irrigated vines during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**, 1136-1146.

Esteban, R. M.; Lopez-Andreu, F. J.; Martin-Cabrejas, M. y Molla, E. (1993). Pectin changes during the development and ripening of eggplant fruits. *Food Chemistry*, **46**, 289-292.

Esteves-Pinto, J. (1971). De vinea et vino. *Portugaliae Documenta, Serie II*, **5**, 1-65.

Estévez, P.; Gil, M. L. y Falqué, E. (2004). Effects of seven yeast strains on the volatile composition of Palomino wines. *International Journal of Food Science and Technology*, **39**, 61-69.

Farris, G. A. (1995). El uso de levaduras seleccionadas en enología. *Vitivinicultura*, **3-4**, 43-45.

Felix, R. y Villettaz, J. (1983). Wine. En: *Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry*, Godfrey, T. y Reichelt, J. (Eds.), The Nature Press, New York, pp. 410-421.

Fernandez-Lopez, J. A.; Almela, L.; Muñóz, J. A.; Hidalgo, V. y Carreño, J. (1998). Dependence between colour and individual anthocyanin content in ripening grapes. *Food Research International*, **31**, 667-672.

Fernandez de Simon, B.; Hernandez, T. y Estrella, I. (1993). Phenolic composition of white grapes (Var.Airen). Changes during ripening. *Food Chemistry*, **47**, 47-52.

Fernández-López, J. A.; Hidalgo, V.; Almela, L. y Lopez-Roca, J. M. (1992). Quantitative changes in anthocyanin pigments of *Vitis vinifera* c.v.Monastrell during maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **58**, 153-155.

Fernández, J. I.; Martínez, A.; Romero, I.; Bautista, A. B.; Cardenal, J. V.; Corredor, J.; Carcelén, J. C.; Fernández, S.; García, M. G.; Carrión, M.; Lozano, J. M. y Palencia, M. S. (2003). Evaluación enológica de clones seleccionados de la variedad Monastrell. Elaboraciones 2000-2002. En: *Reunión Anual del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología*, MAPA, Madrid

Feuillat, M.; Peyron, D. y Berger, J. L. (1987). Influence de la microfiltration tangentielle des vins sur leur composition physicochimique et leurs caractères sensoriales. *Bulletin de la O.I.V.*, **60**, 227-244.

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, **86**, 11-22.

Flexas, J.; Escalona, J. M. y Medrano, H. (1999). Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant, Cell and Environment*, **22**, 39-48.

Francia-Aricha, E. M.; Guerra, M. T.; Rivas-Gonzalo, J. C. y Santos-Buelga, C. (1997). New anthocyanin pigments formed after condensation with flavonols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **45**, 2262-2266.

Fulcrand, H.; Cameira dos Santos, P.; Sarni Manchado, P.; Cheynier, V. y Favre Bonvin, J. (1996). Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal Chemical Society PT.1*, **7**, 735-739.

Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Oszmianski, J. y Moutounet, M. (1997a). An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytochemistry*, **46**, 223-227.

Fulcrand, H.; Benabdejalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V. y Moutounet, M. (1997b). A new class of wine pigments generated by reaction between piruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, **47**, 1401-1407.

Fulcrand, H.; Atanasova, V.; Salas, E. y Cheynier, V. (2004). The fate of anthocyanins in wine. Are they determining factors? En: *Red wine color. Revealing the mysteries. ACS Symposium Series 886*, Waterhouse, A. y Kennedy, J. A. (Eds.), American Chemical Society, Washington, pp. 68-88.

Fuleki, T. y Ricardo da Silva, J. M. (1997). Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **45**, 1156-1160.

Gao, Yu. y Cahoon, G. A. (1994). Cluster shading effects on fruit quality, fruit skin color, and anthocyanin content and composition in Realiance (*Vitis hybrid*). *Vitis*, **33**, 205-209.

## Bibliografía

García-Beneytez, E.; Revilla, E. y Cabello, F. (2002). Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *European Food Research and Technology*, **215**, 32-37.

Gawel, R. (1998). Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **4**, 74-95.

Gawel, R.; Iland, P. G.; Leske, P. A. y Dunn, C. G. (2001). Compositional and sensory differences in Syrah wines following juice run-off prior to fermentation. *Journal of wine research*, **12**, 5-18.

Gerbaux, V. (1993). Etude de quelques conditions de cuvaision susceptibles d'augmenter la composition polyphenolique des vins de Pinot Noir. *Revue des Oenologues*, **69**, 15-18.

Gerland, C. y Poinsaut, P. (2002). Pratiques oenologiques modernes et structure tannique des vins rouges: acquisitions recentes. *Revue des Oenologues*, **105**, 29-32.

Gil-Muñoz, R. (1997). Polifenoles y parámetros indicativos del color, de vinos de la variedad Monastrell (*V. vinífera*) en la D. O. Jumilla. *Tesis de Licenciatura*, Universidad de Murcia.

Gil-Muñoz, R.; Gómez-Plaza, E.; Martínez, A. y López-Roca, J. M. (1999). Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation: influence of grape temperature. *Journal of Food Composition and Analysis*, **12**, 259-272.

Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2ème partie. Mesure, origine et interpretation. *Connaissance Vigne Vin*, **18**, 253-271.

Glories, Y. (1988). Anthocyanins and tannins from wine organoleptic properties. *Plant flavonoids in biology and medicine Biochemical, Cellular and Medicinal properties*, **2**, 123-134.

Glories, Y. y Agustin, M. (1993). *Actes du Colloque Journée Technique du CIVB*, Burdeos, pp. 56-61.

Glories, Y. (1994). Phenómenes oxydatives liés à la conservation sous bois. *Connaissance Vigne Vin*, **Extra**, 93-102.

Glories, Y. (1999). La maturità fenolica delle uve: primo parametro da controllare per una corretta vinificazione in rosso. *Vignevini*, **3**, 46-50.

Glories, Y. y Saucier, C. (2000). Tannin evolution from grape to wine. Effects on wine taste. En: *The ASEV 50<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting*, Rautz, J. (Ed.), ASEV, Davis, CA, pp. 353-355.

Gonzalez-Neves, G.; Gil, G. y Ferrer, M. (2002). Effect of different vineyard treatments on the phenolic contents in Tannat (*Vitis vinifera* L.) grapes and their respective wines. *Food Science and Technology International*, **8**, 315-321.

Gonzalez-Neves, G.; Charamelo, D.; Balado, J.; Barreiro, L.; Bochicchio, R.; Gato, G.; Gil, G.; Tessore, A.; Carboneau, A. y Moutounet, M. (2004). Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Analytica Chimica Acta*, **513**, 191-196.

Gonzalez-San José, M. L.; Santa- Maria, G. y Diez, C. (1990a). Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine growing reaction and wine making methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, **3**, 54-56.

Gonzalez-San José, M. L.; Barron, L. J. R. y Diez, C. (1990b). Evolution of anthocyanins during maturation of Tempranillo grape variety (*Vitis vinifera*) using polynomial regression model. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **51**, 337-343.

Gonzalez-Sanjose, M. L. y Diez, C. (1992). Relationship between anthocyanins and sugars during the ripening of grape berries. *Food Chemistry*, **43**, 193-197.

González, J. L.; Hernández, M. A.; Díaz, E. y Darías, J. (2001). Evolución de los caracteres madurativos de las variedades tintas *Listán Negro* y *Negramole*. *Viticultura y Enología Profesional*, **76**, 27-37.

Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J. M. y Martínez-Cutillas, A. (1999). Color and phenolic compounds of a young red wine as discriminanting of its ageing status. *Food Research International*, **32**, 503-507.

Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J. M.; Martínez-Cutillas, A. y Fernández-Fernández, J. I. (2001). Phenolic compounds and color stability of red wines. Effect of skin maceration time. *American Journal of Enology and Viticulture*, **52**, 271-275.

Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R. y Martínez-Cutillas, A. (2000). Multivariate classification of wines from seven clones of Monastrell grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 497-501.

## Bibliografía

Guidoni, S.; Allara, P. y Schubert, A. (2002). Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv Nebbiolo. *American Journal of Enology and Viticulture*, **53**, 224-226.

Guillamón, J. M.; Barrio, E. y Querol, A. (1996). Characterization of wine yeasts strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of the molecular markers: relationships between genetic distance and geographical or ecological origin. *Systematic and Applied Microbiology*, **19**, 122-132.

Guilloux-Benatier, M. y Chassagne, D. (2003). Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model solution. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 746-751.

Gunata, Y. Z.; Sapis, J.-C. y Moutounet, M. (1987). Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenol oxidases. *Phytochemistry*, **26**, 1573-1575.

Haight, K. G. y Gump, B. H. (1994). The use of maceration enzymes in grape juice processing. *American Journal of Enology and Viticulture*, **45**, 113-116.

Harbord, R.; Simpson, C. y Wegstein, J. (1990). The use of macerating enzymes in grape juice processing. *American Journal of Enology and Viticulture*, **45**, 113-116.

Hebrero, E.; Santos-Buelga, C. y Rivas-Gonzalo, J. (1988). High performance liquid chromatography-diode array spectroscopy identification of anthocyanins of *Vitis vinifera* variety Tempranillo. *American Journal of Enology and Viticulture*, **39**, 227-233.

Hebrero, E.; Garcia-Rodriguez, C.; Santos-Buelga, C. y Riva-Gonzalo, J. (1989). Analysis of anthocyanins by high performance liquid chromatography-diode array spectroscopy in a hybrid grape variety (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* 41B). *American Journal of Enology and Viticulture*, **40**, 283-289.

Hepner, Y. y Bravdo, B. A. (1985). Effect of crop level and drip irrigation scheduling on the potassium status of Cabernet Sauvignon and Carignane vines and its influence on must and wine composition and quality. *American Journal of Enology and Viticulture*, **36**, 140-147.

Hermosin-Gutierrez, I. (2003). Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 4079-4083.

- Hermosín-Gutiérrez, I.; Sánchez-Palomo, L. y Vicario Espinosa, A. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, **92**, 269-283.
- Hermosín, I.; Blanco, F. J. y Castro, J. M. (2002). Evolución de la madurez fenólica en uvas tintas de las variedades Cencibel (Tempranillo) y Cabernet Sauvignon. *Tecnología del Vino*, **8**, 37-47.
- Hernández, L. F.; Espinosa, J. C. y Fernández-González, A. B. (2003).  $\beta$ -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, **80**, 171-176.
- Hidalgo, L. y Candela, M. (1972). Caracteristiques bioclimatiques des cepages et des vignobles. *Bulletin de la O.I.V*, **495**, 383-422.
- Hiratsuka, S.; Onodera, H.; Kawai, Y.; Kubo, T.; Itoh, H. y Wada, R. (2001). Enzyme activity changes during anthocyanin synthesis in 'Olympia' grape berries. *Scientia Horticulturae*, **90**, 255-264.
- Ho, P.; Da Conceição, M.; Silva, M. y Hogg, T. A. (2001). Changes in the colour and phenolic composition during the early stages of maturation of port in wood, stainless steel and glass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 1269-1280.
- Hobson, G. E. (1981). Enzymes and texture changes during ripening. En: *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*, Friend, J. y Rhodes, M. J. C. (Eds.), Academic Press, London, pp. 121-130.
- Hong, V. y Wrolstad, R. (1990). Characterization of anthocyanin containing colorants and fruits juices by HPLC-photodiode assay detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **38**, 698-708.
- Hrazdina, G. y Moskowitz, A. (1980). Subcellular status of anthocyanins in grapes skins. En: *Grape and Wine Centennial Symposium*, Webb, D. A. (Ed.), Universidad de California, Davis, CA, pp. 245-253.
- Huang, H. P. (1955). Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **3**, 141-146.

## Bibliografía

Iland, P. (1987). Interpretation of acidity parameters in grapes and wine. *Australian Grapegrower and Winemaker*, **280**, 81-85.

Iland, P.; Gawel, R.; Mccarthy, M. G.; Botting, D. G.; Giddings, J.; Coombe, B. G. y Williams, P. J. (1996). The glycosyl-glucose assay its application to assessing fruit composition. En: *The Ninth Australian wine Industry Technical Conference*, Lee, T. H., Stockley, A. N., Sas, A. N., y Johnston, T. V. (Eds.), ASVO, Adelaida, pp. 98-100.

Izcara, E. y González-San José, M. L. (2001). Análisis de métodos rápidos de extracción para la maduración fenólica de la uva. *Enólogos*, **14**, 14-28.

Jackson, D. I. y Lombard, P. B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality. A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, **44**, 409-430.

Junquera, B. y Diez, C. (1986). Los índices de madurez y su insuficiencia para establecer el momento óptimo de vendimia. *Semana Vitivinicola*, **2**, 104-105.

Kantz, K. y Singleton, V. L. (1991). Isolation and determination of polymeric polyphenols in wines using Sephadex LH-20. *American Journal of Enology and Viticulture*, **42**, 309-316.

Karna, L.; Sacchi, L.; Bisson, F. y Douglas, O. A. (2004). Effect of yeast selection on the phenolic profile of red wines. En: *The ASEV, 55th Annual Meeting*, Rautz, J. (Ed.), ASEV, San Diego, California.

Kennedy, J. A.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E. J. y Jones, G. P. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 5348-5355.

Klenar, I.; Berovic, M. y Wondra, M. (2004). Phenolic compounds from the fermentation of cultivars Cabernet Sauvignon and Merlot from the Slovenian Coastal region. *Food Technology and Biochnology*, **42**, 11-17.

Kliewer, W. M. y Torres, R. E. (1972). Effect of controlled day and night temperatures on grape coloration. *American Journal of Enology and Viticulture*, **23**, 71-77.

Kovac, V.; Alonso, E.; Bourzeix, M. y Revilla, E. (1992). Effects of several enological practices on the content of catechins and procyanidins in red wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **40**, 1953-1957.

Kovac, V.; Alonso, E. y Revilla, E. (1995). The effect of adding supplementary quantities of seeds during fermentation on the phenolic composition of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **46**, 363-367.

Lamadon, F. (1995). Protocole pour l'évaluation de la richesse polyphénolique des raisins. *Revue des Oenologues*, **76**, 37-38.

Lanzarini, G. y Pifferi, P. G. (1989). Enzymes in the fruit juice industry. En: *Biotechnology Applications in Beverage Production*, Cantarelli, C. y Lanzarini, G. (Eds.), Elsevier Science Publishers Ltd, London, pp. 189-222.

Laubères, R. M. (1987). Exocellular polysaccharides from the yeast *Saccharomyces* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **41**, 267-286.

Lázaro, I.; Almela, L.; Javaloy, S. y López Roca, J. M. (1990). Les acides phénoliques dans l'élaboration de vins de cv. Monastrell. *Science des Aliments*, **10**, 89-98.

Lecas, M. y Brillouet, J. M. (1994). Cell wall composition of grape berry skins. *Phytochemistry*, **35**, 1241-1243.

Ledoux, V.; Dulau, L. y Dubourdieu, D. (1992). Interprétation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **26**, 239-251.

Lee, C.; Smith, N. y Nelson, P. (1979). Relationship between pectinmethylesterase activity and the formation of methanol in Concord grapes juice and wine. *Food Chemistry*, **4**, 143-148.

Lempereur, V.; Blayteyron, L.; Labarbe, B.; Saucier, C.; Klebek, H. y Glories, Y. (2002). Groupe National de travail sur les tanins œnologiques. premiers résultats. *Revue Française d'Œnologie*, **196**, 23-29.

Leroy, M. J.; Charpentier, M.; Duteurtre, B.; Feuillat, M. y Charpentier, C. (1990). Yeast autolysis during champagne aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, **41**, 21-28.

## Bibliografía

Leske, P. (1993). Laccase-athreal in 1993. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, **8**, 122-124.

Liu, S. Q. y Pilone, G. J. (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science and Technology*, **35**, 49-61.

Loiseau, G.; Cuinier, C.; Berger, J. L. y Peyron, D. (1994). Fixation des anthocyanes par les levures oenologiques au cours de la vinification en rouge. En: *The 9th Société Française de Microbiologie Symposium.*, Dijon, Francia.

Lubbers, S.; Leger, B.; Charpentier, C. y Feuillat, M. (1993). Essai colloides protecteurs d'extraits de parois de levures sur la stabilité tartrique d'un vin modéde. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **27**, 13-22.

Lubbers, S.; Charpentier, C.; Feuillat, M. y Voilley, A. (1994). Influence of yeast walls on the behavior of aroma compounds in a model wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **45**, 29-33.

Lurton, L.; Laurent, M. y Garnier, C. (2002). Vinification en rouge: des tannins de raisin pour stabiliser la couleur. *Revue des Oenologues*, **104**, 27-28.

Madini, W.; Kermasha, S.; Goetghebeur, M. y Tse, M. (1997). Partial purification and characterization of a polyphenol esterase from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, **32**, 61-69.

Majdak, A.; Herjavec, S.; Orlic', S.; Redzepovic', S. y Mirosevic', N. (2002). Comparison of wine aroma compounds produced by *Saccharomyces paradoxus* y *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Technology and Biotechnology*, **40**, 103-409.

Martino, A.; Pifferi, P. G. y Spagna, G. (1994). The separation of pectinlyase from  $\beta$ -glucosidase in a commercial preparation. *Food Chemistry, Technology and Biotechnology*, **61**, 255-260.

Martínez García, J.; Lopez Martin, R.; Santamaría Aquilue, P.; Barua González, M. y Gutierrez Viguera, A. (2003). Efecto de la aplicación de taninos enológicos durante la maceración en la composición y estabilidad polifenólica de los vinos tintos. *Viticultura y Enología Profesional*, **85**, 53-62.

Mateos, S.; Valls, J.; Nadal, M. y Arola, L. (2001). Estudio de madurez fenólica sobre diferentes variedades tintas y su relación con el color de los vinos. *Tecnología del Vino*, **2**, 45-50.

Mateus, N.; Proença, S.; Ribeiro, P.; Machado, J. M. y De Freitas, V. (2001). Grape and wine polyphenolic composition of red *Vitis vinifera* varieties concerning vineyard altitude. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, **3**, 102-110.

Mateus, N.; Machado, J. M. y De Freitas, V. (2002). Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**, 1689-1695.

Mateus, N.; Silva, A. M. S.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. y De Freitas, V. (2003). A new class of blue antocyanin-derived pigments isolated from red wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 1919-1923.

Mayen, M. (1993). Comportamiento de la fracción de polifenoles durante la vinificación de variedades tintas (*V. vinifera*) Cabernet Sauvignon y Tempranillo y de la variedad blanca Pedro Ximenez cultivadas en el marco de la D. O. Montilla-Moriles. *Tesis doctoral*, Universidad de Córdoba.

Mazza, G.; Fukumoto, L.; Delaquis, P.; Girard, B. y Ewert, B. (2003). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Columbia. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **47**, 4009-4017.

Mccarthy, M. G.; Cirami, R. M. y McCloud, P. (1983). Vine and fruit responses to supplementary irrigation and canopy management. *South African Journal for Enology and Viticulture*, **4**, 67-76.

Mccarthy, M. G. (1984). The effect of irrigation on grape quality. En: *Irrigation, Salinity and Grape Quality*, Loxton (Australia), pp. 35-49.

McCleary, B. V. y Harrington, J. (1988). Purification of  $\beta$ -D-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Methods in Enzymology*, **160**, 575-583.

McDonald, M. S.; Hughes, M.; Burns, J.; Lean, M. E. J.; Mathews, D. y Cruzier, A. (1998). Survey of the free conjugated myricetin and quercetin content of red wine of different geographical origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **46**, 368-375.

## Bibliografía

- Monagas, M.; Bartolomé, B. y Gómez-Cordovés, M. C. (2005). Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle II. Non-anthocyanin phenolic compounds. *European Food Research and Technology*, **220**, 331-340.
- Morata, A.; Gómez-Cordovés, M. C.; Suberviola, L.; Bartolomé, B.; Colomo, B. y Suárez, J. A. (2003a). Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 4084-4088.
- Morata, A.; Gomez-Cordoves, C.; Colomo, B. y Suarez, J. A. (2003b). Pyruvic acid and acetaldehyde by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with Vitisin A and B formation in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7402-7409.
- Morata, A.; Calderón, F.; González, M. C.; Colomo, B. y Suárez, J. A. (2004a). Influencia de las levaduras en el color de los vinos. *X Congreso Nacional de Enólogos*, Valencia.
- Morata, A.; Gómez-Cordoves, M. C.; Colomo, B. y 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*, (En prensa).
- Nagel, C. W. y Wulf, L. W. (1979). Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, **30**, 111-116.
- Neja, R. A.; Wildman, W. E.; Ayers, R. S. y Kasimatis, A. N. (1977). Grapevine response to irrigation and trellis treatments in the Salinas Valley. *American Journal of Enology and Viticulture*, **28**, 16-26.
- Neubeek, C. E. (1975). Fruits, fruit products and wines. En: *Enzymes in Food Processing*, Reed, G. (Ed.), Academic Press, New York, pp. 397-442.
- Oliva, J.; Azorín, P.; Cámara, M. A. y Barba, A. (2001). Incidencia de la adición de distintos taninos enológicos en el color de vinos tintos de Monastrell. *Alimentación, equipos y tecnología*, **156**, 87-92.
- Oszmanski, J.; Romeyer, F.; Sapis, J. y Macheix, J. (1986). Grape seed phenolics: Extarction as affected by some conditions occurring during wine processing. *American Journal of Enology and Viticulture*, **37**, 7-12.

Ough, C. S. y Berg, H. W. (1974). The effect of two commercial pectic enzymes on grape musts and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **25**, 108-211.

Ough, C. S.; Noble, A. y Temple, D. (1975). Pectin enzyme effects on red grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **26**, 195-200.

Ough, C. S. y Crowell, E. A. (1979). Pectic-enzyme treatment of white grapes: temperature, variety and skin-contact time factors. *American Journal of Enology and Viticulture*, **30**, 22-27.

Palacios, A.; Santiago, L. y Guerrand, D. (2003). Utilización de enzimas de maceración en vinificación en tinto. *Wine Internet Technical Journal*.  
<http://www.haro.org/ingles/pdf/cursoharoantonio.pdf>.

Pardo, F. y Navarro, G. (1993). Influencia del tiempo de maceración sobre el contenido de compuestos fenólicos en la vinificación en tinto de uvas monastrell. *Viticultura y Enología Profesional*, **26**, 51-55.

Pardo, F.; Salinas, R.; Alonso, G.; Navarro, G. y Huerta, M. D. (1999). Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. *Food Chemistry*, **67**, 135-142.

Pardo, F. (2001). Incidencia de la adición de distintos taninos enóxicos en el color de vinos tintos de Monastrell. *Alimentación, equipos y tecnología*, **20**, 87-92.

Parley, A. (1997). The Effect of Pre-Fermentation Enzyme Maceration on Extraction and Colour Stability in Pinot noir Wine. *Tesis de Master*, Lincoln University, Nueva Zelanda.

Peynaud, E. (1984). *Knowing and Making Wine*. John Wiley & Sons, New York.

Peynaud, E. (1989). *Enología Práctica*. Mundi Prensa, Madrid,

Pérez-Magariño, S. y González-San José, M. L. (2000). Effect of pectolytic enzymes on the composition of white grape musts and wines. *Italian Journal of Food Science*, **2**, 153-162.

Pérez-Magariño, S. y González-Sanjosé, M. L. (2002). Incidencia del cultivar en la composición fenólica y color de los vinos tintos. *Viticultura y Enología Profesional*, **80**, 5-14.

## Bibliografía

Pérez-Magariño, S. y González-San José, M. L. (2004). Evolution of flavanols, anthocyanins and their derivatives during the aging of red wines, elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52**, 1181-1189.

Piffaut, B.; Kader, F.; Girardin, M. y Metche, M. (1994). Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. *Food Chemistry*, **50**, 115-120.

Pirie, A. y Mullins, G. (1977). Interrelationships of sugars, anthocyanins, total phenols and dry weight in the skin of grape berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, **28**, 207-214.

Plank, P. F. H. y Zent, J. R. (1993). Use of enzymes in wine making and grape processing. En: *Beer and Wine Production Analysis, Characterisation, and Technological Advances*, Gump, B. H. y Pruet, D. J. (Eds.), American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 191-196.

Plata, P.; Millán, C.; Mauricio, J. C. y Ortega, J. M. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*, **20**, 217-224.

Poinsaut, P. y Gerland, C. (1993). Les tannins: synergies entre tannins des raisins et tannins oenologiques. *Revue des Oenologues*, **93**, 11-12.

Poinsaut, P. (2000). Les tannis oenologiques-propriétés et applications pratiques. *Reveu des Oenologues*, **95**, 33-35.

Pueyo, E.; Hidalgo, P.; Fernández, K. y Martín-Álvarez, P. (1999). Análisis de compuestos volátiles en vinos obtenidos con distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Aplicación de la técnica de microextracción en fase sólida (SPME). En: *V Jornadas Científicas Grupos de Investigación Enológica*, Zaragoza.

Razmkhab, S.; Lopez-Toledano, A.; Ortega, J. M.; Mayen, M.; Merida, J. y Medina, M. (2002). Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 7432-7437.

Regodón, J. A.; Pérez Nevado, F. y Ramírez Fernández, M. (1999). Influencia de la inoculación con levaduras autóctonas seleccionadas en la elaboración de vinos. *Alimentaria*, **307**, 69-75.

Revilla García, E.; Martín Ortega, G. y Ryan Murúa, J. M. (1998). Problemática del análisis de antocianinas en uvas tintas frente a la diferenciación varietal. *Viticultura y Enología Profesional*, **58**, 50-62.

Revilla, I. y González-San José, M. L. (1998). Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. *Food Chemistry*, **63**, 307-312.

Revilla, I.; Perez-Magariño, S.; Gonzalez- San Jose, M. L. y Beltran, S. (1999). Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, **847**, 83-90.

Revilla, I. y González-San José, M. L. (2001). Evolution during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: new anthocyanin pigment formation. *Journal of wine research*, **12**, 183-197.

Revilla, I. y González- San José, M. L. (2002a). Efecto de la aplicación de enzimas pectinolíticas sobre la calidad del vino tinto. *Tecnología del Vino*, **6**, 71-78.

Revilla, I. y González-San José, M. L. (2002b). Multivariate Evaluation of Changes Induced in Red Wine Characteristics by the Use of Extracting Agents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 4525-4530.

Revilla, I. y González-San José, M. L. (2003a). Compositional changes during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivate levels. *Food Chemistry*, **80**, 205-214.

Revilla, I. y González-San José, M. L. (2003b). Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *International Journal of Food Science and Technology*, **38**, 29-36.

Reyero, J. R.; Garijo, J.; Pardo, F. y Salinas, M. R. (1999). Influencia del riego excesivo en la producción y en el contenido polifenólico de diferentes variedades viníferas. *Enólogos*, **3**, 17-21.

Ribéreau-Gayon, P. y Glories, Y. (1980). Structure of condensed phenolic compounds in Vinifera grapes and wine. Influence of ripening and infection by *Botrytis cinerea* on phenolic content. En: *The Grape and Wine Centennial Symposium*, Rautz, J. (Ed.), ASEV, Universidad de California, Davis, pp. 228-233.

## Bibliografía

Ribéreau-Gayon, P. y Glories, Y. (1987). Phenolics in grapes and wines. En: *The Sixth Australian Wine Industry Technical Conference*, Lee, T. H. (Ed.), Australian Industrial Publishers, Adelaide, pp. 247-256.

Ribéreau Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A. y Dubourdieu, D. (1998a). *Traité d'Oenologie.2. Chimie du vin. Stabilisation et traitements*. Dunod, Paris.

Ribéreau Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B. y Lonvaud, A. (1998b). *Traité d' Oenologie 1. Microbiologie du vin. Vinifications*. Dunod, Paris.

Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T. y Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polyssacharides. *Food Hydrocolloids*, **16**, 17-23.

Roby, G. y Matthews, M. (2004). Relative proportions of seed, skin and flesh in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **10**, 74-82.

Rojas-Lara, B. A. y Morrison, J. C. (1989). Differential effects of shading fruit or foliage on the development and composition of grape berries. *Vitis*, **28**, 199-208.

Romero Cascales, I. (2002). Determinación del potencial polifenólico de las variedades Tempranillo, Cabernet Sauvignon, Merlot y Syrah en la D.O. Jumilla durante la campaña 2000. Relación con la calidad del vino. *Proyecto fin de carrera*, Universidad Miguel Hernández (Orihuela).

Rosi, I.; Gheri, A. y Ferrari, S. (1998). Effects des levures produisant des polysaccharides pariétaux sur certaines caractéristiques des vins rouges pendant la fermentation. *Revue Française d' Œnologie*, **172**, 24-26.

Rosi, I.; Gheri, A.; Domizio, P. y Fia, G. (1999). Production of parietal macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* and their influence on malolactic fermentation. En: *Lallemand Technical Meeting*, I, Montreal.

Rosillo, L.; Alonso, G. L.; Garijo, J. y Salinas, M. R. (1998). Diferenciación de variedades de uva tinta (*Vitis vinífera* L.) según su composición antocianica. *Viticultura y Enología Profesional*, **56**, 42-47.

- Rosillo, L.; Revero, J. R.; Alonso, G. L. y Salinas, M. R. (2003). Influencia del sistema de poda y de la carga en la composición fenólica de cuatro variedades de uva tinta (*Vitis vinifera* L.). *Viticultura y Enología Profesional*, **85**, 33-44.
- Roson, J. P. y Moutounet, M. (1992). Quantités d'anthocyanes et des tanins des raisins de quelques cépages du Sud-Ouests en 1988 et 1989. *Revue Francaise d'Oenologie*, **135**, 17-24.
- Roubelakis-angelakis, K. y Kliewer, W. (1986). Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grapes berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, **37**, 275.
- Rounsavill, R.; Martin, C. y Ebeler, S. E. (1996). Flavor interactions in model systems. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47**, 352.
- Ruiz, M. (1990). Compuestos fenolicos de la uva y fermentacion. Sintesis. *Semana Vitivinicola*, **2303**, 4303-4307.
- Saint-Cricq, N.; Vivas, N. y Glories, Y. (1998). Maturité phénolique: définition et contrôle. *Revue Francaise d' OEnologie*, **173**, 22-25.
- Saint-Cricq, N.; Vivas, N. y Glories, Y. (1999). Maduración fenólica de las uvas tintas. Relación con la calidad de los vinos. Comparación entre los viñedos Merlot y Tempranillo. *La Semana Vitivinícola*, **2748**, 1126-1136.
- Sarni, P.; Fulcrand, H.; Souillol, V.; Souquet, J. M. y Cheynier, V. (1995). Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must like model solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **69**, 385-391.
- Sarni Manchado, P.; Deleris, A.; Avallone, S.; Cheynier, V. y Moutounet, M. (1999). Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by protein used as fining agent in enology. *American Journal of Enology and Viticulture*, **50**, 81-86.
- Saucier, C.; Roux, D. y Glories, Y. (1998). The non-specificity of tanin complexation. En: *The 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, Lin, S.-K. y Pombo-Villar, E. (Eds.), MDPI, Switzerland.

## Bibliografía

Scudamore-Smith, P.; Hooper, R. y McLaren, E. (1990). Color and phenolics changes of Cabernet Sauvignon wine made by simultaneous yeast/bacterial fermentation and extended pomace contact. *American Journal of Enology and Viticulture*, **41**, 57-67.

Siegrist, J. y Leglise, M. (1982). Influence de la proportion phase solide / phase liquide de la vendange sur la composition des vin rouges. *Comptes Rendus des Seances des l'Academie d'Agriculture de France*, **67**, 300-310.

Sims, C. y Bates, R. P. (1994). Effects of skin fermentation time on the phenols, ellagic acid sediment and sensory characteristics of a red *Vitis rotundifolia* wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **45**, 56-62.

Sims, C. y Morris, J. (1986). Effects of acetaldehyde and tannins on the color and chemical age of red muscadine (*Vitis rotundifolia*) wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **37**, 163-165.

Singleton, V. L. y Draper, D. E. (1964). The transfer of polyphenolic compounds from grape seed into wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **45**, 34-40.

Singleton, V. L. (1966). The total phenol content of grape berries during the maturation of several varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, **17**, 126-134.

Singleton, V. L. (1972). Effects on red wine quality of removing juice before fermentation to simulate variation in berry size. *American Journal of Enology and Viticulture*, **23**, 106-113.

Singleton, V. L. y Trouslade, E. (1983). White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*, **34**, 27-34.

Singleton, V. L. y Trouslade, E. K. (1992). Anthocyanin-Tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **43**, 63-70.

Sipiora, M. y Gutierrez Granda, M. J. (1998). Effects of pre-veraison irrigation cutoff and skin contact time on the composition, color, and phenolic content of young Cabernet Sauvignon wines in Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, **49**, 152-162.

- Smart, R. E. (1982). The effect of Concord vineyard microclimate on yield. 1. The effect of pruning, training and shoot positioning on radiation microclimate. *American Journal of Enology and Viticulture*, **33**, 99-108.
- Smart, R. E.; Robinson, J. B.; Due, G. R. y Brien, C. J. (1985). Canopy microclimate modification for the cultivar *Shiraz*. I. Definition of canopy microclimate. *Vitis*, **24**, 17-31.
- Smart, R. E.; Dick, J. K.; Gravett, I. y Fischer, B. M. (1990). Canopy management to improve grape yield and wine quality. Principles and practices. *South African Journal for Enology and Viticulture* , **11**, 3-17.
- Somers, T. C. (1975). In search of quality red wines. *Food Technology in Australia*, **27**, 49-56.
- Somers, T. C.; Verette, E. y Pocock, K. F. (1987). Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **40**, 67-78.
- Souquet, J.; Cheynier, V.; Broussaud, F. y Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, **43**, 509-512.
- Spay, S. E.; Tarara, J. M.; Mee, D. L. y Ferguson, J. C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, **53**, 171-182.
- Spranger, M. I.; Clímaco, M. C.; Sun, B.; Eiriz, N.; Fortunato, C.; Nunes, A.; Conceição, L.; Alvelar, M. L. y Belchior, A. P. (2004). Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Analytica Chimica Acta*, **513**, 151-161.
- Sun, B.S.; Leandro, C.; Ricardo da Silva, J. M. y Spranger, I. (1998a). Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **46**, 1390-1396.
- Sun, B.S.; Ricardo da Silva, J. M. y Spranger, I. (1998b). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **46**, 4267-4274.
- Thorngate, J. H.; Noble, A. y Singleton, V. L. (1992). The bound-anthocyanin fraction in Pinot noir. *American Journal of Enology and Viticulture*, **43**, 305.

## Bibliografía

Thorngate, J. H. y Singleton, V. L. (1994). Localization of procyanidins in grape seeds. *American Journal of Enology and Viticulture*, **45**, 259-262.

Valdés Sánchez, M. E. y Regodón Mateos, J. A. (1994). Elaboración de tintos en presencia de enzimas pectolíticos: Evolución de compuestos polifenólicos. Incidencia de atributos cromáticos. *Alimentaria*, **Junio**, 63-68.

Valerio, I. y Gutiérrez, A. (2002). El deshoje en la variedad *Listan Negro*. *Viticultura y Enología Profesional*, **81**, 17-22.

Van Leeuwen, C. y Seguin, G. (1994). Incidences de l'alimentation en eau de la vigne, appréciée par l'état hydrique du feuillage, sur le développement de l'appareil végétatif et la maturation du raisin (*Vitis vinifera* variété Cabernet franc, Saint-Emilion 1990). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **28**, 81-110.

Vasserot, Y.; Caillet, S. y Maujean, A. (1997). Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters. *American Journal of Enology and Viticulture*, **48**, 433-437.

Vidal, S.; Cartalade, D.; Souquet, J. M.; Fulcrand, H. y Cheynier, V. (2002a). Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 2261-2266.

Vivar-Quintana, A. M.; Santos-Buelga, C. y Rivas-Gonzalo, C. (2002). Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta*, **458**, 147-155.

Vivas de Gaulejac, N.; Vivas, N.; Guerra, C. y Nonier, M. (2001). Anthocyanin in grape skins during the maturation of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon and Merlot Noir from different Bordeaux terroirs. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **35**, 149-156.

Vivas, N. (1997). Composition et propriétés des préparations commerciales de tanins à usage œnologique. *Revue des Oenologues*, **23**, 15-21.

Vivas, N. (2001). Les tannins œnologiques: d'hier à aujourd'hui: une révolution discrète que nous devons assimiler dans les pratiques de chais. *Revue des Oenologues*, **98**, 11-16.

Vivas, N.; Nonier, M. F. y Vivas de Gaulejac, N. (2003). Incidence de préparations commerciales de tannins sur les caractéristiques chromatiques des vins rouges. *Progres agricole et viticole*, **120**, 431-435.

Voragen, A. G. L. y van den Broek, L. A. M. (1991). Fruit juices. En: *Biotechnological Innovations in Food Processing*, Green, J. (Ed.), Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, pp. 187-210.

Vrhovsek, U.; Vanzo, A. y Nemanic, J. (2002). Effect of red wine maceration techniques on oligomeric and polymeric proanthocyanidins in wine cv Blaufrankisch. *Vitis*, **41**, 47-51.

Waters, E.; Wallace, W.; Tate, M. E. y Williams, P. J. (1993). Isolation and partial characterization of a haze protective factor from wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **41**, 724-730.

Waters, E.; Pellerin, P. y Brillouet, J. M. (1994). A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydrate Polymers*, **23**, 185-191.

Watson, B. T.; Gerbaux, V.; Price, S. I.; Frey, S.; Bell, P. y Kaiser, K. (1996). Fermentation practices in Pinot Noir. Effects on color, phenols and wine quality. En: *The 4<sup>th</sup> International Symposium on cool climate Viticulture and Enology*, ASEV, Rochester, Nueva York.

Watson, B.; Goldberg, N.; Chen, H.; McDaniel, M. y Price, S. (1999). Effects of macerating pectinase enzymes on color, phenolic profile and sensory characteristics of Pinot Noir wines. En: *2nd Joint Burgundy-California-Oregon Winemaking Symposium*, Waterhouse, A. L. (Ed.), Davis, pp. 36-44.

Watson, B. (2003). Evaluation of winegrape maturity. En: *Oregon Viticulture*, Hellman, E. (Ed.), Oregon State University Press, Corvallis, pp. 235-245.

Wightman, J. D. y Wrolstad, R. E. (1995). Anthocyanin analysis as a measure of glycosidase activity in enzymes for juice processing. *Journal of Food Science*, **60**, 862-867.

Wightman, J. y Wrolstad, R. (1996).  $\beta$ -Glucosidase activity in juice-processing enzymes based on anthocyanin analysis. *Journal of Food Science*, **61**, 544-547,552.

## Bibliografía

Wightman, J.; Price, S.; Watson, B. y Wrolstad, R. (1997). Some effects of processing enzymes on anthocyanins and phenolics in Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **48**, 39-48.

Yakushiji, H.; Sakurai, N. y Morinaga, K. (2001). Changes in cell wall polysaccharides from the mesocarp of grape berries during veraison. *Physiologia Plantarum*, **111**, 188-195.

Yokotsuka, K.; Sato, M.; Ueno, N. y Singleton, V. (2000). Colour and sensory characteristics of Merlot red wines caused by prolonged pomace contact. *Journal of wine research*, **11**, 7-18.

Yuste, J.; Robredo, L. M.; Pelaez, H. y Rubio, J. A. (2000). Evolución de la composición de la uva durante el período de formación de dos sistemas de conducción sobre diferente densidad de plantación (II). *Viticultura y Enología Profesional*, **67**, 18-28.

Zafrilla, P.; Morillas, J.; Mulero, J.; Cayuela, J. M.; Martínez-Cacha, A.; Pardo, F. y López Nicolás, J. M. (2003). Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 4694-4700.

Zamora, F. (2002). La madurez fenólica, un tema abierto. *Enologos*, **18**, 24-28.

Zamora, F. (2003a). Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. AMV, Madrid.

Zamora, F. (2003b). El tanino enológico en la vinificación en tinto. *Enologos*, **25**, 26-30.

Zent, J. B. y Inama, S. (1992). Influence of macerating enzymes on the quality and composition of red wines obtained from red Valpolicella wine grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **43**, 311.

Zhore, D. E. y Erten, H. (2002). La influencia de *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrina* yeast on wine fermentation. *Process Biochemistry*, **38**, 319-324.

Zoecklein, B. (1991). An overview of maceration during red winemaking. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, **6**, 265-267.