



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Posibilidades Tecnológicas de las
Paredes Celulares de los Orujos de
Uva como Agentes Afinantes
durante la Vinificación

Dña. María Dolores Jiménez Martínez
2018

Universidad de Murcia
Escuela Internacional
de Doctorado



POSIBILIDADES
TECNOLÓGICAS DE
LAS PAREDES
CELULARES DE LOS
ORUJOS DE UVA
COMO AGENTES
AFINANTES
DURANTE LA
VINIFICACIÓN

María Dolores Jiménez Martínez

2018



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^ª ENCARNA GÓMEZ PLAZA, Catedrática de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Murcia, y D^ª ANA BELÉN BAUTISTA ORTÍN, Profesora Contratada Doctor, AUTORIZAN

La defensa de esta Tesis Doctoral, titulada: “POSIBILIDADES TECNOLÓGICAS DE LAS PAREDES CELULARES DE LOS ORUJOS DE UVA COMO AGENTES AFINANTES DURANTE LA VINIFICACIÓN”, presentada por MARÍA DOLORES JIMÉNEZ MARTÍNEZ. Todo el trabajo ha sido realizado bajo nuestra supervisión y cumple todos los requerimientos para obtener el título de Doctor.

Murcia, 10 de Diciembre de 2017

Encarna Gómez Plaza

Ana Belén Bautista Ortín

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, expresar mi agradecimiento a mis directoras de Tesis, a la doctora Ana Belén Bautista Ortín y a la catedrática Encarna Gómez Plaza, ambas profesoras del departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, por su dedicación, orientación y por ayudarme a conseguir este reto, la realización de la Tesis Doctoral. También darles las gracias por darme la oportunidad de crecer como persona, en un marco laboral-investigador, y por sus múltiples consejos para seguir adelante.

A la Dra. Rocío Gil Muñoz y a todo el equipo de la Estación Enológica de Jumilla, por su apoyo, generosidad y acogida, de corazón.

Agradecer el cariño de mis amigas y compañeros de la universidad: a Leticia e Irene, por nuestras comidas, viajes y momentos juntas, a Andrea y Pili, y como no Loli, quien se convirtió en una amiga para siempre a las pocas semanas de conocernos, también a los técnicos de laboratorio, Carmen y Antonio, gracias a todos por darme ánimos para seguir adelante. También dar las gracias a Carmen Cárceles por ser la persona que primero me abrió las puertas a este mundo, y a los doctores Sancho y José María Ros, profesores del departamento, por sus charlas y consejos en nuestra hora del café.

A mi familia, a mis amigos y a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de esta Tesis.

Por último, dar las gracias a mis padres, Carmen y Miguel, por darme la oportunidad de convertirme en doctora, por aguantarme, por amor incondicional, por darme ánimos, y por darme ese apoyo y fuerza que siempre me transmiten haciéndome ver que soy capaz de hacer lo que me proponga, y sin ellos no hubiera llegado a muchos de los sitios donde estoy hoy.

Quiero dedicar este trabajo:

A mis padres

"Todo es posible en la medida que tú creas que es posible"
Arturo Orantes



ÍNDICE

ÍNDICE

1. ANTEDECENTES Y OBJETIVOS.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1 El afinamiento de los vinos.....	7
2.1.1 <i>La clarificación de los vinos.....</i>	7
2.1.2 <i>Floculación y estabilidad coloidal</i>	9
2.1.3 <i>Reducción de la astringencia.....</i>	11
2.1.4 <i>Reducción de sustancias perjudiciales.....</i>	13
2.2 Agentes afinantes más usados.....	17
2.2.1 <i>Bentonita.....</i>	17
2.2.2 <i>Proteínas de origen animal.....</i>	18
2.2.3 <i>Proteínas vegetales</i>	19
2.2.4 <i>Manoproteínas.....</i>	20
2.2.5 <i>PVPP.....</i>	22
2.2.6 <i>Productos derivados de la uva.....</i>	23
2.3 Las paredes celulares.....	24
2.3.1 <i>Estructura del grano de uva y las paredes celulares del hollejo y pulpa.....</i>	24
2.3.2 <i>Composición de la pared celular.....</i>	26
2.3.2.1 <i>Polisacáridos de la pared celular.....</i>	27
2.3.2.2 <i>Proteínas</i>	31
2.3.2.3 <i>Compuestos fenólicos</i>	32
2.3.2.4 <i>Lignina.....</i>	32
2.3.3 <i>Interacciones de las paredes celulares con otros componentes del vino.....</i>	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1 Material	39
3.1.1 <i>Orujo de uva</i>	39
3.1.2 <i>Vinos a ensayar.....</i>	40
3.1.3 <i>Productos de afinado comerciales.....</i>	40
3.2 Diseño experimental	42
3.3 Determinación de los parámetros cromáticos del vino	43
3.4 Determinaciones en vino por cromatografía líquida en fase reversa.....	44
3.4.1 <i>Análisis de taninos por fluoroglucinolisis.....</i>	44
3.4.2 <i>Análisis de antocianos.....</i>	45
3.4.3 <i>Análisis de aminas biógenas</i>	46

3.4.4	<i>Análisis de ocratoxina A</i>	46
3.5	Determinaciones en vino por cromatografía líquida de exclusión por tamaño	47
3.5.1	<i>Análisis de taninos</i>	47
3.5.2	<i>Análisis de polisacáridos</i>	47
3.6	Determinación de compuestos volátiles en vino por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas	48
3.7	Determinación de minerales por espectroscopía de plasma ICP – OES	49
3.8	Análisis de los componentes de las paredes celulares	49
3.8.1	<i>Determinación de proteínas</i>	50
3.8.2	<i>Determinación de compuestos fenólicos</i>	50
3.8.3	<i>Determinación de azúcares neutros</i>	50
3.8.3.1	<i>Azúcares libres totales</i>	51
3.8.3.2	<i>Azúcares no celulósicos</i>	51
3.8.4	<i>Determinación de ácidos urónicos</i>	51
3.8.5	<i>Determinación de lignina</i>	52
3.9	Determinación de la turbidez de los vinos	52
3.10	Análisis del volumen de heces	53
3.11	Análisis sensorial	53
3.12	Análisis estadístico	53
4.	RESULTADOS	55
4.1	Afinar vinos tintos con paredes celulares de orujos: Efecto en la composición fenólica del vino. Primeros ensayos	57
4.1.1	<i>Introducción</i>	57
4.1.2	<i>Breve descripción de la experiencia</i>	58
4.1.3	<i>Resultados y discusión</i>	59
4.1.3.1	<i>Evolución del contenido y composición de los antocianos con el uso de los diferentes agentes afinantes</i>	60
4.1.3.2	<i>Evolución del contenido y composición de los taninos con el uso de los diferentes agentes afinantes</i>	62
4.1.3.3	<i>Evolución del perfil de distribución de masa molecular de los taninos en el vino después del uso de los diferentes agentes afinantes</i>	66
4.1.4	<i>Conclusiones</i>	70
4.2	Efecto de los orujos sobre la composición fenólica en vinos de diferentes variedades	71
4.2.1	<i>Introducción</i>	71
4.2.2	<i>Descripción de la experiencia</i>	71
4.2.3	<i>Resultados y discusión</i>	72

4.2.3.1	Efecto de los distintos agentes afinantes sobre vinos jóvenes de diferentes variedades.....	72
4.2.3.2	Efecto de los distintos agentes afinantes sobre un vino envejecido en barrica.....	90
4.2.4	<i>Conclusiones</i>	95
4.3	Estudio del impacto de los orujos purificados en el perfil mineral y aromático del vino tinto, como de su capacidad de retención de ocratoxina A y aminos biógenas	97
4.3.1	<i>Introducción</i>	97
4.3.1.1	Efecto sobre la fracción aromática	97
4.3.1.2	Reducción de sustancias indeseables en el vino	98
4.3.2	<i>Diseño experimental</i>	99
4.3.3	<i>Resultados y discusión</i>	100
4.3.3.1	Efecto de los agentes afinantes y los orujos sobre la composición aromática del vino	100
4.3.3.2	Reducción de OTA por los agentes afinantes y los orujos purificados.....	106
4.3.3.3	Reducción de AB por los agentes afinantes y los orujos purificados.....	109
4.3.3.4	Reducción de minerales por los agentes afinantes y los orujos purificados.....	112
4.3.4	<i>Conclusiones</i>	115
4.4	Efecto de las dosis y el tiempo de contacto de los orujos purificados en la composición fenólica final del vino.....	117
4.4.1	<i>Introducción</i>	117
4.4.2	<i>Descripción de la experiencia</i>	119
4.4.3	<i>Resultados y discusión</i>	119
4.4.3.1	Efecto de la dosis y tiempo de contacto de los orujos sobre las características cromáticas del vino	119
4.4.3.2	Efecto de los orujos sobre la concentración y composición de los antocianos y taninos determinados por HPLC	120
4.4.3.3	Efectos de los orujos en la distribución de la masa molecular de los taninos	123
4.4.3.4	Capacidad de los orujos de ceder polisacáridos al vino	124
4.4.4	<i>Conclusiones</i>	127
4.5	Comparación de la afinidad y selectividad de orujos de distintas variedades	129
4.5.1	<i>Introducción</i>	129

4.5.2	<i>Breve descripción de la experiencia</i>	129
4.5.3	<i>Resultados y discusión</i>	130
4.5.3.1	Comparación de las paredes celulares de orujos de las distintas variedades.....	130
4.5.3.2	Efecto de los orujos de distintas variedades sobre la producción de lías.....	132
4.5.3.3	Efecto de los orujos de las distintas variedades sobre los parámetros espectrofotométricos.....	133
4.5.3.4	Efecto de los orujos de las diferentes variedades sobre la concentración y composición de antocianos y taninos.....	134
4.5.3.5	Capacidad de los orujos de las diferentes variedades sobre la retención de taninos de diferente peso molecular.....	137
4.5.3.6	Capacidad de las paredes celulares de orujos para liberar polisacáridos al medio.....	139
4.5.3.7	Análisis sensorial.....	142
4.5.4	<i>Conclusiones</i>	143
4.6	Efecto del afinamiento con orujos purificados de Monastrell y Macabeo en vino rosado	145
4.6.1	<i>Introducción</i>	145
4.6.2	<i>Descripción de la experiencia</i>	147
4.6.3	<i>Resultados y discusión</i>	148
4.6.3.1	Efecto de los orujos sobre los parámetros espectrofotométricos del vino.....	148
4.6.3.2	Capacidad de las paredes celulares de los orujos de ceder polisacáridos al vino.....	151
4.6.3.3	Efectos de los orujos sobre la composición aromática del vino.....	154
4.6.4	<i>Conclusiones</i>	160
5.	CONCLUSIONES	161
6.	BIBLIOGRAFÍA	167



1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El afinado de los vinos es una técnica que se utiliza en Enología para eliminar componentes del vino no deseados y que afectan negativamente a su calidad. Las técnicas de afinado, llamadas comúnmente técnicas de clarificación, conllevan normalmente la adición al vino de un material reactivo o adsorptivo que elimine o reduzca la presencia de los componentes responsables de propiedades indeseables de los vinos. En general, no se consideran aditivos sino coadyuvantes de la fabricación ya que están diseñados para ser eliminados del vino tratado como parte del proceso de afinado.

La variedad de agentes afinantes usados es muy amplia, desde sustancias minerales como la bentonita, proteínas como las gelatinas, caseínas y albúmina e incluso manoproteínas derivadas de los polisacáridos de las levaduras, hasta polímeros sintéticos como la polivinilpirrolidona (PVPP).

El uso de alguno de estos productos en los vinos ha sido objeto de preocupación en los últimos años. Por ejemplo, el uso de gelatinas de origen vacuno despertó inquietud a partir de que se conoció el llamado "mal de las vacas locas"; ya que las condiciones bajo las que obtienen las gelatinas no afectaban negativamente a los agentes que causan la encefalopatía bovina esponjiforme. Aunque el origen de las gelatinas se ha trasladado al ganado porcino, todavía se prefiere que se sustituya en los vinos el uso de gelatinas animales por proteínas de origen vegetal, con propiedades y protocolos de aplicación similar a las gelatinas animales. Por ello, se han propuesto varias proteínas de origen vegetal para su uso en vinos, incluyendo proteínas derivadas de cereales, legumbres y patatas, y la regulación europea UE 2165, del 2005, autorizó el uso de estas proteínas vegetales.

Otra preocupación aparece cuando algunas de las proteínas que se usan están implicadas en alergias alimentarias, como ocurre con el caseinato (leche), ovoalbúmina (huevo) o proteínas de algunos cereales que contengan gluten. En el Anexo III de la Directiva europea 2007/68/EC de 27 de Noviembre de 2007 aparece una lista de sustancias potencialmente alérgicas, incluyendo huevos, leche, productos derivados de estos, cereales con gluten y otros productos, que según esta directiva deben ser mencionados en la etiqueta del producto, para informar a individuos susceptibles. Esta norma de etiquetado en las bebidas alcohólicas supondría un serio problema a los productores de vino. A día de hoy, estos productos están exentos de indicar en el etiquetado el uso caseína y ovoalbúmina si su presencia no es detectable en cantidades de 0,25 y 0,5 mg/L de caseína y albúmina, respectivamente. De todas formas, hay estudios contradictorios en cuanto a si quedan o no residuos.

Una opción que no ha sido explorada y podría tener una aplicación enológica importante implica el uso de paredes celulares de origen vegetal, ya que su uso, debido a su composición, es muy similar al uso de polisacáridos de cortezas de levaduras. El planteamiento del uso de los orujos obtenidos después de la etapa de maceración como

fuentes de material de pared celular es una buena opción. Esto, además podría suponer una valorización de un subproducto de las bodegas.

Por ello, el objetivo global de este trabajo de investigación es determinar si las paredes celulares de los orujos de uva, más o menos purificadas, pueden servir como un nuevo material para el afinado de vinos rosados y tintos, con el fin de reducir carga fenólica, y sustancias que afecten a la seguridad del vino (aminas biógenas, ocratoxina A y metales pesados).

Para ello se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Determinar el nivel de purificación necesario de las paredes celulares de los orujos para que estos sean efectivos como material de afinado.
- Estudiar el comportamiento de este material en la reducción de compuestos fenólicos en vinos rosados y tintos, actuando, así como sustituto de las proteínas normalmente utilizadas que pueden incrementar la estabilidad proteica de los vinos.
- Determinar la utilidad de este material en la reducción de taninos y astringencia de vinos tintos.
- Estudiar las propiedades de este material en la reducción de aminas biógenas y ocratoxina A en vinos, sustancias que de estar presentes comprometen la seguridad sanitaria de los vinos.
- Determinar si el uso de este material afecta a las características aromáticas de estos vinos, y en el caso de que existan cambios debidos a su uso, si estos son positivos o negativos.



2. INTRODUCCIÓN

2.1 El afinamiento de los vinos

El afinado de los vinos es una técnica que se utiliza en Enología para eliminar componentes del vino no deseados y que afectan negativamente a su calidad. Dentro de estas técnicas a veces también se incluyen la adición de compuestos que ayudan a asegurar que el vino permanece estable en el tiempo (estabilidad colorante, estabilidad proteica...). La técnica se aplica tanto a vinos tintos como blancos y rosados.

Las técnicas de afinado (comúnmente llamadas también técnicas de clarificación, aunque este término es menos adecuado, ya que no todas las técnicas están relacionadas con la "claridad" del vino) conllevan la adición al vino de un material reactivo o adsorptivo que elimine o reduzca la presencia de los componentes responsables de propiedades indeseables de los vinos. En general, no se consideran aditivos sino coadyuvantes de la fabricación ya que están diseñados para ser eliminados del vino tratado como parte del proceso de afinado. El agente de afinado reaccionará con los componentes del vino, física o químicamente para formar un nuevo complejo que se podrá separar del vino.

La efectividad de un agente utilizado con una finalidad determinada dependerá del propio agente, del método de preparación, dosis de adición, características del vino, etc. Los agentes de afinado se ligarán a las sustancias del vino siguiendo estos mecanismos:

- Interacción eléctrica: el agente de afinado y la sustancia que queremos eliminar poseen cargas opuestas e interaccionan formando grandes partículas que precipitan en el vino.
- Reacción química: se forma un enlace químico entre la sustancia a eliminar y el agente de afinado.
- Absorción y adsorción: la sustancia a eliminar queda englobada dentro de la estructura del agente de afinado o se liga a su superficie.

2.1.1 La clarificación de los vinos

La claridad es uno de los requisitos de calidad más destacados de un vino, es un aspecto importante de un primer contacto del consumidor con el vino y un elemento clave en la satisfacción visual. Partículas en suspensión, tanto formando nubes como dispersas

en el líquido, no solo puede dañar la presentación del vino, sino también su sabor (Van Sluyter et al., 2015).

La turbidez en un líquido resulta de un fenómeno óptico conocido como efecto Tyndall, causado por partículas en suspensión que desvían el camino normal de la luz, y su medida puede estimar la claridad de un vino, en función del número y tamaño de partículas.

El vino no solo debe estar claro en el momento de embotellado, sino que también esta claridad se ha de mantener en el tiempo y en el periodo de almacenamiento, a cualquier temperatura.

Tradicionalmente, la clarificación de un vino era lograda con el envejecimiento en bodega, donde ocurrían las transformaciones que estabilizaban el vino y precipitaciones espontáneas, eliminándose cualquier depósito antes de embotellar (Candi, 2006). El vino era normalmente embotellado en el área donde se iba a consumir. Desde hace unos años hasta ahora, gracias al progreso de la enología, los vinicultores pueden disminuir al mínimo el riesgo de turbidez e implementar medidas preventivas apropiadas antes del embotellado. Esto ha hecho posible la distribución del vino embotellado a otros destinos, garantizando calidad y autenticidad tanto a los productores como a los consumidores. Hoy en día, el único depósito "aceptado" es la materia colorante en vino de crianza, donde los sedimentos, en pequeñas cantidades no deberían aparecer hasta pasados los cuatro o cinco años.

Los trabajos en bodega intentan obtener una claridad total por unos métodos adecuados, y, además, lograr estabilidad, lo que significa que los tratamientos empleados deben ser eficientes. Por ejemplo, la filtración clarifica, pero no estabiliza, el afinamiento hace ambas, por eso este último es una buena práctica enológica.

La clarificación consiste en añadir una sustancia que induce la floculación y la estabilización en vinos turbios o con inestabilidad coloidal. El agente afinante captura las partículas responsables de la turbidez o la inestabilidad del vino, clarificando y estabilizándolo. Los agentes afinantes son con frecuencia mezcla de proteínas desnaturalizadas que precipitan en contacto con los taninos, cationes o en medio ácido, aunque también pueden tener un origen mineral o incluso ser levaduras liofilizadas. El uso de estos afinantes puede tener un impacto positivo o negativo en las características organolépticas de un vino, siempre dependiendo de la cantidad y el tipo de agente que se haya empleado, pudiendo así obtener vinos más suaves y más elegantes o por el contrario, más rudos y menos atractivos.

2.1.2 Floculación y estabilidad coloidal

La inestabilidad que presenta la aglomeración de partículas en una disolución coloidal es la responsable de los depósitos y enturbiamientos en el vino, este fenómeno se conoce como floculación.

Las partículas coloidales están sometidas a la energía térmica (movimiento browniano), pudiéndose considerar por un lado un factor positivo que aporta estabilidad, ya que impide el acercamiento entre las partículas y por tanto, su sedimentación, o negativo, si propiciase ese acercamiento entre partículas que se atraen naturalmente. A parte de esta energía térmica, las partículas están sometidas a otras fuerzas, atractivas y repulsivas, siendo determinante, para alcanzar la estabilidad, que la energía resultante de estas últimas sea superior a la del movimiento browniano.

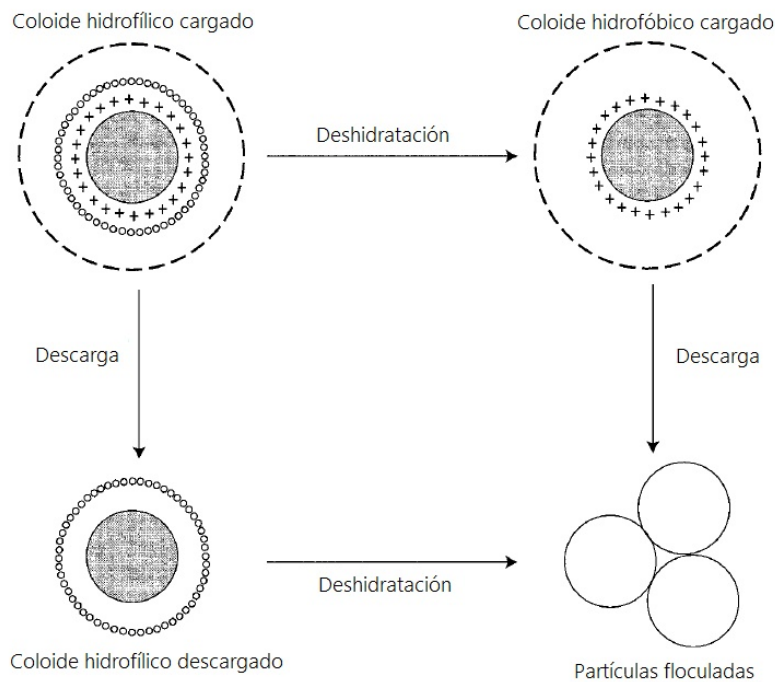
Las interacciones de Van der Waals son las primeras fuerzas a tener en cuenta, estas son proporcionales a su diámetro e inversamente proporcionales a la distancia que las separa, por tanto, a mayor distancia, estas desaparecen y no pueden equilibrar las fuerzas debidas a la agitación térmica, por otro lado, si la distancia es muy pequeña las fuerzas de Van der Waals facilitarán la formación de agregados que precipitarán por el acercamiento de las partículas coloidales. El logro de la estabilidad en el vino ha de ser por otras fuerzas repulsivas que se opongan a esas fuerzas atractivas. Estas fuerzas repulsivas son principalmente interacciones electrostáticas debidas a las cargas situadas en la superficie de las partículas que forman una doble capa con iones de signo opuesto (Saucier, 1993).

El resultado de las interacciones nombradas en el párrafo anterior dará lugar a una aglomeración y floculación del coloide, si se produce atracción, y suspensión de las partículas coloidales si se da repulsión entre ellas. Cuando las partículas están separadas 5 nm, es indicativo de que la concentración de estas es baja en el medio, y por tanto, dominarán las fuerzas de repulsión y la disolución será estable, pero si la distancia que las separa es inferior a 5 nm, el medio tendrá una alta concentración de partículas, las fuerzas de repulsión son casi inexistentes y predominan las interacciones de Van der Waals de atracción, facilitando la floculación (Saucier, 1997; Hunter, 1993).

Una de las teorías más arraigadas que intenta explicar la desestabilización en un vino se basa en la desaparición de los dos factores de estabilidad: la pérdida del carácter hidrófilo del coloide, conocida como "desnaturalización" y la anulación de carga eléctrica (Togeres, 2011) (figura 2.1). Un coloide hidrófilo se desnaturaliza en presencia de alcohol, de taninos o por calentamiento, convirtiéndose así en un coloide hidrófobo, susceptible a la floculación, y se descarga por la compresión de la doble capa eléctrica originada cuando

se incrementa la concentración de electrolitos en el medio. Este último fenómeno sobre el control de carga o de disminución de la doble capa puede ser predicho usando la teoría de la estabilidad coloidal conocida como DLVO (Kruyt, 1952). La descarga también puede ocurrir cuando las partículas alcanzan su punto isoelectrico, por lo que la modificación del pH juega un papel importante.

Figura 2.1 Esquema de la floculación de un coloide hidrófilo por supresión de dos factores de estabilidad, carga eléctrica e hidratación (Ribéreau-Gayon et al., 2002).



Hay otras teorías que no atribuyen la desnaturalización a una deshidratación, sino que la desnaturalización resulta exclusivamente de la absorción de los taninos con las proteínas, floculando en presencia de sales (Kawamoto & Nakatsubo, 1997). De hecho, las teorías más recientes establecen que no hay deshidratación, sino que los taninos se aglomeran entre sí mediante interacciones hidrofóbicas pudiendo ser desestabilizadas por las proteínas debido a interacciones de Van der Waals y precipitar (Saucier, 1997). También el uso de cationes hidrolizables como Cu^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+} pueden promover la agregación mediante la modificación de las partículas dispersas a través de la precipitación superficial de hidróxidos coloidales que conducen a la desestabilización general mediante atrapamiento mecánico o heterocoagulación (Healy & James, 1972).

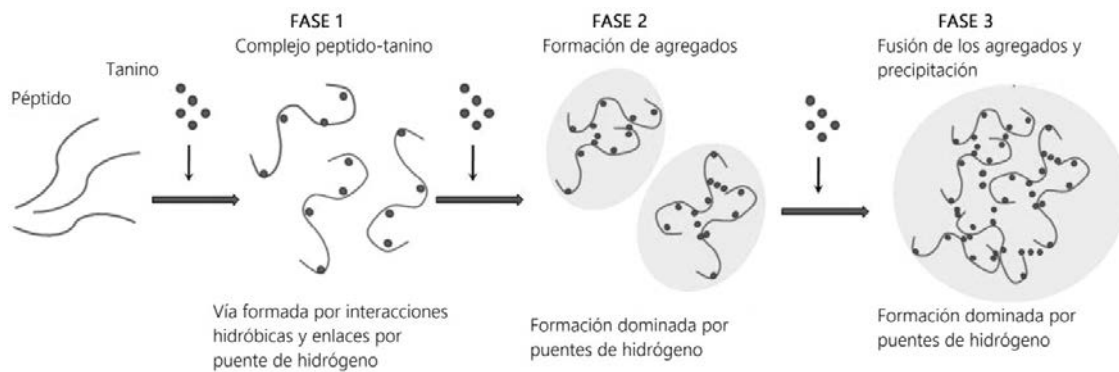
Existen otro tipo de coloides hidrófilos, conocidos como “coloides protectores” que pueden impedir la precipitación de los coloides hidrófobos estabilizándolos en el medio e imposibilitando la aproximación de estos para flocular. El efecto protector se explica porque a los coloides hidrófobos se le unen los protectores, siempre y cuando los protectores se encuentren en una cantidad suficiente pero no es excesiva, puesto que sino daría lugar a la aglomeración de los coloides hidrófobos por aumento de la presión osmótica (Togeres, 2011). Algunos de estos coloides los contiene el vino de manera natural, son los polisacáridos, gomas y mucílagos. En especial los polisacáridos pueden tener un efecto protector en la formación de turbidez (Jaeckels et al., 2016), por tanto, influyen en el afinamiento y en el fenómeno de estabilización (Ferreira et al., 2002).

2.1.3 Reducción de la astringencia

Se ha definido la astringencia como un complejo de sensaciones de sequedad y aspereza en las células del epitelio bucal por la incorporación de sustancias como el alumbre o taninos (American Society for Testing and Materials, 2004). Los compuestos fenólicos, especialmente los flavanoles o taninos, tienen gran influencia en la generación de la sensación de astringencia. En los últimos años se ha considerado que el factor principal con el que varía la astringencia es la concentración de taninos, siendo mayor cuando la concentración de estos aumenta, aunque estudios recientes (Chira et al., 2012) han observado otros factores que podrían influenciar, como la participación de los antocianos para reducir el grado medio de polimerización, parámetro relacionado con el aporte de suavidad al vino.

La sensación de astringencia es producida por la falta de lubricación en la cavidad oral debido a una interacción y consecuente precipitación de las proteínas de la saliva con los taninos, en especial con proteínas ricas en prolina. Esta interacción se da por una combinación de interacciones hidrofóbicas y por enlaces por puentes de hidrógeno. Según McRae et al. (2010), hay una primera interacción donde las interacciones hidrofóbicas (π - π) tienen lugar entre las superficies planas de los anillos aromáticos que constituyen los taninos y los anillos heterocíclicos de prolina (aminoácido principal que constituye las proteínas de la saliva), junto con los enlaces por puente de hidrógeno que se establecen entre los protones ácidos de los taninos y los residuos polares de los aminoácidos de prolina. La segunda interacción es cuando tiene lugar la precipitación, debido a que los complejos asociados de proteínas y taninos van a dar lugar a complejos mucho más grandes que se van a unir y por tanto, precipitar en la disolución (figura 2.2).

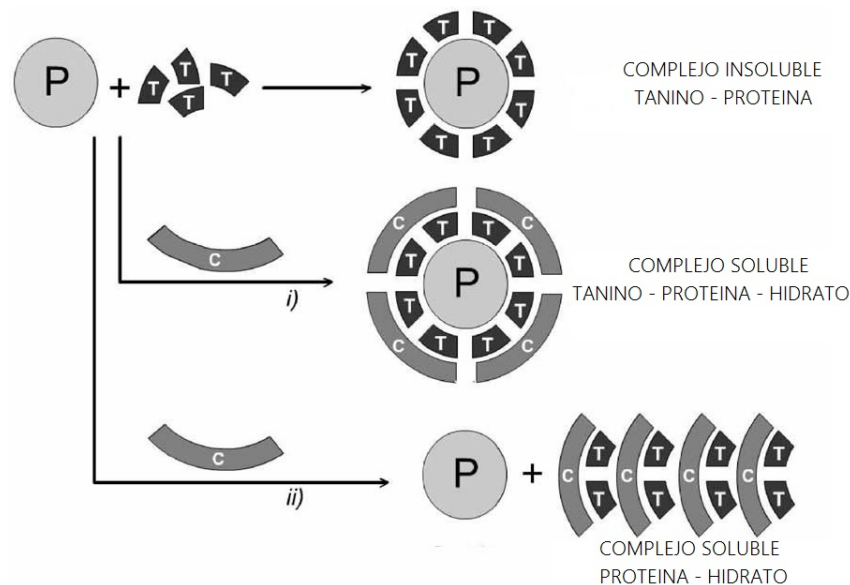
Figura 2.2 Resumen de las fases de interacción tanino-proteína (McRae et al., 2010).



Algunas de las características de las proantocianidinas como el grado medio de polimerización, el grado de galoilación, y la estereoquímica de las subunidades juegan un papel importante en la interacción que puedan tener con las proteínas, y así en la percepción de la astringencia del vino (Ma, et al., 2014). Un grado medio de polimerización (G_{Pm}) y de galoilación alto, aumenta la sensación de astringencia. El G_{Pm} puede verse modificado con el envejecimiento del vino, con la oxidación de los taninos (Poncet-Legrand et al., 2010) o por las reacciones de condensación con los antocianos del vino.

Hay una considerable evidencia de la influencia de los carbohidratos, polisacáridos y manoproteínas principalmente, en la percepción de la astringencia. Posiblemente estos intervienen en la interacción entre las proantocianidinas y las proteínas, mediante enlaces por puente de hidrógeno, reduciendo la precipitación de taninos con las proteínas de la saliva. La combinación de los taninos con los hidratos de carbono puede dar lugar a estructuras estables no reactivas con los residuos de prolina, explicando así el hecho de que los taninos del vino sean menos astringentes en presencia de estos compuestos (Rinaldi et al., 2012), teniendo, por tanto, estos compuestos un efecto protector para el vino. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar la interacción de los taninos con los polisacáridos; por un lado, la formación de complejos que involucre a los polisacáridos, los taninos y las proteínas, y por otro, la encapsulación de los taninos por parte de los polisacáridos (Maury et al., 2016) (figura 2.3).

Figura 2.3 Posibles mecanismos que participan en la inhibición de la agregación de taninos y proteínas por polisacáridos. P: proteínas, T: tanino, C: polisacáridos (Mateus et al., 2004).



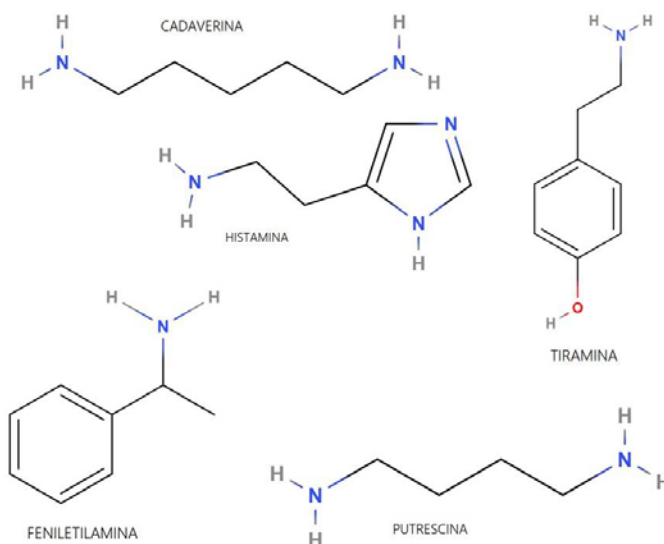
Este fenómeno es importante, ya que generaría un equilibrio coloidal, que le aportaría estabilidad al vino y evitaría la precipitación de los taninos, además la presencia de carbohidratos podría tener una incidencia directa sobre las características organolépticas y fisicoquímicas del vino, siendo clave en algunas ocasiones (Riou et al., 2002; Doco et al., 2007).

2.1.4 Reducción de sustancias perjudiciales

Hay algunas sustancias en el vino perjudiciales para la salud de los consumidores y otras que pueden causar enturbiamiento de los vinos, afectando a su seguridad y calidad respectivamente. Entre estas sustancias, hay algunas que son producidas por microorganismos, como son las aminas biógenas (AB) y la ocratoxina A (OTA), sustancias tóxicas, y otras, como son los metales, que, en general, no afectan a la seguridad del vino, pero sí a su calidad, ya que influyen en la química del vino, participando, por ejemplo, en reacciones de oxidación que modifican el color del vino y pueden degradar su sabor. Las concentraciones de estos compuestos se pueden ver afectadas por el uso de los agentes afinantes.

Las AB son compuestos orgánicos de bajo peso molecular (figura 2.4) que se forman durante la fermentación maloláctica, por la descarboxilación de los aminoácidos causada por bacterias lácticas. Altas concentraciones de estas aminas en el vino pueden causar efectos tóxicos en el consumidor como dolor de cabeza, dificultades respiratorias, palpitaciones, hiper/hipotensión y náuseas entre otros (Manetta et al., 2016). Por tanto, es importante controlar el contenido de AB en el vino, porque, aunque en bajas concentraciones sean necesarias para las funciones metabólicas y fisiológicas del ser humano (por ejemplo, la histamina y la serotonina trabajan como neurotransmisores o como sustancias vaso-activas que regulan la presión sanguínea) (Grossmann et al., 2007), pueden inducir reacciones adversas en personas sensibles cuando estas se encuentran a concentraciones altas.

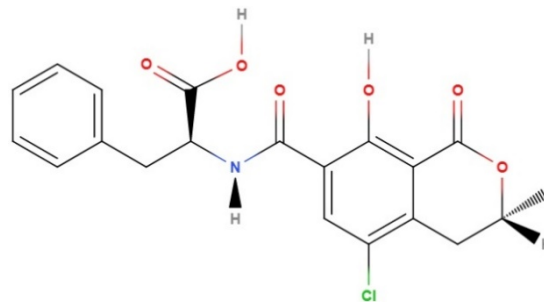
Figura 2.4 Estructura de las aminas biógenas estudiadas (AB).



Algunos países de Europa han establecido unos límites en la concentración de histamina en sus alimentos, por ser una de las AB con mayor toxicidad, ya que produce la apoptosis celular, aunque hay otras como la tiramina, que origina necrosis (Ordóñez et al., 2016). Entre las prácticas para controlar el problema de las AB se encuentra la inhibición del crecimiento de la bacteria carboxilasa (+) y otros microorganismos responsables de producir esta alteración con SO₂ o por el uso de sustancias afinantes como bentonita, caseinato y la albúmina del huevo (Kosmerl et al., 2013).

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina. Está relacionada con enfermedades renales y clasificada como un posible cancerígeno en humanos. La presencia de OTA en mostos y vinos es debido a la contaminación fúngica de las uvas, debido principalmente a la contaminación de las mismas con la cepa *A. carbonarius* (García-Moruno et al., 2005). OTA es un ácido débil con un valor de pK_a 4,4 por el grupo carboxílico de la fenilalanina (figura 2.5), lo que implica que esté parcialmente disociada al pH del vino y con una carga negativa que puede interactuar con superficies que estén cargadas positivamente. También puede establecer puentes de hidrógeno debido al hidroxilo de su estructura fenólica, e incluso esta puede interactuar mediante adsorciones hidrofóbicas, por la interacción de los orbitales donde están contenidos los electrones π (Castellari et al., 2001).

Figura 2.5 Estructura de la Ocratoxina A.



Su presencia puede desarrollarse tanto en los periodos de pre- o post- cosecha antes de la vinificación. Algunos factores, como el clima, el cultivo de la vid, la infección y la interacción entre diferentes hongos y técnicas de vinificación, pueden afectar a la presencia de OTA en los vinos (Ertan-Anli et al., 2011), de hecho, parece existir una correlación geográfica con la concentración de OTA, pues los vinos de las regiones del sur, tienen mayor cantidad de la misma y probabilidad de que esté presente (Ottender & Majerus, 2000; Pietri et al., 2001). La Unión Europea estableció el límite de esta toxina en 2 $\mu\text{g/L}$ en 2005 (Varga et al., 2006), valor coincidente con la máxima concentración establecida por la Oficina Internacional de la Viña y el Vino (Leong et al., 2006).

El Código de Comisión Alimentaria estima que el 15% del total de OTA ingerido es debido al consumo de vino (Castellari et al., 2001). La concentración de OTA es normalmente mayor en el vino tinto que en el rosado y el blanco (Visconti et al., 1999; Grazioli et al., 2006; Solfrizzo et al., 2010). Varios métodos se han probado para eliminarla

del vino como el uso de carbón activo, algunos agentes afinantes, entre los más efectivos la bentonita, la selección óptima de algunas levaduras durante la fermentación alcohólica, las virutas de roble y las lías (Quintela et al., 2013). Algunos autores como Solfrizzo et al. (2010) comprobaron que el uso de los orujos de uva pueden ser útiles para eliminar la OTA del vino, debido a su elevada afinidad.

El perfil mineral de un vino también es importante, sobre todo en lo que se refiere a minerales como el calcio y el potasio, que intervienen en la inestabilidad tartárica, y el cobre y el hierro que intervienen, en la quiebra cúprica y férrica, respectivamente. El ácido tartárico es uno de los ácidos mayoritarios de los vinos, proveniente directamente de las uvas y también de las correcciones de acidez que se efectúan en los mostos. Se puede insolubilizar parcialmente por la presencia de los cationes calcio y potasio, formando las sales de bitartrato potásico (THK) y tartrato cálcico (TCa). Esto puede ser evitado con un tratamiento oportuno. Algunos de estos tratamientos son la estabilización en frío, el uso de intercambiadores de iones, la electrodiálisis, o la adición de ácido metatartárico, manoproteínas o carboximetilcelulosa (CMC) (Lasanta et al., 2012). También una reducción de los iones calcio y potasio, con algún agente afinante, podría favorecer que no se formasen estos cristales (Guerrero et al., 2013).

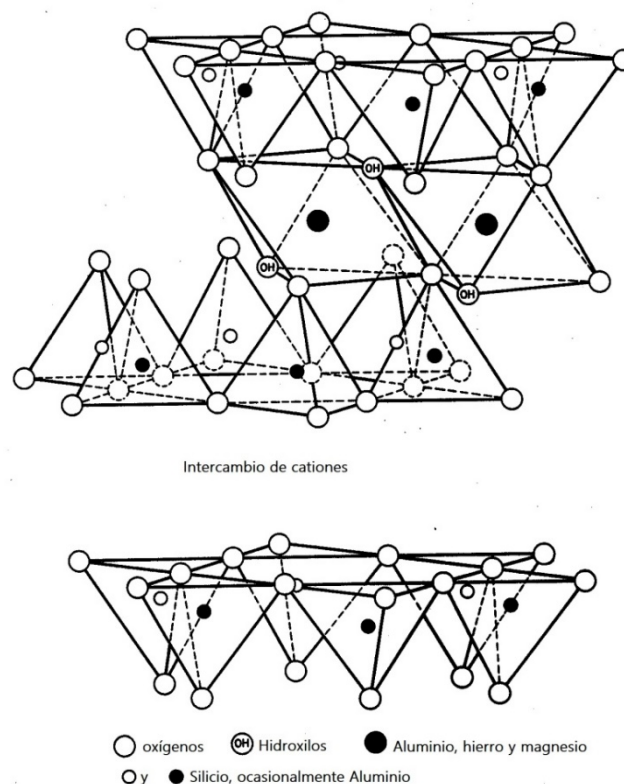
La quiebra cúprica es la formación de depósitos o coloides en suspensión de color marrón-rojizo, se da en los vinos que contienen SO_2 libre, en ausencia de aire, a alta temperatura y a la luz, pudiendo también interaccionar el Cu con las proteínas y formar suspensiones (Clark et al., 2015). Contrariamente a la quiebra cúprica, la quiebra férrica tiene lugar en presencia de oxígeno, bajas temperaturas y en la oscuridad, cuando el Fe^{3+} y el ácido fosfórico forman coloides inestables (quiebra blanca), o forman complejos solubles con compuestos fenólicos, que después flocculan (quiebra azul). Ambos iones, pueden verse reducidos, a parte de con el uso de los métodos tradicionales (Ribéreau-Gayon et al., 2002), con el uso de algunos agentes afinantes como propone Guerrero et al. (2013).

2.2 Agentes afinantes más usados

2.2.1. Bentonita

La bentonita está compuesta principalmente de montmorillonita (mínimo por un 75%), su estructura presenta varias hojas apiladas, cada una de las cuales está constituida por dos hileras de tetraedros de oxígenos encadenados entre sí, llevando en su interior un átomo de silicio, y estas dan lugar a unos huecos octaédricos donde están albergados átomos de aluminio. La diferencia de cargas, con las hileras de tetraedros con Si, crea una carga negativa sobre la superficie interfoliar. En este espacio interfoliar (figura 2.6) diferentes cationes como Ca^{2+} , Na^+ o K^+ , el agua, proteínas y otros compuestos son adsorbidos, siendo así la bentonita un material caracterizado por su función como intercambiador catiónico (Jaeckels, et al., 2017).

Figura 2.6 Estructura en hojas de la montmorillonita (Bentonita).



La adición de bentonita para afinar el vino es uno de los tratamientos más utilizados por su alta capacidad de retirar compuestos del medio (proteínas, compuestos fenólicos...), e incluso se puede añadir al mosto al comienzo de la fermentación para promover sitios de nucleación para las levaduras y aumentar la velocidad de la fermentación (Mierczynska-Vasilev et al., 2015). Su uso se replantea frente a la aparición de nuevos afinantes, por presentar efectos adversos, ya que puede aumentar la turbidez por una mala sedimentación y dificultar la filtración del vino, e inclusive producir una alteración en la calidad del vino, sobre todo a altas dosis. Otra desventaja de su uso es que el 5-10% del volumen del vino tratado queda ocluido en el sedimento de bentonita, conocido como lías (Muhlack et al., 2016).

2.2.2 Proteínas de origen animal

Muchas de las proteínas usadas en el tratamiento de los vinos tienen carga positiva al pH del vino e interactúan con las partículas coloidales que tienen carga negativa al pH del vino, como son los compuestos polifenólicos y partículas en suspensión, como el sulfuro de cobre y el fosfato de hierro. El propósito que tienen las proteínas es actuar sobre los mecanismos responsables de la estabilidad coloidal, como la atracción, repulsión, hidratación y deshidratación (Mierczynska-Vasilev et al., 2015). Los agentes proteicos más utilizados son de origen animal, y casi todos ellos se encuentran incluidos en la lista de los principales alérgenos de la Unión Europea: gelatinas, proteínas de la leche y del huevo, e incluso, la albúmina de la sangre.

- PROTEÍNA DEL HUEVO, más conocida como albúmina del huevo, está positivamente cargada y puede enlazarse con compuestos con carga negativa como los taninos. Sin embargo, presenta una baja afinidad por los complejos antocianos-taninos que tienen una cierta influencia en el color rojo del vino (Peñas et al., 2015).

- PROTEÍNA DE LA LECHE, en concreto la caseína, proteína caracterizada por secciones de aminoácidos hidrofóbicas e hidrofílicas, resultando de carácter anfótero, con capacidad de formar micelas. Es insoluble al pH del vino, pero soluble a pH alcalinos. El caseinato potásico es el derivado de la caseína que se utiliza para afinar, debido a su mayor solubilidad; se utiliza para retirar tanto compuestos fenólicos oxidados como oxidables en vino tinto y blanco (Cosme et al., 2012).

- PROTEÍNA DEL PESCADO, llamada cola de pescado, es un agente afinante que está cargado positivamente y procede de la vejiga de algunos peces como el esturión. Se utiliza para vinos blancos secos, dulces y espumosos mejorando la claridad y el aroma sin una modificación excesiva en el contenido de taninos (Peñas et al., 2015).
- PRODUCTOS DERIVADOS DE LA SANGRE. Durante mucho tiempo se uso la sangre líquida fresca de vacuno, pero actualmente esto está prohibido por la legislación. La albúmina del suero, que proviene de la desecación del plasma tratado con citrato sódico y dispuesta en polvo, es lo que se utiliza como agente afinante. Reduce el carácter vegetal del vino (Ribéreau-Gayon et al., 2002).
- GELATINAS. Las gelatinas derivan de la hidrólisis de colágeno procedente de las pieles de cerdo y de los huesos de los animales. Glicina, prolina, hidroxiprolina y ácido glutámico, son los principales componentes de estas. Hay distintos tipos de gelatinas, clasificadas según sus características fisicoquímicas, la distribución del peso molecular, punto isoeléctrico, superficie de carga etc. (Cosme et al., 2009). Son utilizadas en vinos tintos ricos en compuestos fenólicos.

Las sustancias proteicas de origen animal como afinantes en vino se han estado utilizando por sus excelentes propiedades como agentes afinantes y su bajo coste. Muchas de estas sustancias son alérgenos potenciales que podrían desencadenar alguna reacción alérgica. Además con la enfermedad de la Encefalía Espongiforme Bovina, asociada al "mal de las vacas locas" se empezó a cuestionar el uso de este tipo de afinantes, sobre todo las gelatinas de origen bovino, por las trazas que pudieran quedar en el vino tras su uso. Esto se ha convertido más relevante con las recientes consideraciones de etiquetado de la comida en Europa [regulación (CE) No. 579/2012], Australia y Estados Unidos, teniendo así que mostrarse en la etiqueta del vino, si se ha empleado alguna sustancia que pueda causar alguna reacción alérgica (Vassilopoulou et al., 2011; Lochbühler et al., 2015). Recientemente productos de origen sintético o vegetales se han propuesto como alternativa a los derivados de origen animal.

2.2.3 Proteínas vegetales

Frente a la demanda de los enólogos de sustituir los agentes afinantes proteicos derivados de animales, se abrió la posibilidad de usar afinantes proteicos derivados de plantas (Granato et al., 2014). De este modo, la OIV (Organización Internacional de la Vid

y el Vino) autorizó, en la asamblea de Viena de Julio de 2004, el uso de proteínas vegetales en mosto y vino (Noriega-Domínguez et al., 2010). Algunas proteínas vegetales son:

- GLUTEN DE TRIGO O DE MAÍZ. Estas proteínas vegetales son ricas en prolina, por lo que pueden ser consideradas buenos agentes afinantes, con alta capacidad de retirar compuestos fenólicos. Además, se ha demostrado que reducen la turbidez del vino, así como las lías generadas (Iturmendi et al., 2010).
- PROTEÍNAS DERIVADAS DE LA SOJA, LA LENTEJA Y EL GUISANTE (Granato et al., 2014).
- PROTEÍNAS DERIVADAS DEL ARROZ Y LA PATATA (Tschiersch et al., 2010). La proteína de la patata tiene una masa molecular similar a la de la albúmina del huevo, es adecuada como aditivo en la industria alimentaria, por su alta solubilidad, su capacidad de agente espumante y emulsionante. Estudios han demostrado que la proteína de la patata tiene la misma capacidad de reducir polifenoles, y por tanto, astringencia, como las gelatinas de origen animal (Gambuti et al., 2012).

El problema para algunas de estas proteínas vegetales es que pueden presentar reacciones alérgicas también, como el gluten de trigo, asociado con la enfermedad celiaca. Sin embargo otros, como las proteínas derivadas de la patata, pueden resultar un buen sustituto para las proteínas alérgicas. También muchas de estas proteínas vegetales son subproductos de la industria que podrían revalorizarse con este uso.

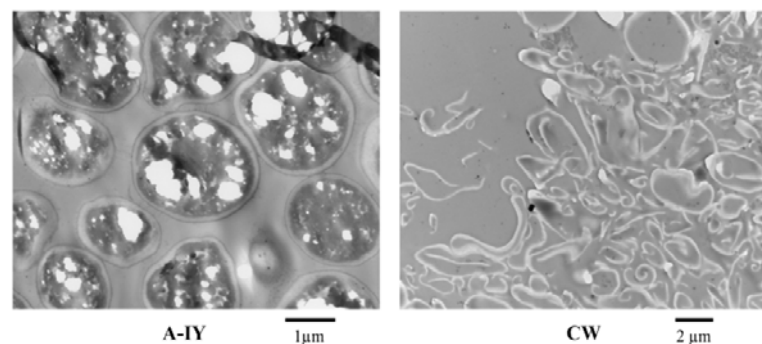
2.2.4 Manoproteínas

Las manoproteínas, junto con los mananos, constituyen el grupo principal de polisacáridos de las membranas de las levaduras, y se encuentran unidas a los glucanos mediante enlaces covalentes y no covalentes (Valentín et al., 1984). Las manoproteínas son proteínas glicosiladas con restos de manosa, pueden tener un tamaño muy variable (5-800 kDa) (Doco et al., 2003b) y forman parte de la capa externa de la pared celular de las levaduras enológicas, constituyendo entre el 25 y el 50% del peso seco de la levadura (Pozo-Bayón et al., 2009a), siendo su principal función en la pared celular, estructural. La proporción de proteínas es aproximadamente 5-20% y entre un 80-95% de cadenas de manosa.

En enología hay un notable interés en el uso de preparados comerciales ricos en manoproteínas (Mekoue-Nguela et al., 2016), como los extractos proteicos de levaduras, que son el extracto soluble que se obtiene tras la degradación total del contenido citoplasmático, y las paredes o cortezas de levadura, obtenidos por centrifugación durante el proceso de obtención de los extractos de levadura, además son insolubles y contienen únicamente las paredes celulares de la levadura, sin el contenido del citosol (figura 2.7). La heterogeneidad de estos compuestos, que depende mucho de la cepa utilizada, puede dar lugar a efectos muy diferentes, fenómeno que ha sido estudiado por algunos autores utilizando diversos preparados comerciales (Guadalupe & Ayesterán, 2008; Pozo-Bayón et al., 2009b; Del Barrio-Galán et al., 2010).

Tienen efectos positivos sobre la estabilización tartárica y proteica, y una influencia positiva en la calidad sensorial del vino. El uso de las manoproteínas como aditivo enológico durante la vinificación para mejorar la estabilidad tartárica y proteica fue autorizado por la Unión Europea en 2005 (Reglamento CE nº 2165/2005 de 20 de Diciembre de 2005). Además, también está autorizado el uso de preparados comerciales de paredes celulares de levadura hasta un límite de 40 g/hL (Reglamento CE nº 606/2009 de 10 de Julio de 2009) (Del Barrio-Galán, 2012).

Figura 2.7 Imágenes a través del microscopio electrónico de transmisión. A-IY: levaduras tras autólisis e inactivación, y CW: paredes celulares de las levaduras (Mekoue-Nguela et al., 2015a).



También son utilizados para reducir el contenido de proantocianidas y estabilizar los pigmentos del vino (Guadalupe et al., 2010). Las manoproteínas interactúan con los taninos y los antocianos, inhibiendo su agregación y precipitación, y de este modo, contribuir a la estabilización del color (Saucier et al., 2000). La presencia de los complejos polisacárido-tanino puede reducir la astringencia y aumentar la redondez, la estructura y

la untuosidad de los vinos en boca. Varios autores han demostrado este último fenómeno ([Poncet-Legrand et al., 2007](#)) pues las manoproteínas pueden impedir la precipitación de los polifenoles con las proteínas, aunque muestran una afinidad baja con los taninos no-glucosilados, actuando de coloides protectores y estabilizadores. [Mekoue-Nguela et al. \(2015b\)](#) demostraron que tanto los taninos, como los pigmentos son capaces de entrar en el espacio periplasmático a través de la pared celular e interactuar con la membrana celular y con su contenido citoplasmático, en el caso de no ser degradado, siendo las manoproteínas las principales involucradas en esta interacción, junto con otros constituyentes de la pared celular como los β -glucanos.

También se ha descrito que pueden mejorar el perfil aromático de los vinos, ya que pueden interactuar con los compuestos volátiles aumentando su persistencia aromática en el tiempo ([Lubbers et al., 1994](#); [Chalier et al., 2007](#)).

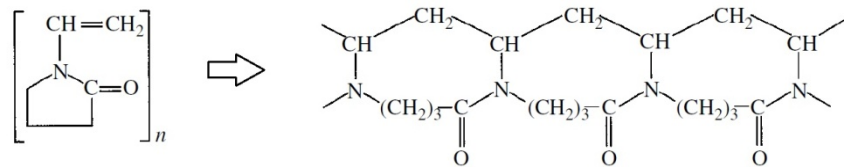
La Unión Europea ha permitido su uso como agente afinante en mosto y vino [regulación (EC) No. 144/2013] ([Lochbühler et al., 2015](#)).

2.2.5 PVPP

El PVPP (polivinilpirrolidona) es un polímero insoluble en agua que proviene de la polimerización de la vinilpirrolidona (figura 2.8), capaz de disminuir el contenido fenólico de los vinos y reducir la tendencia de los vinos blancos al pardeamiento. Se usa solo, en dosis bajas, o en combinación con otros afinantes, retirando taninos, ácidos cinámicos oxidables y las quinonas formadas por la oxidación de estos ([Cosme et al., 2012](#)). Se han propuesto dos mecanismos para explicar la absorción de los polifenoles por el PVPP ([Mierczynska-Vasilev et al., 2015](#)):

- o La formación de puentes de hidrógeno entre el oxígeno del grupo carbonilo de la vinilpirrolidona y los grupos hidroxílicos de los compuestos fenólicos.
- o El aumento del carácter electrofílico del grupo carbonilo, atribuido por la formación del enlace por puente de hidrógeno, siendo este más susceptible a la formación de enlace de elevada energía con agentes nucleófilos.

Figura 28 Polimerización de la vinilpirrolidona en polivinilpirrolidona (PVPP) (Ribéreau-Gayon et al., 2002).



2.2.6 Productos derivados de la uva

El uso de cualquier producto derivado de la uva como afinante es de total interés, ya que se evita el empleo de sustancias exógenas y no sería necesaria una legislación para permitir su uso. Actualmente se están estudiando varias opciones:

- Extracto de proteína de las semillas de la uva (Vincezi et al., 2013). La extracción de pequeñas cantidades de los componentes de las semillas ocurre durante la vinificación y como resultado, se pueden encontrar trazas de estas sustancias, tales como las proteínas constituyentes de las semillas, en el vino final. Por tanto, se propone la utilización de este material para afinar, ya que resulta una sustancia endógena del propio vino. Un descenso de la sensación de astringencia se observa cuando se utilizan estas proteínas, pues son capaces de interactuar con los taninos, sin necesidad de otras proteínas de diferente origen que coadyuven en el proceso de afinamiento. Además, también son capaces de reducir la turbidez de los vinos.

- Paredes celulares de los orujos (Bindon et al., 2013). Los orujos de la uva son considerados un subproducto de la vinificación, con contenido alto en fibra y de taninos, tanto extraíbles como no. Este material, más o menos purificado, tiene un alto potencial para interactuar con los compuestos polifenólicos. La interacción de los taninos, una de las principales familias de compuestos polifenólicos del vino, con el material de las paredes celulares del orujo es rápida y directa, establecida por puentes de hidrógeno y por interacciones hidrofóbicas. Por tanto, su aplicación como agente afinante en vino, permitiría reducir la astringencia que los taninos puedan aportar al mismo, como su interacción con otro tipo de sustancia que sea

deseable de eliminar, ya que la composición de este material celular es muy diverso y le permite establecer múltiples tipos de interacciones.

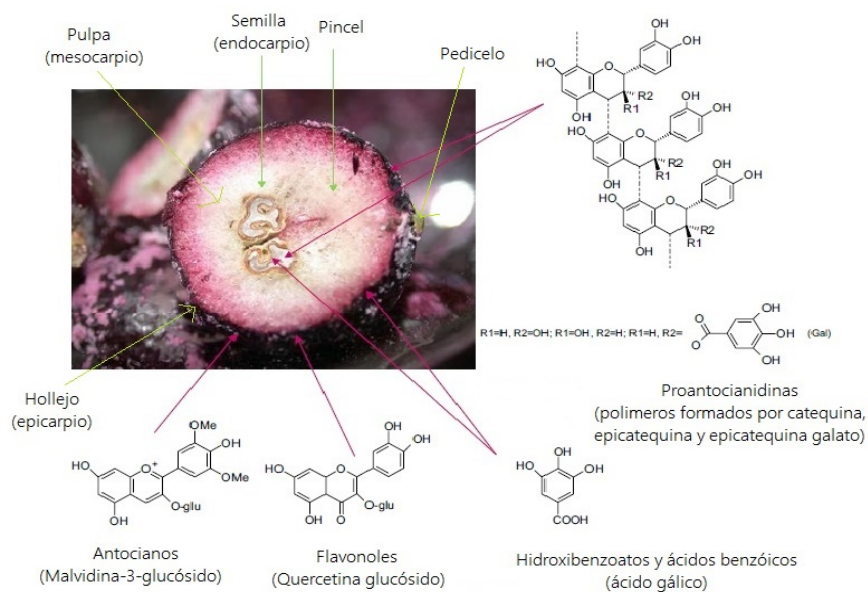
2.3 Las paredes celulares

2.3.1 Estructura del grano de uva y las paredes celulares del hollejo y pulpa

El racimo de la uva está formado por una parte leñosa o raspón y las bayas o granos que están unidos al racimo por el pedicelo. Las bayas de la uva son diferentes dependiendo de la variedad, y en cierta medida, de las condiciones del medio, pero todas ellas están formadas por una película exterior, el hollejo o piel, y una masa tierna de la que se extrae el mosto, la pulpa, más un número variable de semillas o pepitas situadas en el centro. Los granos de uva se unen al racimo mediante el pedicelo, y a partir de este hay una elongación de un haz de vasos conductores, que son los que nutren a la baya, llamado pincel (figura 2.9).

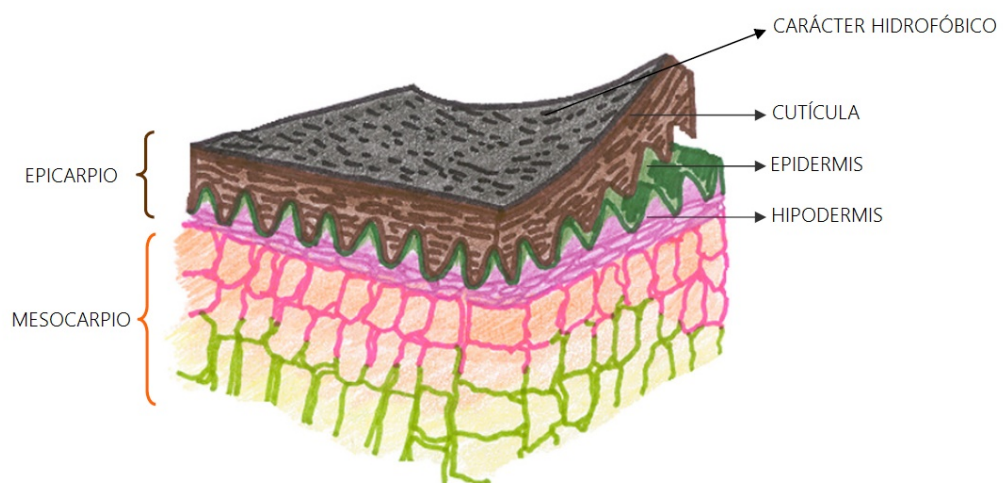
El grano de uva está formado por una serie de tejidos, llamados en conjunto pericarpio. Este se encuentra dividido en tres partes: epicarpio (hollejo o piel), mesocarpio (pulpa) y endocarpio, que es el tejido que rodea a las semillas (figura 2.10).

Figura 2.9 Sección de la baya de la uva, junto con los componentes principales de cada una de las partes (Pineo et al., 2006).



El hollejo representa 5-10% del peso de la baya y actúa como una barrera protectora frente a agentes patógenos, a la luz ultravioleta, frente a la deshidratación y frente a los daños físicos y climatológicos. Comprende los tejidos del epicarpio, que a su vez se puede dividir en tres secciones: la cutícula, que está compuesta por una serie de ácidos grasos hidroxilados, que a su vez le proporcionan carácter hidrofóbico (Comménil et al., 1997); la epidermis, formada por una o dos capas de células, y una porción más interna, la hipodermis, que es la fracción del hollejo más pegada a la pulpa.

Figura 2.10 Morfología del hollejo y la pulpa (Pinelo et al., 2006).



La mayoría de los compuestos fenólicos y los compuestos aromáticos y sus precursores se localizan en el hollejo (Pogorzelski et al., 2007). Los compuestos fenólicos presentes en la piel son los antocianos (en el caso de las uvas tintas), que se encuentran en el interior de las vacuolas de las células (Hernández-Hierro et al., 2014), las proantocianidinas, llamadas comúnmente taninos, que están albergados en la membrana vacuolar y plasmática, en los tonoplastos y en las paredes celulares (Rustioni et al., 2014) o ligados a proteínas, e incluso en la membrana celular unidos a polisacáridos de la pared celular, junto con flavonoles, ácidos benzoicos y cinámicos.

La pulpa representa alrededor de un 85% del peso de la baya, su parte más externa es el mesocarpio, llegándose a confundir sus células con las del hollejo, y su parte más interior, pegada a las semillas es el endocarpio. El compuesto mayoritario de la pulpa es el agua, un 80%, el resto son principalmente azúcares, siendo glucosa y fructosa los más abundantes.

Por último, las semillas representan hasta un 6% en peso del grano de uva, constan de una cutícula, una epidermis fina, con células lignificadas y ricas en taninos, una envoltura media y otra interna, rica en taninos y de naturaleza celulósica (Apolina-Valiente, 2012). Están compuestas por azúcares, compuestos nitrogenados, minerales y aceites, aunque también son una fuente importante de compuestos fenólicos, tanto flavonoides como no flavonoides. Los taninos de las semillas difieren de los del hollejo, en que estos últimos son más ricos en epigallocatequina y menos en epicatequina-3-O-galato, y tienen mayor grado medio de polimerización y masa molecular (Bindon et al., 2011).

2.3.2 Composición de la pared celular

Las paredes celulares de las células de los hollejos de la uva se comportan como una barrera frente a la difusión de los aromas y los compuestos fenólicos contenidos en el interior de las vacuolas de las células (Doco et al., 2003a). La composición de la pared celular influye, además, en la extracción de taninos y antocianos de la piel durante la maceración, siendo este un proceso de carácter difusivo principalmente (Busse-Valverde et al., 2011), de hecho conforme aumenta el grado de madurez la extractabilidad de estos compuestos aumenta por haber una degradación de la pared celular por las enzimas pectolíticas en esta etapa (Quijada-Morín et al., 2015).

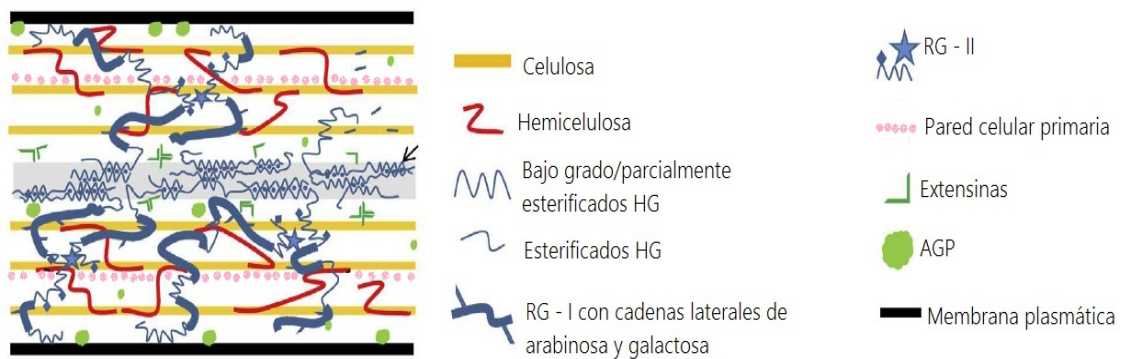
La pared celular es una estructura compleja y dinámica compuesta por un 30% de polisacáridos, 20% de pectinas, alrededor de un 15% de proantocianidinas y menos de un 5% de proteínas estructurales (Pinelo et al., 2006). Está compuesta por tres partes fundamentales: la lámina media, la pared primaria y la pared secundaria, que puede o no estar presente (Lodish, 2005) (figura 2.11):

- La lámina media, está compuesta mayoritariamente por pectina y se forma durante la división celular.
- La pared celular primaria, mucho menos gruesa que la lámina media, se forma justo después de la división celular. Esta a su vez está dividida en tres partes, las dos primeras partes están casi interactuando entre ellas, constituidas por un armazón de celulosa y xiloglucanos, en el que está incrustada una matriz de polisacáridos pectídicos, y la tercera está caracterizada por albergar proteínas estructurales (Carpita et al., 1993).
- La pared celular secundaria, contiene celulosa (40-80%), hemicelulosa (10-40%) y lignina (5-25%), estando la celulosa y la hemicelulosa con

una estructura más organizada en la pared secundaria (Bidlack, Malone, & Benson, 1992). Esta incrementa el grosor de las paredes, proporcionándoles mayor resistencia mecánica.

Los compuestos fenólicos, como los taninos, pueden interaccionar con las proteínas y los polisacáridos de la pared celular primaria y secundaria, mediante interacciones hidrofóbicas o por puente de hidrógeno, ya que los polisacáridos de la pared celular contienen grupos hidroxilos (Rustioni et al., 2014).

Figura 2.11 Modelo simplificado de dos paredes celulares vegetales adyacentes (modificada - Zietsman et al., 2017). La zona sombreada en azul representa la lámina media de ambas paredes.



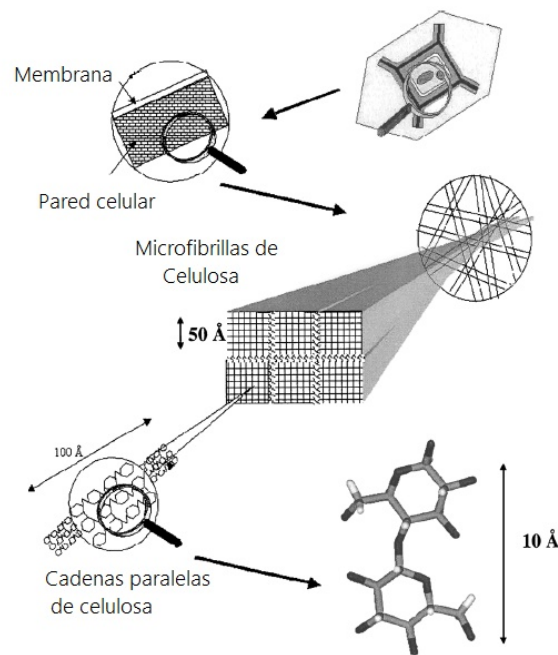
2.3.2.1 Polisacáridos de la pared celular

La proporción de los tipos de polisacáridos que forman la pared celular es variable dependiendo de la especie, siendo los xiloglucanos el polisacárido hemicelulósico mayoritario, alrededor de un 25%, mientras que los polisacáridos no celulósicos o no xiloglucanos comprenderían entre un 10-15% del total de la pared celular (Hatfield et al., 2017).

Celulosa

La celulosa forma la base estructural incrustada en una matriz de otros polisacáridos como hemicelulosa y pectinas. La celulosa está formada por cadenas lineales de D-glucopiranosas unidas en β -(1- \rightarrow 4). La celobiosa, formada por dos glucopiranosas constituye la unidad de repetición de la celulosa. En la naturaleza, la celulosa tiene una estructura más compleja, las paredes celulares están compuestas por microfibrillas entrelazadas. Estas microfibrillas están formadas entre 30-40 cadenas de celulosa, y estas a su vez forman las fibras de celulosa, de 1-2 nm de longitud, formando una red que le confiere resistencia mecánica para el mantenimiento celular de la planta (Pérez et al., 2005) (figura 2.12).

Figura 2.12 Niveles estructurales de organización de la celulosa en una célula vegetal (Pérez et al., 2005).



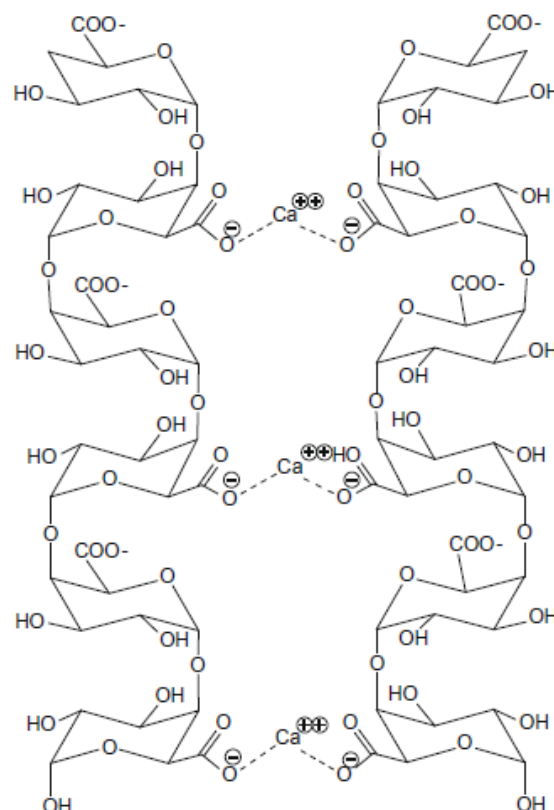
Dentro de los polisacáridos no celulósicos están las pectinas y las hemicelulosas (heteroxilanos, xiloglucanos y glucomanos).

Pectinas

Las pectinas son una clase de polisacáridos galacturónicos que comprenden varias clases estructurales: homogalacturonanos (HG), xilogalacturonanos (XGA), apigalacturonanos (AGA), ramnogalacturonano II (RG-II) y ramnogalacturonano I (RG-I) (Ridley et al., 2001).

HG es un polímero del ácido galacturónico ligado en α -(1- \rightarrow 4), siendo el 60% en composición de las pectinas en las plantas (Ridley et al., 2001). HG se puede encontrar metilesterificado sobre la función carboxílica, en el carbono 6, pero en el caso de no estarlo, los residuos que componen el polímero se encuentran cargados negativamente y pueden interactuar con el ión calcio formando un gel estable, más conocido como el modelo "egg-box" (figura 2.13) (Caffall et al., 2009). La estructura del HG también está covalentemente unida a los xiloglucanos, polisacáridos hemicelulósicos.

Figura 2.13 Modelo "egg-box", donde el calcio es acomplejado por HG (Caffall et al., 2009).



Asimismo, se observan otras sustituciones de los HG, a parte de la metilesterificación, donde los residuos de apiosa están unidos a las estructura del HG, formando los apigalacturónicos o residuos de xilosa, formando los xilogalacturónicos (O'Neill & York, 2003).

La estructura del RG-II es muy compleja, con doce tipos diferentes de residuos glucosídicos, incluyendo especies poco comunes de azúcares. Su presencia en las paredes celulares de las plantas es baja, mientras que en el vino es uno de los polisacáridos más abundantes.

RG-I es un polímero con una estructura en la que se alternan residuos del ácido D-galacturónico unidos en α -(1- \rightarrow 4) y L-ramnosa unidos en α -(1- \rightarrow 2). Tres tipos de polisacáridos se han aislado a partir de los polisacáridos RG-I: galactanos de tipo I y arabinogalactanos de tipo II (Caffall et al., 2009).

La unión de HG, RG-I, y RG-II se establece mediante enlaces glucosídicos, formándose así una red entrecruzada de pectinas, aunque también se pueden dar otro tipo de enlaces como los establecidos con el calcio, enlaces borato diéster (O'Neill et al., 2004) y enlaces covalentes con fenoles. Los enlaces vía borato diéster para formar dímeros de RG-II pueden afectar al tamaño del poro y a la flexibilidad de la red de pectinas.

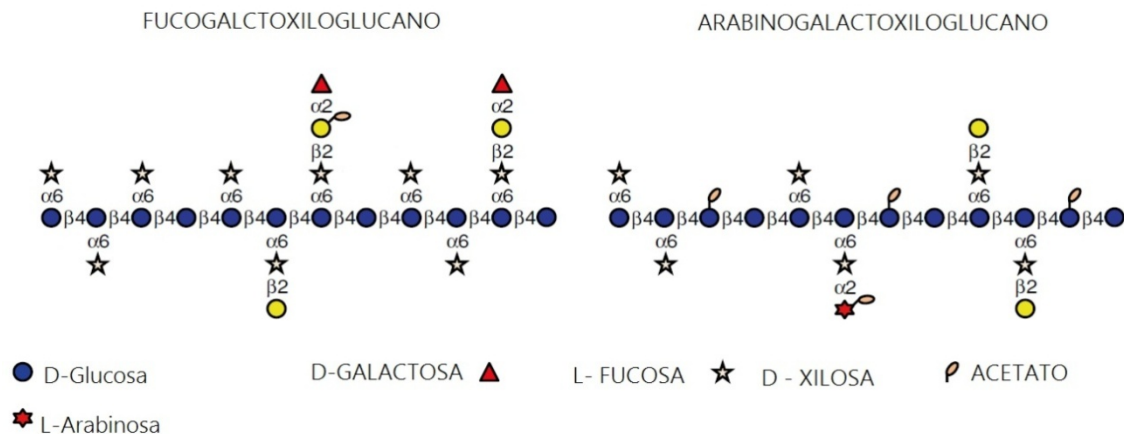
Hemicelulosa

Las hemicelulosas son polímeros muy variables, tanto a nivel de los azúcares que las constituyen, como sus ramificaciones. La presencia de cadenas cortas sobre la principal puede hacer que estos se asocien entre sí de forma no covalente por puentes de hidrógeno, como las microfibrillas de celulosa, y jugar así un papel fundamental en la estructura organizada de la pared.

Los xiloglucanos (XyG) son el componente hemicelulósico principal en plantas dicotiledóneas. Consisten en glucopiranosas enlazadas β -(1- \rightarrow 4), sustituidas en C-6 por residuos de D-xilosa, en muchas especies los residuos de D-xilosa son sustituidos en O-2, por D-galactosa o L-arabinosa (figura 2.14). Además, a los residuos de galactosa se les puede unir en O-2 como sustituyentes L-fucosa y el grupo acetato, denominándose entonces fucogalactoxiloglucanos (Pauly et al., 2013). Los xiloglucanos forman una red entrelazándose entre ellos y a las microfibrillas de celulosa, creando una especie de entramado que bloquea las microfibrillas (Hrmova et al., 2009), aunque también pueden

estar ligados mediante enlaces covalentes, a fracciones pécticas y a otro tipo de polisacáridos.

Figura 2.14 Representación de xiloglucanos hemicelulósicos (Pauly et al., 2013).



Los xilanos son los polisacáridos hemicelulósicos más abundantes en la pared celular secundaria. Están formados por una cadena principal de D-xilopiranosas ligadas en β -(1->4), con varias ramificaciones incorporando en su estructura ácido glucurónico, residuos de éteres con ácido glucurónico y arabinosa (Doering et al., 2012). Según la naturaleza de los sustituyentes, se distinguen varios tipos de xilanos: neutros, arabinoxilanos, heteroxilanos, y glucuronoxilanos o arabinoglucuronoxilanos.

Los mananos, los glucomananos, y los galactomananos (figura 2.14) están constituidos por un esqueleto principal de D-manosa, junto con glucosa y galactosa como sustituyentes en los dos últimos casos. Estos polisacáridos con frecuencia se encuentran acetilados. En ginospermas, los galactoglucomananos son los componentes principales de las paredes secundarias (Scheller et al., 2010).

2.3.2.2 Proteínas

Las paredes celulares de las plantas contienen alrededor del 10% de proteína. Los tipos de proteínas más abundantes son las extensinas (que son las más abundantes e interactúan con los polisacáridos pécticos de la pared), las proteínas ricas en glicina (GRP), las proteínas ricas en prolina (PRP) y las arabinogalacto proteínas (AGP)

(Caffall et al., 2009). También existen otros tipos de proteínas menos abundantes como las expansinas, y se han encontrado ciertas enzimas, quinasas, que juegan un papel importante en la elongación celular, la morfología y la defensa frente a patógenos (Cosgrove, 2001).

2.3.2.3 Compuestos fenólicos

Los componentes fenólicos presentes en la pared celular son fundamentalmente ácidos hidroxicinámicos, siendo los más importantes el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico (Ishii, 1997). Particularmente los ferulatos son importantes por formar una red entrecruzada con los polisacáridos y la lignina (Bunzel et al., 2005).

Asimismo, hay que resaltar la presencia de otros compuestos fenólicos, como los taninos y antocianos, que se encuentran en el interior de las vacuolas y durante el procesado de la uva o de la fruta, estos pueden unirse a las paredes extracelulares, aunque en algunos casos antes de que tenga lugar el procesado, se pueden encontrar formando complejos en la pared celular a causa del estrés medio ambiental que pueda haber llevado la planta, y consecuentemente se produce una descompartimentalización y desestructuración de la célula (Le Bourvellec et al., 2009). Existe también una interacción entre los taninos y la pared celular, en concreto con los polisacáridos que forman su estructura, especialmente con las pectinas, la celulosa y los xiloglucanos (Bautista-Ortín et al., 2015b), mediante uniones covalentes, por lo que también se pueden encontrar en esta estructura.

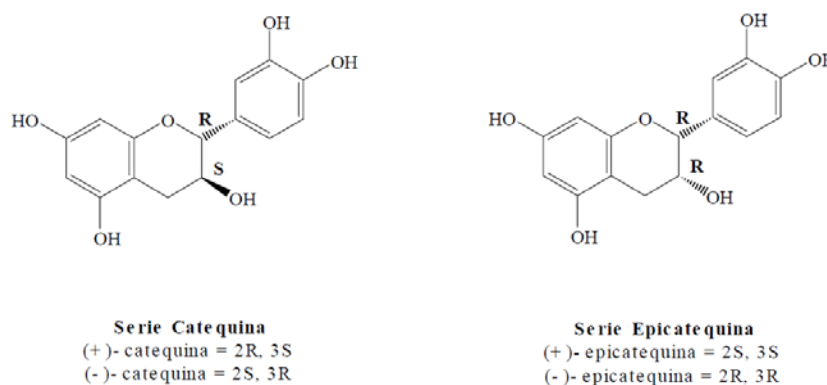
2.3.2.4 Lignina

La lignina es un polímero complejo de moléculas fenólicas, muy importante en la formación de la pared celular, debido a que tiene carácter hidrofóbico y fuerza a que el agua no salga de la pared de la matriz disminuyendo la flexibilidad y permeabilidad (Hatfield et al., 2017).

2.3.3 Interacciones de las paredes celulares con otros componentes en el vino

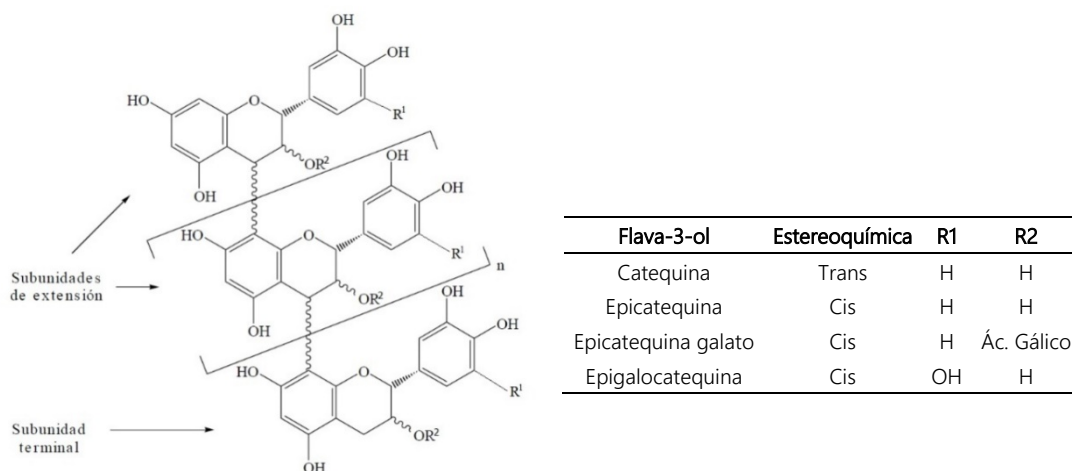
Los componentes fenólicos principales en los vinos tintos son los antocianos y los taninos. La estructura de los taninos condensados se basa en polímeros más o menos complejos formados por unidades de flavan-3-oles o 3-flavanoles. Estos se encuentran principalmente en el hollejo, en las semillas de la baya y en el raspón. Los flavan-3-oles, comúnmente llamados catequinas poseen dos ciclos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado saturado (núcleo fenil-2cromano). Esta estructura presenta dos carbonos asimétricos (C2 y C3) que originan cuatro isómeros (figura 2.15). La (+) catequina y la (-) epicatequina corresponden a las formas más abundantes, así como los derivados de la epicatequina en forma de éster gálico (figura 2.16).

Figura 2.15 Estructura de las unidades básicas de los flavan-3-oles.



La mayoría de los flavanoles se encuentran en forma de oligómeros (hasta cinco unidades) y polímeros (más de cinco unidades) (figura 2.16), y se denominan taninos condensados o proantocianidinas. Este nombre se debe a que pueden dar lugar a antocianos por hidrólisis ácida. Así, la hidrólisis de los taninos formados por unidades de catequina y/o epicatequina dan lugar a cianidina (procianidinas) y los formados por unidades de galocatequina y/o epigalocatequina dan delfinidina (prodelfinidinas) (Porter et al., 1986).

Figura 2.16 Estructura general de las proantocianidinas.

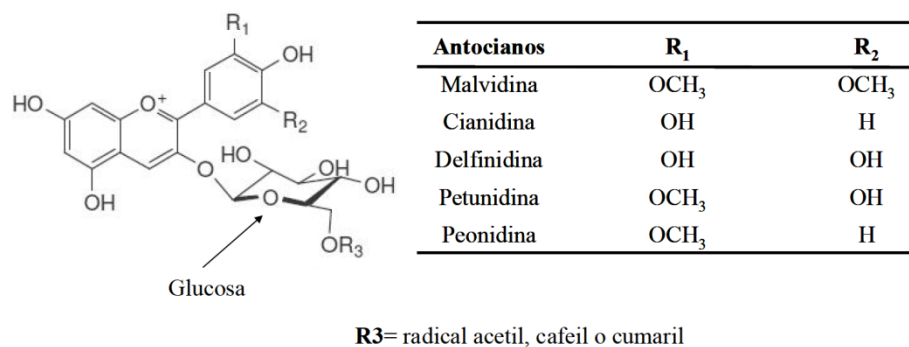


Las proantocianidinas son consideradas como parámetro de calidad en los vinos por su contribución a las características sensoriales de estos, sobre todo en el cuerpo, la astringencia, el amargor y el color. La gran importancia sensorial ha quedado marcada en diversos estudios de Sáenz-Navas et al. (2011), Kassandra & Kennedy (2011), y Mercurio et al. (2010). Estas son moléculas anfipáticas que tienen anillos aromáticos hidrofóbicos y grupos hidroxilos hidrofílicos, lo que les permite que se unan simultáneamente en sitios diferentes de distintas moléculas (Haslam et al., 1988). El mecanismo de la unión proantocianidinas-polisacáridos y proantocianidina-proteína incluye estas interacciones de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Cheynier et al., 1997). Las interacciones con las proteínas es un mecanismo de unión conocido, ya que es la base de la habilidad de las proantocianidinas para precipitar proteínas de la saliva y causar la sensación de astringencia. Su interacción con los polisacáridos para disminuir la sensación de astringencia también ha sido estudiada (Le Bourvellec et al., 2005). La naturaleza de las proantocianidinas influye notablemente en las interacciones que puedan establecer, dependiendo así de la masa molecular, el grado de galoilación y la estereoquímica de las moléculas de proantocianidinas (Bindon et al., 2010a).

Los antocianos son los responsables del color rojo-azulado de la piel de las uvas tintas y por tanto, del color del vino tinto. Su localización en la uva se limita a los hollejos, aunque en las variedades tintoreras también están presentes en la pulpa. Los antocianos están formados por una aglicona (antocianidina) que se encuentra unida a un

monoglucósido, normalmente glucosa. La glucosa también puede estar esterificada con diferentes ácidos, como el ácido acético, *p*-cumárico y *t*-cafeíco (Cheynier et al., 2003). En el género *Vitis* se pueden encontrar cinco antocianos diferentes en función de los grupos hidroxilos (-OH) y metoxilos (-OCH₃) que haya sustituidos en el anillo (figura 2.17).

Figura 2.17 Estructura química de los antocianos.



Los polisacáridos de las paredes celulares contienen grupos hidroxilos y átomos de oxígeno glucosídicos y aromáticos que tienen la habilidad de formar puentes de hidrógeno y establecer interacciones hidrofóbicas con otras moléculas (Le Bourvellec et al., 2004). Las evidencias más fuertes de la existencia de interacciones proantocianidina-polisacáridos de paredes celulares las han proporcionado estudios con polisacáridos modelos, como la ciclodextrina y geles de polisacáridos (McManus et al., 1985; Ficarra et al., 2002), observando así el comportamiento cromatográfico y la encapsulación de proantocianidinas en orificios de las redes de los geles de los polisacáridos (Le Bourvellec et al., 2005).

La fuerza de unión entre proantocianidinas y los componentes de las paredes celulares puede estar influenciada por la estructura y la composición, tanto de las proantocianidinas o taninos, como de las paredes celulares. De esta forma, parece ser que la capacidad de la pared celular de ligar con taninos es mayor cuando hay una gran cantidad de polisacáridos pécticos y una baja cantidad de celulosa, es decir, se podrían ligar más a la lámina intermedia y en las paredes celulares primarias, que tienen más pectinas y xiloglucanos. Asimismo, como la composición cambia dependiendo de la variedad de la uva, como demostraron Ortega-Regules et al. (2006, 2007), unas variedades adsorberán más o menos taninos en sus paredes celulares.

Se han realizado estudios utilizando paredes celulares de manzanas y uva ([Bindon et al., 2010 b](#)), observándose que las interacciones se incrementan con la longitud del polímero, el porcentaje de sustituciones con ácido gálico y la presencia de epigallocatequina ([Cai et al., 1989](#); [Le Bourvellec et al., 2004](#)). La epigallocatequina tiene un grupo hidroxilo adicional en el anillo B y esto proporciona otro sitio para que ocurra un puente de hidrógeno más. Conforme polimeriza la molécula de proantocianidina se incrementa el número de sitios reactivos, por lo que la molécula se puede ligar simultáneamente a más de un punto en la red. La sustitución con ácido gálico incrementa también el número de sitios para enlaces de hidrógeno ([Haslam, 1998](#)). Aunque los tipos de uniones formadas son de tipo débil, cuando uno considera la suma de la energía de enlace de la molécula entera, se puede entender como la fuerza del enlace se incrementa con moléculas grandes ([Renard et al., 2001](#); [Le Bourvellec et al., 2004](#)). Su uso como agente afinante es descrito por [Bindon & Smith \(2013\)](#), quienes midieron la retención de taninos en paredes celulares de manzana y uva, comparando su efectividad con proteínas de uso comercial.

Los antocianos, por la estructura que presentan, al igual que las proantocianidinas, pueden establecer interacciones hidrofóbicas y por puentes de hidrógeno, de hecho uno de los problemas en la vinificación es su extracción del hollejo de las uvas para proporcionarle el color adecuado al vino, y esto es debido a las interacciones que establece con la pared celular ([Rolle et al., 2012](#)). [Bautista-Ortín et al. \(2016\)](#) demuestran en sus estudios la interacción de los antocianos con la pared celular, indicando que este tipo de interacción también es dependiente de la variedad de la uva.

Como se ha visto y debido a la complejidad de la estructura de la pared celular, los tipos de interacciones que se pueden dar con diferentes sustancias son de muchos tipos, al igual que la clase de compuestos con los que las paredes pueden interactuar. De hecho, no solo interactúan con taninos y antocianos sino también con proteínas, reduciendo el contenido de proteínas en el vino y evitando la aparición de turbidez ([Giese et al., 2016](#)). También pueden eliminar ocratoxina A del medio como observaron [Solfrizzo et al. \(2010\)](#) e inclusive interactúan con compuestos aromáticos reduciendo la expresión de algunos componentes aromáticos en el vino ([Dufour & Bayonove, 1999](#); [Mitropoulou et al., 2011](#)).



2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Orujo de uva

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizaron orujos de uva de tres variedades tintas (Monastrell, Syrah y Cabernet Sauvignon) y una variedad blanca (Macabeo) resultantes de la elaboración de vinos en la D.O. Jumilla o Bullas (España). Las muestras de orujos se recogieron tras el proceso del prensado del mosto-vino en bodega y se llevaron inmediatamente al laboratorio para su congelación y posterior tratamiento de las mismas. El orujo congelado fue limpiado y separado cuidadosamente de las semillas y restos de pulpa de los hollejos.

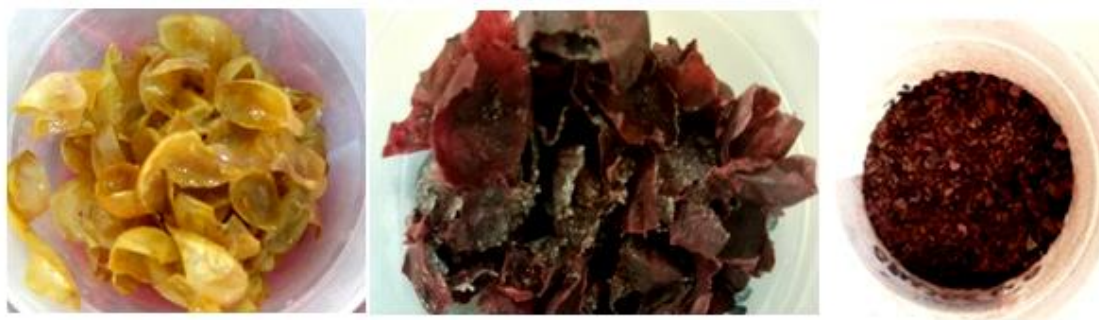
○ *Aislamiento del material de paredes celulares (PC) como residuo insoluble del etanol al 70%:*

Siguiendo el método propuesto por [De Vries et al. \(1981\)](#) y descrito por [Apolinar-Valiente et al. \(2010\)](#), los hollejos del orujo de uva se suspendieron en agua caliente durante 5 minutos y después se homogeneizaron. Una parte del material homogeneizado se mezcló con dos partes de etanol al 96% y se extrajo durante 30 min a 40°C. Los sólidos insolubles en alcohol se separaron por centrifugación (10.000 rpm, 5 minutos) y se extrajeron de nuevo con etanol al 70% durante 30 minutos a 40°C. El tratamiento de lavado con etanol al 70% se hizo varias veces hasta que se comprobó la ausencia de azúcares en la fase etanólica al 70%. Después, los sólidos insolubles en alcohol (SIA) se lavaron dos veces con alcohol al 96% y una vez con acetona, y finalmente se secaron en oscuridad con una corriente de aire a 20°C. Las paredes celulares fueron guardadas en oscuridad y en ausencia de humedad.

○ *Aislamiento de extracto procedente de orujos:*

Los hollejos procedentes de los orujos de uva fueron tratados dos veces con etanol al 70% o con una disolución de acetona:agua (2:1), y sometidos a agitación orbital a 150 rpm durante 24 horas para la extracción de compuestos fenólicos. Transcurrido el tiempo de extracción, el sobrenadante se separó y los hollejos fueron liofilizados y guardados en oscuridad y ausencia de humedad.

Figura 3.1 Orujos limpios y purificados con etanol al 70% y liofilizados.



3.1.2 Vinos a ensayar

En el primer capítulo se utilizó un vino Monastrell joven de la añada 2015.

En el segundo capítulo se trabajó con vinos tintos jóvenes de Monastrell, Cabernet Sauvignon y Merlot elaborados en la Estación Enológica de Jumilla de la añada de 2015, un vino de Monastrell (añada 2015) envejecido en barrica de roble francés durante tres meses y suministrado por la Bodega Cooperativa Nuestra Señora del Rosario.

En el tercer capítulo para el estudio de los componentes volátiles, se utilizó el mismo vino envejecido en barrica que en el segundo estudio, y para experimentar el efecto de los productos comerciales y experimentales en la reducción del nivel de aminas biógenas, ocratoxina A y metales pesados, al no existir muestras adecuadas, es decir, muestras con estos problemas, un vino joven Monastrell de 2015 (elaborado en la Estación Enológica de Jumilla) fue fortificado con patrones de estas sustancias, en cantidades conocidas.

En el capítulo cuarto se utilizó un vino joven de Monastrell del 2016 elaborado en la Estación Enológica de Jumilla y en el quinto y el último estudio, los vinos fueron elaborados en la Bodega Experimental de la Universidad de Murcia, un vino tinto joven y un rosado, respectivamente, de la variedad Monastrell de la añada de 2016.

3.1.3 Productos de afinado comerciales

Los productos comerciales utilizados en este trabajo (tabla 3.1) han sido suministrados por la empresa Agrovin, S.A. (Alcázar de San Juan, España), a excepción de la bentonita y el caseinato potásico que fueron suministrados por Enoproma, S.L. (Jumilla, España) y Laffort, S.A. (Bordeaux Codex, Francia) respectivamente.

Tabla 3.1 Características de los afinantes comerciales. (*) Dosis recomendada por el fabricante.

AFINANTE	Aspecto físico	Composición	Propiedades	DOSIS*
<i>Bentonita</i>	Granulado de color gris	Bentonita sódica activada	En forma granulada y libre de alérgenos	7,5 mg/hL
<i>Caseinato Potásico</i>	Polvo fino de color blanco	Origen vacuno. Albúmina de leche	Altamente puro	7,5 mg/hL
<i>Vinigel Seda</i>	Líquido transparente ligeramente viscoso	Origen porcino. Gelatina medianamente hidrolizada	Gelatina líquida. Libre de alérgenos.	30 – 80 mL/hL
<i>Vinigel Crystal</i>	Líquido transparente ligeramente viscoso	Origen porcino. Gelatina bajamente hidrolizada	Gelatina líquida. Libre de alérgenos.	30 – 80 mL/hL
<i>Vinigel Forte</i>	Granulado muy fino de color amarillo-ámbar	Origen porcino. Gelatina atomizada	Gelatina altamente hidrolizada	15 g/hL
<i>Vinigel Platinum</i>	Granulado de color amarillo-ámbar	Origen porcino. Alto peso molecular	Gelatina purificada y poco hidrolizada	10 g/hL
<i>Ovovin</i>	Blanco-cremosos de aspecto pulvurento	Origen aviar. Albúmina de huevo en polvo	Obtenida por desecación en torre de atomización de clara de huevo	15 g/hL
<i>Proveget 100</i>	Polvo fino color crema, ligero aroma vegetal	Origen vegetal procedente del guisante	Puro y libre de alérgenos	5 - 20 g/hL
<i>Super Bouquet</i>	Granulado color crema	Corteza de levaduras autolisadas	Rico en polisacáridos de levaduras. Alto contenido de manoproteínas solubles	20 – 50 g/hL
<i>Ictioclar</i>	Escamas de color blanco	Preparación de colágeno procedente de la vejiga natatoria de pescado	Colágeno de pescado purificado. Libre de alérgenos	3 g/hL
<i>Divergan - F</i>	Polvo fino de color blanco	PVPP	PVPP. Libre de alérgenos	30 g/hL

3.2 Diseño experimental

Para las experiencias de afinamiento, se realizaron dos tipos de ensayo:

1. A escala de laboratorio: se partió de 2,5 mL de vino en tubos de 3 mL de cierre hermético y este se mezcló con los afinantes comerciales a la dosis mínima y máxima recomendada por el fabricante (tabla 3.1), mientras que en el caso de las paredes celulares procedentes de orujo se usó una dosis de 13 mg/L.

También se preparó un vino control sin agentes afinantes y todos los tratamientos se prepararon por triplicado. A continuación, las diferentes muestras fueron agitadas en un agitador orbital a 300 rpm y a temperatura ambiente durante 90 min. Después de la reacción, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue concentrado en un centrivap (Labconco, USA) a 35°C durante 5 horas para su posterior purificación siguiendo el método propuesto por [Pastor del Río et al. \(2006\)](#) y análisis de taninos y antocianos de las muestras.

2. Simulación de las condiciones usadas en bodega: se usó un volumen de 100 mL de vino, el cual fue transferido a botellines de vidrio de 125 mL. En algunos ensayos el vino de partida ha sido fortificado con alguna de las sustancias objeto de estudio.

Los diferentes agentes afinantes (comerciales y los orujos purificados procedentes del hollejo de la uva) fueron añadidos y mezclados con el vino para asegurar una distribución homogénea de los mismos. Cada uno de los tratamientos ha sido realizado por triplicado. Para cada una de las experiencias se preparó un vino control o testigo al que no se añadió ningún agente afinante. Los afinantes comerciales se usaron a la dosis máxima recomendada por el fabricante (tabla 3.1), mientras que la dosis empleada con los orujos purificados fue de 6, 10 y 13 mg/mL según el ensayo.

Después de la homogeneización de los afinantes con el vino, el espacio de cabeza de los botellines se rellenó con nitrógeno gaseoso para evitar cualquier tipo de oxidación y crear así una atmósfera inerte. Las muestras se mantuvieron sin agitación, a temperatura ambiente, cubiertas con papel de aluminio y en oscuridad, para no sufrir degradaciones por la luz durante el tiempo de contacto, el cual osciló de 3 a 21 días según los experimentos realizados. Transcurrido este tiempo las muestras se filtraron con filtros de nylon 0,45 µm para su posterior análisis, en algunos casos si los análisis a realizar lo requerían se dejó muestra sin filtrar.

3.3 Determinación de los parámetros cromáticos del vino

Todos los parámetros cromáticos fueron medidos en un espectrofotómetro UV/visible Termo Spectronic modelo Helios Alpha (Termo Spectronic, Cambridge, Reino Unido).

El valor de la *intensidad de color* se determinó mediante la suma de las absorbancias a 620 nm (componente azul), 520 nm (componente roja) y 420 nm (componente amarilla) del vino sin diluir (Glories, 1984). El tono se calcula como el cociente entre las absorbancias a 520 y 420 nm (Sudraud, 1958).

El valor de los *antocianos totales* se midió mediante la adición de 0,5 mL de vino a 25 mL de HCl 0,1 N. Transcurridos 30 minutos se mide el valor de la absorbancia a 520 nm en cubetas de 1 cm (Cayla et al., 2002). Para la determinación de los *antocianos poliméricos*, 160 μL de SO_2 al 5% se añadieron a 2 mL de vino, se agitó y tras 1 minuto se midió la absorbancia a 520 nm en cubetas de 0,2 cm de paso óptico. La concentración de antocianos poliméricos se expresa en mg/L de malvidina-3-glucósido (peso molecular 529 y coeficiente de extinción molar $28000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

El *índice de polifenoles totales* se obtiene por lectura de la absorbancia a 280 nm con cubetas de 1 cm de paso óptico de adicionar 0,25 mL de vino a 25 mL de agua destilada (Ribéreau-Gayon et al., 1983).

Para la determinación de taninos totales se han utilizado dos métodos de medida:

- Método propuesto por Ribéreau-Gayon et al. (1998): se utilizan dos muestras conteniendo cada una 4 mL de vino (dilución 1:50), 2 mL de agua y 6 mL de HCl (12N). Una de ellas se calienta en un baño de aceite a 100°C durante 30 minutos y después se le adiciona 1 mL de etanol (95%) para solubilizar el color rojo aparecido. La otra muestra (referencia) no se calienta en el baño y se le adiciona también 1 mL de etanol (95%). Se miden los incrementos de absorbancia de la muestra con y sin calentamiento a 420, 470 y 520 nm con cubetas de 1 cm de paso óptico. Se obtiene, 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 proantocianidinas, ya que, en función de las sustancias parasitarias, la reacción se amplifica hacia longitudes de onda mayores (malva), o hacia longitudes de onda cortas (naranja-amarillo).
- Determinación de taninos por precipitación con metil-celulosa (MC) (Smith, 2005): a 50 μL de vino se le adicionan 600 μL de una solución de MC (0,04%), se deja reposar 2-3 minutos y a continuación se le adicionan 400 μL de una solución

saturada de sulfato de amonio y 800 μ L de H₂O. La muestra se agita y se deja reposar 10 minutos. Después se centrifuga a 10.000 rpm durante 5 minutos y se mide la absorbancia a 280 nm. Una muestra control sin metil-celulosa es requerida para determinar la absorbancia correspondiente a los taninos. La concentración de estos compuestos se expresa en mg/L utilizando la (-)-epicatequina (Extrasynthèse, Genay, Francia) como patrón externo.

3.4 Determinaciones en vino por cromatografía líquida en fase reversa

3.4.1 Análisis de taninos por fluoroglucinolisis

La determinación de proantocianidinas en el vino requiere una preparación previa del mismo (Pastor del Río et al., 2006). Para ello, se evaporan 4 mL de vino en un concentrador Centrivap (Labconco, USA), y después se redisuelve el extracto seco en 2 mL de agua para pasarlo por un cartucho Sep-Pak-C18 (1 g, Waters, Mildford, USA) previamente activado con 10 mL de metanol seguido de 15 mL de agua. Después de pasar la muestra por el cartucho, éste se lava con 15 mL de agua y los compuestos de interés se eluyen con 10 mL de metanol. El extracto metanólico se evapora y el residuo seco se redisuelve en 0,4 mL de metanol para el análisis de taninos por fluoroglucinolisis y por cromatografía de exclusión por tamaño.

Para llevar a cabo la reacción de la fluoroglucinolisis se ha utilizado el método descrito por Kennedy & Taylor (2003), y optimizado por Busse-Valverde et al. (2010). El extracto metanólico reacciona con el reactivo de fluoroglucinolisis (HCl 0,2 N en metanol, conteniendo 100 g/L de fluoroglucinol y 20 g/L de ácido ascórbico) en proporción 1:1 en un baño de agua durante 20 minutos a 50°C y después se combina con 2 volúmenes de acetato sódico 200 mM para parar la reacción. Para analizar los aductos del fluoroglucinol, las muestras son centrifugadas durante 10 minutos a 10.000 rpm y colocadas en viales para su posterior análisis.

La separación de los productos de reacción (unidades terminales y aductos con el fluoroglucinol) se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido Waters 2695 (Waters, PA, USA), equipado con un detector diodo-array Waters 2696. La columna utilizada fue una Atlantis C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m de tamaño de partícula) protegida con una precolumna del mismo material (20 x 4,6 mm, 5 μ m de tamaño de partícula) (Waters, Milford, MA). El volumen de muestra inyectado fue de 10 μ L, y la temperatura de 30°C. Los disolventes utilizados son

ácido fórmico al 2% (A) y una mezcla de acetonitrilo/H₂O/fórmico (B) (80:18:2) con un flujo de 0,8 mL/min. Las condiciones del gradiente comienzan con 0% B durante 5 min, un gradiente lineal de 0 a 10% B en 30 min y un gradiente lineal de 10 a 20% B en 30 min. Después la columna se lava con 80% de B durante 10 min y se reequilibra con 0% B durante 20 min antes de la siguiente inyección.

Los diferentes compuestos han sido identificados a 280 nm y los productos de ruptura se estiman usando sus factores de respuesta relativos a la catequina (Extrasynthèse, Genay, Francia), que se usa como patrón de cuantificación.

Mediante este análisis se puede determinar tanto el grado medio de polimerización de los taninos, como el porcentaje de cada unidad constitutiva. Así, el grado medio de polimerización de los taninos es obtenido mediante el cociente entre la suma de todas las subunidades (monómeros y aductos del fluoroglucinol, en moles) y la suma de todos los monómeros (en moles) y el porcentaje de galoilación, como la suma de los porcentajes de unidades galoiladas.

3.4.2 Análisis de antocianos

El aislamiento de los antocianos monoméricos por cromatografía líquida en los vinos se realiza según el método descrito por [Cano-López et al. \(2006\)](#). La identificación y cuantificación de estos compuestos se hace por inyección directa del vino previamente filtrado en un cromatógrafo líquido de alta resolución descrito anteriormente. La columna utilizada es una Licrochart RP-C18 (Merck, Darmstadt, Alemania) 25 x 0,4 cm de 5 µm de tamaño de partícula). El volumen de la muestra inyectada fue de 20 µL. Los disolventes utilizados han sido ácido fórmico al 4,5% y acetonitrilo, con un flujo de 0,8 mL/min. Las condiciones de gradiente utilizadas fueron las propuestas por [Busse-Valverde et al. \(2011\)](#). Los diferentes compuestos se identificaron a 520 nm comparando sus espectros con los indicados en la bibliografía ([Cano-López et al., 2006](#); [Chinnici et al., 2009](#); [Boido et al., 2006](#); [Alcalde-Eon et al., 2006](#)). La cuantificación de los antocianos se realizó utilizando cloruro de malvidina-3-glucósido (Extrasynthèse, Genay, Francia) como patrón externo.

3.4.3 Análisis de aminas biógenas

Se utilizó el método descrito por [Gómez-Alonso et al. \(2007\)](#) basado en la reacción de derivatización con etoximetilmenmalonato (DEMM). Primeramente, 1 mL de la muestra se mezcló con 1,75 mL de tampón borato a pH 9, 750 μ L de metanol, y 30 μ L de DEMM, en un vial con cierre hermético durante 30 minutos en un baño de ultrasonidos. Después, las muestras fueron calentadas a 70°C durante dos horas para completar la degradación del exceso de DEMM y la formación de los productos derivatizados.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con el mismo equipo de HPLC descrito anteriormente. La columna de separación fue una ACE (5 C18-HL, Aberdeen, Escocia), 250 mm \times 4,6 mm y 5 μ m de tamaño de partícula, operando a temperatura ambiente. Los disolventes usados fueron un tampón acetato 25 mM y pH 5,8 con 0,02% de azida sódica y una mezcla de acetonitrilo y metanol (80:20) con un flujo de 0,9 mL/min. La identificación y cuantificación de las aminas biógenas se realizó a 280 nm usando su respectivo patrón externo (Merck, Darmstadt, Alemania & Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.4.4 Análisis de ocratoxina A

El análisis de ocratoxina A en vinos se llevó a cabo siguiendo la metodología empleada por [Castellari et al. \(2001\)](#) con algunas modificaciones.

El método de análisis está basado en la extracción de la micotoxina de los alimentos y su posterior purificación y concentración mediante columnas de inmunoafinidad, que contienen anticuerpos específicos para la ocratoxina A (columnas de inmunoafinidad Ochraprep, R-BiopharmRhone). Seguidamente, se lleva a cabo su identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia, en condiciones selectivas de excitación y emisión.

Para su determinación se parte de una muestra de vino de 10 mL, y se ajusta a un pH 7,8 usando NaOH 2 M, posteriormente se diluye con 10 mL de PBS (tampón fosfato pH 7,4) y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos. Después la muestra es añadida a las columnas de inmunoafinidad, con un flujo de 2-3 mL/min usando una cámara de vacío. Una vez está seca la muestra sobre la columna tras la aplicación de vacío, es lavada con 20 mL de PBS a un flujo de 5 mL/min hasta sequedad. La elución se realiza sobre un vial ámbar con 1,5 mL de la solución de desorción (metanol:ácido acético 98:2 v/v) y posteriormente con 1,5 mL de agua para tener un volumen final de 3 mL.

La ocratoxina es identificada y cuantificada por fase reversa y detectada mediante fluorescencia, usando el mismo cromatógrafo descrito anteriormente equipado con un detector de fluorescencia Waters 2475. La separación cromatográfica fue realizada con una columna Cortecs C18, 75 x 4,6 mm y un tamaño de partícula de 2,7 μm (Waters, Milford, MA, USA). La fase móvil utilizada está formada por acetonitrilo:ácido acético:agua (51:2:47 v/v/v) y la elución se realiza a un flujo de 1 mL/min en régimen isocrático. La longitud de onda de excitación fue de 333 nm y la de emisión de 443 nm. El volumen de inyección fue de 100 μL . La cuantificación de la OTA se llevó a cabo usando un patrón externo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.5 Determinaciones en vino por cromatografía líquida de exclusión por tamaño

3.5.1 Análisis de taninos

El método descrito por [Kennedy y Taylor \(2003\)](#) ha sido utilizado para la cromatografía de exclusión por tamaño, el cual proporciona información sobre la distribución de masa de los taninos. El método para el análisis de las proantocianidinas consiste en 2 columnas de gel, 300 x 7,5 mm, 5 μm , de 500 Å (rango de masa molecular efectivo de hasta 4000 utilizando patrones de poliestireno) y de 100 Å (rango de masa molecular efectivo de 500-30000 utilizando patrones de poliestireno) conectadas en serie y protegidas por una precolumna del mismo material (50 x 7,5 mm, 5 μm), todo ello adquirido de PolymerLabs (Amherst, MA, USA). El volumen de inyección de la muestra diluida (1:3) fue de 20 μL . El método isocrático utiliza una fase móvil constituida por N, N-dimetilformamida conteniendo 1% de ácido acético glacial, 5% de agua y cloruro de litio 0,15 M. El caudal es de 1 mL/min y la temperatura de la columna de 60°C. La elución fue monitorizada a 280 nm.

3.5.2 Análisis de polisacáridos

La distribución de los pesos moleculares de los polisacáridos liberados por los orujos purificados se ha determinado por cromatografía de exclusión por tamaño según el método propuesto por [Apolinar-Valiente et al. \(2013\)](#). Para ello, 2,5 mL de vino modelo enriquecido en polisacáridos se evaporaron, y a continuación fueron redissueltos en 1 mL de agua MiliQ y se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 rpm para su análisis. El volumen de muestra inyectada fue de 50 μL , el cual es diluido con un caudal de 1 mL/min

de LiNO_3 0,1 M, pasando por dos columnas Shodex Ohpak KB-803 y KB-805 (0,8 x 30 cm, Showa Denkko, Japón) montadas en serie y conectadas a un detector de tipo refractómetro, Waters 2414. Las masas molares aparentes se determinan a partir de una curva de calibración, establecida con un kit de calibración Pullulan (rango de masa 380000-5800, Showa Denko K.K., Japón).

3.6 Determinación de compuestos volátiles en vino por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas

Las muestras son analizadas por cromatografía de gases-espectrometría de masas (Gómez-Plaza et al., 2012) usando para ello un equipo HP 5890 CG acoplado a un espectrómetro de masas simple cuadrupolo HP 5972 (Agilent Technologies, CA, USA). La preparación de las muestras es muy sencilla, siendo necesario 10 mL de vino, 3 g de NaCl y 10 μL de patrón 2-octanol (250 $\mu\text{g/L}$). Las inyecciones se hacen en modo splitless. Se utiliza una columna capilar HP Innowax 30M (50 m x 0,32 mm, 0,25 μm de grosor, Agilent Technologies, CA, USA) para el análisis. La identificación de los picos es llevada a cabo por la comparación del espectro de masas con una librería (Wiley 6.0) y comparando los índices de retención calculados con los publicados en la bibliografía. Los datos semicuantitativos son obtenidos calculando el área relativa del pico (o señal TIC) en relación al patrón interno. Las muestras son analizadas por triplicado y la concentración de cada uno de los compuestos volátiles es calculada realizando la media.

Figura 3.2 Muestras para la determinación de aromas.



3.7 Determinación de minerales por espectroscopía de plasma ICP-OES

Para comparar la composición de metales antes y después del tratamiento del vino con los diferentes agentes afinantes, las muestras se analizaron por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (Agilent 7900, Tokio, Japón). Las muestras fueron previamente diluidas (1:10, v/v) usando HNO₃ al 2%. Las curvas de calibrado usadas para Na, K, Mg, S, Ca y P, fueron realizadas hasta 100 ppm, y para los elementos minoritarios, Fe, Mn, Cu, Zn, Al y B, hasta 1 ppm. Las condiciones de trabajo del equipo son detalladas en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Parámetros de medición de ICP-OES.

	Ajustes
Energía	1,55 KW
Flujo del plasma	15,0 L/min
Flujo del gas auxiliar	0,90 L/min
Tipo de cámara de pulverización	Tipo Scott de doble paso (cuarzo)
Antorcha	Cuarzo (2,5 mm diámetro interno del inyector)
Tipo de nebulizador	Micro niebla
Flujo del gas de nebulización	1,05 L/min
Tiempo de lectura entre réplicas	0,2 s
Número de réplicas	3
Tiempo de retraso de la muestra	40,0 s
Estabilización	30,0 s
Tiempo de enjuague	10,0 s
Tiempo rápido	on
Corrección de fondo	ajustada

3.8 Análisis de los componentes de las paredes celulares

Los componentes de las paredes celulares fueron determinados con los siguientes análisis, ya descritos en estudios previos (Apolinar-Valiente, et al., 2015a; Apolinar-Valiente et al., 2017). Todas las medidas fueron realizadas en un espectrofotómetro UV/visible Termo Spectronic modelo Helios Alpha (Termo Spectronic, Cambridge, Reino Unido).

3.8.1 Determinación de proteínas

Se pesaron aproximadamente 10 mg de pared celular en un tubo eppendorf con rosca y se añadió 1 mL de NaOH 1 N. La muestra se mantuvo 10 minutos a 100°C en un baño de aceite y a continuación, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. A 30 µL del sobrenadante se le añadieron 2,37 mL de agua destilada y 0,6 mL de reactivo Bradford (Bio-Rad, Munich, Alemania). Las muestras se agitaron y después de 15 min se midió la absorbancia a 595 nm. Las muestras son estables durante 2 horas.

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

3.8.2 Determinación de compuestos fenólicos

A 10 mg de pared celular en un tubo eppendorf con rosca, se le agregó 1 mL de NaOH 1 N, dejando la muestra 10 minutos a 100°C en un baño de aceite. Después, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Se mezclaron 30 µL del sobrenadante, 120 µL de NaOH 1 N, 2,73 mL de agua destilada y 120 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac, Barcelona, España) diluido con agua destilada, (1:2, v/v). Las muestras se agitaron, se dejaron reposar 1 hora y se midió la absorbancia a 700 nm.

El ensayo se calibró con una curva estándar de ácido gálico (500 µg/mL) dando una concentración final en 920 µL entre 0 y 16,3 µg/mL.

3.8.3 Determinación de azúcares neutros

La determinación de los azúcares se realiza con prehidrólisis de la muestra, dependiendo de la fracción que se desee analizar, la de los polisacáridos no celulósicos o la de la celulosa y otros polisacáridos.

- La prehidrólisis se realiza con 10 mg de pared celular en un tubo de pyrex cerrado herméticamente al que se le añaden 0,45 mL de H₂SO₄ al 72%, se agita y se introduce en un baño a 30°C durante una hora. Esto se realiza para hidrolizar los enlaces glucosídicos fuertemente unidos de la celulosa, también se denomina "hidrólisis de Saeman".

- La hidrólisis tiene lugar una vez enfriados los tubos, para ello se añaden al tubo de pyrex 4,95 mL de agua destilada, se agita y se introduce en un baño de aceite durante 3 horas a 100°C. A continuación, se deja enfriar toda la noche a temperatura ambiente, se traspasa el sobrenadante a un eppendorf y se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos. Quedando así el sobrenadante para analizar ácidos urónicos y azúcares libres totales, y el residuo seco para la determinación de lignina.

3.8.3.1 Azúcares libres totales

Esta determinación se llevó a cabo con un kit enzimático de determinación de D-Glucosa de R-biopharm (Darmstadt, Alemania) una vez hecha la prehidrólisis, más la hidrólisis, mencionadas anteriormente ([Castro-López et al., 2016](#)).

3.8.3.2 Azúcares no celulósicos

El análisis se realiza teniendo lugar la hidrólisis durante 3 horas, a 100°C en el baño de aceite, y utilizando el sobrenadante, bien centrifugado, seguido de la utilización del kit enzimático de determinación de D-Glucosa de R-biopharm (Darmstadt, Alemania) ([Castro-López et al., 2016](#)).

3.8.4 Determinación de ácidos urónicos

Para la determinación de los ácidos urónicos se utilizó el método propuesto por [Scott \(1979\)](#). Se basa en la reacción para formar un compuesto coloreado entre el ácido 5-formil-2-furanoico y el 3,5-dimetilfenol. El ácido 5-formil-2-furanoico se forma a partir de los ácidos urónicos en medio ácido sulfúrico caliente. Para ello, en un tubo de ensayo hermético se dispusieron 250 µL de muestra proveniente de la hidrólisis de Saeman. A continuación, se le añadió 4 mL de ácido sulfúrico concentrado frío y se agitó. La muestra se dejó enfriar y se traspasó a un baño a 70°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se deja enfriar a temperatura ambiente. Después se adicionaron 200 µL de 3,5-dimetilfenol formándose un compuesto coloreado durante 15 minutos en reposo a temperatura ambiente.

La absorbancia de la muestra se determinó por diferencia de las absorbancias medidas a 450 nm y a 397 nm. La lectura a 397 nm se realiza para corregir la interferencia producida por los azúcares neutros. Para obtener el blanco se sustituyó la muestra por agua.

El ensayo se calibró con una disolución de ácido D-(+)-galacturónico monohidrato de 500 $\mu\text{moles/L}$. Se prepararon diluciones para obtener concentraciones entre 0 y 500 $\mu\text{moles/L}$. Un volumen de 250 μL de cada una de estas disoluciones se sometió al análisis y se midió su absorbancia frente a un blanco.

3.8.5 Determinación de lignina

La determinación de lignina se realiza gravimétricamente como lignina Klason (lignina insoluble en ácido). El material insoluble proveniente de la prehidrólisis más la hidrólisis mencionado en el apartado de determinación de azúcares neutros, se obtiene por filtración a vacío a través de un filtro de teflón previamente pesado y humedecido con etanol, donde se deposita la muestra y se lava exhaustivamente con agua caliente (85°C) hasta que quede libre de ácido sulfúrico de la hidrólisis, comprobando esto con papel indicador de pH. La muestra se seca en un horno a 105°C durante 5 días. El peso del residuo se registra como lignina Klason.

3.9 Determinación de la turbidez de los vinos

La turbidez es la expresión de la propiedad óptica de la muestra que causa que los rayos de luz sean dispersados y absorbidos en lugar de ser transmitidos en línea recta a través de la muestra. La turbidez en el vino es causada por la presencia de partículas suspendidas y disueltas de gases, líquidos y sólidos, tanto orgánicos como inorgánicos, con un ámbito de tamaños desde el coloidal hasta partículas macroscópicas.

La turbidez (UNT) se midió a partir de 27 mL de vino sin centrifugar usando un turbidímetro Hach 2100N (Düsseldorf, Alemania).

3.10 Análisis del volumen de heces

El análisis del volumen de heces se llevó a cabo según la metodología propuesta por [Bindon y Smith \(2013\)](#). A 0,1 g de orujos se le añadió 10 mL de una disolución hidroalcohólica (15% etanol y 0,01% de ácido trifluoroacético) en un tubo de ensayo de medición y cierre hermético. Se mezcla y se deja sedimentar durante 24 h a 4°C. Se mide el volumen del material seco antes de la adición de la disolución hidroalcohólica y el de los sólidos sedimentados.

3.11 Análisis sensorial

La prueba sensorial que se llevó a cabo fue una cata descriptiva, en la que los atributos a valorar fueron la intensidad y la calidad del aroma y el gusto, junto con la astringencia y el color. Los vinos fueron catados por un panel de 6 catadores expertos pertenecientes a la Universidad de Murcia, quienes cuantificaron la magnitud de estas características de los vinos a describir.

Para la cata de los vinos, estos se dejaron atemperar 30 min y fueron presentados de forma aleatoria a los catadores. Antes de la cata, cada una de las tres réplicas obtenidas para un mismo vino, se mezclaron para tener una muestra más representativa.

El tratamiento de los resultados se hizo teniendo en cuenta todos los valores, para cada uno de los parámetros a estudiar, de los diferentes jueces, y se realizó una media de los mismos, para disponer los resultados en gráficos de araña e ilustrar así las evaluaciones de los diferentes atributos.

3.12 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 (Least Significant Difference).

Los análisis multivariantes que se han utilizado en este estudio incluyen el análisis multivariable de la varianza, conocido como MANOVA (Multivariate Analysis of Variance). Otro de los análisis realizados es el análisis discriminante y componentes principales que

son unas técnicas de reducción de la información disponible cuando se disponen de muchas observaciones.

Todos los análisis estadísticos se han realizado utilizando el paquete informático Statgraphics Centuriun XVI (Statpoint Technologies INC., Warrenton, UA, USA). Intentando 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.



4. RESULTADOS

4.1 AFINAR VINOS TINTOS CON PAREDES CELULARES DE ORUJOS: EFECTO EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL VINO. PRIMEROS ENSAYOS

4.1.1 Introducción

Tal y como previamente se ha comentado, diferentes agentes afinantes se han utilizado en los vinos con diferentes finalidades. La diferente naturaleza de estos compuestos hace que su forma de interactuar con los componentes del vino sea distinta. En un primer paso, nuestro interés fundamental se centra en el estudio de las interacciones de estos diferentes agentes con los compuestos fenólicos del vino. En el caso de los agentes afinantes proteicos, su composición y su peso molecular influyen sobre el tipo de compuestos fenólicos con los que interactúan (Cosme et al., 2007, 2009), y por ello, en este primer estudio se han utilizado tres afinantes proteicos que difieren en origen y características: una proteína de origen vegetal derivada del guisante (Proveget 100), y dos gelatinas líquidas de origen porcino, Vinigel Seda con un grado medio de hidrólisis y un peso molecular medio, y Vinigel Cristal con bajo grado de hidrólisis y peso molecular alto. Las proteínas que componen estos agentes pueden interactuar con los antocianos y taninos en varias etapas, pudiéndose unir de forma inicial mediante enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, para formar después agregados, complejos de proteínas y taninos, que finalmente por vía coloidal precipitan.

Otros de los afinantes usados, y que se emplean en la industria enológica, pero que no tienen una composición basada en proteínas, son los derivados de levaduras. En este ensayo se empleó Super Bouquet, el cual está constituido por levaduras autolisadas desactivadas por calor con un porcentaje de 18-22% de polisacáridos en su composición. Esto le permite interactuar con los compuestos fenólicos del medio, aunque también la

presencia de poros en las paredes celulares de estos derivados de levaduras puede contribuir al descenso del contenido de estos compuestos en el medio.

Una alternativa a todos ellos son las paredes celulares purificadas de orujos de uva, con una estructura y composición compleja que permiten establecer numerosos tipos de interacciones con los compuestos polifenólicos del vino. La interacción de los taninos con las paredes celulares de los orujos (PCO) parece ser rápida. [Bautista-Ortín et al. \(2015b\)](#) estudiaron este comportamiento y comprobaron que las PCO tienen una afinidad elevada con los taninos, e incluso estas podrían reducir la astringencia causada por un exceso de taninos en el vino. También [Bautista et al. \(2016b\)](#) observaron que tenían un comportamiento similar con los antocianos, ya que, tras una interacción de 90 minutos con el vino, eran capaces de retener casi un 50% de los antocianos del medio.

Para asegurar el uso potencial de las PCO como material alternativo para el proceso de afinamiento se usaron paredes celulares aisladas y purificadas de orujos de dos variedades, Monastrell y Cabernet Sauvignon. Además, para identificar los posibles cambios que sufre la composición de PCO durante diferentes condiciones de fermentación y como esto afecta a su capacidad para interactuar con los compuestos fenólicos del vino, se aislaron los orujos tanto después de una vinificación estándar como de otra donde se añadió una enzima, teniendo así cuatro tipos de orujos diferentes.

4.1.2 Breve descripción de la experiencia

Este ensayo se llevó a cabo a escala de laboratorio utilizando 2,5 mL de un vino tinto joven de Monastrell del año 2015. Los afinantes comerciales se aplicaron a la dosis mínima y máxima recomendada por el comercial, mientras que PCO se usaron a una dosis de 13 mg/mL de vino. El ensayo se realizó en tubos de 3 mL, que fueron sometidos a agitación orbital a 200 rpm durante 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y también se preparó un vino control sin agente afinante. Transcurrido este tiempo las muestras de vino fueron filtradas, concentradas y purificadas para su posterior análisis e identificación de los diferentes compuestos fenólicos por HPLC y cromatografía de exclusión por tamaño.

4.1.3 Resultados y discusión

Como se ha comentado anteriormente, el material de paredes celulares usado en este experimento fueron paredes celulares purificadas de Monastrell y Cabernet Sauvignon procedentes de los orujos obtenidos después de una vinificación control (PCO1) y de una vinificación donde se usó una enzima durante la maceración (PCO2). Los datos de la composición de las PCO pueden ser encontrados en [Apolinar-Valiente et al. \(2015a\)](#) y se reproducen en la tabla 4.1.1, asimismo se pueden comparar con los datos de la composición de las paredes celulares purificadas de uva fresca y observar que la composición de carbohidratos no cambia significativamente con el procesado. Cuando la composición de las PC de los orujos se compara con la de las uvas frescas, solo se observa un pequeño descenso en el contenido de celulosa y de ácidos urónicos en los PCO cuando se utiliza la enzima durante la maceración. Esto último coincide con los hallazgos de [Guerrero et al. \(2013\)](#), quienes también encontraron que la composición que presentan las paredes celulares de los orujos es bastante similar a la de la uva fresca.

Tabla 4.1.1 Análisis multifactorial de la varianza sobre la composición de los componentes mayoritarios de las paredes celulares procedentes de la uva fresca y de los orujos purificados de los hollejos de Monastrell y Cabernet Sauvignon expresados como mg/mg de pared celular.

Variedad	Proteína	PT	Lignina	Celulosa	AU	AZ Totales
PC MO	114,8 a	126,3 a	270,2 a	97,2 a	104,7 a	300,4 a
PCO1 MO	115,6 a	139,4 b	375,2 ab	110,4 a	120,3 a	335,4 a
PCO2 MO	113,7a	130,3 ab	470,8 b	112,3 a	103,9 a	318,6 a
PC CS	104,7 a	135,4 a	581,3 b	120,0 b	120,4 c	325,7 b
PCO1 CS	109,1 ab	151,4 a	449,0 ab	85,7 a	95,8 b	266,0 a
PCO2 CS	113,1 b	171,9 b	434,2 a	83,4 a	82,2 a	245,0 a

Abreviaciones: PT: polifenoles totales, AU: ácidos urónicos, AZ: azúcares; MO: Monastrell; CS: Cabernet Sauvignon), PCO MO/CS: paredes celulares aisladas de los orujos de Monastrell/Cabernet Sauvignon de una vinificación control (1) y una vinificación donde se usó una enzima durante la maceración (2). Letras diferentes en una misma columna y para cada variedad significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD ([Apolinar-Valiente et al., 2015](#)).

4.1.3.1 Evolución del contenido y composición de los antocianos con el uso de los diferentes agentes afinantes

Los diferentes agentes afinantes se aplicaron a un vino tinto de Monastrell y su efecto sobre la composición de los antocianos puede observarse en la tabla 4.1.2.

Todos los tratamientos produjeron una reducción en la composición de antocianos, en un rango entre 25-68%. La retención más baja se observó cuando el vino fue tratado con V.Seda y la más alta cuando fue tratado con las PCO1 de Monastrell, PCO2 de Cabernet Sauvignon y S.Bouquet2.

Con relación a las dos gelatinas, el bajo grado de hidrólisis y el alto peso molecular de V.Cristal comparado con V.Seda produce un mayor descenso de antocianos en el vino, mientras que el uso de proteína del guisante dio lugar a valores intermedios entre las dos gelatinas. No se encontró ninguna diferencia debido a la dosis utilizada. Otros autores también han expuesto que las interacciones entre agentes afinantes proteicos y los polifenoles pueden afectar al color de los vinos tintos jóvenes, debido a la adsorción y precipitación de los pigmentos del vino ([Castillo-Sánchez et al., 2006](#); [Castillo-Sánchez et al., 2008](#)), aunque contrariamente a nuestros resultados, [González-Neves et al. \(2014\)](#) establecieron que el contenido de antocianos decrecía ligeramente con el uso de las gelatinas y no se veía afectado por el uso de proteínas vegetales en la mayoría de los vinos que ellos estudiaron.

Es interesante señalar que S.Bouquet produjo un alto descenso de antocianos, similar al observado con el uso de las paredes celulares de los orujos. Las manoproteínas han sido normalmente consideradas como agentes estabilizantes fenólicos. Sin embargo, [Guadalupe y Ayesterán \(2008\)](#) ya observaron que el uso de manoproteínas comerciales en situaciones reales de vinificación no mantuvieron los polifenoles en dispersión coloidal, y los vinos jóvenes elaborados a los que se les añadió estas manoproteínas presentaron bajos valores de color al final de la fermentación. En otro estudio, [Guadalupe et al. \(2007\)](#) mostraron otra vez que la adición de manoproteínas comerciales a mostos de Tempranillo condujo a valores más bajos en la intensidad de color con respecto a los vinos controles (sin manoproteínas). Todos estos resultados coinciden con los obtenidos en este estudio.

Tabla 4.1.2 Concentración de los antocianos (mg/L) en el vino antes y después del tratamiento con los diferentes agentes afinantes.

MUESTRAS	Del-Glu	Cian-Glu	Pet-Glu	Peon-Glu	Malv-Glu	AC	AT	%Adsorción*
Vino	49,4 h	14,2 e	75,2 f	41,6 g	322,4 e	89,8 g	592,6 f	
Vino + V.Seda1	36,5 f	9,7 d	55,1 de	31,2 f	241,5 d	68,7 f	442,7 e	25,3
Vino + V.Seda2	36,5 f	9,9 d	55,4 e	30,4 f	237,1 d	67,4 ef	436,7 e	26,3
Vino + V.Cristal1	29,1 cde	7,8 bcd	43,5 c	25,2 cdef	196,0 cd	56,5 de	358,1 cd	39,6
Vino + V.Cristal2	25,8 cd	7,5 bc	39,0 bc	22,0 bcde	171,4 bc	48,7 cd	314,4 c	46,9
Vino + Proveget1	31,7 ef	8,9 cd	46,9 cde	26,9 ef	206,4 cd	59,3 fg	380,1 de	35,9
Vino + Proveget2	30,6 de	8,6 cd	45,4 cd	25,7 def	200,4 cd	57,1 ef	367,9 cd	37,9
Vino + S.Bouquet1	20,3 ab	6,1 ab	30,4 ab	17,8 abc	129,9 ab	40,4 bc	245,0 ab	58,6
Vino + S.Bouquet2	17,2 a	5,3 a	25,5 a	14,4 ab	109,1 a	34,1 ab	205,6 a	65,3
Vino + PCO1 MO	16,1 a	5,2 a	24,3 a	14,2 a	101,1 a	25,9 a	186,9 a	68,5
Vino + PCO2 MO	19,7 ab	5,9 ab	30,3 ab	18,6 abcd	130,1 ab	30,7 a	235,2 a	60,3
Vino + PCO1 CS	24,8 bc	7,4 bc	38,9 bc	23,8 cdef	172,4 bc	39,4 b	306,8 bc	48,2
Vino + PCO2 CS	24,1 bc	4,6 a	25,1 a	28,8 ef	108,9 a	40,3 b	231,9 a	60,9

Abreviaturas: *Calculado sobre el contenido de antocianos totales en el vino antes y después del uso de los agentes afinantes. Del-Glu: delphinidina-3-glucósido, Cian-Glu: cianidina-3-glucósido, Pet-Glu: petunidina-3-glucósido, Peon-Glu: peonidina-3-glucósido, Malv-Glu: malvidina-3-glucósido, AC: suma de antocianos acilados, AT: antocianos totales, V.Seda: Vinigel Seda usado a la dosis mínima (1, 30 mL/hL) y máxima (2, 80 mL/hL), V.Cristal: Vinigel Cristal usado a la dosis mínima (1, 30 mL/hL) y máxima (2, 80 mL/hL), Proveget: Proveget 100 usado a la dosis mínima (1, 5 g/hL) y máxima (2, 20 g/hL), S.Bouquet: Super Bouquet usado a la dosis mínima (1, 20 g/hL) y máxima (2, 50 g/hL), PCO MO/CS: paredes celulares aisladas de los orujos de Monastrell/Cabernet Sauvignon de una vinificación control (1) y una vinificación donde se usó una enzima durante la maceración (2). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

En lo que respecta al efecto de las paredes celulares sobre la concentración de antocianos, el valor decrece sustancialmente. [Guerrero et al. \(2013\)](#) también observaron que los antocianos interactúan con las paredes celulares, sugiriendo que esta reacción fue en dos etapas, inicialmente uniéndose a la estructura polisacárida por vía iónica e interacciones hidrofóbicas, adicionándose una siguiente capa de antocianos a esta estructura, implicando el apilamiento de más antocianos sobre esta primera. Comparando el efecto de las PCO de las dos variedades, la retención de antocianos es menor cuando se usó PCO1 CS, mostrando que PCO1 MO tiene una afinidad ligeramente mayor por los antocianos. Estudios anteriores de [Bautista et al. \(2016b\)](#) mostraron que la reacción entre las paredes celulares de uva Monastrell y los antocianos disueltos en una disolución modelo disminuían a la mitad la concentración de antocianos en la disolución. Relacionado con estos hallazgos, [Guerrero et al. \(2013\)](#) expusieron que la aplicación de las PCO durante la fermentación o en vinos muy jóvenes, con un alto ratio antocianos/pigmentos poliméricos, producían una reducción de los antocianos que podría ser perjudicial para la estabilidad futura del color del vino, por lo que el uso de las PCO como afinantes podrían no ser aconsejables antes de que los aductos estabilizadores del color se hayan desarrollado en el vino.

No se observó prácticamente ninguna diferencia en cuanto a la preferencia por el tipo de antociano. Las proteínas no mostraron ninguna preferencia por ningún tipo de antociano, ni tampoco lo hizo S.Bouquet. Contrario a esto, [Morata et al. \(2003\)](#) encontraron que los antocianos acilados (compuestos acetilados y *p*-cumáricos) fueron más fuertemente adsorbidos por las paredes celulares de las levaduras que los derivados no acilados y que la peonidina-3-glucósido fue también adsorbida más fuertemente. Sin embargo, ellos también observaron grandes diferencias en los niveles de adsorción y preferencias dependiendo de la cepa de levadura utilizada. Las PCO de Monastrell mostraron una adsorción ligeramente más alta de los antocianos acilados, aunque las diferencias no fueron muy pronunciadas.

4.1.3.2 Evolución del contenido y composición de los taninos con el uso de los diferentes agentes afinantes

Los resultados encontrados en el análisis de taninos se muestran en la tabla 4.1.3. La concentración de taninos en vino, medida con el método de la fluoroglucinolisis, fue 1043 mg/L. En todos los casos, la adición de agentes afinantes produce una reducción del contenido de taninos. De nuevo, V.Seda da lugar al menor descenso (30-35%), mientras que el uso de V.Cristal dio lugar a un descenso del 44-50%. Estudios previos han comprobado que el grado y la capacidad de eliminar taninos depende directamente de

algunas características químicas de la proteína, como la distribución de la masa molecular, la composición de aminoácidos, la densidad de carga superficial, y de la dosis utilizada en cada tratamiento (Yokotsuka & Singleton, 1995; Lagune, 1994; Versari et al., 1998; Maury et al., 2001, 2003). La eliminación de polifenoles poliméricos se vio favorecida por el incremento de la densidad de carga superficial, la dosis y un alto peso molecular de la proteína. Además, la mayor cantidad de taninos precipitados por V.Cristal podría ser debido, no solo a su mayor superficie de carga, sino también a diferencias en la composición general de ambas proteínas, que podría afectar su conformación, ayudando u obstruyendo el acceso de los taninos hacia los sitios de unión, tal y como concluyeron Maury et al. (2016).

La proporción de taninos eliminados fue incluso más alta cuando se utilizó la proteína del guisante (Proveget 100), alcanzando un 64%, un valor mucho más alto que aquellos mostrados por otros autores, como Maury et al. (2001) quienes encontraron que la eliminación de taninos condensados fue el 10% de la cantidad inicial.

El uso de S.Bouquet también condujo a una reducción elevada de taninos en las muestras después del tratamiento, resultando un hecho inesperado para las manoproteínas, ya que son, tal y como se ha comentado antes, usadas en enología para la estabilización fenólica de los vinos y para prevenir su precipitación. Sin embargo, Guadalupe & Ayesteran (2008) también encontraron que la cantidad de taninos en el vino fue significativamente afectada por la adición de manoproteínas comerciales, presentando las muestras que contenían manoproteínas un contenido de taninos más bajo al final de fermentación. Ellos sugirieron que la combinación de los taninos con las manoproteínas, cuando estos tuviesen estructuras de alto peso molecular, podrían ser inestables y precipitar, no solo dando lugar a una reducción del contenido total de taninos, sino también a la formación de complejos solubles manoproteína-tanino, los cuales no son disociados por la reacción de la fluoroglucinolisis, explicando esto también el bajo contenido de los taninos que queda en el vino.

Con el uso de ambos tipos de PCO de Monastrell se observaron valores similares (64-67%), mientras que con las PCO de Cabernet Sauvignon se consiguió una reducción menor en la concentración de taninos que el obtenido con las PCO de Monastrell, siendo los valores similares a los de V.Cristal. Esta diferente capacidad de adsorción de taninos por las PCO de las diferentes variedades puede estar asociado a diferencias en su composición, ya que la alta concentración de compuestos polifenólicos insolubles, lignina y bajo contenido en proteínas presentado por las PCO de Cabernet Sauvignon le confiere una reducida flexibilidad. Coincidiendo con estos resultados, Guerrero et al. (2013) encontraron una reducción en el contenido de taninos del 42% con el empleo de paredes celulares de Cabernet Sauvignon a una dosis de 10 mg/L.

Tabla 4.1.3 Concentración y composición de las proantocianidinas en el vino antes y después del uso de los diferentes agentes afinantes.

MUESTRAS	TT (mg/L)	%Adsorción*	GPm	EGC (μM)	ECG (μM)
Vino	1043,3 h		6,1 b	1811,8 h	227,3 h
Vino + V.Seda1	732,6 g	29,8 a	6,1 b	1273,1 g	158,8 g
Vino + V.Seda2	676,2 f	35,2 b	6,5 c	1181,5 f	149,8 fg
Vino + V.Cristal1	580,9 e	44,3 c	6,1 b	992,5 e	106,8 d
Vino + V.Cristal2	517,1 d	50,4 d	5,9 b	895,0 d	94,1 c
Vino + Proveget1	439,3 c	57,9 e	6,8 d	790,5 c	95,5 cd
Vino + Proveget2	371,5 ab	64,4 f	6,6 cd	773,1 c	76,0 b
Vino + S.Bouquet1	370,3 ab	64,5 f	6,9 d	598,7 ab	68,1 ab
Vino + S.Bouquet2	343,4 a	67,1 f	6,5 c	544,3 a	64 a
Vino + PCO1 MO	376,6 ab	63,9 f	5,9 b	607,1 ab	91,0 c
Vino + PCO2 MO	410,2 bc	60,7 e	5,6 a	625,8 b	99,3 cd
Vino + CO1 CS	552,4 de	47,1 c	6,6 cd	944,9 de	131,2 e
Vino + PCO2 CS	585,5 e	43,9 c	6,7 cd	1002,2 e	144,7 f

Abreviaturas: * Calculado como la diferencia entre la concentración de PA en el vino antes y después del uso con los agentes afinantes. TT: taninos totales, GPm: grado de polimerización medio, EGC: (-)-epigallocatequina, ECG: (-)-epicatequinagalato, V.Seda: Vinigel Seda usado a la dosis mínima (1, 30 mL/hL) y máxima (2, 80 mL/hL), V.Cristal: Vinigel Cristal usado a la dosis mínima (1, 30 mL/hL) y máxima (2, 80 mL/hL), Proveget: Proveget 100 usado a la dosis mínima (1, 5 g/hL) y máxima (2, 20 g/hL), S.Bouquet: Super Bouquet usado a la dosis mínima (1, 20 g/hL) y máxima (2, 50 g/hL), PCO MO/CS: paredes celulares aisladas de los orujos de Monastrell/Cabernet Sauvignon de una vinificación control (1) y una vinificación donde se usó una enzima durante la maceración (2). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

El grado medio de polimerización de los taninos (GPm) del vino parece ser la variable estructural que más afecta a la astringencia ([Kallithraka et al., 2001](#)). En cuanto al efecto de los afinantes utilizados sobre el GPm de los taninos que quedan en disolución, se puede observar que este parámetro solo desciende en el vino cuando se usan las PCO2 de Monastrell, mientras que para todos los otros afinantes hubo un ligero aumento o los valores se mantuvieron similares al vino control. En los vinos afinados con V.Seda1, Proveget, S.Bouquet, y PCO de Cabernet Sauvignon se observaron aumentos del GPm, pareciendo tener estos productos una preferencia por reaccionar con taninos de bajo peso molecular. El hecho de que las paredes celulares de los orujos de Cabernet Sauvignon incrementen la masa molecular media de los taninos no fue un hallazgo inesperado, ya que ha sido observada previamente esta interacción de paredes celulares de Cabernet Sauvignon del hollejo de uva fresca con taninos de la piel de la uva. Este fenómeno se puede deber a la limitada porosidad de la fibra de la matriz, en concreto de las paredes del orujo, que puede limitar la capacidad de adsorción de los taninos de alto peso molecular observándose, por tanto, un incremento de esta fracción ([Bautista-Ortín et al., 2015b](#)).

Nuestros resultados también son similares a los de [Cosme et al. \(2009\)](#), que trabajaron con gelatinas de diferente peso molecular. Estos autores encontraron una elevada interacción entre gelatinas de bajo peso molecular con taninos monoméricos, dímeros y trímeros; mientras que en el caso de taninos oligoméricos y poliméricos no se encontraron ninguna diferencia significativa con respecto al vino control. Además, solo gelatinas de elevado peso molecular produjeron un mayor descenso en taninos oligoméricos y poliméricos. Contrario a estos hallazgos, otros autores observaron cómo gelatinas de bajo peso molecular eran capaces de precipitar más taninos polimerizados que una gelatina de mayor peso, probablemente debido al hecho de que las gelatinas de bajo peso molecular son más flexibles, proporcionando mayor contacto o acceso a los taninos de mayor tamaño ([Maury et al., 2001](#)). Trabajando con la proteína del guisante, [Granato et al. \(2014\)](#) observaron que ésta no cambió la composición cualitativa de los flavanoles en el vino, sugiriendo que esta proteína no produce grandes cambios en la composición de estos compuestos.

Los niveles de galoilación de las proantocianidinas (representado por el contenido de subunidades de epigallocatequina) decrecen después del afinado con los diferentes agentes comerciales y las PCO. Sin embargo, el descenso fue más pronunciado con S.Bouquet y con PCO de Monastrell, y con la dosis más alta de los agentes afinantes. Algunos autores han descrito una fuerte interacción entre proteínas y taninos esterificados con ácido gálico ([Cosme et al., 2009](#); [Ricardo-Da-Silva et al., 1991](#); [Sarni-Manchado et al., 1999](#); [Granato et al., 2010](#)). Esta reducción de los taninos galoilados podría afectar a las propiedades sensoriales del vino, reduciendo los atributos

de la astringencia como "aspereza", "sequedad" y "arenosidad". De hecho, esto fue lo que demostraron los estudios de [Del Barrio Galán et al. \(2012\)](#), quienes observaron que, en general, el uso de preparaciones comerciales de levaduras secas, reducían los taninos verdes e incrementaban la suavidad del vino, lo que podría estar relacionado con el descenso del porcentaje de galoilación.

4.1.3.3 Evolución del perfil de distribución de masa molecular de los taninos en el vino después del uso de los diferentes agentes afinantes

El método de análisis de la fluoroglucinolisis solo proporciona información relacionada con los taninos que se pueden despolimerizar, por lo que [Herderich & Smith \(2005\)](#) subrayaron que esta técnica es limitada para la caracterización de los taninos resistentes a la despolimerización ácida, pudiéndose solo caracterizar una pequeña porción de taninos presentes en el vino. Además, los métodos de despolimerización no proporcionan información sobre la distribución polimérica de los taninos porque todos los taninos contenidos en la fracción son rotos en unidades monoméricas en el transcurso de la reacción. Para tener más información al respecto, en este trabajo se ha utilizado también el análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), que nos puede ayudar a averiguar las modificaciones que sufren los taninos del vino con los distintos tratamientos. El análisis fue realizado con todo el vino, y no con taninos aislados, para explorar la respuesta de los diferentes agentes afinantes en la distribución de la masa molecular de los diferentes compuestos polifenólicos.

La figura 4.1.1 y la tabla 4.1.4 muestran los cambios en el perfil polifenólico de los vinos después del tratamiento con los diferentes afinantes y como varía la proporción de cada fracción de compuestos (de mayor a menor masa molecular). Con respecto a las gelatinas, los resultados sugieren que los efectos de V.Seda, determinados por SEC, son mucho más dependientes de la dosis que cuando su efecto se estudió por fluoroglucinolisis. A la dosis mínima, el análisis por SEC muestra solo un 12% de retención de taninos, y a la dosis máxima, la retención fue similar a la encontrada en el análisis de fluoroglucinolisis. En contraste, el efecto de V.Cristal no pareció ser dependiente de la dosis, puesto que las diferencias observadas a dosis máxima y mínima eran pequeñas. La retención mostrada por V.Cristal es más baja que la observada en la fluoroglucinolisis. El comportamiento de Proveget fue muy similar al de V.Cristal2, la retención de taninos observada fue más baja que en la de la fluoroglucinolisis. Se debe señalar que el comportamiento observado por S.Bouquet en SEC difiere apreciablemente de lo observado con el reactivo fluoroglucinol, siendo muy similar la retención de taninos a la observada cuando se usan agentes proteicos. El hecho de que el porcentaje de

adsorción observado sea más bajo en SEC que con el método de la fluoroglucinolisis, sugiere que muchos de los taninos que quedan en el vino no pueden ser despolimerizados, y, por tanto, no son medidos por el método de la fluoroglucinolisis, ni retenidos por los agentes afinantes (por ejemplo, taninos oxidados, polímeros antociano-tanino, etc.).

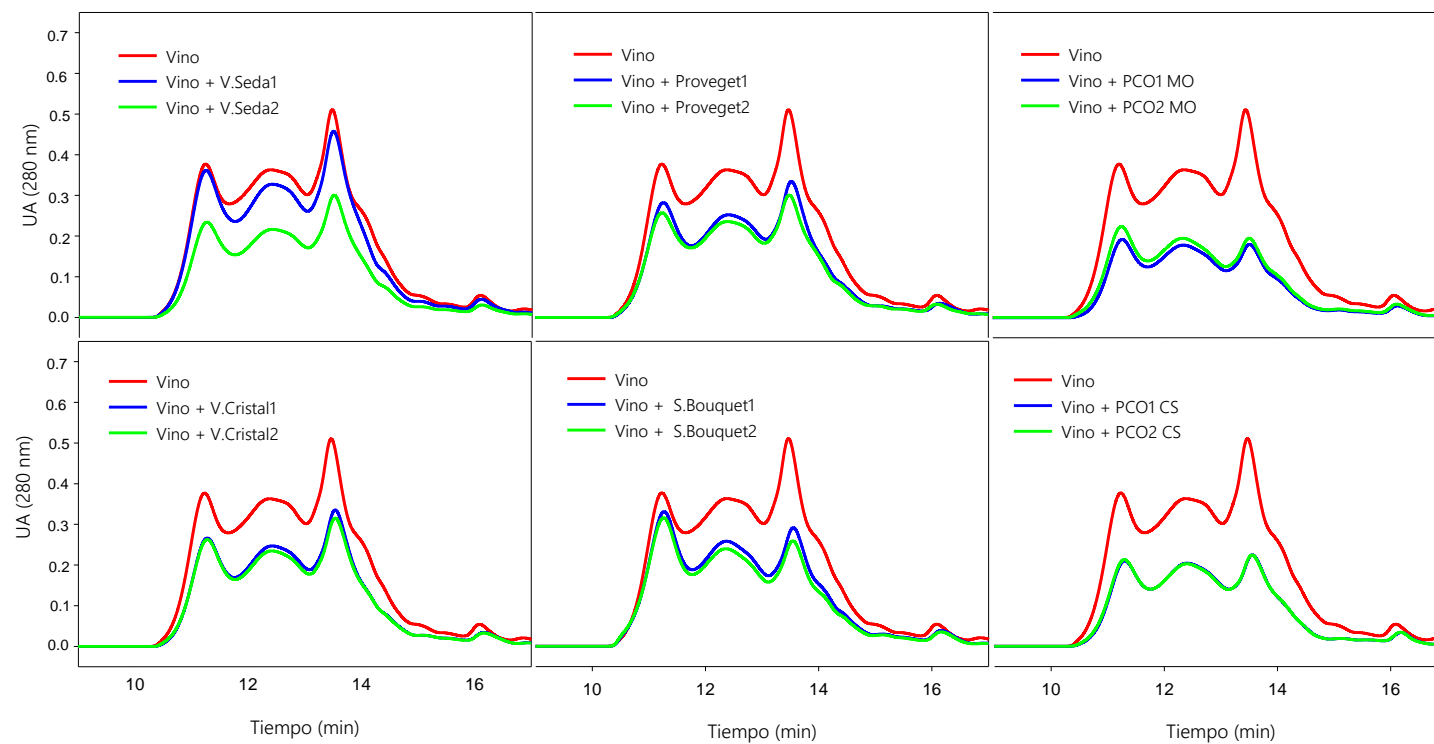
El descenso de compuestos fenólicos en vino afinado fue todavía mayor con las PCO, especialmente cuando se usó las de la variedad de Monastrell, siendo los resultados bastante similares a los observados por fluoroglucinolisis. Además, solo las PCO de Cabernet Sauvignon mostraron un mayor porcentaje de retención cuando se midieron por SEC que por HPLC, indicando que estas PCO tienen la capacidad de retener compuestos fenólicos como taninos oxidados y pigmentos poliméricos.

Si el cromatograma se divide en diferentes áreas que corresponden con compuestos fenólicos de alto, medio y bajo peso molecular, se puede observar, por un lado, el área correspondiente entre los minutos 10 y 11,5 min, que es donde tiene lugar la elución de compuestos de mayor masa molecular. En esta zona del cromatograma, el descenso fue muy bajo para V.Seda, y sorprendentemente en los vinos tratados con S.Bouquet, los cuales no parecen tener ninguna afinidad por compuestos de alto peso molecular, coincidiendo con los resultados obtenidos por fluoroglucinolisis. La máxima retención de los compuestos de alto peso molecular fue con las PCO, en concreto con PCO1 de Monastrell, mientras que las PCO2 de esta misma variedad parecen no tener parte de esta afinidad, probablemente como resultado de la pérdida de pectina debido a las enzimas usadas en la maceración durante la vinificación.

Entre los minutos 11,5 y 13,0 y para todos los productos comerciales usados, el descenso varía entre 12% y un 37%. Otra vez, PCO mostraron la más alta retención (con un valor máximo del 53% para PCO1 de Monastrell). Entre los minutos 13,0 y 17,0, el rango de retención fue entre 33-39%, y de nuevo, fue bastante similar para todos los agentes afinantes comerciales excepto para PCO de Monastrell, lográndose un 64%, lo cual coincide con los valores de antocianos y taninos medidos por HPLC.

Los resultados del análisis por SEC nos permiten determinar, además, que con el uso de gelatinas comerciales (excepto V.Seda1) y Proveget se logran valores similares de retención de compuestos fenólicos y estas proteínas no discriminan entre compuestos fenólicos de diferente peso molecular; S.Bouquet conduce a una retención más baja de los compuestos más polimerizados y similar selectividad para la fracción oligomérica y monomérica, mientras que las PCO son las que retienen más compuestos polifenólicos a lo largo de todo el rango de masas.

Figura 4.1.1 Comparación de los cromatogramas de exclusión molecular sobre el contenido de proantocianidas en el vino antes y después del uso de los diferentes agentes afinantes usados.



Abreviaturas: V.Seda: Vinigel Seda usado a la dosis mínima (1, 30 mL/hL) y máxima (2, 80 mL/hL), V.Cristal: Vinigel Cristal usado a la dosis mínima (1, 30 mL/hL) y máxima (2, 80 mL/hL), Proveget: Proveget 100 usado a la dosis mínima (1, 5 g/hL) y máxima (2, 20 g/hL), S.Bouquet: Super Bouquet usado a la dosis mínima (1, 20 g/hL) y máxima (2, 50 g/hL), PCO MO/CS: paredes celulares aisladas de los orujos de Monastrell/Cabernet Sauvignon de una vinificación control (1) y una vinificación donde se usó una enzima durante la maceración (2).

Tabla 4.1.4 Porcentaje de retención de taninos calculados por fluoroglucinolisis (*) y compuestos fenólicos medidos por cromatografía de exclusión molecular (**).

MUESTRAS	% retención de taninos (*)	% retención fenólica (**)	% retención a diferentes rangos de tiempo (**)		
			Tiempo (min)		
			10,0-11,5	11,5-13,0	13,0-17,0
Vino + V.Seda1	29,0	12,0	4,3	12,3	13,6
Vino + V.Seda2	35,0	32,0	30,0	32,3	33,0
Vino + V.Cristal1	40,0	33,8	34,3	35,3	36,4
Vino + V.Cristal2	50,0	37,9	34,6	37,9	39,1
Vino + Proveget1	57,0	35,6	27,0	33,3	36,0
Vino + Proveget2	64,0	38,8	31,0	37,1	41,3
Vino + S.Bouquet1	64,0	32,6	14,2	31,5	36,0
Vino + S.Bouquet2	67,0	37,9	16,6	36,5	41,3
Vino + PCO1 MO	60,0	60,6	55,0	53,7	63,9
Vino + PCO2 MO	63,0	53,4	44,8	49,1	60,5
Vino + PCO1 CS	43,0	50,8	50,1	46,8	55,4
Vino + PCO2 CS	47,0	50,8	48,3	47,1	55,2

Abreviaturas: V.Seda: Vinigel Seda usado a la dosis mínima (1, 30 mL/hL) y máxima (2, 80 mL/hL), V.Cristal: Vinigel Cristal usado a la dosis mínima (1, 30 mL/hL) y máxima (2, 80 mL/hL), Proveget: Proveget 100 usado a la dosis mínima (1, 5 g/hL) y máxima (2, 20 g/hL), S.Bouquet: Super Bouquet usado a la dosis mínima (1, 20 g/hL) y máxima (2, 50 g/hL), PCO MO/CS: paredes celulares aisladas de los orujos de Monastrell/Cabernet Sauvignon de una vinificación control (1) y una vinificación donde se usó una enzima durante la maceración (2).

4.1.4 Conclusiones

Con los resultados obtenidos se puede concluir que los diferentes agentes afinantes usados afectan de forma diferente al perfil polifenólico del vino, lo que también podría influenciar en las propiedades gustativas de los vinos. En nuestras condiciones experimentales, las PCO tuvieron el mayor efecto de reducción de taninos; aunque hay diferencias en la capacidad de interacción lograda por las dos variedades. Las PCO de Monastrell son posiblemente las más interesantes para reducir taninos, astringencia y amargor en el vino. Su alto potencial de unión podría permitirles ser usadas a dosis más bajas que las que se han usado en este estudio, reduciendo la producción de lías y el volumen de vino adsorbido por dichas paredes. Además, este material podría ser una buena alternativa para los agentes afinantes de origen proteico que son usados en el vino tinto, pues son insolubles e inertes a reacción, con una estructura basada en polisacáridos que podría incluso reducir los problemas de turbidez. Su uso también podría evitar efectos alérgicos. El uso de las paredes celulares de los orujos como material de afinamiento podría incrementar el valor añadido a este subproducto, que es muy bajo actualmente y generado en gran cantidad en las bodegas.

4.2 EFECTO DE LOS ORUJOS SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA EN VINOS DE DIFERENTES VARIEDADES

4.2.1 Introducción

En estudios anteriores (Bautista-Ortín et al., 2015b; Bindon et al., 2010b) y en el capítulo previo, el estudio de los efectos de las interacciones de las paredes celulares de los orujos con el vino se han realizando con una purificación exhaustiva de los mismos. Pero esta metodología consume mucho tiempo y por eso, además de la propuesta de utilizar las paredes celulares de orujos como afinantes, se ha ensayado una purificación menos rigurosa de los orujos para su futura utilización en el mundo enológico-industrial. Así, en el presente estudio, los orujos de uva de la variedad Monastrell se han purificado utilizando dos tipos de disoluciones diferentes, etanol al 70% y acetona:agua (2:1) y posteriormente se han liofilizado, obteniendo dos tipos de orujos purificados (OP). Se ha planteado la purificación con etanol, aunque esta es menos exhaustiva que la de la acetona, porque de esta forma este subproducto puede tener una introducción fácil en el mercado, ya que el empleo de la acetona en la industria alimentaria no está aconsejado.

También está claro que el tipo de vino a tratar puede influir sobre el resultado final del proceso, por ello los orujos purificados (OP) obtenidos se han aplicado a tres vinos jóvenes de diferente variedad, Monastrell, Cabernet Sauvignon y Merlot una vez terminada la fermentación maloláctica y a un vino envejecido en barrica durante 3 meses.

Al igual que en el capítulo anterior, para estimar el efecto que tienen los orujos sobre el perfil fenólico del vino, éstos se han comparado con afinantes comerciales de distinta naturaleza.

4.2.2 Descripción de la experiencia

Los agentes afinantes comerciales empleados en esta experiencia fueron bentonita (silicato de aluminio) y caseinato potásico (proteína de la leche) usados a la dosis de 7,5

mg/hL, dos gelatinas (diferentes al ensayo anterior debido a su baja capacidad de interacción), como V.Forte (gelatina altamente hidrolizada) y V.Platinum (gelatina de alto peso molecular, poco hidrolizada), Ovovin (albúmina del huevo), Proveget (proteína del guisante) y S.Bouquet, todos usados a la dosis máxima recomendada por el fabricante, ya que en esta experiencia, a diferencia de la anterior, no se aplica agitación durante el tiempo de contacto de los diferentes afinantes con el vino. Los orujos purificados (OP) con etanol (OEtOH) y con acetona (OAcetona) se aplicaron a la dosis de 13 mg/mL.

Este ensayo fue realizado a mayor escala que el ensayo anterior para simular las condiciones de bodega. Para ello se partió de 100 mL de vino (tres jóvenes 2015 de Monastrell, Cabernet Sauvignon (CS) y Merlot, y uno pasado por barrida de 2015 de la variedad Monastrell) los cuales fueron transferidos a botellines de 125 mL. Una vez adicionados los diferentes agentes afinantes, se mezclaron con el vino para asegurar una distribución homogénea y se introdujo N₂ gas en el espacio de cabeza para evitar procesos oxidativos. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y también se preparó un control sin agente afinante. Los botellines se cubrieron con papel de aluminio para evitar su exposición a la luz y se dejaron en reposo durante 21 días. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron preparadas para su análisis por espectrofotometría, HPLC y SEC.

4.2.3 Resultados y discusión

4.2.3.1 Efecto de los distintos agentes afinantes sobre vinos jóvenes de diferentes variedades

Los vinos de las tres variedades muestran diferentes valores en cuanto a su composición cromática (tabla 4.2.1). Así, el vino Merlot es el que muestra mayores valores de intensidad de color (IC) probablemente debido a su más alta concentración en antocianos totales (AT), ya que la concentración de taninos es parecida a la del vino Monastrell, como también lo es el índice de polifenoles totales (IPT). El vino de Cabernet Sauvignon (CS) tiene los valores más altos de taninos totales (TT), IPT y antocianos poliméricos (AP), siendo estos últimos parámetros bastante próximos a los mostrados por el vino Merlot. El vino Monastrell presenta valores de IPT y TT más bajos que los vinos CS y Merlot.

Tabla 4.2.1 Efecto de los afinantes sobre los parámetros espectrofotométricos de los vinos Monastrell, Cabernet Sauvignon y Merlot.

Muestras	IC	IPT	AT (mg/L)	AP (mg/L)	TT (mg/L)
<i>Monastrell</i>					
Vino Testigo	12,1 g	42,4 f	284,1 f	61,0 f	1847,9 f
Vino + Bentonita	9,0 c	38,7 c	212,8 a	44,7 b	1784,5 de
Vino + Caseinato	10,4 d	37,5 b	262,1 b	50,0 c	1537,0 b
Vino + V.Forte	11,3 e	40,2 d	275,0 cd	55,2 d	1824,9 ef
Vino + V.Platinum	11,4 ef	40,1 d	273,9 cd	56,3 de	1778,8 de
Vino + Ovovin	11,6 ef	41,3 e	277,7 d	56,7 e	1819,1 ef
Vino + Proveget	11,7 f	40,7 de	278,4 de	57,5 e	1735,6 cd
Vino + S.Bouquet	11,6 f	40,5 de	271,2 c	56,6 e	1701,1 c
Vino + OEtOH	8,2 a	34,8 a	208,6 a	40,3 a	1514,0 b
Vino + OAcetona	8,5 b	34,4 a	212,8 a	41,5 a	1381,6 a
<i>Cabernet Sauvignon</i>					
Vino Testigo	13,2 f	47,8 e	246,6 g	91,3 h	2012,0 f
Vino + Bentonita	11,3 b	46,8 cd	211,7 c	75,1 c	1727,0 e
Vino + Caseinato	11,7 c	44,2 b	222,7 d	78,8 d	1468,0 ab
Vino + V.Forte	12,5 d	46,5 c	233,7 e	83,8 e	1542,8 bc
Vino + V.Platinum	12,5 d	46,2 c	237,1 ef	84,8 e	1583,1 cd
Vino + Ovovin	12,7 de	47,5 de	239,7 fg	86,7 f	1594,6 cd
Vino + Proveget	13,1 f	47,7 e	243,5 gh	89,8 g	1531,3 bc
Vino + S.Bouquet	12,9 ef	48,1 e	243,5 gh	89,7	1649,3 de
Vino + OEtOH	10,2 a	43,0 a	198,4 a	67,3 a	1468,0 ab
Vino + OAcetona	10,4 a	42,3 a	203,7 b	69,1 b	1390,2 a
<i>Merlot</i>					
Vino Testigo	16,2 g	43,3 ef	376,7 e	89,6 e	1899,7 f
Vino + Bentonita	12,2 c	40,9 cd	295,5 c	65,4 b	1485,2 e
Vino + Caseinato	14,4 d	39,7 c	354,7 d	74,8 c	1191,6 ab
Vino + V.Forte	16,0 fg	43,6 f	375,8 e	84,3 d	1370,1 de
Vino + V.Platinum	15,8 ef	42,8 ef	375,2 e	83,6 d	1289,5 bcd
Vino + Ovovin	15,9 fg	42,9 ef	369,9 e	86,5 de	1226,2 bc
Vino + Proveget	15,6 e	42,2 de	371,7 e	83,5 d	1226,2 bc
Vino + S.Bouquet	15,8 ef	41,1 d	369,1 e	86,0 de	1318,3 cd
Vino + OEtOH	11,2 b	36,6 b	279,9 b	58,5 a	1266,5 bcd
Vino + OAcetona	10,6 a	34,6 a	265,9 a	55,1 a	1099,5 a

Abreviaturas: IC: intensidad de color, IPT: índice de polifenoles totales, AT: antocianos totales, AP: antocianos poliméricos, TT: taninos totales y O: orujos. Letras diferentes en la misma columna y para cada vino indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

En general, con los tratamientos, la intensidad de color de los vinos llega a variar de cuatro puntos con el uso de los diferentes afinantes comerciales y con los OP hasta seis.

Las variaciones más altas sobre la IC se observan con el vino Merlot, y las más bajas con CS, de hecho, la variación de AP, que contribuyen a la estabilidad del color en el vino, también es más acusada en Merlot que en CS, siendo las variaciones de AP de este último vino muy similares a las mostradas por el vino Monastrell. Los agentes afinantes que mayor descenso ocasionan sobre el color son los orujos purificados, tanto OEtOH como OAcetona, en los tres vinos, seguido del tratamiento con bentonita y caseinato, el resto de afinantes estudiados también producen disminuciones del color, pero no tan significativas como los agentes nombrados anteriormente. [Guerrero et al. \(2013\)](#) también observaron que las paredes celulares de los orujos, junto con las paredes celulares de la manzana, eran también los agentes que mayores descensos de color y pigmentos poliméricos producían respecto al vino sin tratar

La mayor retención de AT se observó en el vino Merlot, y la menor en el vino CS, un 29,4% y un 19,5% de máxima retención respectivamente. El porcentaje de retención en el vino Monastrell llega a alcanzar valores del 26,6%. El efecto de los afinantes con respecto a los AT es bastante similar en los tres vinos, así la mayor reducción de AT se experimenta con los OP, seguido de bentonita y caseinato, el resto de agentes afinantes no provocan retenciones de AT significativamente altas con respecto al testigo.

Las máximas retenciones experimentadas por los vinos sobre los taninos que se observan son un 25% en Monastrell y del 31% para CS, mientras que Merlot experimenta la mayor retención de estos compuestos, con un 42%. Los OP de nuevo son los que presentan mayor afinidad causando los mayores descensos de taninos, seguidos del tratamiento con caseinato, los demás afinantes, a diferencia de lo que sucedía con los parámetros anteriores, presentan efectos muy diversos, no causando retenciones tan elevadas de TT como los OP y caseinato. Al pH del vino los taninos se encuentran cargados negativamente, por lo que tendrán afinidad por aquellos afinantes cuya superficie esté cargada positivamente. [Castellari et al. \(2001\)](#) establecieron que el punto isoeléctrico de caseinato y la albúmina del huevo eran, 4,5 y 4,9, respectivamente, por lo que su superficie está cargada positivamente, y de ahí la gran afinidad que presenta caseinato por los taninos, seguido en algunos casos, como ocurre en el vino Merlot y CS, de la acción de Ovovin. Bentonita tiene una densidad de carga negativa al pH del vino ([Castellari et al., 2001](#)) y por ello no presenta apenas efecto sobre la retención de taninos. S.Bouquet no presenta en el vino CS buena afinidad por los taninos, pues los extractos de levaduras se caracterizan por tener una densidad de carga negativa ([Noriega-Domínguez et al., 2010](#)). También [Braga et al. \(2007\)](#) hacen una diferenciación sobre la distribución de masa molecular de las gelatinas sobre la cantidad y tipo de compuestos fenólicos eliminados en el vino. Estos autores observaron una mayor eliminación de taninos con gelatinas de bajo alto grado de hidrólisis frente a gelatinas de alto peso molecular. Estos resultados no son completamente coincidentes con los obtenidos en este estudio, ya que

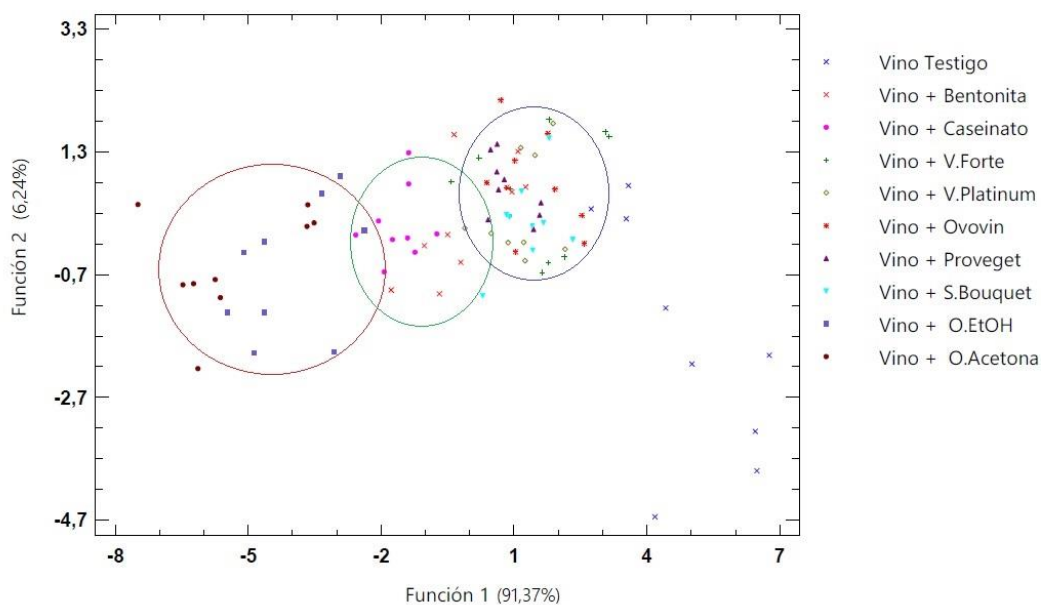
dependiendo de la variedad del vino la retención de taninos por parte de V.Forte y V.Platinum varía. Estas diferencias pueden estar asociadas a la carga superficial neta de dichas gelatinas al pH del vino y también a la composición fenólica del vino al que se adicionen (Noriega-Domínguez et al., 2010; Braga et al., 2007).

El vino CS es el que menor descenso muestra en el IPT con el uso de los distintos tratamientos (un 11,5%), mientras que los vinos de Merlot y Monastrell muestran valores de retención más similares y duplicando prácticamente los valores obtenidos sobre el vino CS (20,1 % y el 18,9% respectivamente). Otra vez se observa el efecto generalizado sobre los tres vinos ensayados, donde los OP tienen un mayor efecto sobre este parámetro, junto con caseinato y bentonita, por este orden, seguidos del efecto del resto de afinantes.

Para observar más profundamente el comportamiento general de los distintos agentes afinantes en los tres vinos, se realizó un análisis discriminante utilizando estos datos cromáticos como variables. Tras este análisis discriminante (figura 4.2.1), tres grupos de agentes afinantes se pueden diferenciar en la distribución de estos vinos. Los agentes proteicos usados, a excepción de caseinato, tanto los de origen animal como vegetal, junto con las levaduras autolisadas (S.Bouquet), forman uno de estos tres grupos, pues presentan un comportamiento bastante similar entre ellos, siendo los afinantes que menos afectan a los valores de los parámetros mostrados en la tabla 4.2.1. Iturmendi et al. (2010) observaron un efecto similar en la IC y el IPT cuando trabajaron con extractos proteicos de levaduras y extractos proteicos de origen porcino, con descensos en estos valores del mismo orden que los encontrados en este trabajo. Dentro de este grupo, el uso de Proveget en los tres vinos no provoca un descenso grande en el color, pero sí retenciones importantes sobre los taninos totales, lo que puede resultar beneficioso para reducir la astringencia sin variar mucho la intensidad de color. Otros investigadores observaron los mismos efectos para afinantes proteicos de origen vegetal procedente de la patata y el arroz (Tschiersch et al., 2010).

Otro grupo que presenta un descenso de los parámetros cromáticos y retención de compuestos polifenólicos mayor que el anterior, sería el formado por la bentonita y el caseinato, siendo los cambios mayores cuando se emplea este último. Además, bentonita no parece ser muy afín a los taninos de los vinos, ya que muestra una retención parecida a la experimentada por los agentes proteicos del primer grupo y S.Bouquet. Los OP formarían el último grupo, presentando los mayores valores de retención y disminución sobre los diferentes parámetros estudiados, encontrándose algunas diferencias entre los purificados con acetona o etanol.

Figura 4.2.1 Análisis discriminante en función de los agentes afinantes utilizados.



Puesto que como se ha explicado en párrafos anteriores, parece ser que hay un comportamiento generalizado sobre el efecto de ciertos grupos de afinantes sobre los vinos de las distintas variedades estudiadas, corroborado por el análisis discriminante mostrado en la figura 4.2.1, en el que se puede ver perfectamente diferenciados tres grupos, se analiza de forma más detallada el vino Monastrell, por ser el varietal más importante en nuestra zona.

En el vino Monastrell, la IC llega a descender hasta tres puntos de color con el uso de bentonita y los orujos purificados (tanto con acetona, como con etanol); además con el tratamiento de los OP también disminuyen bastante los antocianos poliméricos y los totales, lo que justifica estas bajadas en la IC. Los agentes afinantes proteicos, como V.Forte, V.Platinum, Ovovin, Proveget, y las levaduras autolisadas (S.Bouquet), no muestran grandes diferencias en el efecto que causan en los parámetros cromáticos, ni en el descenso de la IC, ni en la retención antocianos totales y poliméricos. Sin embargo, el vino tratado con caseinato, también de origen proteico, sí muestra diferencias significativas con respecto a V.Forte, V.Platinum, Ovovin, Proveget, y S.Bouquet, mostrando valores más bajos en estos tres parámetros (IC, AT y AP). [Cosme et al. \(2009\)](#) también observaron diferencias en la intensidad de color al aplicar distintos afinantes proteicos, aunque no en la cantidad de antocianos totales de los vinos.

La mayor retención de TT se produce con los OP y con el tratamiento con caseinato. El IPT también disminuye de forma significativa con este agente afinante. Esta mayor capacidad de interacción del caseinato con los compuestos fenólicos respecto al resto de

agentes proteicos (V.Forte, V.Platinum, Ovovin, Proveget) puede ser debido a diferencias en su densidad de carga superficial, entre otras características. Los OP, precisamente debido a su compleja composición, pueden interactuar con una gran y diversa cantidad de moléculas polifenólicas, y por ello provocan los mayores valores de retención, lo que queda reflejado en el valor de IPT, AT, AP y de los TT. En este último parámetro hay diferencias significativas entre los OAcetona y los OEtOH, siendo mayor la retención con los primeros, debido probablemente a que la acetona realiza una purificación más exhaustiva sobre los orujos que el etanol, quedando así más sitios libres para albergar compuestos. S.Bouquet también reduce significativamente la cantidad de taninos totales, aunque en menor proporción que los OP y la aplicación de caseinato. La composición de la pared celular de las levaduras autolisadas es similar a la pared celular de los orujos, de ahí que S.Bouquet pueda experimentar también retenciones importantes de taninos.

Bentonita actúa como un afinante no selectivo, no reduce en gran cantidad los taninos, pero presenta afinidad por la mayoría de compuestos polifenólicos, por lo que baja de forma significativa el IPT.

Los resultados se muestran en la tabla 4.2.2 donde se observan diferencias en la concentración y composición de los compuestos medidos por HPLC en los diferentes vinos. Cabernet Sauvignon se caracteriza por presentar los valores más bajos de antocianos monoméricos, pero los más altos de taninos totales, mostrando además estos compuestos el mayor grado medio de polimerización (GPm), el mayor contenido de epigallocatequina y de epicatequinagalato. El vino de Merlot presenta los valores más altos de antocianos monoméricos y los más bajos de taninos totales, mientras que Monastrell muestra valores intermedios de antocianos monoméricos y taninos, y los más bajos del GPm, del contenido de epigallocatequina y de epicatequinagalato. Estos resultados solo coinciden en parte con aquellos medidos por espectrofotometría, lo cual puede ser debido a la diferente metodología usada.

En general, se observa que, tras la adición de los diferentes agentes afinantes, la mayor retención de antocianos monoméricos es debida a la actuación de los OP y la bentonita. Los taninos despolimerizables son retenidos en altas cantidades, principalmente por el tratamiento con caseinato y los OAcetona, pues estos presentan una gran afinidad por los taninos, e incluso mayor que caseinato, como se observa en el vino Monastrell. Sin embargo, los OEtOH como experimentan una purificación menos exhaustiva que la de la acetona, tienen menos sitios de unión libres y esto hace que estos tengan un efecto similar sobre los taninos despolimerizables que el resto de los agentes afinantes comerciales. Hay que destacar también que la menor retención de taninos por parte de los orujos se produce en el vino Merlot, el cual presenta el mayor contenido de antocianos monoglucósidos. Parece ser, que estos pigmentos compiten con los taninos para interactuar con los polisacáridos de las paredes celulares de la uva reduciendo su retención (Bautista-Ortín, et

al., 2016). En cuanto al G_{Pm} de los taninos, este parámetro se incrementa o disminuye en función del tipo de vino, aunque los mayores descensos son ocasionados por los OAcetona, en los vinos Monastrell y Merlot y por Ovovin en el vino CS. Así, en general, en el vino Monastrell su valor se incrementa, mientras que para los vinos CS y Merlot disminuye ligeramente; esto refleja que en el vino Monastrell los afinantes retienen fundamentalmente taninos de bajo peso molecular dejando los de mayor masa en el vino, justo lo contrario a lo que sucede con los vinos CS y Merlot, pues el G_{Pm} desciende, indicando que los agentes afinantes muestran mayor afinidad por taninos de masa molecular alta. El contenido de epigallocatequina en los taninos de los diferentes vinos disminuye, y especialmente con la presencia de caseinato. También se observa que, en el vino de CS, el cual muestra el doble de esta subunidad que los vinos de Monastrell y Merlot, sufre las mayores pérdidas, llegando a ser en algunos casos superiores al 50%. La epicatequinagalato también disminuye en los taninos de todos los vinos y, sobre todo, en aquellos de Merlot tras la adición de caseinato. La epigallocatequina tiene una alta afinidad porque tiene en su estructura un grupo hidroxilo adicional en el anillo B, que puede considerarse un sitio más para establecer enlaces por puente de hidrógeno (Haslam,1998), mientras que la epicatequinagalato por estar esterificada con el ácido gálico podría establecer más puentes de hidrógeno que la epigallocatequina, pero como es una subunidad más voluminosa puede ser menos accesible a los sitios de unión con los constituyentes de las paredes celulares, haciendo que sus retenciones sean menores.

En el vino Monastrell, los antocianos monoméricos sufren una retención entre 0,7-42,0%. Solo los OP y la bentonita, seguidos de la acción de S.Bouquet producen retención de estos compuestos, mientras que el resto de los afinantes no afectan significativamente al contenido de antocianos. En general, los diferentes agentes afinantes sí que muestran una gran afinidad por los taninos, sufriendo estos compuestos una retención entre 15,7-37,7%. Las retenciones más altas son producidas por los OAcetona y por caseinato, seguidos de V.Forte y Ovovin, mientras que con el resto de agentes afinantes la retención es menor, no observándose además, diferencias significativas en su comportamiento frente a los taninos. La retención es mayor con los OAcetona porque la purificación es más exhaustiva que la de aquellos tratados con etanol, permitiendo así más sitios de unión libres para interactuar con los compuestos fenólicos del vino.

Tabla 4.2.2 Efecto de los afinantes sobre los parámetros obtenidos por HPLC de los vinos Monastrell, Cabernet Sauvignon y Merlot.

Muestras	AT (mg/L)	TT (mg/L)	%Ret A	%Ret T	Gpm	Epigcat (uM)	Epicatg (uM)
<i>Monastrell</i>							
Vino Testigo	153,6 d	671,5 d			5,9 b	492,4 f	70,1 bcd
Vino + Bentonita	102,3 b	519,4 bc	33,4	22,6	7,8 f	353,7 bcd	66,7 bc
Vino + Caseinato	152,6 d	423,4 a	0,7	36,9	7,5 cde	291,5 ab	56,3 a
Vino + V.Forte	151,8 d	469,7 ab	1,2	30,0	7,7 de	346,3 bc	64,6 b
Vino + V.Platinum	151,0 d	563,6 c	1,7	16,1	7,4 cde	439,2 ef	74,9 cd
Vino + Ovovin	152,5 d	479,5 ab	0,8	28,6	7,2 cd	318,4 ab	69,0 bc
Vino + Proveget	149,5 d	565,2 c	2,7	15,8	7,3 cd	388,0 cde	77,4 d
Vino + S.Bouquet	138,3 c	566,4 c	10,0	15,7	7,1 c	411,6 de	77,6 d
Vino + OEtOH	89,0 a	530,8 bc	42,0	20,9	7,5 cde	426,9 e	73,2 cd
Vino + OAcetona	93,8 a	418,5 a	38,9	37,7	5,2 a	265,6 a	54,7 a
<i>Cabernet Sauvignon</i>							
Vino Testigo	81,5 e	778,6 d			8,3 f	1288,7 f	123,7 b
Vino + Bentonita	26,2 a	501,3 bc	67,9	35,6	7,0 d	541,4 bc	112,8 ab
Vino + Caseinato	34,8 d	434,9 a	57,3	44,1	6,2 bc	474,8 a	112,4 ab
Vino + V.Forte	32,2 c	489,2 abc	60,5	37,2	7,0 d	619,0 de	108,0 a
Vino + V.Platinum	31,7 c	501,7 bc	61,0	35,6	5,9 ab	499,7 abc	121,5 b
Vino + Ovovin	33,1 cd	526,4 c	59,4	32,4	5,7 a	524,5 abc	121,2 b
Vino + Proveget	32,5 c	482,3 abc	60,1	38,1	5,8 ab	494,0 ab	107,5 a
Vino + S.Bouquet	31,4 c	490,2 abc	61,4	37,0	6,7 cd	558,2 cd	118,2 ab
Vino + OEtOH	26,8 ab	482,5 abc	67,2	38,0	7,5 e	622,5 e	114,1 ab
Vino + OAcetona	28,6 b	455,8 ab	64,8	41,5	8,3 f	628,1 e	108,3 a
<i>Merlot</i>							
Vino Testigo	259,0 f	643,4 f			6,1 c	628,9 f	73,2 g
Vino + Bentonita	165,8 a	578,4 e	36,0	10,1	5,9 c	590,8 e	64,6 f
Vino + Caseinato	229,7 e	374,2 a	11,3	41,8	5,1 b	322,3 a	42,1 a
Vino + V.Forte	215,8 bc	487,2 bc	16,7	24,3	5,3 b	437,7 b	54,1 e
Vino + V.Platinum	227,3 de	488,3 bc	12,2	24,1	5,8 c	481,8 cd	53,1 de
Vino + Ovovin	228,6 de	538,9 d	11,7	16,3	6,6 c	590,5 e	49,9 cd
Vino + Proveget	221,1 cd	483,3 b	14,6	24,9	6,0 c	496,7 d	47,4 bc
Vino + S.Bouquet	211,7 b	517,3 cd	18,3	19,6	6,1 c	594,5 e	43,9 ab
Vino + OEtOH	169,3 a	510,8 bcd	34,6	20,6	5,1 b	457,7 bc	56,1 e
Vino + OAcetona	164,4 a	501,5 bc	36,5	22,1	4,5 a	439,6 b	52,2 de

Abreviaturas: AT: antocianos totales, TT: taninos totales, ret: retención, Gpm: grado medio de polimerización, Epigcat: epigalocatequina, Epicatg: epicatequinagalato y O: orujos. Letras diferentes en la misma columna y para cada vino indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

Los agentes comerciales utilizados, a excepción de bentonita y S.Bouquet, son proteicos y pueden compartir el mecanismo con el que retirar taninos del medio, de hecho, en su estructura tienen grupos funcionales (-COOH, -NH₂, -OH, etc.) con los que establecen puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilos de los compuestos polifenólicos ([Granato et al., 2014](#)), de ahí que a veces no se observan diferencias significativas entre ellos. En este caso del vino Monastrell, se observan diferencias en la retención de taninos entre las gelatinas utilizadas, donde V.Forte, de menor peso molecular, retiene significativamente más taninos despolimerizables que V.Platinum, de mayor peso molecular. El G_{Pm} de los taninos en este vino se incrementa en general con todos los agentes afinantes y sobre todo con la presencia de bentonita. En cambio, con el uso de OAcetona sus valores disminuyen, poniendo de manifiesto la preferencia de este material por interactuar con taninos de mayor tamaño de este vino, dejando en el medio los de menor masa. La epigalocatequina de los taninos disminuye principalmente con los OAcetona, caseinato y Ovovin, seguidos del efecto de V.Forte y bentonita, mientras que V.Platinum no presentó una gran preferencia para interactuar con taninos ricos en esta subunidad. Un comportamiento bastante similar es mostrado por la epicatequinagalato. Estos resultados solo coinciden en parte con los encontrados en el capítulo anterior, lo cual puede ser debido, tanto a diferencias en la composición inicial del vino usado en ambas experiencias, como en la forma de llevar a cabo el proceso de interacción.

En el vino de CS, los antocianos sufren retenciones muy altas, entre el 57,3-67,9%, aunque también la cantidad de estos compuestos es inferior a la mostrada por los vinos Merlot y Monastrell, por lo que al ser menos en el vino testigo y presentar los mismos sitios de unión para todos los afinantes utilizados con los tres vinos, la reducción que se observa es más acusada. De nuevo, la adición de bentonita y los OP son los responsables de las mayores interacciones con los antocianos, y caseinato y Ovovin de las interacciones más bajas. Los trabajos de [Bautista-Ortín et al. \(2016\)](#) mostraron que las paredes celulares de la uva Monastrell son capaces de retener hasta el 50% de los antocianos que hay presentes en el medio. Los taninos, presentes en valores superiores en este vino, sufren una caída muy importante tras la aplicación de los diferentes agentes afinantes, la cual oscila entre el 32,4-44,1%. Al igual que ocurre en el vino Monastrell, caseinato y los OAcetona, seguidos de Proveget, V.Forte y S.Bouquet son los causantes del mayor descenso de taninos. En este caso, Ovovin muestra un menor efecto sobre estos compuestos, siendo similar al mostrado por V.Platinum y bentonita. [Bautista-Ortín et al. \(2014b\)](#) estudiaron la capacidad de las paredes celulares de Monastrell para retener taninos de características distintas y observaron que su adsorción era mayor al incrementar su G_{Pm} y su porcentaje de galoilación, fenómeno que coincide con los valores de composición inicial de taninos mostrados por CS. El G_{Pm} de los taninos desciende con el uso de todos los agentes afinantes comerciales, y especialmente con Ovovin, Proveget y V.Platinum, mientras este prácticamente no varía con la presencia de los OP, especialmente con aquellos purificados

con acetona. Algunos autores han indicado la mayor capacidad de estos agentes proteicos para eliminar taninos poliméricos, que puede ser debido principalmente a interacciones de tipo hidrofóbico (Cosme et al., 2009; Granato et al., 2014). En el tratamiento con caseinato, bentonita y S.Bouquet se observa un comportamiento intermedio respecto a los demás agentes afinantes para reducir el G_{Pm}. El efecto de Proveget sobre el G_{Pm} de los taninos hace que algunos investigadores lo planteen como sustituto del caseinato (Cosme et al., 2012). Coincidiendo con los resultados de este estudio, el trabajo de Guerrero et al. (2013) con vino de Cabernet Sauvignon, también encontró un efecto mayor del caseinato para retirar taninos poliméricos del vino que los orujos, en este caso de la variedad Cabernet Sauvignon. También se encuentra una menor capacidad por parte de la gelatina altamente hidrolizada (V.Forte) para interactuar con taninos muy polimerizados, lo cual coincide con los resultados del capítulo anterior. Los valores de epigallocatequina sufren un descenso importante con la presencia de los diferentes agentes afinantes, a diferencia del comportamiento mostrado por la epicatequinagalato. Caseinato, seguido de Proveget, Ovovin y V.Platinum muestran una gran preferencia para interactuar con taninos ricos en epigallocatequina, mientras que los OAcetona, V.Forte y Proveget muestran una mayor afinidad para interactuar con taninos ricos en epicatequinagalato.

En el vino de Merlot, la retención de antocianos oscila entre 11,3-36,5% y al igual que ocurre en los vinos Monastrell y CS, la aplicación de bentonita y los OP son los tratamientos que mayor capacidad muestran para interactuar con estos compuestos, mientras que una menor adsorción es mostrada por caseinato, V.Platinum y Ovovin. Los taninos son eliminados del vino en cantidades que oscilan entre 10,1-41,8%, siendo la mayor reducción causada con el uso de caseinato, y la menor con bentonita. El G_{Pm} de los taninos solo desciende por la presencia de caseinato, V.Forte y los OP, especialmente con aquellos purificados con acetona, pues se diferencia bastante su efecto si se compara con aquellos purificados con etanol porque la purificación con acetona es más rigurosa, y es capaz de eliminar mayor cantidad de componentes de la pared celular de los orujos, dejando libres muchos sitios de unión para retener taninos tanto de alto como de bajo peso molecular de este vino. Caseinato además presenta la mayor capacidad para interactuar con taninos ricos en epigallocatequina y epicatequinagalato, mientras que bentonita muestra un comportamiento completamente contrario. Contrariamente a este resultado, Bindon & Smith (2013) encontraron, que de todos los afinantes comerciales estudiados, caseinato era el que retiraba menor contenido de epigallocatequina y epicatequinagalato. El agente V.Forte, junto con los OP también muestran una gran capacidad para eliminar taninos del medio ricos en epigallocatequina, pero no en epicatequinagalato, mientras que S.Bouquet muestra una afinidad por estos taninos completamente contraria.

Con los datos espectrofotométricos y obtenidos por HPLC se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para cada uno de los vinos (figuras 4.2.2, 4.2.3 y 4.2.4).

En conjunto, en estas figuras, se puede observar que el testigo más diferenciado es el del vino CS, por estar más separado de los tratamientos con los distintos agentes afinantes. También se puede observar que la adición al vino de bentonita, caseinato, y los OEtOH y OAcetona tienen un comportamiento diferenciado con el resto de los afinantes, y a la misma vez diferente según la variedad del vino. De hecho, esto se ve reflejado en que el efecto de los OP sobre su capacidad de retención de taninos y antocianos es alta, igualándose en muchos casos al gran efecto mostrado por bentonita, en el caso de los antocianos, y por caseinato, en relación a los taninos, en los tres vinos, ya que están poco separados por el componente uno. Sin embargo, como se observan en las figuras, el resto de agentes afinantes, no están muy bien diferenciados entre ellos, y, además, como ocurría con lo mencionado anteriormente, el comportamiento es diferente según el vino al que se adicionen.

Figura 4.2.2 Análisis de componentes principales del efecto de los agentes afinantes en el vino Monastrell.

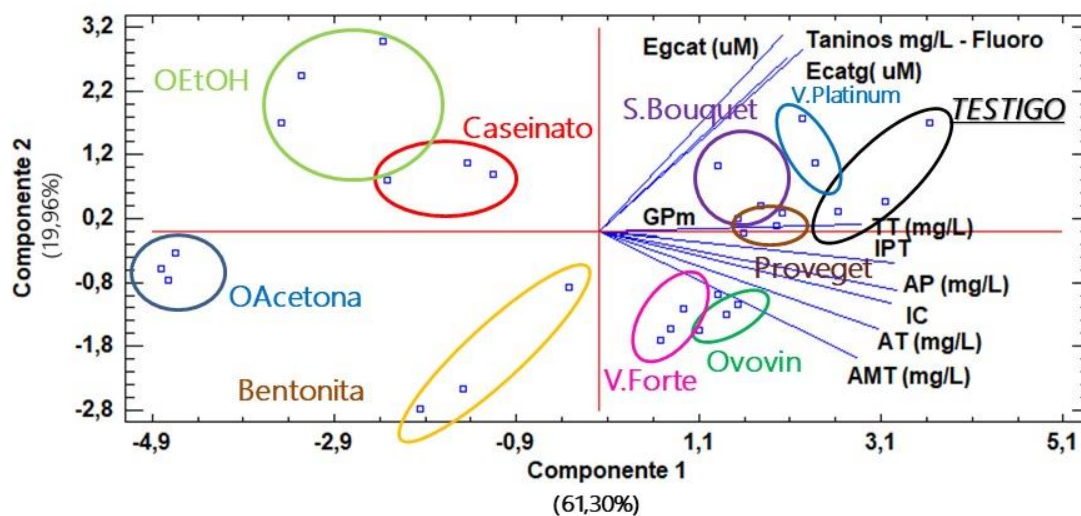


Figura 4.2.3 Análisis de componentes principales del efecto de los agentes afinantes en el vino Cabernet Sauvignon.

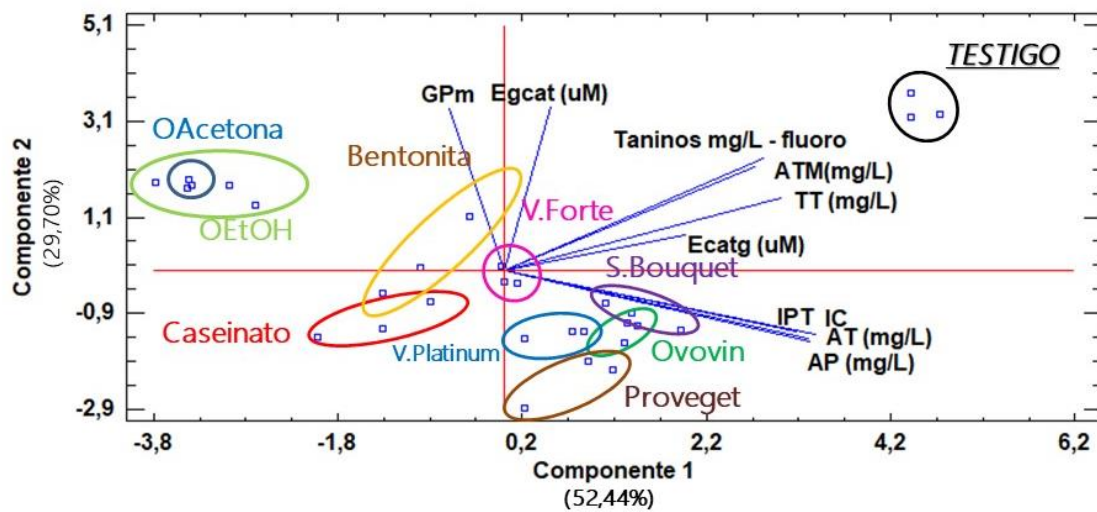
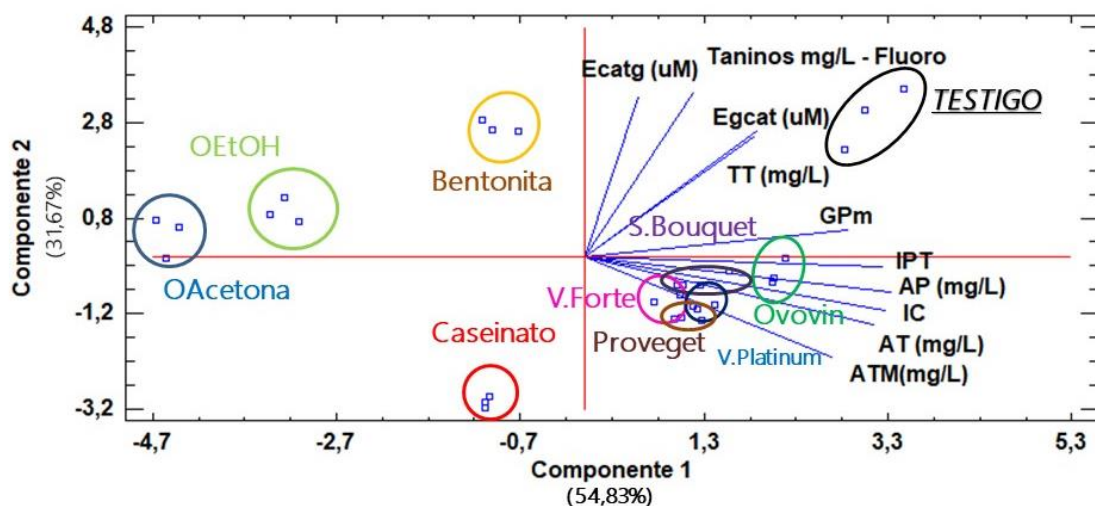


Figura 4.2.4 Análisis de componentes principales del efecto de los agentes afinantes en el vino Merlot.



El análisis por SEC permite medir tanto los taninos que se pueden despolimerizar, que son aquellos que se pueden medir tras la reacción de la fluoroglucinolisis y se analizan por cromatografía líquida en fase reversa, como los taninos que no se pueden despolimerizar, que se encuentran oxidados, complejados con antocianos...etc. En las figuras de SEC se pueden diferenciar tres fracciones de compuestos: de alto peso molecular, que se corresponden del minuto 10,5 al 11,8, los compuestos de peso molecular medio, del minuto 11,8 al 13,2 y, los de menor peso molecular, los cuales son eluidos entre los minutos 13,2 y 17,4.

Los vinos muestran un perfil polifenólico diferente (figuras 4.2.5, 4.2.6, y 4.2.7) debido a su distinta concentración y composición fenólica como se ha mostrado anteriormente.

La fracción de compuestos fenólicos de peso molecular intermedio es más importante en los vinos Merlot y CS, además, el vino CS presenta una fracción monomérica menos importante que los otros dos vinos. Según estos resultados los taninos de Merlot y Monastrell deberían de tener un G_{Pm} menor a los mostrados por CS, lo cual coincide con lo obtenido por fluoroglucinolisis. Lo que no coincide con los datos obtenidos por fluoroglucinolisis es la capacidad de retención de taninos por los agentes afinantes, mostrándose en ocasiones que la retención obtenida por SEC es mayor que la obtenida por la reacción con fluoroglucinol. Posiblemente, la presencia en los vinos de taninos oxidados, e incluso de pigmentos poliméricos de mayor tamaño sean los responsables de estas diferencias observadas por SEC, pues su retención por parte de los distintos agentes si será observada por SEC y esto se refleja en un mayor porcentaje de retención en algunos vinos.

En el vino Monastrell (figura 4.2.5) se observa un descenso importante principalmente en las fracciones de compuestos de peso molecular alto e intermedio con la aplicación de los diferentes afinantes. Esto no coincide con los valores de G_{Pm} medidos por fluoroglucinolisis, los cuales se incrementan tras la aplicación de los diferentes tratamientos. Esto podría ser debido a que los compuestos retenidos que estamos catalogando como de alto peso molecular sean taninos de bajo peso molecular ricos en epicatequinagalato, extensión cuya presencia incrementa el volumen hidrodinámico del tanino, haciendo que éste presente bajos tiempos de retención (Kennedy y Taylor, 2003) y esto coincide con el descenso observado en los valores de este parámetro medido por HPLC.

La mayor retención de compuestos fenólicos por SEC es observada con el uso de OAcetona, seguido de Ovovin y caseinato, afectando especialmente a las fracciones de compuestos fenólicos de peso molecular alto e intermedio. En cambio, V.Platinum, seguido de Proveget, bentonita y V.Forte muestran la menor retención. V.Platinum muestra un comportamiento bastante similar a Proveget frente a las diferentes fracciones fenólicas del vino, mientras que V.Forte es más parecido al efecto que ocasiona bentonita, aunque ésta última muestra mayor capacidad para interactuar con compuestos de bajo peso molecular. S.Bouquet y los OEtOH muestran una capacidad de retención intermedia y la misma afinidad por las diferentes fracciones fenólicas del vino. Estos resultados coinciden con los observados por fluoroglucinolisis.

La mayor capacidad de adsorción presentada por algunos agentes afinantes por SEC frente a la mostrada por fluoroglucinolisis puede ser debido a su mayor capacidad para eliminar de este vino taninos oxidados o pigmentos poliméricos, como es el caso de Proveget y S.Bouquet.

Tabla 4.2.3 Efecto de los afinantes sobre la retención de taninos medidos por HPLC y SEC, de los vinos Monastrell, Cabernet Sauvignon y Merlot.

	<i>Monastrell</i>		<i>Cabernet Sauvignon</i>		<i>Merlot</i>	
	% ret. de taninos *	% ret. de fenólica**	% ret. de taninos *	% ret. de fenólica **	% ret. de taninos *	% ret. de fenólica**
Vino Testigo	-	-	-	-	-	-
Vino + Bentonita	22,6	18,2	35,6	21,6	10,1	30,0
Vino + Caseinato	36,9	25,3	44,1	16,9	41,8	25,3
Vino + V.Forte	30,0	18,7	37,2	18,2	24,3	2,7
Vino + V.Platinum	16,1	14,5	35,6	5,8	24,1	21,1
Vino + Ovovin	28,6	27,2	32,4	7,9	16,3	22,3
Vino + Proveget	15,8	17,3	38,1	20,5	24,9	23,4
Vino + S.Bouquet	15,7	20,6	37,0	12,9	19,6	33,0
Vino + OEtOH	20,9	19,4	38,0	16,0	20,6	40,5
Vino + OAcetona	37,7	33,2	41,5	12,6	22,1	45,4

Abreviaciones: ret: retención; O: orujos. (*) porcentaje de retención de taninos medidos por fluoroglucinolisis, (**) porcentaje de retención de compuestos fenólicos medidos por SEC.

Figura 4.2.5 Comparación de los cromatogramas por SEC del uso de los distintos afinantes con vino Monastrell.

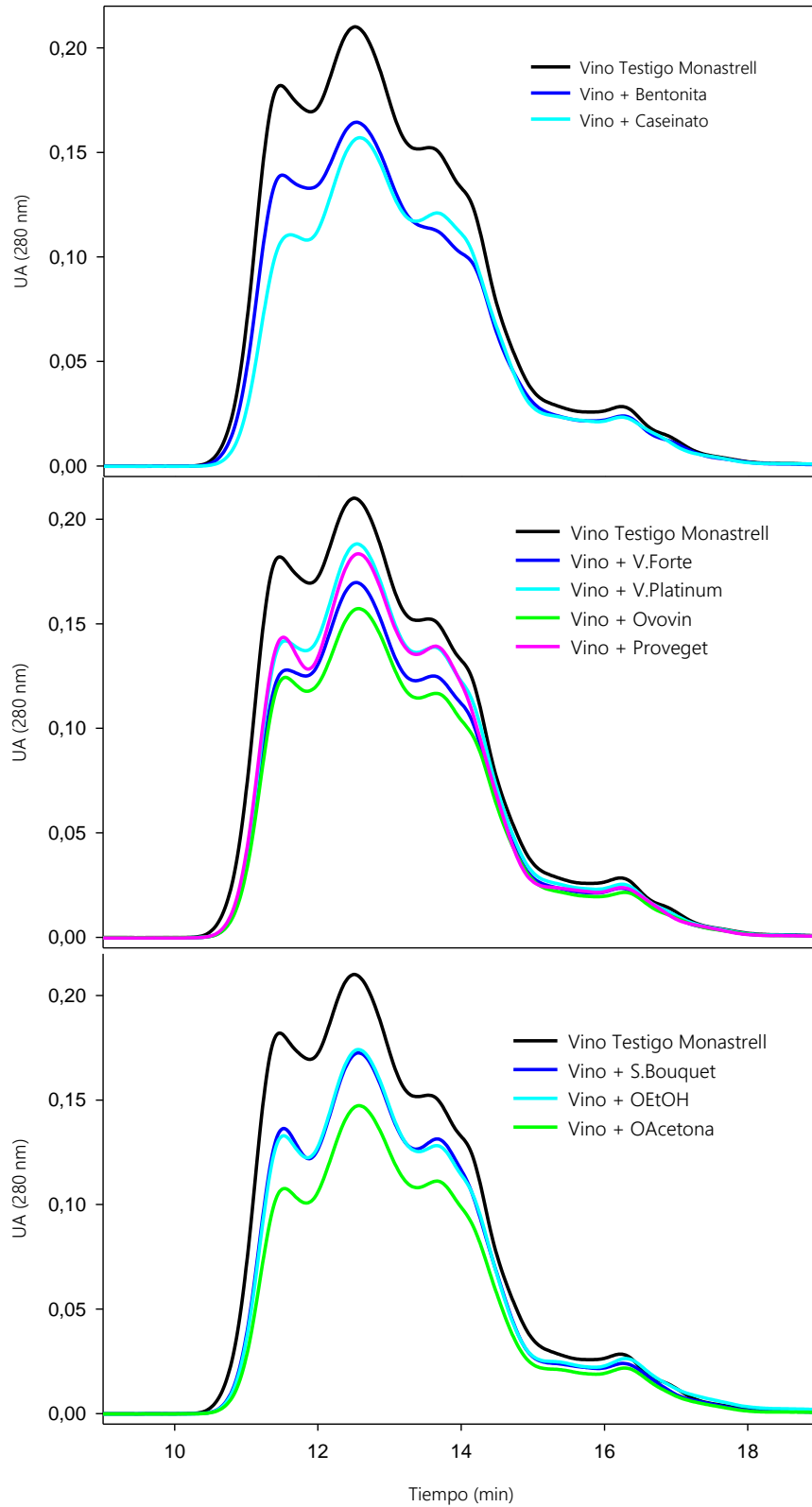


Figura 4.2.6 Comparación de los cromatogramas por SEC del uso de los distintos afinantes con vino CS.

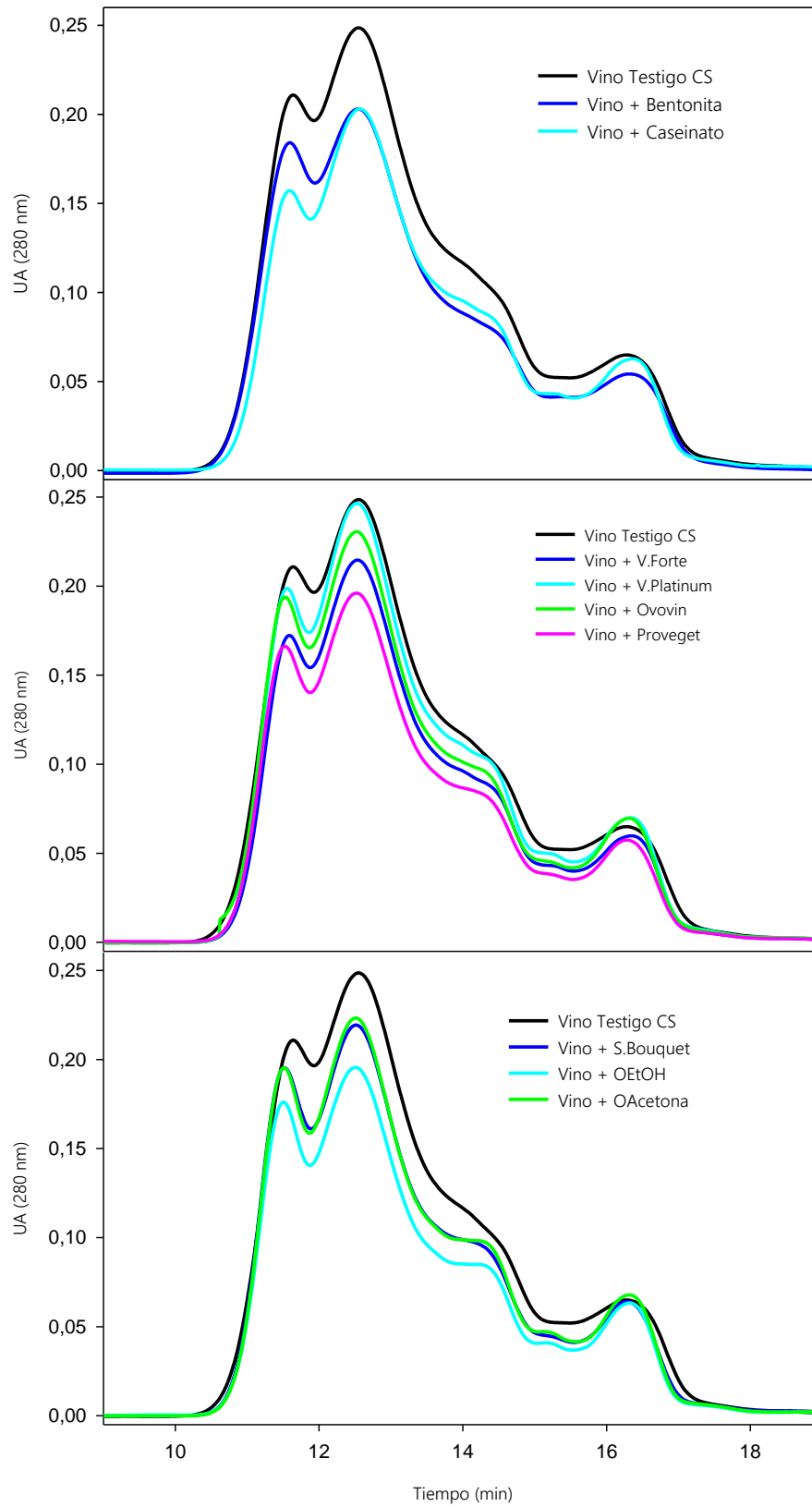
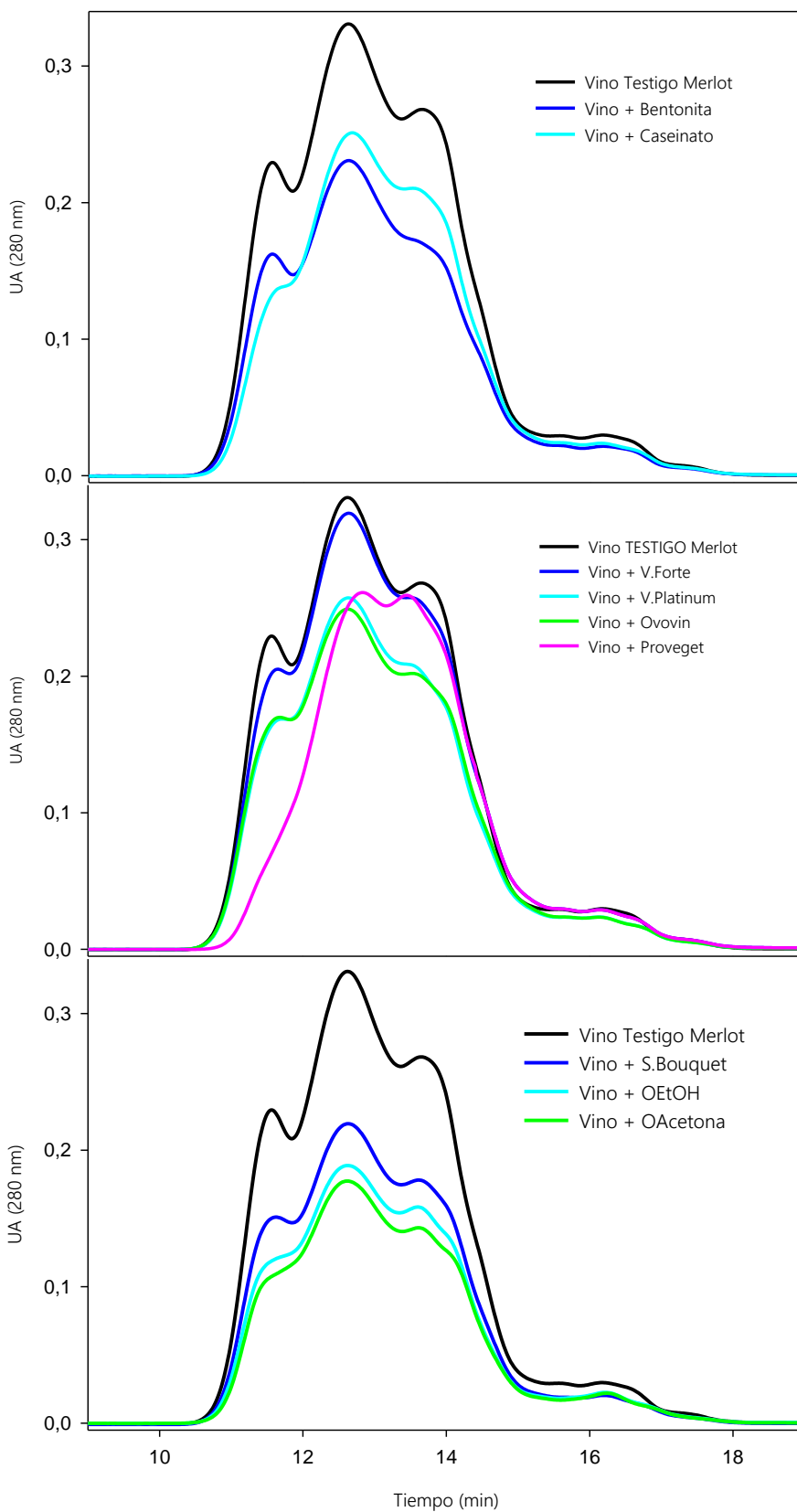


Figura 4.2.7 Comparación de los cromatogramas por SEC del uso de los distintos afinantes con vino Merlot.



En las figuras obtenidas para el vino CS (figura 4.2.6) se observa que la retención total de compuestos fenólicos determinados por SEC es también menor que aquella medida por fluoroglucinolisis (tabla 4.2.3), al igual que ocurre en el caso del vino Monastrell, lo cual también parece indicar la mayor retención en este vino de taninos que son fácilmente despolimerizables. También se observa, al igual que ocurre con el vino Monastrell, un descenso principalmente en las fracciones de compuestos de peso molecular alto e intermedio con la aplicación de los diferentes afinantes, aunque en este caso si que coincide con los valores de G_{Pm} medidos por fluoroglucinolisis para todos los agentes afinantes, excepto para OAcetona, los cuales no varían respecto a los mostrados por el vino testigo. Esto podría ser justificado por la retención taninos de bajo peso molecular ricos en epicatequinagalato, los cuales presentan bajos tiempos de retención. El efecto de bentonita, seguido del de Proveget y V.Forte muestran la mayor retención, aunque su capacidad de retención es diferente, mostrando bentonita menor afinidad por los compuestos fenólicos de alto peso molecular y mayor por aquellos de bajo peso molecular, mientras que Proveget, a diferencia de V.Forte que muestra mayor afinidad por aquellos compuestos de peso molecular intermedio, coincidiendo los valores de G_{Pm} medidos por fluoroglucinolisis. Las menores adsorciones son presentadas por V.Platinum y por Ovovin, mostrando este último mayor capacidad para retener compuestos de peso molecular intermedio, mientras el resto de los afinantes muestran valores de adsorción intermedios. Para este vino, los OEtOH muestran mayores retenciones que los OAcetona, presentando además, la misma afinidad por las diferentes fracciones fenólicas que caseinato, mientras que con los de OAcetona el perfil es similar al mostrado por S.Bouquet.

La figura 4.2.7 presenta las distribuciones moleculares de los compuestos polifenólicos tras la adición de los diferentes agentes afinantes en el vino Merlot. La tabla 4.2.3 muestra los porcentajes de retención fenólica, los cuales no coinciden con aquellos obtenidos por fluoroglucinolisis, siendo en algunos casos mayores los obtenidos por SEC, como el tratamiento con los OP, S.Bouquet, Ovovin y bentonita, indicando que para este vino, estos agentes afinantes tienen capacidad para retener también taninos no despolimerizables. Con la adición al vino de caseinato, V.Forte y V.Platinum los porcentajes de retención obtenidos por SEC son más bajos que aquellos medidos por fluoroglucinolisis y además, también se observa un comportamiento muy diferente según el agente afinante aplicado. Los orujos, y especialmente aquellos tratados con acetona, muestran la mayor capacidad para interactuar con los compuestos fenólicos del vino, seguidos de la reducción ocasionada por S.Bouquet, bentonita y caseinato. En general, las fracciones fenólicas más afectadas son las de compuestos de peso molecular alto e intermedio, siendo adsorbidas por igual, excepto al usar caseinato, pues muestra menos capacidad para adsorber las fracciones de compuestos de peso molecular intermedio y bajo. [Guerrero et al. \(2013\)](#) también informaron sobre la baja selectividad de los orujos de CS por las diferentes fracciones fenólicas del vino, fenómeno reflejado en este estudio, ya que los OP

son capaces de interaccionar tanto con taninos de alto como de bajo peso molecular. La retención más baja es mostrada por V.Forte, afectando además solo a las fracciones fenólicas de peso molecular alto e intermedio, mientras que el resto de afinantes muestran valores de retención intermedios. Hay que destacar la mayor capacidad por parte de Proveget para retener compuestos de la fracción más polimerizada, mientras que la capacidad para retener compuestos fenólicos de peso molecular medio es intermedio entre las demás proteínas comerciales utilizadas.

El diferente comportamiento del vino Merlot frente al observado en los vinos Monastrell y CS, con el que se experimenta, en general, una mayor reducción de los compuestos fenólicos medidos por SEC puede ser debido a diferente composición fenólica, al mostrar un mayor contenido de antocianos, un menor contenido taninos capaces de despolimerizarse (34%) y más taninos oxidados, asociados a pigmentos...etc. (66%).

4.2.3.2 Efecto de los distintos agentes afinantes sobre un vino envejecido en barrica

Con el fin de evaluar el efecto de los agentes afinantes en un vino más evolucionado y por tanto, con una composición fenólica diferente de un vino joven, se estudió el efecto de estos productos sobre un vino de Monastrell envejecido en barrica de roble durante tres meses. Este vino se caracteriza por presentar valores de IC y de antocianos similares a los del vino Merlot, pero el contenido de taninos totales y los valores de IPT son superiores a los presentados por los tres vinos jóvenes. El vino pasado por barrica experimenta pocas variaciones cuantitativas en los antocianos poliméricos (AP) (tabla 4.2.4), pero estas pequeñas disminuciones influyen mucho en el color del vino ya que llega a disminuir hasta en cuatro puntos con respecto al vino testigo. La retención máxima de antocianos y taninos que experimenta el vino de barrica es de 18,8% y 29,9% respectivamente, disminuciones que son menores que en los vinos jóvenes estudiados anteriormente y que no han pasado por barrica; aunque el IPT sufre descensos en sus valores de hasta 10 puntos, este comportamiento es similar al mostrado por los vinos jóvenes de Monastrell y Merlot.

En el vino envejecido en barrica, también se pueden clasificar los agentes afinantes en tres grupos, en función de su efecto en el vino. En un primer grupo se encuentran los agentes afinantes de origen proteico (excepto caseinato) y S.Bouquet, que siguen la misma tendencia y no provocan reducciones muy significativas de los valores de IC, AT, IPT y AP. Entre las dos proteínas de origen animal, V.Forte y V.Platinum se observan diferencias significativas en la disminución del color, siendo con V.Forte más acusada. V.Forte es una proteína de bajo peso molecular, y coincidiendo con los resultados de [Braga et al. \(2007\)](#), causa mayores efectos sobre el color que una proteína de alto peso molecular como es V.Platinum, de hecho esta diferencia en la disminución que causan en el color también es

apreciable sobre los antocianos poliméricos, que son inferiores con el uso de V.Forte. Con el resto de proteínas de este grupo, junto con S.Bouquet, los cambios no son muy marcados en el color ni tampoco en los antocianos. Los pequeños cambios se deben a que cada agente proteico tiene una composición, una masa molecular, un punto isoeléctrico y una densidad de superficie de carga diferente, reflejándose esto en las pequeñas variaciones de los resultados (Maury et al., 2001). Es sorprendente el bajo efecto de S.Bouquet por los pigmentos rojos del vino, al igual que ocurre en los vinos jóvenes Merlot y CS.

Tabla 4.2.4 Efecto de los afinantes sobre los parámetros espectrofotométricos del vino en barrica.

Muestras	IC	IPT	AT (mg/L)	AP (mg/L)	TT (mg/L)
Vino Testigo	16,8 h	63,0 de	348,2 f	99,7 f	2849,6 d
Vino + Bentonita	14,1 b	59,8 bcd	287,9 ab	83,9 b	2694,1 d
Vino + Caseinato	14,8 c	57,9 b	322,8 c	87,7 c	2340,1 bc
Vino + V.Forte	15,1 d	59,4 bc	324,7 cd	88,0 c	2170,3 ab
Vino + V.Platinum	15,7 e	60,3 e	332,9 de	92,1 d	2106,9 bc
Vino + Ovovin	15,7 e	60,8 bcde	332,3 e	91,5 d	2256,6 abc
Vino + Proveget	16,4 f	62,1 cde	345,6 f	98,0 e	2391,9 bc
Vino + S.Bouquet	16,4 g	62,6 cde	347,7 f	98,1 e	2391,9 c
Vino + OEtOH	12,9 a	54,4 a	282,6 a	75,4 a	2348,7 bc
Vino + OAcetona	12,8 a	52,7 a	291,3 b	75,3 a	1997,6 a

Abreviaturas: IC: intensidad de color, IPT: índice de polifenoles totales, AT: antocianos totales, AP: antocianos poliméricos, TT: taninos totales, y O: orujos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

En un segundo grupo estarían los agentes caseinato y bentonita, siendo el efecto de esta última más notable a la hora de retirar antocianos, y por ello de experimentar descensos de color mayores, efecto comprobado también por Stankovic et al. (2012). La razón de que bentonita disminuya más la intensidad de color es porque provoca una reducción importante de los antocianos poliméricos con respecto al control al igual que ocurre en los vinos jóvenes Merlot y Monastrell, y estos cobran una mayor importancia en vinos envejecidos (Cheynier et al., 2006), pudiendo así explicar que la eliminación de 15,8 mg/L de AP, se refleje en la pérdida de 2,7 puntos de color.

En un tercer grupo estarían los orujos purificados, los cuales dan lugar a las mayores reducciones de todos los parámetros, no observándose diferencias significativas entre los purificados con etanol o acetona, en la IC, el IPT y los AP. Esto también es observado en el

caso de los valores de IC e IPT en el vino joven de CS y en el caso de los AP para el vino joven de Monastrell.

En los taninos totales (TT) no hay muchas diferencias entre el efecto de los agentes afinantes, a excepción del uso de bentonita, que no parece tener ningún efecto significativo, y el uso de los orujos purificados con acetona que retira de forma bastante significativa estos compuestos, siendo mayor que con aquellos purificados con etanol. Este comportamiento también es observado en los tres vinos jóvenes estudiados.

La tabla 4.2.5 muestra la concentración y composición de los taninos medidos por fluoroglucinolisis y el porcentaje de retención de estos compuestos. La concentración de taninos en este vino es superior a la mostrada por los tres vinos jóvenes, aunque composición es más parecida a la de los taninos del vino joven de Cabernet Sauvignon. Las retenciones más acusadas son obtenidas con caseinato y los orujos purificados con acetona, el resto de afinantes muestran valores ligeramente inferiores, no encontrándose entre ellos diferencias significativas. Se observan reducciones muy bajas en el caso de bentonita, Proveget y V.Platinum, mostrando valores no diferentes significativamente respecto al vino testigo. Ovovin, derivado de la albúmina del huevo, a diferencia de lo que experimentan [González-Neves et al. \(2014\)](#), con un vino de dos meses en barrica, si provoca una reducción importante de taninos. La reducción del G_{Pm} más significativa es cuando se emplea Ovovin, y los orujos purificados con etanol y con acetona. En el contenido de epigallocatequina, son importantes los efectos causados por caseinato, y los orujos purificados con acetona, y los purificados con etanol también disminuyen la cantidad de esta subunidad significativamente, pero no presentan diferencias significativas con respecto a los orujos purificados con acetona ni con algunos agentes usados. Los valores de epicatequinagalato se ven reducidos significativamente con respecto al vino testigo al tratarlo con caseinato, V.Forte, S.Bouquet y los orujos purificados con acetona, pero solo presentan diferencias significativas con el agente afinante bentonita, pues tras su aplicación los valores son muy próximos a los mostrados por el vino sin tratar.

La distribución de los pesos moleculares de los compuestos fenólicos medidos por SEC es mostrada en la figura 4.2.8 y los porcentajes de retención sobre las distintas fracciones en la tabla 4.2.6. En la figura se observa que en este vino la fracción polimérica es más importante que en los vinos jóvenes, siendo superior en unidades de absorbancia a la fracción de compuestos de peso molecular intermedio. La fracción de compuestos de bajo peso molecular es muy pequeña como ocurre con los vinos de Merlot y Monastrell.

Todos los agentes afinantes disminuyen la cantidad de compuestos fenólicos siguiendo el mismo perfil que el vino testigo. El porcentaje de retención de compuestos fenólicos medidos por SEC no coincide con los obtenidos por fluoroglucinolisis, siendo la adsorción determinada por SEC más alta prácticamente para todos los afinantes. Este

resultado pone de manifiesto la capacidad de los afinantes para retener taninos oxidados y pigmentos poliméricos presentes en dicho vino.

Tabla 4.2.5 Efecto de los afinantes sobre los parámetros obtenidos por HPLC y SEC del vino en barrica.

Muestras	TT (mg/L)	% ret. de taninos *	% ret. fenólica **	GPm	Epigcat (uM)	Epicatg (uM)
Vino Testigo	1197,1 d			7,1 ef	1145,0 f	139,1 b
Vino + Bentonita	1131,8 cd	5,5	10,7	7,0 de	896,2 cde	136,2 b
Vino + Caseinato	974,5 a	18,6	18,2	6,6 ab	780,7 ab	121,1 a
Vino + V.Forte	1000,4 ab	16,4	20,7	6,9 cd	930,8 bcde	114,8 a
Vino + V.Platinum	1080,8 abcd	9,7	4,0	6,8 bc	921,4 e	129,5 ab
Vino + Ovovin	1050,6 abc	12,2	16,5	6,3 a	829,4 abcd	123,9 ab
Vino + Proveget	1107,3 bcd	7,5	5,0	6,9 cd	911,1 cde	128,4 ab
Vino + S.Bouquet	1035,8 abc	13,5	21,6	7,2 f	977,4 de	121,1 a
Vino + OEtOH	1039,6 abc	13,2	20,1	6,4 a	793,2 abc	129,4 ab
Vino + OAcetona	968,5 a	19,1	22,6	6,2 a	740,4 a	123,3 a

Abreviaturas: TT: taninos totales, ret: retención, GPm: grado medio de polimerización, Epigcat: epigallocatequina, Epicatg: epicatequinagalato y O: orujos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD. (*) porcentaje de retención de taninos medidos por fluoroglucinolisis y (**) porcentaje de retención de compuestos fenólicos medidos por SEC.

Solo caseinato muestra porcentajes de retención similares por ambas metodologías, mientras que para V.Platinum y Proveget son más bajos aquellos medidos por SEC que por fluoroglucinolisis, indicando que estos afinantes tienen así más facilidad para interactuar con compuestos más sencillos del vino en barrica. Destacable es que Proveget no muestra capacidad para retener compuestos polifenólicos poliméricos. Algunos investigadores (Granato et al., 2010) concluyeron tras comparar el uso de distintas proteínas vegetales (derivadas del gluten, la soja, la lenteja y el guisante) para retirar proantocianidinas oligoméricas, desde dimeros hasta decámeros, que la proteína derivada del guisante era la menos eficiente, lo cual coincide con los resultados de este estudio. Caseinato, V.Forte y S.Bouquet, junto con los OP son los que mayores disminuciones experimentan, no mostrándose mucha diferencia entre los orujos purificados con etanol y acetona. Además, V.Forte muestra una de las retenciones más importante de la fracción polimérica, con un 31% de retención (tabla 4.2.6), mientras que caseinato no parece tener capacidad para retener compuestos de alto peso molecular, y S.Bouquet presenta mayor afinidad por los compuestos polifenólicos de bajo peso molecular. Los orujos purificados

con acetona parecen ser más selectivos con la fracción polimérica, mientras que los OEtOH, no muestran selectividad frente a las diferentes fracciones.

Figura 4.2.8 Comparación de los cromatogramas por SEC del uso de los distintos afinantes con vino envejecido en barrica.

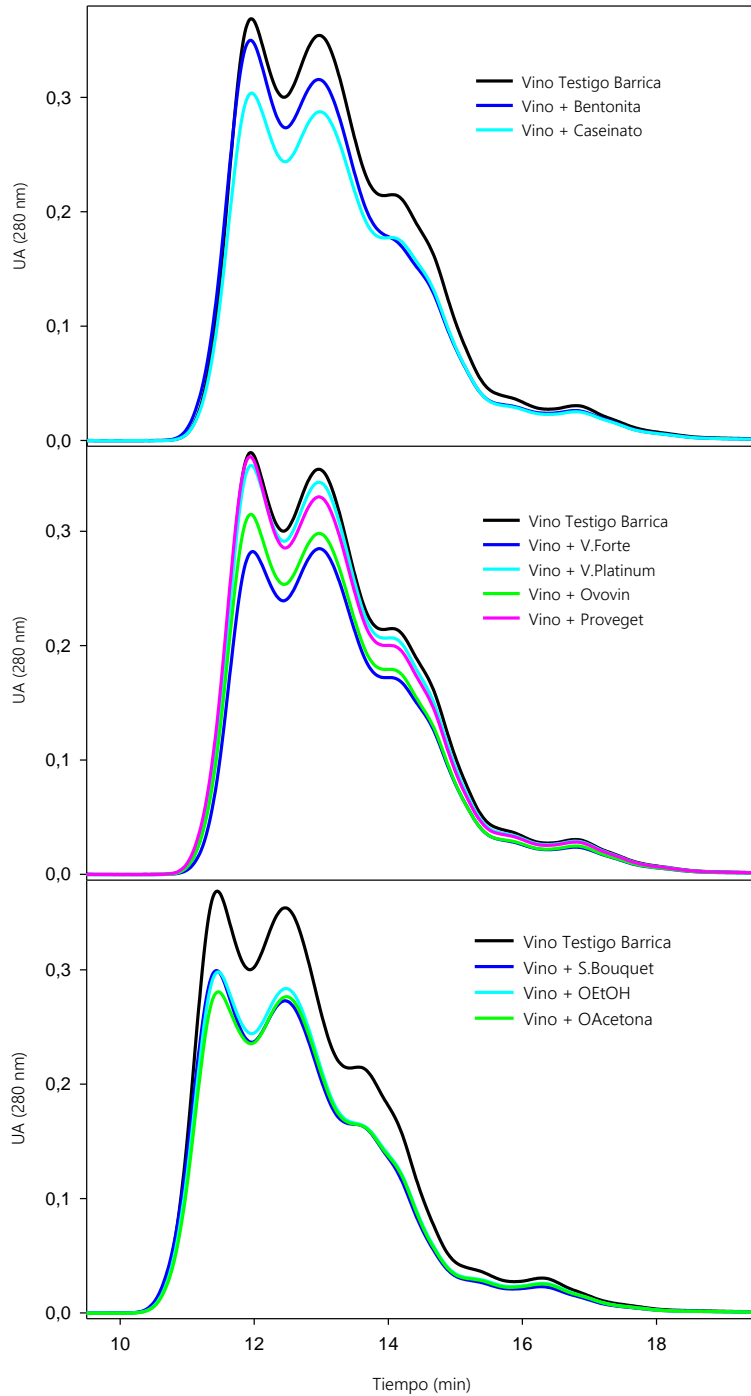


Tabla 4.2.6 Efecto de los afinantes sobre la retención de taninos medidos por fluoroglucinolisis y por SEC del vino en barrica. Porcentaje de retención de taninos calculados en la fluoroglucinolisis (*) y los compuestos fenólicos medidos por SEC (**).

Muestras	% retención de taninos*	% retención fenólica**	% retención a diferentes tiempos (min)		
			10,3 - 11,9	11,9 -13,3	13,3 -18,2
Vino + Bentonita	5,5	10,7	3,9	9,5	18,7
Vino + Caseinato	18,6	18,2	19,1	18,2	18,5
Vino + V.Forte	16,4	20,7	31,0	20,2	21,2
Vino + V.Platinum	9,7	4,0	6,9	3,0	5,6
Vino + Ovovin	12,2	16,5	16,6	15,4	19,1
Vino + Proveget	7,5	5,0	0,0	5,1	8,7
Vino + S.Bouquet	13,5	21,6	15,2	21,6	25,2
Vino + OEtOH	13,2	20,1	22,5	19,1	21,7
Vino + OAcetona	19,1	22,6	28,1	21,7	22,9

4.2.4 Conclusiones

Tras la evaluación del uso de los orujos purificados con etanol y acetona, sobre su capacidad de interacción con los compuestos polifenólicos del vino, y poder así equiparar su uso al de los agentes afinantes comerciales utilizados habitualmente en enología se puede concluir que tras el uso de vinos de distinta naturaleza, jóvenes o envejecidos, y de diferente variedad (Monastrell, CS y Merlot), que estos agentes son los que mayores reducciones ocasionan en general sobre el contenido de taninos y antocianos. Y, además, en general se observa una mayor capacidad de retención por parte de los OAcetona, qué con aquellos purificados con etanol, provocando los mayores efectos en la composición fenólica del vino, pudiendo disminuir así la sensación de astringencia y amargor en el vino.

En cuanto a la composición (GPm, epigalocatequina y epicatequinagalato) de los taninos, se observa un diferente comportamiento según el tipo de vino. Esto da lugar a que el efecto de los afinantes sea diferente según la composición inicial del vino, pero los OP

por lo general, tienden de nuevo, a ocasionar las mayores disminuciones de estos parámetros.

En cuanto a la selectividad que presentan los OP, por medio de los análisis realizados por SEC se puede concluir que no son selectivos, lo que beneficia al vino, disminuyen de igual forma los taninos sin importar su masa, porque de lo contrario podrían ocasionar desequilibrios en el mismo. De nuevo se ha observado, en comparación con los agentes comerciales, que son los que más reducen los compuestos polifenólicos, donde se incluyen los taninos despolimerizados, los más complejos, oxidados, los pigmentos poliméricos...etc., aunque, según la variedad de uva con la que se haya elaborado el vino, y el grado de envejecimiento del vino hace que su efecto sea más o menos acusado, pues en el vino pasado por barrica y en el vino Merlot, se observó que la capacidad de los OP para retirar compuestos polifenólicos de este tipo era más importante que para los vinos Monastrell y CS.

4.3 ESTUDIO DEL IMPACTO DE LOS ORUJOS PURIFICADOS EN EL PERFIL MINERAL Y AROMÁTICO DEL VINO TINTO, COMO DE SU CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE OCRATOXINA A Y AMINAS BIÓGENAS.

4.3.1 Introducción

4.3.1.1 Efecto sobre la fracción aromática

La fracción volátil del vino es una de las características más importantes que influyen en su calidad y en las preferencias de los consumidores. Hay más de 1000 compuestos identificados, de familias químicas diferentes, con rangos de solubilidades, polaridades y volatilidad muy distintas ([Andujar-Ortiz et al., 2009](#)). Los compuestos volátiles pueden interactuar física y químicamente con otros analitos de mezclas complejas, como es el propio vino. De este modo, pueden interactuar con los antocianos, con los polisacáridos, los compuestos fenólicos o con el dióxido de azufre ([Sáenz-Navajas et al., 2010](#)).

Los constituyentes del aroma de un vino son clasificados según su origen como varietales, prefermentativos, fermentativos y postfermentativos, siendo los dos primeros los responsables del aroma primario, y los dos últimos del aroma secundario y terciario. Los compuestos químicos que constituyen el aroma primario se encuentran principalmente en el hollejo de la uva, siendo los principales los terpenoles, los norisoprenoides, tioles volátiles, y compuestos C₆, tanto aldehídos como alcoholes. El aroma secundario es constituido por compuestos fermentativos, originados por las levaduras durante la fermentación, como los alcoholes superiores, los ésteres, los compuestos carbonilados, azufrados y nitrogenados, junto con las lactonas y los fenoles volátiles. Por último el aroma terciario o "bouquet" es caracterizado por los constituyentes postfermentativos, resultantes del envejecimiento del vino en barrica o en botella.

El tratamiento del vino con agentes afinantes puede producir modificaciones gustativas y olfativas en los vinos; además desde el punto de visto organoléptico, el afinamiento de los vinos puede tener tanto aspectos positivos como negativos, dependiendo de la cantidad del agente afinante utilizado y de su actuación en el vino, pues se puede lograr un vino más suave y elegante, o todo lo contrario, uno menos atractivo y pesado. Según cómo los compuestos aromáticos se vean afectados, el aroma del vino variará más o menos.

El uso de los agentes afinantes influye directamente sobre los aromas, disminuyendo esta fracción en la mayoría de los casos. Agentes de origen proteico pueden retener compuestos aromáticos hidrofílicos mediante enlaces de hidrógeno débiles con su superficie proteica, mientras que otros de carácter hidrofóbico pueden unirse a sitios interiores de la proteína de naturaleza hidrófoba con mucha mayor afinidad (Granato et al., 2014). Otros afinantes de tipo arcilloso, como es la bentonita también producen pérdidas importantes de la fracción aromática de los vinos (Vincenzi et al., 2015). Altos porcentajes de retención de aldehídos, alcoholes, ésteres, terpenos o metilcetonas, también han sido descritos con el uso de las proteínas de la soja, de la leche y de legumbres, como el guisante, cuando se han usado como afinantes mediante interacciones hidrofóbicas o por puentes de hidrógeno (Chalier et al., 2007). Lubbers et al. (1994) sugirieron en un estudio que las paredes celulares de las levaduras, las cuales en composición se pueden asemejar a los orujos purificados, que disminuían los compuestos volátiles del vino, en especial los más hidrofóbicos, por su adsorción sobre las superficies de las paredes celulares, de ahí la importancia de estudiar como afecta el afinado con orujos, al perfil aromático del vino.

4.3.1.2 Reducción de sustancias indeseables en el vino

Las aminas biógenas (AB), derivadas de los aminoácidos son formadas principalmente tras la fermentación maloláctica, presentan efectos tóxicos en personas sensibles a este tipo de sustancias. La histamina es la más estudiada de todas ellas, por tener mayores efectos sobre la salud, puede causar dolores de cabeza, bajadas de la presión arterial, palpitaciones cardiacas, edemas, vómitos, diarrea y fiebre, entre otros (Arrieta & Prats-Moya, 2012). Otra de las sustancias perjudiciales que se puede encontrar en el vino, es la ocratoxina A (OTA), considerada un carcinógeno que se acumula en varios tejidos del cuerpo, por lo que la posibilidad de que sea retirada por los orujos purificados a la misma vez que afinan el vino sería una buena opción, de hecho algunos autores han corroborado la eficacia de los orujos para descontaminar el vino de esta sustancia (Solfrizzo et al., 2010).

Los minerales tienen tanto un efecto nutricional como tóxico para la salud, y en el vino un exceso de ellos puede ocasionar efectos negativos. El consumo de vino contribuye a los requerimientos nutricionales diarios de los minerales esenciales, aunque su

biodisponibilidad depende de la forma fisicoquímica en la que se encuentren. Pero hay algunos minerales que pueden tener efectos tóxicos, como el cadmio y el plomo, y su contenido está regulado (Pohl, 2007). Factores como los fertilizantes utilizados para el cultivo de la vid, el contacto del vino con materiales de cobre, hierro, vidrio, aluminio, madera, acero inoxidable...etc., y el uso de agentes afinantes, puede contribuir al aumento de los minerales en el vino. Algunos minerales tienen efectos negativos en el vino, como el calcio y el potasio, en exceso, pueden aumentar la precipitación tartárica, y otros, como el hierro y el cobre, que en elevada concentración causan la quiebra ferrosa y cúprica respectivamente. Por tanto, el hecho de que los orujos purificados (OP), además de afinar puedan retirar este tipo de sustancias que pueden resultar perjudiciales para las personas y repercutir en la calidad del vino, debe de ser estudiado.

4.3.2 Diseño experimental

Para comprobar cómo se ven afectados los compuestos volátiles de un vino, se utilizó 100 mL de vino de Monastrell de la añada de 2015 envejecido en barrica de roble francés durante tres meses. A este vino se le añadieron los distintos agentes afinantes, a la máxima dosis recomendada por el fabricante, y una cantidad de 13 mg/mL de OP de la variedad Monastrell, purificados tanto con etanol (OEtOH) como con acetona (OAcetona). El tiempo de contacto fue de 21 días. Tras pasar este tiempo, los vinos tras cada uno de los tratamientos (repetidos por triplicado), fueron analizados según la metodología descrita en el apartado 3.6, para ver la variación en componentes volátiles tras el proceso de afinamiento.

Para comprobar la eficacia de los OP y de los afinantes comerciales para retirar OTA, AB y algunos minerales, se realizaron tres experimentos diferentes con un vino joven de Monastrell (añada 2015):

En primer lugar, para ver su capacidad de interacción con las aminas biógenas, el vino fue dopado con las aminas biógenas más comunes (cadaverina, putrescina, histamina, fenilalanina y tiramina) hasta una concentración final de 100 mg/L cada una. Se añadieron a las muestras de vino los diferentes agentes afinantes y los OP, realizándose todos los ensayos por triplicado, y poniendo nitrógeno gaseoso en el espacio de cabeza para evitar posibles oxidaciones. El tiempo de contacto fue de 21 días.

En segundo lugar, la capacidad de retención de OTA fue estudiada dopando una cantidad de vino hasta alcanzar una concentración final de 0,5 µg/L de la micotoxina. El vino se mezcló con los OP y los agentes afinantes comerciales, cada tratamiento por triplicado, y se puso nitrógeno en el espacio de cabeza. Se dejó un tiempo de contacto de 21 días.

Por último, el análisis sobre los minerales se realizó directamente sobre el vino Monastrell al que se le añadió los afinantes y los OP, por triplicado cada tratamiento, y dejándolo interactuar durante 21 días. También se realizaron vinos controles para cada uno de los tratamientos, en los que los agentes afinantes y los OP estaban en contacto 21 días con una disolución modelo de vino, para comprobar si alguno de los afinantes cedía al medio alguno de los minerales estudiados.

4.3.3 Resultados y discusión

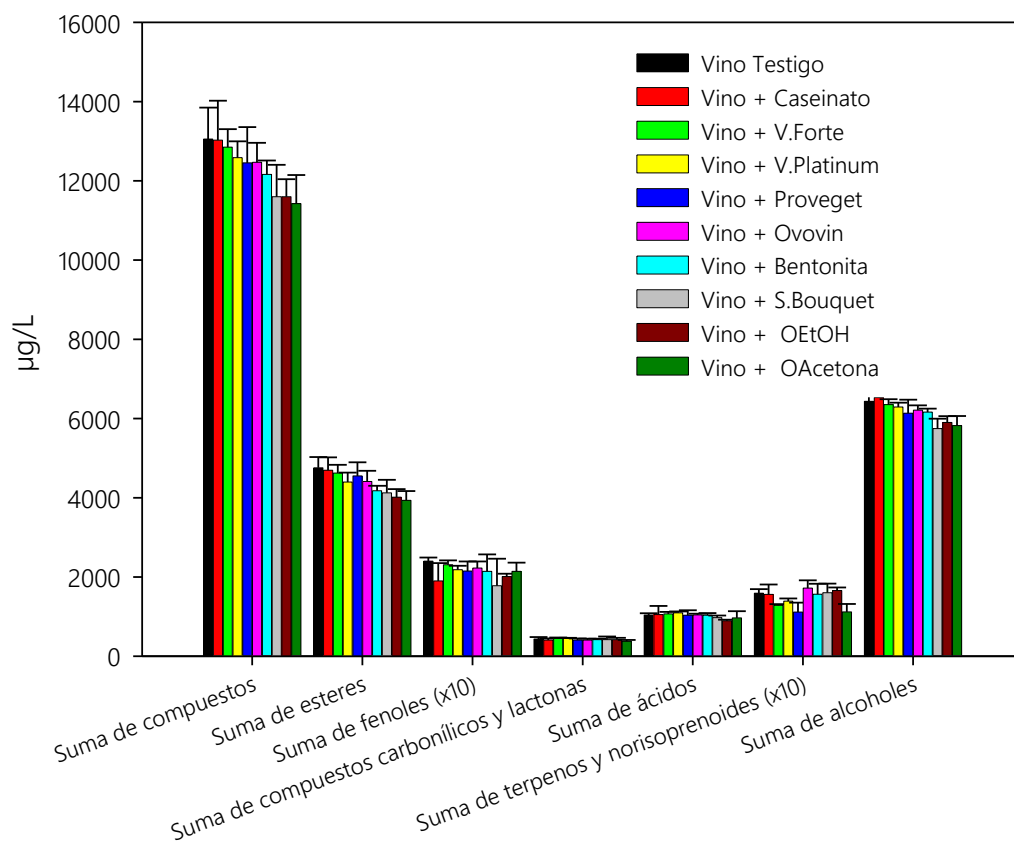
4.3.3.1 Efecto de los agentes afinantes y los orujos purificados sobre la composición aromática del vino

Los resultados del análisis semicuantitativo de los compuestos volátiles presentes en el vino se muestran en la figura 4.3.1. Los compuestos identificados incluyen alcoholes, compuestos carbonílicos, esterés, fenoles, terpenos y norisoprenoides, y ácidos. En la concentración total de compuestos volátiles se observan diferencias entre los afinantes, y estas son más acusadas en el caso de S.Bouquet y los orujos purificados de Monastrell, tanto con etanol como con acetona, sin embargo, con otros afinantes apenas se observan diferencias, como es el caso de caseinato y las dos gelatinas utilizadas, V.Forte y V.Platinum. [Castillo-Sánchez et al. \(2006\)](#), usaron agentes afinantes como PVPP y gelatina para afinar un vino con un envejecimiento de ocho meses en barrica, y los resultados de la evaluación sensorial correspondiente a la fracción aromática mostraban que se veía intensificada, por lo que un buen uso de los agentes afinantes puede favorecer la conservación de la fracción organoléptica del vino, no enmascarándola e incluso favorecer su expresión en el vino.

Los alcoholes principales que se han detectado en el vino estudiado son el 2-metilpropanol, el 3-metilbutanol, hexanol y el 2-feniletanol. Generalmente, estos alcoholes mayoritarios ven reducido su contenido al aplicar los agentes afinantes, sobre todo con los OP, algo que podría resultar beneficioso, pues algunos de ellos aportan notas vegetales y químicas ([Chavez-Muñoz, 2012](#)). Otros alcoholes minoritarios en la composición de este vino, incrementan los valores de su concentración pero sin diferencias significativas, tanto con algunos afinantes comerciales, como Proveget y bentonita, así como con los OP, como es el caso del 3-metil-1-pentanol, el 2,3-butanodiol y el *p*-cresol. El hecho de que los OP puedan producir algún incremento es porque la gran mayoría de los compuestos volátiles que le proporcionan el aroma al vino se encuentran en la piel ([Selli et al., 2006](#)), y estos durante un tiempo de contacto largo, en este caso, 21 días, pueden experimentar cesiones. [De Torres et al. \(2015\)](#), maceraron con orujos de Moscatel liofilizados y orujos de la variedad Airén durante la elaboración del vino, y experimentaron que al añadir los orujos liofilizados durante la fermentación, se incrementaban algunas fracciones aromáticas en el vino final,

aumentando las notas frutales y frescas. La cantidad de 3-metilpropanol se ve reducida con los OP, y aún más con S.Bouquet, por un lado esto puede resultar un fenómeno importante, pues este compuesto cede al vino unos tonos a coliflor y patata cruda, pero por otro lado, investigadores han demostrado que su presencia en el vino podría resultar beneficiosa ya que, acentúa las notas a tostado y afrutado, permitiendo así que no se enmarcaren los olores correspondientes a los compuestos que causan estos tonos, y además ocasiona una reducción de las notas a piracina y eucalipto, traduciéndose la presencia de este compuesto en un aumento de la calidad del vino (Cacho, 2006).

Figura 4.3.1 Efecto de los afinantes y los OP sobre la composición aromática del vino y las distintas familias en las que se divide. Abreviaciones: O: orujos.



En el balance total de alcoholes, los OP junto con S.Bouquet son los que reducen de forma más elevada esta fracción, debido quizás a la compleja composición de los orujos purificados que hace que compuestos como los alcoholes, con cierto carácter hidrofílico establezcan interacciones con ellos de tipo puente de hidrógeno, ya que el resto de afinantes probados, con los que no se reduce de forma tan marcada la composición de alcoholes, son de origen proteico e intervienen más fuerzas de tipo hidrofóbicas, o interacciones π - π , que no son típicas de los alcoholes. Cabe destacar que con el uso de caseinato se mantiene la misma concentración de alcoholes que en el testigo, y que el uso de bentonita reduce esta fracción, aunque la reducción es en menor grado que la provocada por S.Bouquet y los OP. [Lisanti et al. \(2017\)](#), estudiando otros afinantes, comprobaron que PVPP no provoca un descenso en el contenido de alcoholes en el vino tinto, por la menor hidrofobicidad de estos, sin embargo, con carbón activo experimentaron un descenso del 17%. Otros investigadores como [Granato et al. \(2014\)](#), con proteínas derivadas de las lentejas y del guisante, experimentaron reducciones entre el 40-60% de la composición de alcoholes en el vino blanco. Sin embargo, en este estudio la reducción causada por Proveget, proteína derivada del guisante, fue del 4,7%.

En la fracción correspondiente a los ésteres (tabla 4.3.2), el efecto de los agentes afinantes comerciales sobre la concentración de estos no es muy elevada, ya que la concentración de los ésteres totales, tras la aplicación de los agentes afinantes no es muy diferente a la del vino testigo. S.bouquet, Ovovin, bentonita, y los OP son los que más reducen el contenido total, y caseinato junto con V.Platinum mantienen prácticamente igual la concentración de ésteres que en el vino testigo. Algunos compuestos ven incrementado su valor absoluto individualmente, tras la aplicación de caseinato, como el caso de lactato de etilo y dietilsuccinato, pero sin diferencias con respecto al vino testigo, ambos compuestos por su umbral de percepción no contribuyen mucho al aroma del vino ([Gil et al., 2006](#)). Además, decanoato de etilo y dietilsuccinato también ven aumentado su valor absoluto, pero sin variaciones grandes, con respecto al vino testigo, tras la aplicación de las dos gelatinas, mientras que otros, como decanoato de etilo, octanoato de etilo, hexanoato de etilo y el acetato de 3-metilbutanol disminuyen su concentración tras el uso de los OP. [Lisanti et al. \(2017\)](#) observaron que esta familia era la más afectada tras afinar el vino tinto con PVPP, una zeolita y carbón activo, quizás por la mayor hidrofobicidad que presentan estos compuestos, aunque la matriz y su concentración inicial juegan un papel importante en su reducción.

Tabla 4.3.1 Efecto de los agentes afinantes y los OEtOH y OAcetona sobre las fracciones aromáticas de alcoholes, compuestos carbonílicos, fenoles y ácidos (µg/L).

Compuestos (µg/L)	TRATAMIENTOS									
	Vino Testigo	BENTONITA	CASEINATO	V.Forte	V.Platinum	OVOVIN	PROVEGET	S.BOUQUET	OEtOH	OAcetona
ALCOHOLES										
2-metil propanol	154,60 ± 84,63	207,29 ± 3,92	202,19 ± 43,31	166,24 ± 10,22	158,00 ± 7,70	200,00 ± 5,57	192,47 ± 2,16	181,33 ± 11,02	193,67 ± 6,51	169,33 ± 41,86
butanol	11,50 ± 3,40	3,38 ± 5,86	10,09 ± 5,42	0,00 ± 0,00	10,00 ± 3,42	11,26 ± 2,49	6,98 ± 9,87	11,40 ± 1,55	10,40 ± 3,32	11,56 ± 3,50
3-metil butanol	3599,57 ± 210,17	3323,87 ± 22,85	3.540,83 ± 180,84	3466,08 ± 53,90	3348,80 ± 64,49	3336,55 ± 64,83	3275,66 ± 140,17	3.067,63 ± 130,74	3139,07 ± 72,06	3063,91 ± 66,02
4-metilpentanol	2,00 ± 0,40	2,20 ± 0,61	1,84 ± 1,60	2,87 ± 0,45	1,28 ± 0,50	2,25 ± 0,93	1,36 ± 1,07	1,95 ± 1,15	2,87 ± 1,55	2,11 ± 1,69
3-metil-1-pentanol	17,80 ± 8,95	23,80 ± 3,76	17,85 ± 2,42	21,04 ± 1,81	15,66 ± 1,60	21,87 ± 1,70	22,86 ± 4,44	21,25 ± 1,36	21,35 ± 3,69	18,66 ± 4,78
hexanol	169,64 ± 5,82	159,68 ± 0,96	160,93 ± 3,94	162,51 ± 2,18	158,70 ± 1,44	155,85 ± 3,01	153,72 ± 6,57	146,38 ± 6,12	147,37 ± 2,35	163,22 ± 4,71
cis-3-hexenol	1,66 ± 0,44	3,42 ± 0,52	3,05 ± 0,45	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,39 ± 0,82	2,81 ± 0,26	2,69 ± 0,46	3,14 ± 1,68	2,93 ± 0,52
2-etil hexanol	15,88 ± 5,17	18,94 ± 3,96	16,78 ± 2,62	17,75 ± 4,03	11,15 ± 0,87	16,47 ± 4,14	14,17 ± 2,74	12,95 ± 1,64	24,09 ± 3,09	15,43 ± 3,10
2,3-butanodiol	37,22 ± 3,20	36,43 ± 1,64	40,07 ± 6,74	34,84 ± 5,52	28,50 ± 3,77	35,85 ± 1,79	33,25 ± 7,71	31,26 ± 1,76	35,45 ± 1,42	36,32 ± 5,45
octanol	0,00 ± 0,00	30,77 ± 1,73	24,39 ± 3,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	28,61 ± 6,13	29,83 ± 0,23	28,42 ± 1,01	23,75 ± 1,39	28,33 ± 3,06
2,3 butanodiol	31,23 ± 6,11	36,38 ± 1,12	26,17 ± 2,74	37,30 ± 3,53	34,09 ± 1,51	34,54 ± 10,03	36,98 ± 7,96	35,34 ± 1,94	36,60 ± 9,36	33,96 ± 11,23
metil tiopropanol	21,09 ± 0,45	18,59 ± 0,07	18,12 ± 1,74	17,42 ± 0,98	16,90 ± 0,37	15,01 ± 1,65	15,41 ± 1,51	12,56 ± 0,90	15,33 ± 0,40	15,49 ± 1,05
bencil alcohol	0,00 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
2-feniletanol	2369,95 ± 69,37	2293,40 ± 34,38	2.460,00 ± 82,87	2405,67 ± 53,53	2498,00 ± 0,00	2344,94 ± 17,75	2344,40 ± 155,86	2.184,96 ± 90,27	2243,81 ± 49,73	2255,10 ± 93,89
p-Cresol	1,23 ± 2,13	4,35 ± 2,53	5,51 ± 2,96	3,66 ± 0,95	6,41 ± 1,50	3,89 ± 0,79	3,83 ± 1,28	5,22 ± 1,58	4,11 ± 0,49	3,29 ± 1,17
Suma de alcoholes	6433,37 ± 400,24	6162,51 ± 83,91	6527,83 ± 340,78	6335,38 ± 137,09	6287,49 ± 87,16	6210,48 ± 121,62	6133,73 ± 341,82	5743,35 ± 251,50	5901,02 ± 157,04	5819,66 ± 242,01
COMPUESTOS CARBONÍLICOS										
3-hidroxi-2-butanona	0,00 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	5,97 ± 1,68	6,58 ± 0,66	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
2-octanona	67,98 ± 12,31	76,36 ± 5,21	57,39 ± 17,58	81,06 ± 3,71	98,00 ± 10,25	73,73 ± 3,34	74,35 ± 12,34	68,15 ± 3,00	74,25 ± 0,77	62,91 ± 9,09
Furfural	13,91 ± 0,95	12,50 ± 1,05	12,41 ± 4,25	10,37 ± 0,65	11,20 ± 0,56	13,14 ± 1,42	10,24 ± 3,40	10,05 ± 0,40	10,55 ± 0,86	10,45 ± 0,51
2-etil-5-metil furano	4,33 ± 4,99	6,98 ± 1,97	5,55 ± 0,96	5,77 ± 2,93	2,63 ± 0,05	6,10 ± 3,34	3,10 ± 0,64	3,54 ± 1,05	7,22 ± 0,59	6,04 ± 2,85
benzaldehido	15,76 ± 4,04	10,61 ± 0,11	1,93 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	8,50 ± 2,12	7,33 ± 0,58	4,13 ± 0,23	8,00 ± 1,00
5-metilfuranocarboxil aldehido	102,37 ± 16,11	71,98 ± 2,45	72,48 ± 5,57	113,27 ± 2,44	113,99 ± 0,06	80,76 ± 3,87	75,05 ± 4,60	75,97 ± 3,56	102,12 ± 28,27	70,33 ± 2,08
butirolactona	17,77 ± 1,49	19,19 ± 1,40	15,72 ± 4,12	14,84 ± 6,36	7,60 ± 7,60	18,84 ± 4,78	18,85 ± 0,95	18,98 ± 0,34	17,91 ± 4,17	15,20 ± 4,88
Z-lactona	83,17 ± 8,93	87,80 ± 1,40	84,94 ± 1,01	83,59 ± 5,06	87,86 ± 0,64	80,53 ± 8,42	83,94 ± 0,66	76,83 ± 1,69	82,13 ± 3,75	82,46 ± 4,76
E-lactona	126,49 ± 1,49	124,61 ± 2,96	133,92 ± 6,35	132,77 ± 5,02	139,20 ± 0,08	124,61 ± 3,49	122,11 ± 10,99	115,46 ± 4,26	113,79 ± 3,50	115,09 ± 4,92
Suma carbonilos y lactonas	431,78 ± 50,32	410,03 ± 16,56	384,34 ± 39,90	447,64 ± 27,84	467,06 ± 19,91	397,71 ± 28,66	396,15 ± 35,69	376,31 ± 14,88	412,11 ± 42,15	370,49 ± 30,09
FENOLES										
4-metil guayacol	28,47 ± 0,31	21,78 ± 7,75	20,98 ± 6,39	25,11 ± 2,02	13,68 ± 0,54	17,80 ± 8,44	16,12 ± 2,70	17,87 ± 12,89	12,33 ± 0,58	19,29 ± 5,43
Guayacol	10,21 ± 0,81	9,67 ± 0,30	10,79 ± 1,01	9,87 ± 0,14	10,64 ± 0,44	10,28 ± 0,18	9,52 ± 0,77	7,92 ± 3,09	10,41 ± 0,33	9,96 ± 0,16
4-etilguayacol	24,40 ± 2,27	22,09 ± 1,46	24,04 ± 1,52	23,28 ± 1,39	23,51 ± 0,74	21,23 ± 0,45	21,36 ± 2,47	13,67 ± 10,64	19,96 ± 1,13	20,66 ± 1,18
4-propil guayacol	7,44 ± 0,19	10,30 ± 3,02	9,01 ± 0,99	9,22 ± 1,55	11,08 ± 1,80	8,46 ± 1,45	7,78 ± 0,96	7,01 ± 0,27	6,30 ± 0,36	7,36 ± 2,16
Eugenol	14,01 ± 0,39	13,32 ± 1,43	14,66 ± 0,24	14,56 ± 0,78	15,90 ± 0,49	13,53 ± 1,40	13,29 ± 3,13	9,91 ± 5,62	21,67 ± 0,56	21,12 ± 1,29
4-etil fenol	88,80 ± 0,83	74,54 ± 25,68	89,83 ± 2,36	92,98 ± 3,69	100,00 ± 3,80	87,51 ± 3,14	85,66 ± 8,56	82,96 ± 5,45	73,35 ± 1,51	72,47 ± 1,98
fenol	67,26 ± 4,73	62,39 ± 3,34	20,64 ± 32,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	63,73 ± 1,70	61,14 ± 5,96	38,47 ± 30,75	57,78 ± 2,62	63,35 ± 9,81
Suma de fenoles	240,59 ± 9,54	214,09 ± 42,97	189,95 ± 45,00	175,02 ± 9,58	174,81 ± 7,82	222,53 ± 16,77	214,87 ± 24,53	177,82 ± 68,71	201,81 ± 7,08	214,22 ± 22,01
ÁCIDOS										
ácido acético	232,09 ± 34,65	206,89 ± 1,57	179,85 ± 159,34	212,93 ± 13,54	218,40 ± 3,62	245,17 ± 4,18	247,54 ± 36,86	242,77 ± 20,57	279,43 ± 8,23	276,74 ± 25,73
ácido butanoico	18,75 ± 0,28	16,55 ± 1,96	16,92 ± 2,32	15,72 ± 1,82	17,37 ± 0,26	17,45 ± 0,70	17,11 ± 1,00	16,12 ± 0,48	18,14 ± 0,90	17,07 ± 0,50
ácido hexanoico	252,48 ± 2,53	254,47 ± 12,76	268,99 ± 15,24	13,91 ± 0,31	246,00 ± 6,02	229,50 ± 9,49	229,83 ± 25,86	215,58 ± 3,77	213,95 ± 6,21	220,87 ± 5,37
ácido octanoico	466,67 ± 3,86	485,67 ± 28,46	507,55 ± 28,26	501,70 ± 16,16	529,40 ± 20,79	474,68 ± 13,59	474,20 ± 50,74	437,24 ± 6,67	353,50 ± 7,82	357,05 ± 21,14
ácido nonanoico	15,07 ± 0,75	15,20 ± 1,53	14,76 ± 7,04	17,02 ± 2,14	19,71 ± 0,00	17,96 ± 0,67	12,93 ± 6,07	8,25 ± 1,12	10,66 ± 0,17	9,99 ± 0,23
ácido decanoico	50,95 ± 4,68	56,94 ± 4,63	62,44 ± 6,76	64,31 ± 3,29	65,45 ± 0,53	57,39 ± 2,49	51,12 ± 7,08	54,72 ± 20,96	19,80 ± 0,64	84,68 ± 117,26
Suma de ácidos	1036,00 ± 46,75	1035,72 ± 50,91	1050,51 ± 218,95	825,59 ± 37,25	1096,33 ± 31,22	1042,14 ± 31,11	1032,73 ± 127,61	974,68 ± 53,58	895,48 ± 23,96	966,41 ± 170,22

Tabla 4.3.2 Efecto de los agentes afinantes y los OEtOH y OAcetona sobre las fracciones aromáticas de ésteres, terpenos y norisoprenoides (µg/L).

Compuestos (µg/L)	TRATAMIENTOS									
	Vino Testigo	BENTONITA	CASEINATO	V.Forte	V.Platinum	OVOVIN	PROVEGET	S.BOUQUET	OEtOH	OAcetona
ESTERES										
acetato de 2-metilpropilo	0,00 ± 0,00	4,88 ± 0,24	5,32 ± 0,53	5,30 ± 0,14	5,60 ± 0,32	4,43 ± 1,24	5,14 ± 0,33	2,80 ± 2,43	4,83 ± 0,63	3,15 ± 1,23
butanoato de etilo	63,50 ± 9,22	53,81 ± 1,44	46,82 ± 9,69	43,38 ± 9,86	52,89 ± 2,13	48,07 ± 7,61	54,06 ± 5,30	42,69 ± 10,47	45,48 ± 5,11	42,62 ± 1,49
2-metilbutanoato de etilo	11,25 ± 0,96	8,99 ± 1,30	7,56 ± 2,99	5,17 ± 4,07	8,99 ± 2,55	7,73 ± 1,60	11,29 ± 0,02	8,35 ± 4,12	8,11 ± 3,31	8,27 ± 0,72
3-metilbutanoato de etilo	11,72 ± 1,65	11,47 ± 0,76	9,88 ± 1,53	8,50 ± 3,63	12,14 ± 1,22	11,25 ± 1,87	12,68 ± 0,16	10,30 ± 2,21	10,93 ± 1,22	9,16 ± 0,32
acetato de 3-metilbutanol	295,14 ± 38,39	269,24 ± 7,58	235,89 ± 18,59	230,00 ± 40,00	265,76 ± 14,49	238,23 ± 37,13	258,98 ± 17,12	214,37 ± 46,61	168,75 ± 17,11	160,34 ± 9,21
acetato de 2-metilbutanol	12,63 ± 0,00	10,29 ± 3,88	1,67 ± 1,48	10,04 ± 1,44	10,37 ± 1,77	6,58 ± 4,86	8,03 ± 3,03	3,01 ± 1,32	2,59 ± 1,99	0,53 ± 0,46
acetato de pentilo	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,97 ± 0,99	1,67 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
hexanoato de etilo	466,87 ± 41,28	461,74 ± 17,76	417,24 ± 32,26	232,06 ± 62,87	301,99 ± 19,99	365,00 ± 103,94	418,86 ± 27,07	377,00 ± 74,59	378,33 ± 44,00	360,00 ± 26,46
acetato de hexilo	4,26 ± 4,21	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
lactato de etilo	242,05 ± 21,30	214,91 ± 3,48	252,18 ± 34,91	214,00 ± 5,83	223,32 ± 5,60	222,98 ± 6,17	216,25 ± 22,14	205,60 ± 9,21	211,21 ± 2,76	209,03 ± 6,11
octanoato de metilo	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
octanoato de etilo	679,28 ± 42,85	607,41 ± 25,15	641,29 ± 45,64	636,86 ± 27,15	707,66 ± 36,26	645,97 ± 7,98	674,58 ± 46,57	578,63 ± 64,27	540,36 ± 46,90	467,36 ± 43,70
hexanoato de isopentilo	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3-hidroxibutanoato de etilo	7,76 ± 4,26	5,26 ± 2,02	4,13 ± 2,01	3,80 ± 0,16	5,84 ± 1,62	5,90 ± 2,09	5,90 ± 2,09	3,89 ± 0,41	6,80 ± 0,86	5,36 ± 2,01
nonanoato de etilo	55,15 ± 2,15	52,58 ± 2,15	60,73 ± 6,08	55,02 ± 0,43	58,22 ± 3,45	59,01 ± 2,78	55,33 ± 7,31	49,29 ± 2,17	54,65 ± 2,43	52,55 ± 3,76
metoxiacetato de 3-metilbutilo	32,12 ± 3,03	35,29 ± 0,19	29,78 ± 1,47	35,64 ± 1,47	34,41 ± 0,92	34,41 ± 0,92	33,72 ± 4,39	33,24 ± 0,79	34,71 ± 5,14	28,33 ± 3,06
2-furanocarboxilato de etilo	3,27 ± 2,91	4,96 ± 0,76	3,33 ± 1,70	4,89 ± 0,11	4,05 ± 1,22	5,12 ± 1,16	4,33 ± 1,24	4,80 ± 1,40	4,97 ± 0,55	4,46 ± 0,73
butanodioato de metiletilo	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0 ± 0,00	0,00 ± 0,00
decanoato de etilo	433,79 ± 10,63	379,00 ± 6,48	438,01 ± 60,23	385,40 ± 7,99	441,87 ± 52,07	344,42 ± 35,44	371,69 ± 18,22	302,23 ± 13,30	160,64 ± 4,65	154,24 ± 12,84
octanoato de 3-metilbutanol	21,10 ± 0,51	8,00 ± 0,60	11,70 ± 1,39	28,08 ± 0,66	29,22 ± 0,69	21,50 ± 8,19	19,48 ± 9,96	24,88 ± 0,89	21,40 ± 1,88	19,85 ± 1,03
dietil succinato	2090,34 ± 49,56	1697,84 ± 14,05	2144,80 ± 61,82	2163,00 ± 56,43	2108,60 ± 42,05	2068,65 ± 17,42	2052,23 ± 115,08	1961,99 ± 43,22	2025,51 ± 38,04	2022,72 ± 58,57
salicilato de metilo	20,07 ± 2,52	22,85 ± 5,17	34,64 ± 2,30	19,95 ± 0,14	16,84 ± 0,67	21,60 ± 0,26	19,50 ± 7,45	15,51 ± 0,70	14,84 ± 0,73	22,36 ± 14,01
benzoacetato de etilo	13,78 ± 0,73	12,73 ± 0,67	14,40 ± 1,62	15,15 ± 0,89	14,46 ± 0,16	13,80 ± 1,03	13,73 ± 1,69	13,69 ± 0,85	12,58 ± 0,25	12,81 ± 1,39
acetato de 2-feniletilo	91,01 ± 3,61	89,68 ± 0,97	99,15 ± 5,82	99,06 ± 3,71	96,49 ± 2,50	93,80 ± 4,28	90,86 ± 6,20	84,41 ± 1,53	70,10 ± 1,73	69,88 ± 1,27
tetradecanoato de etilo	20,20 ± 8,41	24,00 ± 2,88	39,90 ± 2,06	16,53 ± 0,17	25,36 ± 4,10	16,17 ± 2,46	27,31 ± 8,44	18,36 ± 13,71	31,47 ± 3,78	46,35 ± 3,02
hexadecanoato de etilo	46,47 ± 9,95	85,58 ± 13,34	113,88 ± 7,85	62,93 ± 6,86	72,23 ± 7,05	69,19 ± 6,59	89,23 ± 17,86	84,39 ± 16,90	115,02 ± 17,48	126,81 ± 11,43
etilhidrogeno succinato	131,12 ± 16,49	115,68 ± 12,19	82,81 ± 20,04	117,66 ± 4,26	125,30 ± 5,84	108,83 ± 9,55	110,42 ± 25,22	82,00 ± 21,04	89,56 ± 4,04	106,42 ± 32,54
Suma de esteress	4752,89 ± 274,64	4176,21 ± 123,04	4695,10 ± 322,00	4394,39 ± 239,26	4623,70 ± 206,77	4411,95 ± 268,04	4550,98 ± 344,95	4121,45 ± 332,13	4012,85 ± 204,59	3932,61 ± 235,37
TERPENOS Y NORISOPRENOIDES										
Limoneno	2,40 ± 0,40	1,17 ± 1,07	0,45 ± 0,56	2,57 ± 0,12	3,30 ± 0,66	0,34 ± 0,31	0,94 ± 1,33	2,15 ± 3,03	0,88 ± 0,79	0 ± 0
Ionona	76,98 ± 7,02	82,79 ± 18,39	82,83 ± 8,79	47,27 ± 19,63	52,95 ± 2,07	112,67 ± 7,23	48,12 ± 13,72	100,33 ± 10,69	109,98 ± 0,33	50,68 ± 6,67
Linalol	24,21 ± 0,50	23,00 ± 0,91	22,38 ± 3,08	22,51 ± 2,32	21,63 ± 0,23	21,07 ± 3,76	23,06 ± 0,44	20,96 ± 0,40	19,06 ± 3,14	24,69 ± 5,17
α-Terpineol	21,60 ± 0,46	17,83 ± 3,40	20,84 ± 6,31	19,58 ± 6,20	24,16 ± 2,99	6,79 ± 0,44	9,25 ± 5,33	3,76 ± 1,43	15,14 ± 2,65	14,04 ± 1,80
Citronelol	16,72 ± 0,91	15,99 ± 0,80	16,68 ± 1,76	16,84 ± 0,67	17,48 ± 0,21	16,01 ± 1,21	15,96 ± 2,05	14,27 ± 0,82	10,44 ± 0,46	12,99 ± 5,65
Damascenona	15,74 ± 0,85	15,66 ± 1,82	12,80 ± 4,55	15,54 ± 0,50	15,61 ± 0,47	15,01 ± 6,82	13,99 ± 0,84	18,92 ± 6,57	10,20 ± 0,35	9,58 ± 0,47
Nerolidol	2,10 ± 0,17	0 ± 0,00	0 ± 0,00	4,20 ± 1,39	3,69 ± 0,18	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0	0 ± 0
Suma terpenos y norisoprenoides	159,74 ± 10,32	156,44 ± 26,39	155,97 ± 25,06	128,50 ± 30,82	138,82 ± 6,82	171,89 ± 19,77	111,31 ± 23,71	160,40 ± 22,93	165,69 ± 7,72	111,98 ± 19,76
SUMA TOTALES	11633,02 ± 729,76	10765,19 ± 225,02	11620,48 ± 705,90	11190,80 ± 407,93	11394,44 ± 316,27	11036,51 ± 421,36	11097,87 ± 723,86	10256,21 ± 602,12	10341,87 ± 405,55	10136,36 ± 508,52

Los fenoles son una familia de compuestos donde algunos de ellos se caracterizan por olores a ahumados y tostados, como el guayacol, el 4-metilguayacol y el 4-etilguayacol, y otros a especiados, como el eugenol, que contribuye con aromas a clavo. El origen de estos compuestos es muy variado, pues pueden proceder de la madera sin tostar, de la termólisis de la lignina durante el tostado o del humo del fuego producido durante el tostado (Sefton et al., 1990), pero también pueden originarse mediante la descarboxilación de los ácidos fenólicos presentes en la uva y en el vino. Estos son reducidos por todos los agentes afinantes, caseinato, Ovovin, Proveget, y los OAcetona tienen un efecto parecido a los anteriores pero los OEtOH reducen bastante esta fracción. Bentonita disminuye el contenido individualmente de algunos como el 4-etilfenol y el 4-metilguayacol. Hay dos compuestos pertenecientes a esta familia que incrementan ligeramente su concentración, sin grandes diferencias con respecto al vino testigo, por un lado, y tras el uso de Ovovin y caseinato se incrementa el 4-propilguayacol, y el eugenol cuando se utilizan los OP. El 4-etilfenol (4-EP), procedentes de la descarboxilación de ácidos hidroxicinámicos, tras la acción de las levaduras del tipo *Brettanomyces*, es un etilfenol que a altas concentraciones puede ser perjudicial y puede estar producido por la presencia de levaduras contaminantes, proporcionándole efectos negativos al vino, aportando notas herbáceas, farmacéuticas y equinas (Pérez-Prieto et al., 2002). Este fenómeno se ha intentado solucionar con diferentes prácticas enológicas, utilizando sulfitos, e incluso resinas una vez que el vino ya ha estado suficiente tiempo en barrica, pero no han tenido mucho éxito (Garde-Cerdán et al., 2006), por tanto, el uso de los OP, que como se observa en la tabla 4.3.1 reducen el contenido de este compuesto, así pueden considerarse una alternativa inocua y no alérgica para su eliminación. Afinantes como bentonita, Ovovin y algunas gelatinas no disminuyen en proporciones importantes estos tipos de compuestos. Otros investigadores como Milheiro et al. (2017), trataron muestras de vino tinto enriquecidas con 4-EP y 4-EG con ovoalbúmina, carbón activo, quitosán, carboximetilcelulosa y proteína de pescado, y comprobaron que estos tres últimos afinantes disminuían estos compuestos en el espacio de cabeza, pero a su vez otros compuestos aromáticos importantes, mientras que los dos primeros agentes mencionados reducían su concentración en disolución en cantidades importantes. En nuestros resultados el uso de Ovovin, no reduce de forma considerable este tipo de compuestos.

Los terpenos y los norisoprenoides, sufren un descenso en su concentración de forma considerable con el uso de Proveget y los OAcetona, el resto de afinantes mantienen la concentración de estos compuestos a niveles similares a los del testigo, mientras S.Bouquet, Ovovin y ambos tipos de OP, como se puede observar en la figura 4.3.1, incrementan la concentración de los mismos. En el caso de los OP, pueden incrementar el contenido de esta familia porque la mayoría de terpenos y norisoprenoides se encuentran en el hollejo y su concentración se mantiene tras la liofilización, e incluso puede aumentar (De Torres et al., 2015, 2010), y por tanto, tras un periodo largo de contacto con el vino pueden cederlos al vino, contribuyendo a un incremento de las notas frutales y florales, algo beneficioso para el vino. La β -ionona, con notas a violeta, es el principal componente norisoprenoide presente en el vino y cuyo origen son los hollejos de la uva (Noguerol-Pato

et al., 2012; Ribéreau-Gayon et al., 2002), y mantener su contenido, e incluso incrementarlo, como ocurre con los OEtOH, es un resultado importante. Sin embargo, los OAcetona, como experimentan una purificación más agresiva pueden perder parte de estos compuestos durante su purificación, y de ahí que no se observe un incremento de la misma tras la aplicación de los OAcetona.

Por último, la cantidad de ácidos prácticamente no se ve afectada con el uso de los afinantes comerciales, pero sí con los OP, causando un descenso mayor aquellos purificados con etanol. Es importante destacar que la concentración de ácido acético se ve incrementada con los OP, fenómeno que puede estar relacionado con el proceso de vinificación del que fueron obtenidos y de su conservación. S.bouquet también disminuye la fracción total de ácidos, igualándose su efecto al de los OEtOH.

4.3.3.2 Reducción de OTA por los agentes afinantes y los orujos purificados

La tabla 4.3.3 muestra los resultados obtenidos en la reducción de ocratoxina A, tras el uso de los agentes afinantes a las dosis fijadas, y los orujos purificados. Las dos gelatinas estudiadas, V.Forte y V.Platinum, son los agentes afinantes que muestran el porcentaje de retención más bajo de OTA, probablemente porque los polifenoles del vino compiten con la OTA por adsorberse a estas gelatinas de origen proteico (Castellari et al., 2000). La interacción de las proteínas y los polifenoles es un fenómeno conocido. La OTA compete con los polifenoles del vino por los sitios reactivos de los agentes proteicos, y esto hace que los agentes muestren bajos porcentajes de retención de OTA. Castellari et al. (2001) también propusieron que los polifenoles en el vino tinto podrían competir con la OTA por los sitios de unión a la gelatina, prediciendo así que las gelatinas son menos efectivas en los vinos tintos que en los blancos para retirar OTA.

Con el uso de caseinato y Ovovin desciende ligeramente el contenido de OTA en el vino aunque sin mostrar diferencias significativas con el vino testigo. Ertan-Anli et al. (2011) encontraron que la albúmina del huevo era más eficiente como agente afinante para reducir la cantidad de OTA que las gelatinas, ocasionando reducciones de OTA entorno al 20%, sin embargo, la caseína y el PVPP no parecían tener un papel significativo para disminuir la cantidad de esta micotoxina en el vino blanco. Castellari et al. (2001) también comprobaron que grandes cantidades de OTA eran eliminadas con el uso de la albúmina del huevo y de caseinato potásico (40% y 35%, respectivamente), aunque la dosis utilizada de estos afinantes fue mucho mayor que la empleada en este estudio. El hecho de que la albúmina del huevo y caseinato potásico retengan mayor cantidad de OTA, que las gelatinas, se debe a que el punto isoeléctrico de los dos primeros agentes es, 4,9 y 4,5 respectivamente, mientras que el de las gelatinas es de 7,4, lo que significa que la albúmina del huevo y el caseinato potásico están cargados positivamente, mientras que las gelatinas

negativamente, así si OTA presenta carga negativa al pH del vino presentará afinidad por los dos primeros agentes y repulsión frente a las gelatinas. Los mismos autores también demostraron que el contenido de OTA en el vino es dependiente de la dosis del agente afinante.

Contrariamente a los resultados encontrados en este estudio, [Leong et al. \(2006\)](#) demostraron que los afinantes de origen proteico, como la gelatina y la albúmina del huevo decrecieron ligeramente la concentración de OTA en un vino de Syrah, siendo el descenso mayor al aumentar la dosis utilizada. Estos investigadores explicaron que el contenido de proteínas en el vino puede ser un factor importante, ya que el vino de Syrah tenía un bajo contenido de las mismas, y en ausencia de estas en el vino, la OTA está presente de forma más libre y se une directamente a las gelatinas, porque de lo contrario, con un vino rico en proteínas, derivadas de la uva, la OTA tendría que competir con estas por interaccionar con las gelatinas.

Tabla 4.3.3 Efecto de los diferentes agentes afinantes y los orujos purificados en la reducción de OTA.

Abreviaturas: O. orujos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

Muestras	OTA $\mu\text{g/L}$	Recuperación OTA (%)	Reducción OTA (%)
Vino Testigo	0,45 d	90,02	
Vino + Bentonita	0,37 bc	73,45	16,57
Vino + Caseinato	0,40 bcd	79,49	10,52
Vino + V.Forte	0,45 d	90,62	0,00
Vino + V.Platinum	0,43 cd	86,53	3,49
Vino + Ovovin	0,40bcd	81,02	9,00
Vino + Proveget	0,39bcd	78,55	11,47
Vino + S.Bouquet	0,34 b	68,71	21,31
Vino + OEtOH	0,16 a	32,40	57,62
Vino + OAcetona	0,18 a	35,56	54,46

También fue usada una proteína vegetal derivada del guisante, Proveget, presentando estas retenciones ligeramente más altas de OTA que las gelatinas, aunque de nuevo, las

diferencias con respecto al vino testigo no fueron significativas. Estudios previos de algunos investigadores, como [Iturmendi et al. \(2010\)](#), observaron que algunas proteínas vegetales utilizadas como afinantes presentaban una carga negativa y esto hacía que su interacción con los polifenoles del vino no fuese muy intensa, ya que los polifenoles están cargados negativamente, por lo que habría más sitios de unión para que la OTA fuese adsorbida, al no competir con los polifenoles para interaccionar con las proteínas de origen vegetal, fenómeno que no es muy observable en este estudio.

Bentonita tiene una superficie cargada negativamente, por ello solo muestra un descenso de OTA ligeramente mayor que el conseguido con caseinato y Ovovin, aunque no fueron encontradas diferencias significativas al usar bentonita con respecto a estos dos últimos afinantes, pero sí con el vino testigo. Este comportamiento es explicable por la presencia en la superficie de bentonita de aluminosilicato, con regiones terminales polares que pueden estar cargadas positivamente de forma local.

La OTA es un ácido débil con un valor de pK_a , para el grupo carboxílico de la fenilalanina, de 4,4, por lo que la OTA es parcialmente disociada al pH del vino (3,5), y lleva así una carga negativa ([Iturmendi et al., 2010](#)) que puede interaccionar con esas regiones positivas situadas en la superficie de la bentonita, pudiéndose explicar ese incremento en la reducción de OTA por parte de la esta, frente al uso de las gelatinas. Además, las moléculas de OTA pueden ser adsorbidas por la superficie con carga negativa de la bentonita por enlaces por puente de hidrógeno ([Castellari et al., 2001](#)). Estos últimos investigadores también formularon la hipótesis de que la OTA puede ser adsorbida bajo los espacios interlaminares de la bentonita por un mecanismo de intercambio catiónico. [Valenta \(1998\)](#) también anunció que la OTA podría unirse por interacciones iónicas a las proteínas derivadas de la uva, presentes en el vino, que estas a su vez se unen a la bentonita y precipitan todos en su conjunto en el vino. Este modelo de unión de la OTA con la bentonita es sustentado por los datos que [Lataste et al. \(2004\)](#) obtuvieron, pues demostraron que una combinación de gelatina (para unir OTA) y bentonita (para unir y precipitar la gelatina) era más eficiente para eliminar OTA que las combinaciones probadas con gelatina y gel de sílice o gelatina y galotáninos.

S.Bouquet es una manoproteína rica en levaduras autolisadas y que logra reducir la cantidad de OTA un 21%, reducción similar a lo observado por [García Moruno et al. \(2005\)](#) al usar, durante un tiempo de contacto de siete días, levaduras activas liofilizadas a una dosis más alta, 1 g/L. Otros autores, como [Silva et al. \(2003\)](#) y [García Moruno et al. \(2005\)](#), demostraron la eficacia de las cáscaras de las levaduras como agentes afinantes para reducir las cantidad de OTA, después de que tuviera lugar la fermentación alcohólica. [Bejaoui et al. \(2004\)](#), realizaron experimentos en los que derivados de las levaduras también fueron añadidos a zumos de uva y el porcentaje de adsorción para la OTA fue de un 60%. Este mecanismo de adsorción podría ser similar a lo que se espera obtener al emplear los orujos purificados de la uva. Los orujos purificados tienen en su estructura polisacáridos, lípidos y proteínas, que muestran numerosos y accesibles sitios de unión por diversos mecanismos (puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas).

El uso de los orujos purificados tanto con etanol como con acetona (y no contaminados con OTA, como previamente se determinó) pueden eliminar un 57-54% de OTA respectivamente. [Solfrizzo et al. \(2010\)](#), estudiaron la reducción de OTA por paso continuado de vino sobre orujos, demostrando que estos pueden reducir la concentración de OTA entre un 50-100%, e incluso estos orujos podían ser reutilizados y mostrar la misma eficacia para reducir OTA. También, ellos observaron que el paso continuo del vino por los orujos, siendo tanto el vino, como los orujos, de la misma variedad, aunque hubiesen sido utilizados en otros procesos de vinificación, no se vería afectada la calidad de los parámetros del vino tratado, pero si las variedades de los orujos eran diferentes al vino a tratar, las características del vino podían ser modificadas tanto de forma positiva como negativa ([Solfrizzo et al., 2010](#)). Quizás, la alta reducción de OTA ocasionada por los orujos purificados es debido a su compleja composición, pues las paredes celulares que componen los orujos forman una red que está compuesta por un 30% de polisacáridos neutros, un 20% de sustancias pécticas ácidas, 15% de taninos insolubles, junto con lignina, proteínas estructurales y fenoles ([Apolinar-Valiente et al., 2015b](#)). Esta composición permite tener numerosos, fáciles y accesibles sitios de adsorción donde OTA se puede unir, incluyendo diferentes tipos de mecanismos de adsorción también.

4.3.3.3 Reducción de AB por los agentes afinantes y los orujos purificados

Algunos estudios proponen el proceso de afinamiento como uno de los tratamientos enológicos para reducir el contenido de aminas biógenas (AB) en el vino ([Kosmerl et al., 2013](#)). En este trabajo, el vino tratado fue dopado con cinco de las AB más frecuentes: histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y feniletilamina, a una concentración de 100 mg/L. Solo uno de ellas, histamina, se redujo significativamente tras el uso de los agentes afinantes utilizados en este estudio, en particular con bentonita y con los orujos purificados. Al pH del vino, todas las aminas están cargadas positivamente lo que puede hacer que se unan a la superficie del agente afinante por el mecanismo de intercambio iónico, pero también por los puentes de hidrógenos generados por las moléculas de agua que pueden estar adheridas a algunos grupos superficiales que posea el agente afinante o adsorbente ([Amghouz et al., 2014](#)). Pero solo la histamina es sensible a estos afinantes, por lo que la diferencia entre la histamina y el resto de aminas biógenas ha de estar en su estructura. Histamina tiene un grupo amino, un grupo imidazol, constituido por una amina heterocíclica con dos átomos de nitrógeno cuyos electrones libres están conjugados con los electrones π del anillo aromático, como consecuencia, esos átomos de nitrógeno tendrán una basicidad baja. En el resto de aminas los grupos alquilo pueden donar densidad electrónica a los átomos de nitrógeno por efecto inductivo, consiguiendo que los electrones libres alrededor de los átomos de nitrógeno estén más disponibles para ser compartidos con ácidos de Lewis. La basicidad del nitrógeno, por tanto, está favorecida por

efectos inductivos. Además, los valores de pK_a mostrados por [Gugliucci \(2004\)](#) y [Kvasnicka et al. \(2006\)](#) para las AB estudiadas indican que en el caso de la histamina, el átomo de nitrógeno localizado en el anillo aromático es mucho menos básico que el que está unido al carbón alquilo, así la basicidad de la histamina es mayor que para la tiramina y la feniletilamina. Esto último explica cómo la histamina tiene mayor afinidad por los grupos ácidos superficiales de la bentonita, fenómeno que [Mayer & Pause \(1978\)](#) enunciaron, pues demostraron que solo el tratamiento con bentonita tenía efectos sobre la adsorción de las AB, principalmente cuando entraba en contacto con la histamina. [Kallay & Body-Szalkai \(1996\)](#) también observaron que en los vinos tintos, 80 g/hL de bentonita reducía el contenido de histamina en un 60%. De la misma forma, [Mannino et al. \(2006\)](#) también encontraron que el afinante más efectivo para reducir las AB era bentonita, pues el descenso es directamente correlativo con la cantidad de bentonita utilizada. Este descenso es incluso más efectivo cuando bentonita es utilizada en el mosto ([Grossmann et al., 2007](#)).

Los orujos purificados también resultan efectivos para la reducción de las AB, provocando un 10% de retención. La explicación de porqué los orujos purificados son capaces de retener histamina podría estar en la compleja composición que presentan, pues algunas moléculas presentes en su estructura pueden establecer fuertes interacciones iónicas con las aminas biógenas, posiblemente de una forma similar a la interacción que tiene lugar entre los antocianos y el material celular ([Padayachee et al., 2012](#))

Tabla 4.3.4 Efecto de la adición de los afinantes comerciales y los orujos purificados sobre la concentración de las aminas biógenas (mg/L).

MUESTRAS	HISTAMINA	TIRAMINA	PUTRESCINA	CADAVERINA	FENILETILAMINA	Adsorción de histamina (%)
Vino Testigo	93,2 bc	103,4 abc	112,1 a	60,0 a	102,8 ab	
Vino + Bentonita	83,7 a	104,1 bcd	115,5 ab	60,5 a	105,5 ab	10,2
Vino + Caseinato	95,4 c	105,4 cd	116,1 ab	62,2 ab	105,1 ab	0,0
Vino + V.Forte	95,0 c	104,5 bcd	116,2 ab	62,2 ab	105,2 ab	0,0
Vino + V.Platinum	93,5 bc	104,0 abcd	112,3 a	61,8 ab	100,0 a	0,0
Vino + Ovovin	90,3 b	105,4 cd	122,3 b	65,2 b	106,5 ab	3,1
Vino + Proveget	92,6 bc	105,7 cd	115,8 ab	62,5 ab	105,6 b	0,7
Vino + S.Boquet	92,9 bc	105,9 d	117,5 ab	63,7 ab	105,6 ab	0,3
Vino + O.EtOH	83,5 a	102,2 ab	114,1 a	61,5 ab	101,4 a	10,4
Vino+ O.Acetona	82,3 a	101,6 a	115,6 ab	62,8 ab	100,9 a	11,7

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

4.3.3.4 Reducción de minerales por los agentes afinantes y los orujos purificados

En las tablas 4.3.5 y 4.3.6 se muestran los cambios en la composición de los minerales del vino tras el tratamiento con los afinantes estudiados y los orujos purificados. El hecho más significativo se observa en la reducción de K y Ca cuando los orujos fueron utilizados como afinantes. La reducción de K y Ca es importante y podría tener un efecto significativo en la prevención de la precipitación de las sales tartáricas, mejorando así la estabilidad del vino y el mantenimiento del pH y su acidez. Las cantidades encontradas en el vino testigo son similares a las enunciadas por otros autores, quienes encontraron que la concentración K y Ca era sobre 826 y 47 mg/L respectivamente ([González et al., 2009](#)). En este estudio el contenido fue de 673,1 mg/L de K y 100,4 mg/L de Ca, como se puede ver en la tabla 4.3.5. El uso de otros agentes afinantes no afecta a la concentración de K y Ca, solo Proveget parece reducir significativamente la cantidad de Ca. El uso de los orujos purificados permite una reducción de K y Ca, alrededor de 15-25% y 18-21% respectivamente, la disminución más grande fue obtenida cuando se utilizaron los orujos purificados con etanol. Estas reducciones son importantes porque por esta razón los orujos purificados podrían ser una buena opción para disminuir la cantidad de K y Ca. De hecho, cuando el contenido de calcio es superior a 60 mg/L, hay riesgo de la formación de depósitos de tartratos ([Ribéreau-Gayon, et al., 2006](#)), por lo que los OP en vinos con un alto contenido en calcio podrían ayudar a evitar la precipitación de estas sales. La tecnología tradicional para la estabilización tartárica en bodega es la refrigeración, pero el tartrato de calcio no es muy sensible a la temperatura, e incluso es diez veces menos soluble que el bitartrato potásico, además la eliminación total de estos cationes podría ser la mejor solución.

Los otros minerales presentes en altas concentraciones, como Na, Mg apenas se vieron afectados por los afinantes ensayados, solo un pequeño incremento en la concentración de Na cuando se aplicó bentonita. P y S no disminuyeron, y se observó un ligero incremento con el uso de agentes de origen proteico. Con el uso de bentonita, los niveles de Na aumentan, esto es debido a su naturaleza sódica, y con Proveget también aumenta ligeramente.

Tabla 4.3.5 Efecto de la adición de los afinantes comerciales y los orujos purificados en la concentración (mg/L) de minerales mayoritarios.

Muestras	Na	Mg	P	S	K	Ca
Vino Testigo	45,4 bc	129,0 a	187,5 a	152,6 a	673,1 cd	100,4 cd
Vino + Bentonita	47,2 c	128,0 a	197,1 abc	155,0 ab	658,8 cd	103,6 d
Vino + Caseinato	44,3 ab	127,2 a	202,7 bc	162,6 bcd	668,0 cd	98,3 bcd
Vino + V.Forte	44,2 ab	128,4 a	205,3 c	166,4 cd	668,3 cd	99,6 bcd
Vino + V.Platinum	43,5 ab	125,6 a	200,0 abc	170,7 de	661,9 cd	97,4 bc
Vino + Ovovin	44,2 ab	130,6 a	205,8 c	177,5 e	678,3 d	99,4 bcd
Vino + Proveget	42,3 a	123,1 a	190,6 ab	163,0 bcd	639,5 cd	93,9 b
Vino + S.Bouquet	44,0 ab	127,4 a	193,2 abc	162,7 bcd	658,8 cd	96,7 bc
Vino + O.EtOH	42,9 ab	126,2 a	196,2 abc	155,2 ab	501,6 a	79,1 a
Vino + O.Acetona	43,5 ab	126,3 a	197,8 abc	159,3 abc	568,8 b	82,5 a

Abreviaturas: O: orujos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

La concentración de B no cambia con los afinantes. Al y Fe aumentan con bentonita, pues es un aluminosilicato (Bimpilas et al., 2007). El uso de los OP no reduce estos minerales minoritarios, pero los OAcetona ligeramente incrementan Fe, Cu y Zn, aunque al final, las concentraciones siguen estando en niveles bajos (Phol, 2007). El rango en el que Zn se encuentra en los vinos es de 0,14-4 mg/L (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

En este estudio ninguna de las muestras tiene valores superiores a los 0,8 mg/L. Los valores de Cu también son bajos, incluso tras el uso de los orujos purificados, a excepción de los OAcetona pues incrementan el contenido de forma ligeramente significativa con respecto al vino testigo, pero en valores del orden de décimas de mg/L. La concentración de Fe en vino no ha de ser superior a 5-6 mg/L (Dippong et al., 2016), valores entre 10-12 mg/mL causan la quiebra férrica, en este caso por lo general no se ve reducido con ningún agente afinante, y los OP incrementan en orden de décimas de mg/L, su valor, al igual que sucedía con el Cu. Se pueden lograr valores más bajos de hierro tras la estabilización del vino (Bornet et al., 2008), por lo que no sería un inconveniente utilizar los OP, ya que después la cantidad incrementada, que es muy pequeña con respecto a lo que tienen los vinos habitualmente (Pohl, 2007), podría ser eliminada y además, si quedarán restos de hierro podría resultar beneficioso, ya que junto con Cu y Mn dan lugar a un mecanismo anti-oxidativo, pues favorecen la formación de complejos estables con los aminoácidos y los polifenoles minimizando la velocidad de formación de especies reactivas con el oxígeno responsables de la ranciedad del aroma y el gusto del vino.

Tabla 4.3.6 Efecto de la adición de los afinantes comerciales y los orujos purificados en la concentración ($\mu\text{g/L}$)

Muestras	B	Al	Mn	Fe	Cu	Zn
Vino Testigo	13015,7 ab	172,2 b	539,2 abc	725,7 ab	48,6 cd	414,2 bc
Vino + Bentonita	13115,1 ab	480,2 c	541,7 bcd	1563,2 d	26,7 a	406,0 abc
Vino + Caseinato	13176,6 ab	147,1 ab	559,6 cde	715,3 ab	42,9 b	454,1 c
Vino + V.Forte	13608,9 b	175,1 b	577,3 e	736,1 ab	51,3 d	424,8 bc
Vino + V.Platinum	12966,0 ab	159,7 ab	557,1 bcde	702,0 ab	49,1 cd	391,8 abc
Vino + Ovovin	13162,2 ab	165,2 b	568,7 de	611,4 a	47,6 bcd	335,2 a
Vino + Proveget	12601,2 a	129,4 a	530,4 ab	715,3 ab	46,0 bc	364,5 ab
Vino + S.Bouquet	13030,4 ab	160,9 ab	539,8 abcd	703,8 ab	44,6 bc	355,9 ab
Vino + O.EtOH	12400,5 a	180,3 b	507,9 a	809,2 bc	47,5 bcd	557,3 d
Vino + O.Acetona	12412,1 a	173,6 b	527,8 abc	941,7 c	60,1 e	567,1 d

de minerales minoritarios.

Abreviaturas: O: orujos. Letras diferentes en la misma columna y para cada vino indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

4.3.4 Conclusiones

Como conclusión, afinantes como caseinato y las dos gelatinas utilizadas, V.Forte y V.Platinum, disminuyen muy poco la cantidad de compuestos aromáticos, sin presentar apenas diferencias con respecto al vino testigo, el resto de afinantes comerciales, Bentonita, Ovovin y Proveget, si producen una disminución mayor. Los orujos purificados junto con S.Bouquet, son los que al afinar el vino retiran mayor cantidad de compuestos volátiles, disminuyendo más desde el punto de vista semicuantitativo, la fracción aromática del vino. Un hecho beneficioso de los OP, es que tienden a aumentar la cantidad de compuestos correspondientes a la familia de los terpenos y norisoprenoides, acentuando la notas frutales y florales, por lo que su propuesta como afinante en vino no alérgico, y junto con su actuación moderada a la hora de retirar compuestos aromáticos, aparte de aumentar los tonos frutales y florales, podría ser una buena alternativa a los afinantes comerciales. Esto solo se daría en el caso de los orujos purificados con etanol, puesto que purificar con acetona no sería aconsejable en la industria alimentaria.

Los OP se pueden utilizar para eliminar OTA de forma muy efectiva, igualándose su efecto al provocado por bentonita, que es el agente afinante considerado como el mejor para la eliminación de esta micotoxina. La reducción de las AB no se ve afectada por ninguno de los agentes afinantes comerciales estudiados, y solo la histamina se ve reducida con la aplicación de los orujos purificados, estos también son capaces de eliminar minerales como el K y Ca, reduciendo la formación de tartratos, aunque algunos minerales pueden ver incrementado su contenido en el orden de décimas de mg/L pero esto no supondría un riesgo para la calidad del vino.

4.4 EFECTO DE LAS DOSIS Y EL TIEMPO DE CONTACTO DE LOS ORUJOS PURIFICADOS EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA FINAL DEL VINO

4.4.1 Introducción

Tras el estudio sobre la utilización de los orujos purificados de acuerdo con el método de [De Vries et al. \(1981\)](#), adaptado por [Apolinar-Valiente et al. \(2010\)](#), se planteó posteriormente la idea de una purificación mucho más sencilla de los orujos, empleando disoluciones de etanol al 70% o una mezcla de acetona:agua 1:2. La eficacia de estas disoluciones para purificar orujos fue efectiva, ya que estos cumplían con el objetivo de afinar el vino. Puesto que está desaconsejado la utilización de la acetona en alimentos que se van a destinar al consumo, los nuevos ensayos solo se han realizado con orujos purificados con una disolución de etanol al 70%.

Los resultados mostraron que estas sustancias afinantes modificaban la cantidad de antocianos y taninos en los vinos. En el vino siempre ha de haber un equilibrio entre la cantidad de taninos y antocianos, para que este no pierda su color y estructura, por lo que una retención excesiva por parte de los agentes afinantes, y en concreto de los orujos podría no ser deseable, dada la importancia de las características cromáticas de los vinos tintos para el consumidor ([González-Neves et al., 2014](#)). En experiencias anteriores se observó que con una dosis de 13 mg/mL de orujos la disminución del color con respecto al control era importante, casi excesiva, provocando una disminución importante en el contenido de antocianos y taninos. Por ello, en este capítulo se plantea la optimización de la dosis de orujo a emplear, considerando 6, 10, 13 mg/mL, y un tiempo de contacto de 5, 10 y 20 días, para estudiar cómo varían los valores de los parámetros cromáticos y fenólicos, y decidir así cuál puede ser la dosis y el tiempo óptimo en función de lo que se desee finalmente en el vino, sin afectar de manera negativa a ninguno de sus atributos.

Los orujos no solo pueden retirar compuestos y actuar como afinantes, sino que también pueden proporcionar al vino componentes beneficiosos para matener sus cualidades e incluso potenciarlas. Así, la adición de orujos podría conseguir un aumento de polisacáridos en el medio, y con ello un aumento del cuerpo y la estabilidad del vino. Por tanto, el estudio de la posible cesión de polisacáridos por parte de los orujos purificados podría ser una información interesante a tener en cuenta. Hoy en día existen diferentes técnicas enológicas para aumentar el contenido de polisacáridos en el vino, bien añadiendo enzimas pectolíticas para degradar la pared celular (Apolinar-Valiente et al., 2013) o aplicando polisacáridos comerciales (Del Barrio-Galán et al., 2012). El uso de orujos podría proporcionar una nueva forma de enriquecimiento de estos compuestos. Además, un aumento de la concentración de polisacáridos podría ser beneficioso a la hora de mantener los taninos estables en el medio y que estos no precipiten como coloide, podrían darle también más cuerpo al vino, sin variar la acción del propio agente afinante (Maury et al., 2016), e incluso aumentar la estabilidad del color con el tiempo. Poncet-Legend et al. (2007) enunciaron que los polisacáridos poliméricos pueden actuar tanto de agentes floculantes como de estabilizadores coloidales, dependiendo de su peso molecular, carga y estructura. Así, los de mayor peso molecular floculan los agregados coloidales, mientras que los de menor peso estabilizan las partículas. Además, aquellos que actúan como estabilizadores lo hacen mediante un mecanismo de estabilización estérica, previniendo incluso la precipitación de polifenoles cuando la fuerza iónica aumenta.

Otras características con las que pueden contribuir los polisacáridos son las recogidas en las investigaciones de Vidal et al. (2004b), quienes observaron que, tanto las arabinogalactano proteínas (AGPs) como el ramnogalacturonano II (RG-II), incrementan la sensación de estructura de un vino, y el RG-II disminuye, además, las sensaciones de astringencia. Así, en presencia de proantocianidinas, los descriptores de la astringencia disminuyen en presencia de RG-II (Vidal et al., 2004a).

Hoy en día, hay una cierta discrepancia en como se produce la interacción entre los polisacáridos y los taninos. Por un lado, se establece que los polisacáridos interaccionan con los compuestos fenólicos e impiden su unión a las proteínas de la saliva, y por otro lado, que estos favorecen los agregados de taninos que finalmente precipitan y así son eliminados (Rinaldi et al., 2012). Últimos estudios proponen la formación de complejos solubles entre las proantocianidinas y los polisacáridos, o entre estos junto con las proteínas (Maury et al., 2016). En la formación de agregaciones de tres componentes polisacárido/proteína/proantocianidina el mecanismo de interacción está todavía en investigación pero sí se ha comprobado que las arabinogalactanoproteínas neutras y el ramnogalacturonano-II (RG-II) monomérico no muestran un gran efecto en la inhibición de los agregados de taninos (Scollary et al., 2012).

Otro efecto adicional que pueden tener los polisacáridos sobre las propiedades organolépticas del vino es su capacidad de interactuar con los aromas y de inhibir la formación de cristales de tartrato potásico (Doco et al., 2007) aumentando su estabilidad en botella.

4.4.2 Descripción de la experiencia

Un volumen de 100 mL de un vino joven de Monastrell (2016) se mezcló con orujos de uva Monastrell purificados con etanol al 70% (OP Mo). Se han ensayado tres dosis diferentes: 6, 10 y 13 mg/mL y se mantuvieron en contacto durante tres tiempos diferentes: 5, 10 y 20 días. Durante el tiempo de contacto, los vinos se mantuvieron en reposo y para evitar oxidaciones se aplicó N₂ gas en el espacio de cabeza de los botellines y estos fueron cubiertos con papel de aluminio, para mantenerlos en oscuridad. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y también se hizo un control sin la adición de orujos purificados. Trascurrido el tiempo de contacto, las muestras se prepararon para realizar sus análisis por espectrofotometría, HPLC y SEC.

Para estudiar la capacidad de cesión de los polisacáridos al medio por parte de los orujos purificados, se utilizó un vino modelo tratado con las dosis estudiadas e interaccionando los tiempos de contacto propuestos. Posteriormente, las muestras se analizaron por SEC.

4.4.3 Resultados y discusión

4.4.3.1 Efecto de la dosis y tiempo de contacto de los orujos sobre las características cromáticas del vino

La tabla 4.4.1 muestra los valores de los diferentes parámetros cromáticos tras un análisis multivariante de la varianza. La intensidad de color (IC) del vino tinto, uno de los primeros atributos sensoriales apreciados por los consumidores, no cambia con el incremento del tiempo de contacto, a pesar del descenso observado en el contenido de antocianos y taninos. Esto se puede atribuir a la formación de pigmentos estables en el vino, tal y como parece indicar el ligero incremento observado en los valores de los antocianos poliméricos, a pesar de no mostrar diferencias significativas entre ellos.

El contenido en taninos también desciende al incrementarse el tiempo de contacto, ya siendo evidente a los cinco días. Tiempos de contacto de 10 y 20 días descienden aún más el contenido de taninos, no encontrándose diferencias significativas entre ellos, pero sí entre 5 y 20 días de contacto, siendo la disminución más acusada con 20 días de contacto.

Al incrementar la dosis de orujo, los valores de intensidad de color del vino descienden. La disminución en los valores de este parámetro es debida al descenso observado en los valores del índice de polifenoles totales, el contenido de antocianos totales y poliméricos y taninos al ser adsorbidos por los orujos de la uva, tal y como se ha visto en capítulos anteriores. Guerrero et al. (2013) también observaron una disminución en el color del vino tras usar orujos del hollejo de uva de Cabernet Sauvignon como agente afinante. Además, con el incremento de la dosis de orujos de 6 a 10 mg/L se observan más cambios en los valores de estos parámetros que con la dosis de 10 a 13 mg/L.

Tabla 4.4.1 Análisis multifactorial de la varianza de las características cromáticas del vino en función de la dosis de orujo de uva y el tiempo de contacto.

Efecto	IC	IPT	AT (mg/L)	AP (mg/L)	TT (mg/L)
<i>Días de contacto</i>					
0	11,7 b	23,8 b	569,8 c	34,2 a	1258,9 c
5	10,2 a	21,3 a	487,2 b	30,1 a	1175,8 b
10	10,5 ab	21,5 a	476,8 ab	31,9 a	1054,8 ab
20	10,6 ab	20,5 a	447,4 a	33,3 a	976,9 a
<i>Dosis Orujos (mg/mL)</i>					
0	11,8 d	23,4 d	539,6 d	37,2 c	1190,9 c
6	10,5 c	21,3 c	478,0 c	31,8 b	1062,1 b
10	9,9 b	20,4 b	450,0 b	29,4 a	951,6 a
13	9,5 a	19,5 a	424,3 a	27,8 a	961,4 a

Abreviaciones: IC: intensidad de color, IPT: índice de polifenoles totales, AT: antocianos totales, AP: antocianos poliméricos y TT: taninos totales. Letras diferentes en la misma columna y para cada efecto indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

4.4.3.2 Efecto de los orujos sobre la concentración y composición de los antocianos y taninos determinados por HPLC

La concentración de los antocianos monoglucósidos (tabla 4.4.2) muestra un comportamiento bastante similar respecto a la dosis de orujos y al tiempo de contacto a los antocianos totales medidos por espectrofotometría. El contenido de estos compuestos en el vino desciende entre un 15,0 y 26,1% al incrementarse el tiempo de contacto y entre un 12-24% con el incremento de la dosis, aunque las diferencias no son significativas entre

la aplicación de 5 y 10 días de contacto y entre una dosis de 10 y 13 mg/L. También se observa un descenso importante en función de la dosis y el tiempo de contacto en los valores de petunidina glucósido, malvidina-glucósido y antocianos acilados, lo cual pone de manifiesto que la adsorción de los antocianos por dichas paredes se incrementa con el grado de hidroxilación y metoxilación y con la esterificación (acil y p-cumaril derivados). Resultados bastantes similares a los de este estudio fueron también encontrados por [Morata et al. \(2003\)](#) con paredes de levadura.

Tabla 4.4.2 Análisis multifactorial de la varianza de la concentración (mg/L) y composición de antocianos monoglucósidos en función de la dosis de orujo de uva y el tiempo de contacto.

Efecto	Del-Glu	Cian-Glu	Pet-Glu	Peon-Glu	Malv-Glu	ACT	AT	% Adsorción
<i>Días de contacto</i>								
0	39,2 c	7,9 c	71,3 c	36,3 c	367,8 c	74,0 c	596,4 c	-
5	34,9 b	7,2 bc	61,8 b	32,7 b	316,8 b	53,9 b	507,2 b	15,0
10	34,0 ab	6,7 ab	59,0 b	32,4 b	301,5 b	49,5 ab	483,1 b	19,0
20	32,1 a	6,4 a	54,0 a	29,4 a	275,2 a	43,7 a	440,9 a	26,1
<i>Dosis Orujos (mg/mL)</i>								
0	37,3 c	7,5 c	66,6 c	34,6 c	343,7 d	66,9 c	556,6 c	-
6	34,3 b	6,9 b	60,0 b	32,1 b	304,7 c	50,1 b	488,2 b	12,3
10	32,8 b	6,6 ab	55,6 a	30,2 ab	285,0 b	43,2 a	453,5 a	18,5
13	30,7 a	6,3 a	52,5 a	30,0 a	265,8 a	38,4 a	423,2 a	24,0

Abreviaciones: Del-Glu: delfinidina-3-glucósido, Cian-Glu: cianidina-3-glucósido, Pet-Glu: petunidina-3-glucósido, Peon-Glu: peonidina-3-glucósido, Malv-Glu: malvidina-3-glucósido, ACT: antocianos acilados totales y AT: antocianos monoglucósidos totales. Letras diferentes en la misma columna y para cada efecto indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

[Guerrero et al. \(2013\)](#), tras la aplicación de fibra de manzana al vino a una dosis de 5 mg/mL, encontraron una reducción del 18,5% en la cantidad de antocianos totales, siendo el descenso algo inferior con la aplicación de orujos de uva (sobre 8%). Otros trabajos encontraron reducciones de casi el 50% en los antocianos al aplicar una dosis de 13 mg/mL de paredes celulares de Monastrell, tanto para los monoglucósidos, como para acilados ([Bautista-Ortín et al., 2016](#)). Este descenso tan importante observado por estos autores en este estudio puede ser debido a la aplicación de agitación durante el tiempo de contacto de las paredes celulares de la uva con los antocianos durante el proceso de interacción. Una reducción excesiva de los antocianos se puede traducir en pérdidas importantes en el color del vino, o incluso en un desequilibrio en la relación antociano/tanino, lo cual podría desfavorecer las reacciones de estabilización de estos pigmentos, dando vinos de un color menos estable.

La evolución de la concentración y composición de los taninos libres y no oxidados medidos por el método de la fluoroglucinolisis se muestra en la tabla 4.4.3. El contenido de estos compuestos muestra una reducción entre el 14,2 y 22,9% con el incremento del tiempo de contacto y entre 4,3 y 21,3% con el incremento de la dosis.

La mayor adsorción de estos compuestos se obtiene con 5 días de contacto, este hecho posiblemente sea debido a que, con el incremento del tiempo de contacto (10 y 20 días), junto con los procesos de adsorción, también tengan lugar procesos de desorción de taninos retenidos en las paredes de los orujos, al igual que ocurre durante la etapa de maceración, incrementándose por tanto su concentración en el medio. Con la dosis máxima de 13 mg/L también se observa el menor contenido de taninos en solución en el vino. [Guerro et al. \(2013\)](#) también encontraron una mayor retención de taninos al incrementar la dosis de orujo de uva, aunque los valores reportados por estos autores fueron mayores a los de este estudio (8,4-38,2%).

Con respecto a la dosis de orujos utilizada, con la dosis mínima de 6 mg/mL, no se observa diferencias significativas con el contenido de taninos de vino sin tratar, ni con el GPM o galoilación. Con 10 y 13 mg/mL sí que se observan descensos de las concentraciones.

Tabla 4.4.3 Análisis multifactorial de la varianza de la concentración (mg/L) y composición de taninos en función de la dosis de orujo de uva y el tiempo de contacto.

Efecto	TT (mg/L)	% Adsorción	GPM	Epigalocat (µM)	Epicatg (µM)
<i>Días de contacto</i>					
0	718,4 c	-	7,0 c	515,3 c	81,1 b
5	553,6 a	22,9	6,2 a	393,1 a	68,4 a
10	616,7 b	14,2	6,6 b	445,0 b	76,3 b
20	577,6 ab	19,6	6,6 b	418,5 ab	71,8 ab
<i>Dosis Orujos (mg/mL)</i>					
0	653,8 c	-	6,6 a	479,4 c	78,6 b
6	625,7 c	4,3	6,4 a	424,8 b	76,2 b
10	557,8 b	14,7	6,5 a	397,0 ab	69,3 ab
13	514,6 a	21,3	6,4 a	386,2 a	65,4 a

Abreviaciones: TT: taninos totales, GPM: grado medio de polimerización, Epigalocat: epigalocatequina y Epicatg: epicatequinagalato. Letras diferentes en la misma columna y para cada efecto indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

En cuanto a la composición de los taninos, la reducción máxima del grado de polimerización se observó tras 5 días de contacto, mientras que la dosis no tiene ningún efecto en este parámetro. La epigalocatequina, la cual procede únicamente de los taninos del hollejo y la epicatequinagalato, que procede principalmente de los taninos de las semillas, son retenidas en mayor cantidad a los 5 días de contacto y con una dosis de orujo de 13 mg/L. Estos cambios en la composición de los taninos del vino pueden afectar a las características sensoriales de los vinos ya que un descenso en la concentración de taninos

y del porcentaje de galoilación de los mismos en el vino, está asociado con una reducción de la astringencia y el amargor en el vino (Cheynier et al., 2006; Bautista-Ortín et al., 2014a).

4.4.3.3 Efecto de los orujos en la distribución de la masa molecular de los taninos

Cuando las muestras fueron analizadas por SEC (figura 4.4.1 y tabla 4.4.4), el menor porcentaje de retención fenólica observado por parte de los orujos purificados fue del 3,2% para la dosis de 6 mg/mL a los diez días de contacto y el mayor del 18,8% con la dosis de 13 mg/mL a los veinte días. Con un tiempo de contacto de cinco días se observa que el porcentaje de retención de taninos es mayor cuando la concentración fue determinada con el análisis de la fluoroglucinolisis que cuando lo fue por SEC, sin embargo, con diez y veinte días de contacto ocurre lo contrario, es mayor la retención determinada por SEC que por fluoroglucinolisis. Estos valores más altos de retención observados por fluoroglucinolisis que por SEC, a los cinco días de contacto, ponen de manifiesto una mayor rapidez en el proceso de adsorción por parte de los taninos despolimerizables. El efecto contrario que se observa con los tiempos de contacto de 10 y 20 días puede deberse a que, al incrementarse el tiempo de contacto, los taninos no despolimerizables y aquellos asociados a otros compuestos van siendo, aunque de forma más lenta, progresivamente adsorbidos en los orujos purificados. Este resultado es coincidente con el mostrado por el trabajo de Bautista-Ortín et al. (2014b), quienes observaron menor retención de la proantociandina B2 frente a su homólogo oxidado, la proantocianidina A2, aunque en este estudio no se determinó si la velocidad de la reacción de adsorción fue diferente para cada compuesto. Además, también hay que poner de manifiesto que los resultados de estos autores fueron aplicando agitación durante el tiempo de contacto de los taninos con las paredes celulares del hollejo de la uva a diferencia de este ensayo, donde no se aplica agitación para simular las condiciones de elaboración, y esto también podría cambiar la capacidad de interacción de los taninos. Le Bourvellec et al. (2009) también indicaron que la oxidación no limita la capacidad de enlace de los taninos.

Las retenciones más grandes son las observadas a los veinte días y para todos los tiempos de contacto estudiados se ha observado que al aumentar la dosis de orujos, el porcentaje de retención es mayor, de forma similar a lo descrito por Bautista-Ortín et al. (2014b) y Bindon et al. (2010b). Esto no es coincidente con los resultados de Bindon et al. (2013) con el uso de 10 y 13 mg/mL de orujos de Syrah, quizás porque estas dosis son ya suficientemente elevadas y se va produciendo una saturación en la capacidad de adsorción de los orujos de esa variedad.

Tabla 4.4.4 Efecto de la dosis de orujo y días de contacto sobre la retención de taninos medidos por HPLC (*) y compuestos fenólicos medidos por SEC (**).

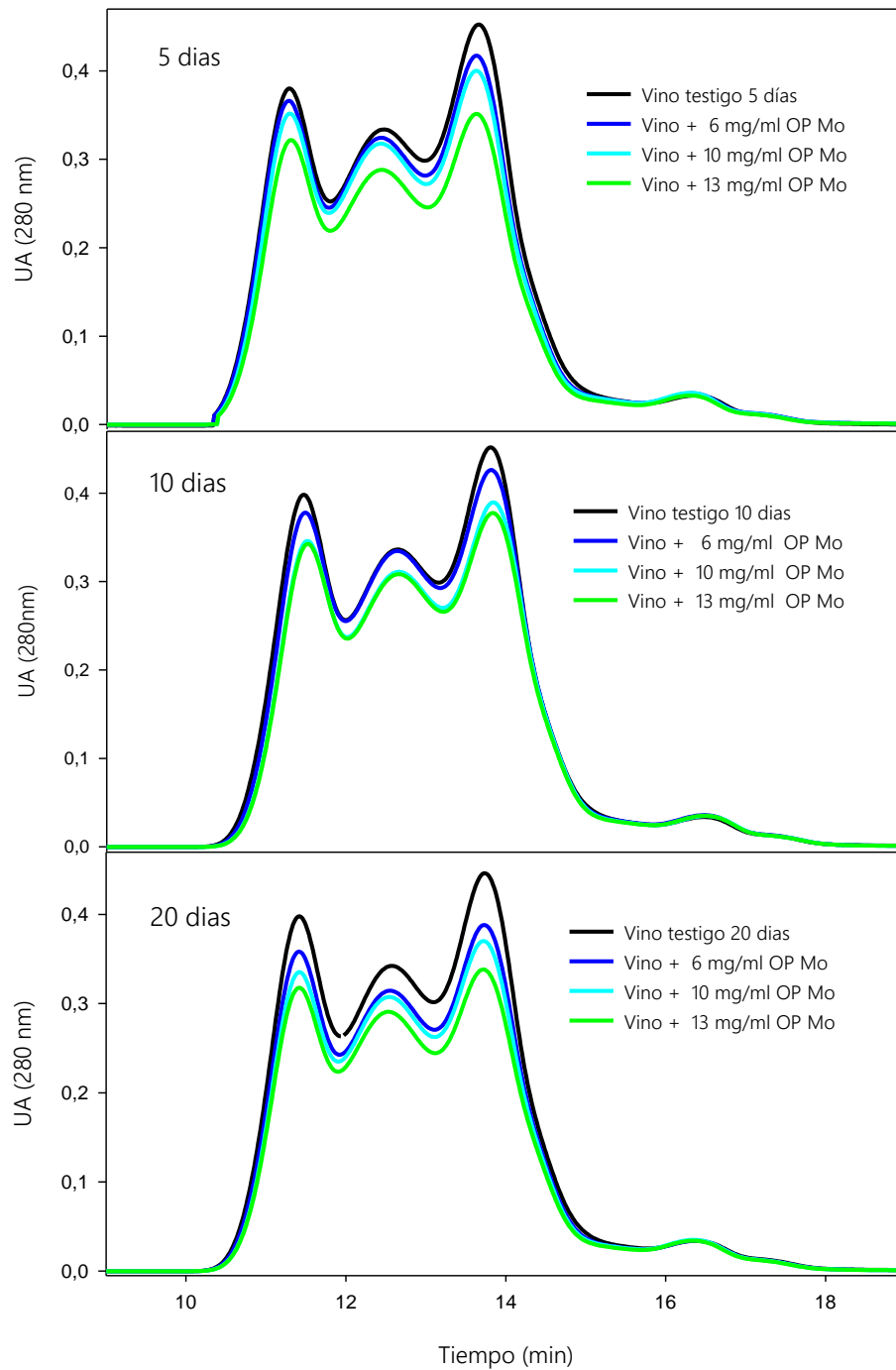
Días de contacto	Dosis Orujos (mg/mL)	% retención de taninos*	% retención fenólica**	% retención a diferentes tiempos (min)		
				10-11,9	11,9-13,1	13,1-18
5	6	6,0	4,2	10,1	8,3	11,1
	10	17,9	7,7	16,6	10,5	14,5
	13	30,3	17,1	20,7	15,5	20,5
10	6	3,6	3,2	6,8	0,7	2,9
	10	7,3	10,6	16,9	8,0	8,8
	13	9,5	12,2	18,1	8,9	11,1
20	6	3,1	10,1	4,1	3,1	8,1
	10	10,0	13,9	6,2	4,9	13,8
	13	15,9	18,8	14,8	13,9	23,3

En cuanto al efecto de los orujos purificados de Monastrell sobre las fracciones fenólicas de alto, medio, y bajo peso molecular del vino, calculadas respectivamente entre los minutos 10 y 11,9, 11,9 y 13,1 y entre 13,1 y 18,0, se observa, en general, que los compuestos menos retenidos para los tres tiempos de contacto estudiados, son los de peso molecular medio, y el porcentaje de retención en cada una de las fracciones, aumenta cuando se incrementa la dosis de orujo para cada tiempo de contacto. La pérdida de compuestos de bajo y alto peso molecular se corresponden con los resultados obtenidos por HPLC, donde tanto los antocianos, como taninos de alto peso molecular (reflejado por el descenso de los valores de G_{Pm}) son eliminados. Estos resultados son coincidentes con el estudio de [Bautista-Ortín et al. \(2016\)](#) llevado a cabo con antocianos y taninos disueltos en un vino modelo y paredes celulares del hollejo de Monastrell, pero no con aquellos del trabajo de [Guerrero et al. \(2013\)](#) llevados a cabo con la fracción fenólica purificada del vino, quienes observaron una mayor retención de compuestos de peso molecular intermedio usando orujos de Cabernet Sauvignon.

4.4.3.4 Capacidad de los orujos de ceder polisacáridos al vino

También se realizó un estudio de la cantidad y tipos de polisacáridos que pueden ceder los orujos al vino. Para ello se realizó una maceración de los orujos en un vino modelo (Agua MiliQ al 12% de etanol, ajustado a pH 3,65 con ácido trifluoroacético) y se estudió la presencia de polisacáridos por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Figura 4.4.1 Comparación de los cromatogramas SEC de la cantidad de los compuestos fenólicos retenidos por las diferentes dosis de orujo, 6, 10, 13 mg/mL, empleadas en comparación con el vino testigo, para 5, 10, 20 días de contacto. Abreviaturas: OP Mo: orujos purificados de Monastrell.



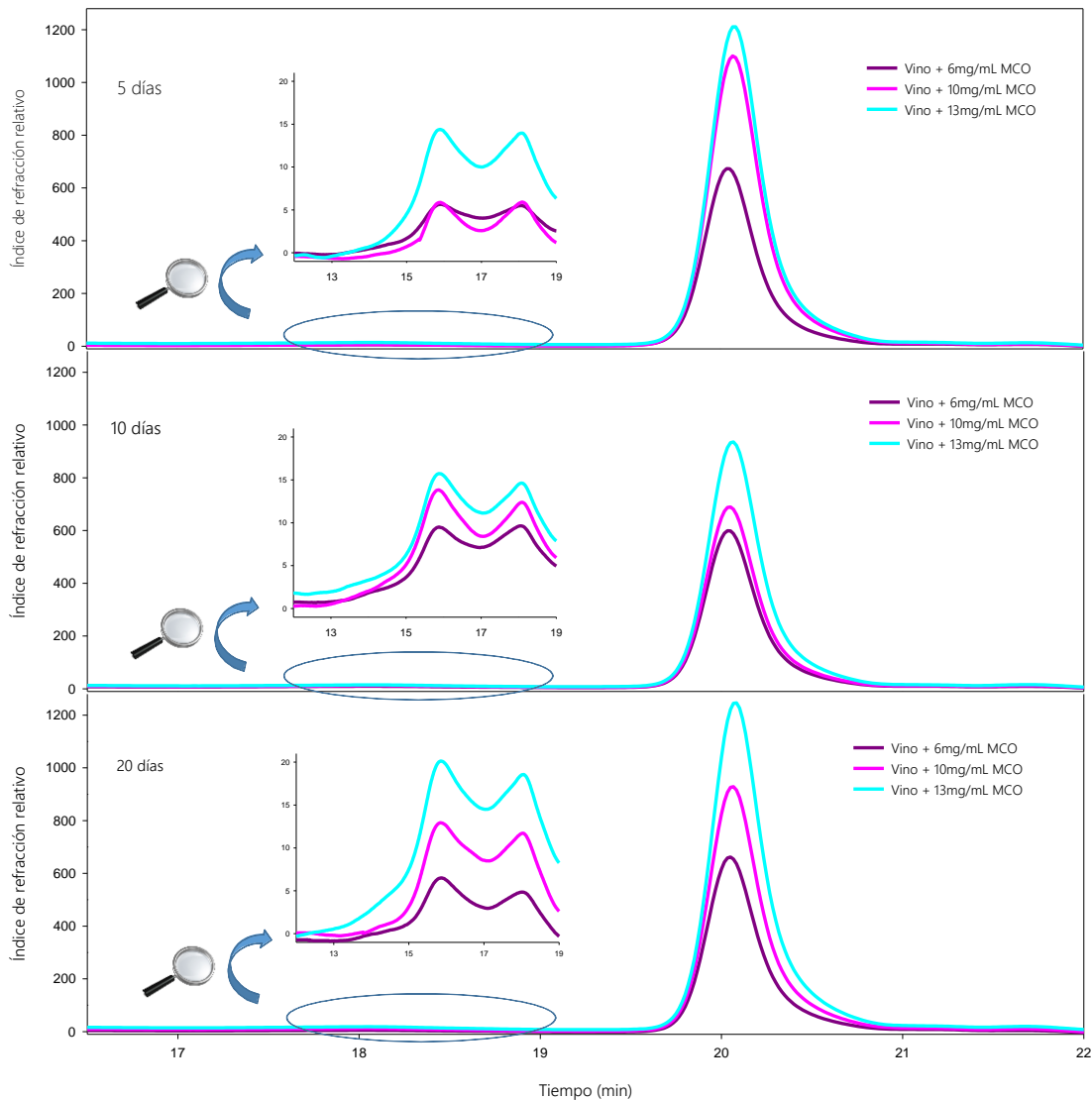
La figura 4.4.2 muestra las distribuciones de poblaciones para tiempos de contacto de 5, 10 y 20 días, cuando se añadió unas dosis de orujo de Monastrell de 6, 10 y 13 mg/mL. La población que se eluye entre los minutos 14 y 17 (fracción I) se corresponde principalmente con polisacáridos de alto peso molecular. En un vino tinto esta fracción es asociada a las manoproteínas (Apolinar-Valiente et al., 2013), liberadas por las paredes de las levaduras durante el proceso fermentativo y su autólisis (Rosi et al., 1999), pero en este caso, como se analizó sobre un vino modelo, su presencia puede ser debida a restos de estos compuestos que sean constituyentes de las paredes celulares de los orujos de la uva. La segunda población (fracción II) que se establece entre los minutos 17 y 19 se corresponde principalmente a una mezcla compleja de AGPs (arabinogalactano-proteínas derivadas de RG-II) y arabinanos, mientras que la tercera población (fracción III), eluída entre los minutos 19 y 21 corresponde principalmente a RG-II y PRAGs (polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa) (Apolinar-Valiente et al., 2014).

Como era previsible, los valores más altos de las fracciones I y II se consiguen con la dosis máxima de 13 mg/mL, siendo además mucho más importantes después de 20 días de contacto, no observándose grandes diferencias entre las cantidades liberadas con 5 y 10 días de tratamiento. Con la dosis de 6 mg/mL, la concentración de los polisacáridos de cada fracción es, en general, la más baja, mientras que con la dosis de 10 mg/mL y 10 días de contacto se obtienen valores muy similares a los obtenidos con 20 días de tratamiento.

En el caso de la fracción III, la cual presenta valores más altos que los encontrados para las fracciones I y II se observa, claramente, que la cantidad liberada se incrementa con la dosis utilizada de orujo, aunque 5 días de contacto serían suficientes para alcanzar cantidades elevadas de estos polisacáridos en el medio, no siendo además muy diferentes de los conseguidos con 20 días de contacto. A los diez días de contacto se observa una menor concentración de polisacáridos en el medio que podría ser atribuida a una readsorción parcial de estos compuestos sobre la pared de los orujos o bien a la formación de agregados con los compuestos fenólicos presentes en el vino, precipitando posteriormente.

Los resultados muestran, por tanto, que 5 días de contacto y una dosis de 13 mg/mL permitirían alcanzar concentraciones importantes de polisacáridos en el vino tratado con orujos. Un alto contenido de estos compuestos puede modificar la agregación de taninos y romper agregados de taninos y proteínas, disminuyendo la astringencia del vino e incrementando su cuerpo (Maury et al., 2016; González-Royo et al., 2017). Ya se ha comprobado que 13 mg/mL de orujos retiene una cantidad de compuestos fenólicos que puede ser excesiva para la calidad cromática de los vinos, por lo que es necesario encontrar un equilibrio, que en gran parte dependerá fundamentalmente del objetivo fundamental que se busque en el vino y el nivel de reducción de taninos y su astringencia asociada, que se desee.

Figura 4.4.2 Cromatogramas de SEC donde se refleja la distribución de pesos moleculares de los polisacáridos cedidos al vino por los orujos a las distintas dosis empleadas y los diferentes días de contacto estudiados. Abreviaturas: OP Mo: orujos purificados de Monastrell.



4.4.4 Conclusiones

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el estudio de los parámetros cromáticos y de la concentración de antocianos y taninos analizados por espectrofotometría y cromatografía líquida indican que la dosis de 6 mg/mL y un tiempo de contacto de 5 días podría ser la dosis más adecuada para que las caídas del color y la reducción de antocianos y taninos no sean excesivamente grandes, y no se rompa el equilibrio de estos en el vino. De todas formas, la dosis se puede modular en función del objetivo que se persiga, sobre todo en función de la cantidad de compuestos fenólicos que se quieran reducir en el vino. Los análisis por SEC permiten observar la variación del tamaño

molecular de la composición fenólica, que afectarán a la expresión de los atributos del vino (sensación en boca, amargor, astringencia y la concentración de pigmentos poliméricos estables en el vino), especialmente los compuestos de alto peso molecular, que están relacionados con la astringencia y el amargor. Así, 5 días de contacto y una dosis de 6 mg/mL podría ser el tiempo de contacto y la dosis más idónea para que la reducción de compuestos fenólicos no sea excesiva y no se obtenga un vino sin cuerpo y de pobres características cromáticas. Junto con estos resultados, y tal y como se ha comentado anteriormente, una dosis de 13 mg/mL permitiría alcanzar concentraciones importantes de polisacáridos en el vino tratado con orujos, disminuyendo la astringencia del vino e incrementando su cuerpo (Maury et al., 2016; González-Royo et al., 2017). Será necesario encontrar un equilibrio, que en gran parte dependerá fundamentalmente de objetivo fundamental que se busque en el vino y el nivel de reducción de taninos y su astringencia asociada, que se desee.

4.5 COMPARACIÓN DE LA AFINIDAD Y SELECTIVIDAD DE ORUJOS DE DISTINTAS VARIEDADES

4.5.1 Introducción

Para comprobar el uso potencial de los orujos como afinantes se han realizado numerosos estudios para determinar sus efectos sobre los principales compuestos polifenólicos del vino y su habilidad de ceder polisacáridos a éste, puesto que estos polisacáridos pueden actuar como coloides protectores incrementando la estabilidad del color del vino con el tiempo, evitando la precipitación de algunos compuestos fenólicos (Riou et al., 2002), e inclusive pueden aumentar el cuerpo y sensación en boca del vino.

Estudios anteriores han demostrado la efectividad de una dosis de 6 mg/mL y cinco días de contacto para disminuir la concentración de taninos, y con ello la astringencia, sin que disminuya en exceso el color, en definitiva, un periodo corto de tiempo que puede favorecer la rapidez en la elaboración del vino, hecho que beneficia al mundo enológico a la hora de sacar al mercado vinos jóvenes. Pero diferencias en la composición de estos orujos, como las que pueden suponer el origen varietal de estos, pueden provocar modificaciones en su manera de interacción con el vino y por ello se pretende comparar el comportamiento de orujos purificados obtenidos de cuatro variedades diferentes.

4.5.2 Breve descripción de la experiencia

En la siguiente experiencia se han utilizado orujos purificados con etanol al 70% procedentes de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon (CS), Syrah, y Macabeo, los cuales se mezclaron con 100 mL de un vino tinto joven de Monastrell (2016). Se usó una dosis de 6 mg/mL y un tiempo de contacto de cinco días. Además de los análisis espectrofotométricos, por HPLC y SEC, también se ha realizado un control de la cantidad de lías generadas por los diferentes orujos y un análisis sensorial de los vinos para comprobar si la aplicación de los orujos produce cambios en las fases visual, gustativa y olfativa junto con un estudio de la cesión de polisacáridos por parte de los orujos al medio,

utilizando un vino modelo que se puso en contacto con los orujos de las diferentes variedades estudiadas, a la dosis y el tiempo de estudio; después estos fueron medidos por SEC.

4.5.3 Resultados y discusión

4.5.3.1 Composición de las paredes celulares de orujos de las distintas variedades.

La tabla 4.5.1 muestra la composición de las paredes celulares de los orujos purificados (OP) de las diferentes variedades utilizadas en este estudio. La composición de los carbohidratos analizados, correspondiente a los ácidos urónicos, la glucosa celulósica y la no asociada a celulosa, muestran diferencias significativas entre los OP de las distintas variedades. El contenido de ácidos urónicos es menor en Monastrell (108,0 mg/g OP), y mayor en Syrah (150,5 mg/g OP), mientras que Macabeo y CS presentan valores intermedios (138,1 y 131,6 mg/g OP respectivamente), sin presentar diferencias significativas entre ellas. Un contenido bajo de ácidos urónicos indica menores cantidades de polisacáridos pectídicos, galacturónicos y ramnogalactorónicos, (Apolinar-Valiente et al., 2015a). Otros autores (Apolinar-Valiente et al., 2015a; Bindon & Smith, 2013) encontraron que CS tenía mayor proporción de ácidos urónicos que Syrah y Monastrell, siendo los valores de esta última un poco más altos que Syrah. Por otro lado, González-Centeno et al. (2010), analizaron el contenido de ácidos urónicos de Macabeo, Syrah y CS obteniendo valores que incluso duplican la cantidad que se muestra en la tabla 4.5.1.

El contenido de glucosa no celulósica indica la concentración de hemicelulosa. En este caso, Monastrell presenta significativamente mayores cantidades, seguido de los OP de CS, y con menores proporciones los de Macabeo y Syrah, sin presentar diferencias entre ellos. Apolinar-Valiente et al. (2015a) encontraron justo lo contrario, al obtener para Syrah un mayor contenido de glucosa que para CS y Monastrell, siendo debido posiblemente a diferencias en el estado de maduración de la uva, climatología entre los años de estudio, y metodología usada para su purificación y determinación.

Las cantidades de glucosa celulósica son mayores en Monastrell y CS (128,4 y 121,4 mg/g OP) respectivamente, presentando diferencias significativas entre ellas, mientras que Macabeo (117,8 mg/g OP) y Syrah (106,3 mg/g de OP) contienen cantidades inferiores y significativamente diferentes. Este parámetro es indicativo de la cantidad de celulosa que pueden contener los orujos, que junto con el contenido de lignina, van a determinar su mayor o menor flexibilidad, y por tanto, superficie de contacto de los orujos en los procesos

de interacción con los compuestos del vino (Bindon & Smith, 2013). Así, con las cantidades de lignina mostradas para cada una de las variedades, se observa que Monastrell presenta los valores más altos, encontrando diferencias significativas con el resto de las variedades estudiadas, no observándose diferencias significativas entre Macabeo, Syrah y CS. Por tanto, si estos orujos purificados de Monastrell son los que mayor contenido de lignina y celulosa presentan, son los que probablemente van a presentar una pared más rígida y con menor accesibilidad, y los orujos de la variedad Syrah tendrán la pared con más flexibilidad y mayor superficie de contacto.

Tabla 4.5.1 Composición de la pared celular de los orujos (mg/g OP) de las variedades Monastrell, Macabeo, Syrah y Cabernet Sauvignon.

Variedad	Proteína	PT	Lignina	Glu celulósica	AU	Glu no Celulósica
Monastrell	40,8 a	37,9 a	640,4 b	128,4 d	108,0 a	44,5 c
Macabeo	48,5 ab	65,8 c	617,2 a	117,8 b	138,1 b	12,5 a
Syrah	62,7 c	63,1 c	602,0 a	106,3 a	150,5 c	15,4 a
CS	52,8 b	58,4 b	613,6 a	121,4 c	131,6 b	22,2 b

Abreviaturas: PT: polifenoles totales, AU: ácidos urónicos, Glu: glucosa y CS: Cabernet Sauvignon. Letras diferentes en la misma columna significan diferencias significativas de acuerdo con el test LSD ($p < 0,05$).

Los orujos de la variedad Monastrell presentan el menor contenido de proteínas seguido de Macabeo y CS, y el contenido más alto es mostrado por Syrah. González-Centeno et al. (2010) analizaron el contenido de proteínas de las variedades, CS, Syrah y Macabeo, hayando cantidades más bajas que las obtenidas en este estudio, y no encontrando diferencias significativas entre sus valores. Apolinar-Valiente et al. (2015a) encontraron, sin embargo, valores mayores de proteínas, siendo los mayores los encontrados para Syrah y Monastrell, y menor en Cabernet Sauvignon. El hecho de que Syrah presente un mayor contenido de proteínas que CS es coincidente con los resultados de este trabajo. Sin embargo, Bindon & Smith (2013) analizaron el contenido de proteínas en CS y Syrah, obteniendo valores significativamente más bajos en Syrah. Los valores de proteínas pueden variar de unas investigaciones a otras según el método que se haya utilizado para su determinación (Apolinar-Valiente et al., 2010).

La cantidad de compuestos polifenólicos totales (PT) presentes en los orujos es mayor para las variedades de Macabeo y Syrah (65,8 y 63,1 mg/g OP respectivamente), no siendo significativamente diferentes entre ellos y menor en Monastrell (37,9 mg/g OP), mientras que CS (58,4 mg/g OP) muestra valores intermedios. Un contenido alto de polifenoles totales podría traducirse en una baja afinidad con los taninos (Bindon & Smith, 2013), siendo por tanto los orujos de Monastrell los que tendrían una mayor afinidad por los taninos y menor los de Macabeo.

4.5.3.2 Efecto de los orujos de distintas variedades sobre la producción de lías

Aunque el uso de los orujos purificados podría ser una buena alternativa como agentes afinantes, se debe tener en cuenta la producción de lías, por las pérdidas de volumen de vino que pueden llegar a generar. En la tabla 4.5.2 se muestra la cantidad de vino absorbido por 0,1 g de orujos purificados de las variedades analizadas en 10 mL de vino modelo.

Tabla 4.5.2 Efecto de los orujos sobre la producción de lías.

Variedad	Volumen ocupado por 0,1 g de orujos (mL)	Volumen de ocupación en 10 mL de vino (mL)	Volumen de vino absorbido por 0,1 g de orujos (mL)	LIAS (%)
Syrah	0,2 a	1,4 c	0,9 b	9
CS	0,3 b	1,3 b	0,7 b	7
Monastrell	0,2 a	0,7 a	0,3 a	3
Macabeo	0,4 c	1,7 d	1,0 c	10

Letras diferentes en la misma columna y para cada vino indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

Como se puede observar, Macabeo genera el mayor volumen de lías y el menor, Monastrell, siendo los valores de lías generados por Syrah y CS intermedios, aunque más cercanos a las cantidades generadas por Macabeo. Bindon & Smith (2013) analizaron el volumen de heces generado por orujos de uva CS y de manzana, presentando CS valores más altos que los mostrados en la tabla 4.5.2, alcanzando un 10% de volumen de lías,

mientras que los orujos de manzana generaban valores mucho más altos, en torno al 25% de volumen de heces. Otros investigadores (Noriega-Domínguez et al., 2010) cuantificaron el contenido de lías generado por afinantes comerciales, mostrando que las gelatinas generan en torno al 2,4% de lías, los extractos de levaduras un 0,3%, y un 0,8% de volumen de lías producidos por derivados del trigo, además también comprobaron que al incluir bentonita a la acción de estos últimos afinantes proteicos el volumen de lías podía subir a valores del 2,5%. Estos valores son próximos a los mostrados por los orujos purificados de Monastrell, por lo que su uso se hace comparable a los agentes afinantes utilizados tradicionalmente.

4.5.3.3 Efecto de los orujos de las distintas variedades sobre los parámetros espectrofotométricos

En la tabla 4.5.3 se muestran los valores de los parámetros espectrofotométricos obtenidos tras aplicar los orujos de las diferentes variedades al vino. Los valores de UNT indican el grado de turbidez del vino, el cual varía en los vinos comerciales de 5,6 a 190 UNT (Mutanen et al., 2007). Todos los orujos disminuyen los valores de la turbidez en el vino, sobre todo, aquellos de Syrah y Macabeo, aunque solo los de esta última variedad presentan valores significativamente diferentes respecto al vino sin tratar. El hecho de que solo Macabeo muestre valores significativamente diferentes en los valores de turbidez, puede deberse a que los OP de esta variedad tras su adición al vino se depositan en el fondo, mientras que los de las variedades tintas, no decantan rápidamente y quedan partículas en suspensión afectando a la transparencia del vino.

La intensidad de color no disminuye más de dos puntos tras la aplicación de los diferentes orujos. Estas pérdidas en el color del vino van asociadas a la interacción de los orujos con los compuestos fenólicos del vino como indica el descenso en los valores de IPT, antocianos y taninos. Los antocianos poliméricos son los que menos descensos sufren en sus valores, poniendo de manifiesto que estos agentes afinantes tienen más capacidad para interactuar con antocianos, en general, y con los taninos. Los orujos de Monastrell, Syrah y CS son los que muestran la mayor capacidad de interacción, viéndose reflejado en un descenso más importante en los valores del color del vino. Además, no se encuentran diferencias significativas entre ellos en cuanto a su capacidad para reducir antocianos totales y taninos, aunque sí en el contenido de antocianos poliméricos, siendo mayor el descenso con los orujos de Monastrell y Syrah. Los orujos de Macabeo presentan una gran capacidad para interactuar con los AT, similar a la mostrada por los orujos de las otras variedades, y poca con los AP, y aunque también reduce el contenido de TT, sus valores no

son significativamente diferentes respecto a aquellos mostrados por el vino sin tratar. Guerrero et al. (2013) para una dosis de 5 mg/mL de paredes celulares de CS comprobaron que estas reducen un 11,6% los antocianos totales y un 36,8% los antocianos poliméricos, valores mucho mayores, sobre todo para estos últimos compuestos, a los experimentados en este estudio.

Tabla 4.5.3 Efecto de los orujos sobre las características cromáticas del vino.

Muestras	Turb (UNT)	IC	IPT	AT (mg/L)	AP (mg/L)	TT (mg/L)
Vino Testigo	16,8 b	12,0 c	18,1 b	470,0 b	32,7 c	963,2 b
Vino + OP Monastrell	15,8 ab	10,2 a	16,8 a	422,6 a	30,1 a	760,4 a
Vino + OP Macabeo	10,2 a	10,6 b	17,8 b	434,0 a	32,5bc	882,7 b
Vino + OP Syrah	11,6 ab	10,2 a	16,4 a	426,4 a	31,1 ab	794,1 a
Vino + OP CS	15,0 ab	10,3 a	16,7 a	429,4 a	32,2 bc	781,0 a

Abreviaciones: OP: orujos purificados, CS: Cabernet Sauvignon, Turb: turbidez, UNT: unidades nefelométricas de turbidez, IC: intensidad de color, IPT: índice de polifenoles totales, AT: antocianos totales, AP: antocianos poliméricos y TT: taninos totales. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

4.5.3.4 Efecto de los orujos de las diferentes variedades sobre la concentración y composición de antocianos y taninos

Los valores de los antocianos monoméricos son mostrados en la tabla 4.5.4. El contenido de estos compuestos se ve reducido tras la aplicación de los diferentes orujos al vino. El mayor descenso se observa cuando se aplican los orujos de Monastrell y el menor con los de Macabeo, mientras que los de Syrah y CS muestran un comportamiento intermedio. La concentración de antocianos acilados desciende al afinar el vino con los orujos, aunque los valores no son diferentes significativamente, respecto aquellos mostrados por el vino sin tratar, mientras que en el caso de los antocianos no acilados, todos ellos, a excepción de la cianidina monoglucósido disminuyen con respecto al vino testigo, aunque solo se encuentran diferencias entre los orujos empleados para el monoglucósido de malvidina.

Con respecto al comportamiento de los orujos frente a los antocianos totales o los acilados, solo los OP de Macabeo parecen tener un comportamiento diferente, pues son

capaces de producir un descenso significativo en el contenido de antocianos totales con respecto al testigo, pero no muestran ninguna afinidad por antocianos acilados. [Padayachee, et al. \(2012\)](#), trabajando con paredes celulares de zanahoria no observaron diferencias en el comportamiento de las paredes con respecto a los antocianos acilados y no acilados, tal y como ocurre con las variedades tintas en este estudio, mientras que [Bautista-Ortín et al. \(2016\)](#) reportaron valores de retención de estos compuestos, acilados y totales, bastantes importantes tras la adición de paredes celulares de Monastrell al vino, lo cual puede ser debido a la dosis usada, siendo más alta a la de este ensayo; el grado de purificación e incluso a la aplicación de agitación para forzar los procesos de interacción también puede haber influenciado.

Tabla 4.5.4 Efecto de los orujos sobre la concentración (mg/L) y composición de antocianos.

Muestras	Del-Glu	Cian-Glu	Pet-Glu	Peon-Glu	Malv-Glu	ACT	AT	% Ads
Vino Testigo	34,0 b	2,7 a	59,4 b	21,2 b	316,9 c	54,7 a	488,8 c	
Vino + OP Monastrell	30,0 a	2,8 a	53,3 a	19,6 a	284,7 ab	43,7 a	433,9 a	11,2
Vino + OP Macabeo	30,6 a	3,2 a	54,2 a	20,7 ab	288,6 b	45,4 a	442,6 b	9,5
Vino + OP Syrah	30,2 a	3,6 a	54,1 a	20,3 ab	283,8 a	44,8 a	436,7 ab	10,7
Vino + OP CS	30,4 a	3,3 a	54,3 a	19,5 a	285,7 ab	45,9 a	439,1 ab	10,2

Abreviaciones: OP: orujos purificados, CS: Cabernet Sauvignon, %Ads: porcentaje de adsorción, Del-Glu: delfinidina-3-glucósido, Cian-Glu: cianidina-3-glucósido, Pet-Glu: petunidina-3-glucósido, Peon-Glu: peonidina-3-glucósido, Malv-Glu: malvidina-3-glucósido, ACT: antocianos acilados totales, AT: antocianos monoglucósidos totales y Ads: Adsorción. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

Los parámetros relacionados con los taninos capaces de despolimerizarse por la reacción de la fluoroglucinolisis se muestran en la tabla 4.5.5. Entre las distintas variedades de los orujos estudiados, los que menor retención muestran son los de la variedad Monastrell, no produciendo además cambios importantes en los parámetros estudiados relacionados con la composición de los taninos. Un efecto parecido es mostrado por los OP de Syrah, pues no presentan diferencias significativas con respecto a los OP de Monastrell, en la reducción de taninos, epigallocatequina y epicatequinagalato. Los orujos de Macabeo y CS presentan mayor capacidad de retención de taninos y su uso provoca un descenso en los valores del G_{Pm}, el contenido de epigallocatequina y de

epicatequinagalato. La única diferencia entre estas dos variedades es en cuanto al G_{Pm} de los taninos con los que interactúan, mostrando los orujos de CS mayor capacidad para interactuar con taninos de mayor peso molecular. El hecho de que los OP de Monastrell muestren menores valores con respecto a la retención de taninos que los OP de Macabeo, cuando estos se analizan por fluoroglucinolisis, y no ocurra así cuando los taninos son analizados espectrofotométricamente, podría deberse a que la variedad Monastrell no presenta tanta afinidad por taninos capaces de despolimerizarse como la variedad Macabeo, ya que por fluoroglucinolisis solo se miden taninos despolimerizables y por determinaciones espectrofotométricas taninos en general, muchos de ellos oxidados o asociado a otras moléculas, que es lo que se ve corroborado en la tabla 4.5.6 en los análisis por SEC, pues el porcentaje de retención es mayor.

Tabla 4.5.5 Efecto de los orujos sobre la concentración (mg/L) y composición de taninos.

Muestras	TT (mg/L)	G _{Pm}	Epigalocat (μM)	Epicatg (μM)
Vino Testigo	357,8 c	4,6 c	182,1 c	53,7 c
Vino + OP Monastrell	311,4 bc	4,6 c	165,5 bc	48,8 bc
Vino + OP Macabeo	231,6 a	3,9 b	113,9 a	36,4 a
Vino + OP Syrah	271,8 ab	3,9 b	148,7 b	41,5 ab
Vino + OP CS	253,2 a	3,7 a	118,8 a	39,4 ab

Abreviaciones: OP: orujos purificados, CS: Cabernet Sauvignon, TT: taninos totales, G_{Pm}: grado medio de polimerización, Epigalocat: epigalocatequina, Epicatg: epicatequinagalato. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

Esta diferente capacidad para retener los taninos del vino puede ser explicada completamente por diferencias en la composición de las paredes de los orujos. Así, un bajo contenido de pectinas y proteínas y alto contenido de celulosa, mostrados por los orujos de Monastrell, se corresponde con una menor capacidad de interacción, además el alto contenido en lignina hace que tenga una estructura menos flexible impidiéndole interactuar con los taninos de alto peso molecular, de ahí que no disminuya el G_{Pm}.

En los trabajos de [Bindon & Smith \(2013\)](#) con paredes celulares de orujos de Syrah y CS, se observó una mayor capacidad de retención de taninos con las paredes celulares de Syrah, lo que se atribuyó al menor contenido de lignina y celulosa presentado por las paredes celulares de los orujos de dicha variedad en este estudio, ya que las de CS doblaban el contenido de estos dos parámetros, convirtiéndola en una pared mucho más

rígida y menos accesible para la interacción y retención de los taninos. En este estudio, no se observan diferencias en la capacidad de retención de taninos entre los OP de estas dos variedades, pues como se muestra en la tabla 4.5.1, tampoco presentan diferencias significativas en el contenido de lignina, lo que puede hacer que se comporten del mismo modo.

[Bautista-Ortín et al. \(2015a\)](#), observaron una menor capacidad de retención de taninos por parte de las paredes celulares de CS que Syrah, no encontrando además grandes diferencias entre ambas mientras que aquellas de la variedad Monastrell mostraban la mayor interacción con los taninos, dando lugar a altos porcentajes de retención, entre 20-80%. Esta elevada afinidad de las paredes celulares de Monastrell por los taninos, fue atribuida por presentar en su composición los valores más altos de pectina y los más bajos de lignina, composición totalmente diferente de la que presentan los orujos purificados de la variedad Monastrell en este estudio, ya que presentan los valores más altos de lignina y los más bajos de pectina, justificando así su menor retención y demostrando la importancia de la composición de los orujos en los procesos de interacción.

4.5.3.5 Capacidad de los orujos de las diferentes variedades sobre la retención de taninos de diferente peso molecular

Los resultados del efecto que causan los orujos purificados sobre la distribución molecular de los taninos se muestran en la figura 4.5.2 y en la tabla 4.5.6.

En la figura 4.5.2 se pueden diferenciar las tres secciones que corresponden a los compuestos fenólicos de diferente rango de peso molecular. En la tabla 4.5.6 se muestran los porcentajes de reducción que sufren cada una de estas fracciones y el efecto causado sobre el total de compuestos polifenólicos.

La retención de los compuestos fenólicos medidos por SEC oscilan entre 11,4-22,4%, los cuales se corresponden con los OP de Syrah y CS respectivamente. La baja afinidad que presentan los orujos purificados de Syrah con una dosis de 6 mg/mL sobre el perfil de distribución de masas de los taninos, ya fue mencionado por [Bindon et al. \(2010b\)](#), con paredes celulares de esta misma variedad. Todos los diferentes tipos de orujos purificados estudiados, a excepción de los de Monastrell, causan mayores retenciones de los taninos analizados por fluoroglucinolisis que por SEC. Esto indica que los orujos purificados de la variedad Monastrell tienen afinidad tanto por los taninos que no pueden despolimerizarse como por los que sí, o que se encuentran asociados a otros compuestos, como los antocianos; este fenómeno también fue observado por [Bautista-Ortín et al. \(2015b\)](#). Los

orujos purificados de las otras variedades muestran mayor afinidad por taninos capaces de despolimerizarse, por mostrar valores mayores en los porcentajes de retención de taninos analizados por fluoroglucinolisis que por SEC.

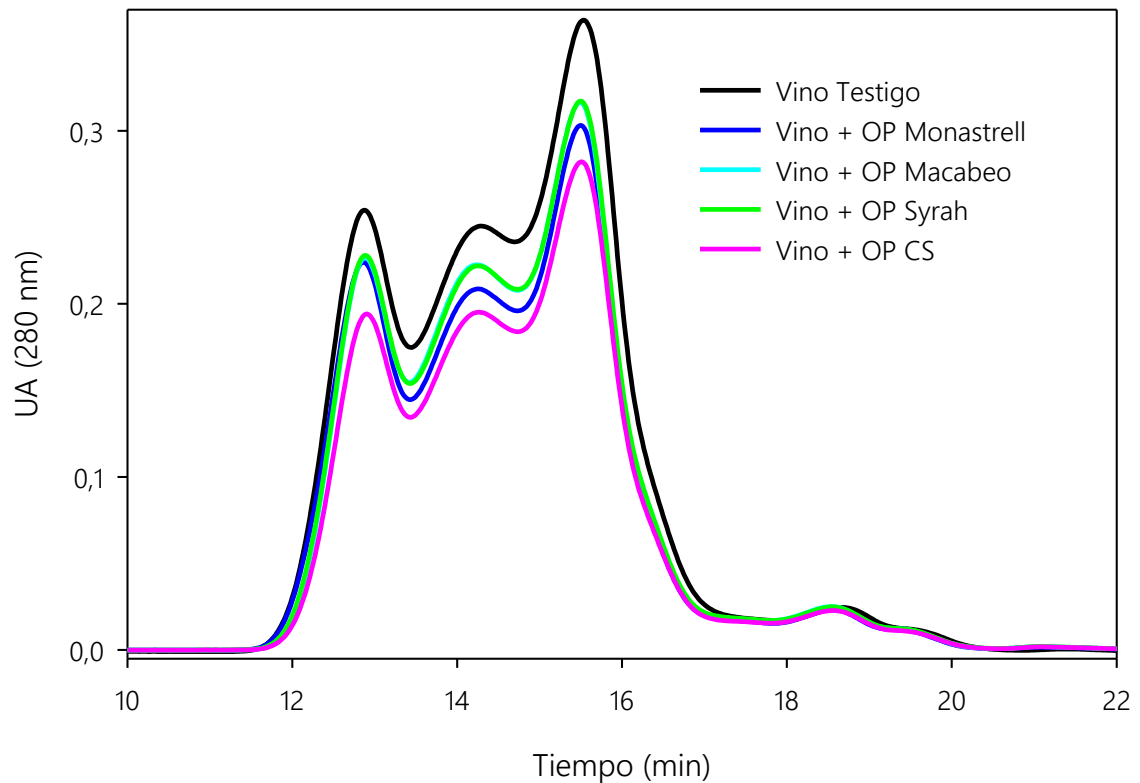
Los orujos de la variedad CS presentan una alta selectividad por los compuestos fenólicos de elevado peso molecular, lo cual coincide con los valores más bajos del GPM de los taninos medidos por fluoroglucinolisis. Contrariamente a estos resultados, [Guerrero et al. \(2013\)](#) no observaron ningún tipo de selectividad por los orujos de esta variedad. Los orujos purificados de Monastrell presentan mayor afinidad por los compuestos de menor peso molecular, esto se refleja en la conservación del GPM de los taninos frente al vino testigo cuando estos se utilizan, aunque también puede ser debido a una gran retención de antocianos monoméricos, los cuales están presentes en el vino y muestran absorbancia a 280 nm.

Tabla 4.5.6 Efecto de los orujos de las diferentes variedades sobre la retención de taninos medidos por HPLC y SEC en el vino. Porcentaje de retención de taninos calculados en la fluoroglucinolisis (*) y los compuestos fenólicos (**) medidos por SEC. Abreviaciones: OP: orujos purificados, CS: Cabernet Sauvignon.

Muestras	% retención de taninos*	% retención fenólica**	% retención a diferentes tiempos (min)		
			11,4 - 13,4	13,4 - 14,5	14,5 - 20,4
Vino + OP Monastrell	13,0	15,1	11,3	15,4	19,0
Vino + OP Macabeo	35,3	12,1	13,6	9,6	14,6
Vino + OP Syrah	24,0	11,4	12,5	10,0	13,9
Vino + OP CS	29,2	22,4	26,6	21,0	22,8

Estos hallazgos son contrarios a los experimentados por [Bautista-Ortín et al. \(2015b\)](#) con paredes celulares de esta misma variedad, aunque estos autores solo trabajaron con taninos. Los orujos de Macabeo y Syrah no muestran grandes diferencias en cuanto a su afinidad por los compuestos fenólicos de diferente peso molecular, no siendo así selectivos.

Figura 4.5.2 Comparación de los cromatogramas SEC de la cantidad de compuestos fenólicos retenidos por los diferentes orujos de las diferentes variedades estudiadas. Abreviaciones: OP: orujos purificados y CS: Cabernet Sauvignon.



4.5.3.6 Capacidad de las paredes celulares de orujos para liberar polisacáridos al medio

En la figura 4.5.3 se puede observar la distribución de masas de los polisacáridos cedidos a un vino modelo (disolución de etanol al 12% y pH 3,6) por los orujos de las diferentes variedades estudiadas.

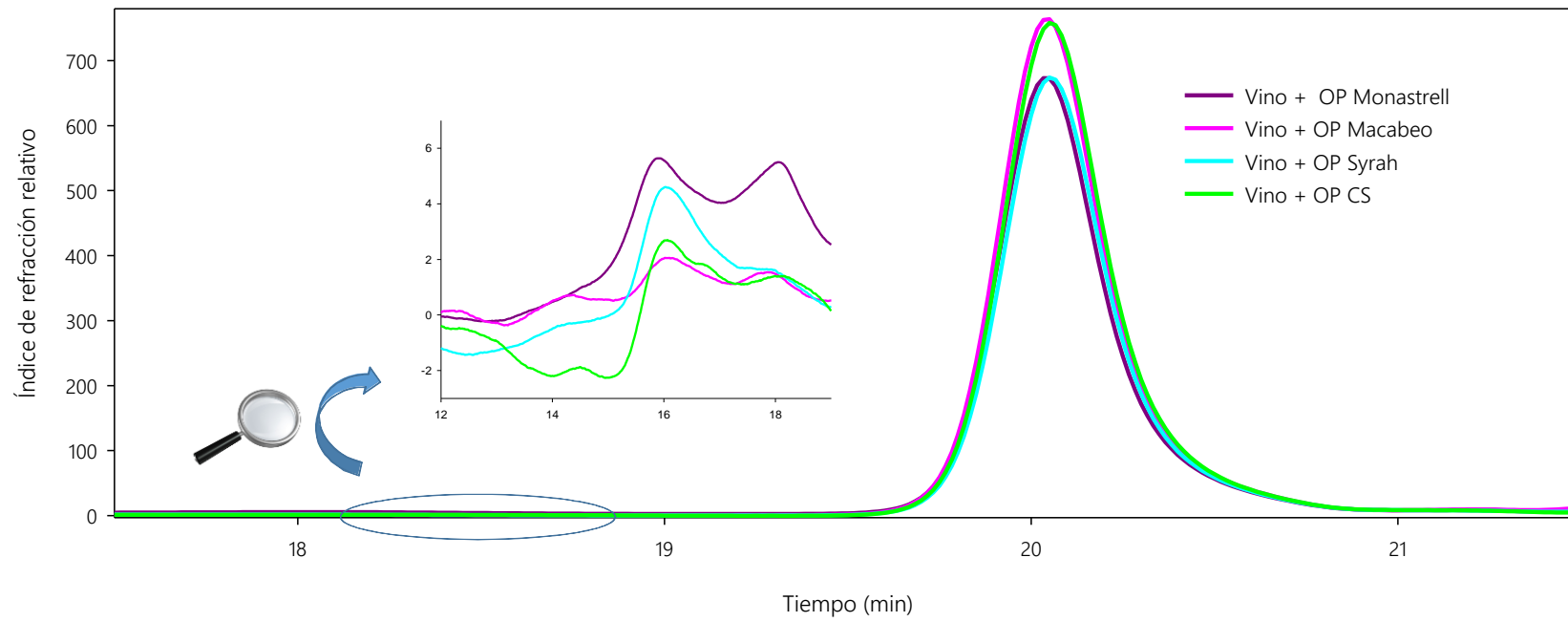
Se aprecia claramente, que para los OP de las cuatro variedades, la fracción que se libera en mayor cantidad se corresponde con polisacáridos de bajo peso molecular, siendo la mayor cesión de estos compuestos por parte los OP de Macabeo y CS, no encontrándose diferencias entre ambas variedades, ni entre los valores mostrados por Monastrell y Syrah.

Por otro lado, las cantidades de polisacáridos liberados de la primera y de la segunda fracción son muy pequeñas, consiguiéndose los valores más altos con los OP de Monastrell. [Apolinar-Valiente et al. \(2014\)](#) enunciaron que la facilidad de la degradación de la pared se veía reflejado por la cesión de polisacáridos de menor peso molecular aunque esta capacidad de extracción de polisacáridos también depende de la madurez de la uva, su origen y el modo de cultivo ([Doco et al., 2007](#); [Apolinar-Valiente et al., 2013](#)).

Como se comentó anteriormente, RG-II es uno de los principales componentes de esos polisacáridos de bajo peso molecular. Una mayor proporción de RG-II en el medio, puede suavizar bastante la sensación de astringencia, aunque todas las familias de polisacáridos contribuyen en mayor o menor medida a disminuirla; este tipo de polisacárido presenta azúcares inusuales y uniones entre ellos que crean una red de polisacáridos en el vino que le confiere eficacia para este fin ([Quijada-Morín et al. 2014](#)). Otros investigadores como [Guadalupe et al. \(2010\)](#), consideran que RG-II pueden desestabilizar al vino, favoreciendo la agregación de taninos, por lo que no sería bueno una cantidad excesiva de RG-II en el vino aportada por los orujos, aunque este fenómeno depende tanto de la concentración y estructura del tanino como de la concentración de manoproteínas, su peso, carga y estructura.

El hecho de que los OP de las distintas variedades no cedan polisacáridos de alto peso molecular puede ser una ventaja, pues estos se caracterizan por su capacidad para flocular compuestos, fenómeno que podría parecer interesante para reducir la astringencia, pero a la misma vez el vino pierde cuerpo y estructura, mientras que los polisacáridos de menor peso molecular, como los aportados por los OP, suavizan el vino y disminuyen la sensación de astringencia por que limitan las interacciones con las proteínas, no disminuyendo el cuerpo del vino ([Vidal et al., 2004a](#); [2004b](#)).

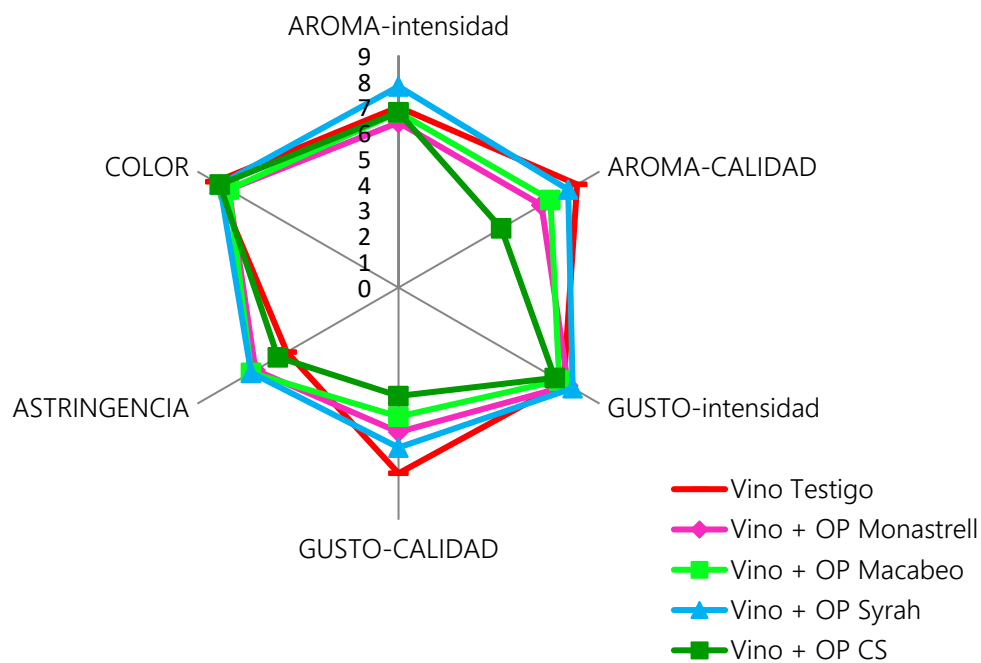
Figura 4.5.3 Cromatogramas de SEC donde se refleja la distribución de pesos moleculares de los polisacáridos cedidos a un vino modelo por los orujos de las distintas variedades utilizadas. Abreviaciones: OP: orujos purificados y CS: Cabernet Sauvignon.



4.5.3.7 Análisis sensorial

La figura 4.5.4 muestra los resultados del análisis sensorial del vino testigo y el tratado con los orujos de las diferentes variedades

Figura 4.5.4 Análisis sensorial del vino testigo y tratado con los orujos de las diferentes variedades. Abreviaturas: OP: orujos purificados y CS: Cabernet Sauvignon.



Se observa que la aplicación de los OP no produce cambios importantes en el color, ni tampoco en la intensidad gustativa del vino. La intensidad aromática se incrementa con el uso de los OP de Syrah, no produciendo los OP de esta variedad cambios en la calidad del aroma, aunque este parámetro sí que se ve disminuido con los demás OP y especialmente con los de CS, mientras que la astringencia se incrementa con los orujos de Syrah, Monastrell y Macabeo, no encontrándose, además, diferencias entre ellos. Estas sensaciones obtenidas por los catadores en cuanto a la astringencia, no coincide con los valores de concentración y composición presentada por los taninos de los vinos tratados, ya que un menor contenido de taninos y bajo porcentaje de galoilación causado al aplicar

los OP (Bautista-Ortín, et al., 2014a) puede ser relacionado con una menor astringencia en el vino. Posiblemente, la menor presencia en el vino tratado con orujos de CS de taninos de alto y bajo peso molecular, unido a un mayor contenido de polisacáridos de bajo peso molecular podría explicar que la astringencia no se vea incrementada en su caso.

4.5.4 Conclusiones

Con estos resultados se puede concluir que la capacidad de los orujos purificados como afinantes en vino ha quedado demostrada, aunque el comportamiento es algo diferente según la composición de las paredes celulares de estos orujos. Los orujos de Monastrell, CS y Syrah han sido estudiados en los últimos años, y su efectividad para afinar el vino se refleja en este estudio, siendo similar la capacidad de estas tres variedades para retener antocianos y el efecto sobre el descenso del color, mientras que en la retención de taninos, los OP de la variedad Monastrell presentan una menor interacción con aquellos capaces de despolimerizarse por la reacción con el fluoroglucinol, pero a la hora de disminuir el contenido de taninos en general, los OP de Monastrell, CS y Syrah, tienen el mismo comportamiento.

Hay que destacar el comportamiento de los orujos de Macabeo, variedad blanca, pues es el primer estudio donde se analiza su afinidad por los compuestos fenólicos para su uso como afinante. Se ha observado que presenta una ligera afinidad por los antocianos, menor que la presentada por las variedades tintas estudiadas, y reduce de forma considerable taninos despolimerizables, aunque su capacidad de interacción con otras formas de taninos (los más complejos y oxidados) se ve reducida. Un parámetro importante de estos OP es la mayor reducción de turbidez que experimentan los vinos cuando se trata con orujos de esta variedad, frente a la observada cuando se utilizan las variedades tintas. Este es un fenómeno muy importante a tener en cuenta a la hora de evaluar el grado de limpidez que necesita el vino a tratar.

La cesión de polisacáridos al medio por parte de los diferentes orujos es muy similar, aunque los OP de Macabeo y CS hacen un aporte ligeramente mayor. Principalmente aportan al vino polisacáridos de bajo peso molecular, los cuales son los considerados de estabilizar el vino, aumentar su "redondez", y reducir la sensación de astringencia, así como otros aspectos negativos del vino como el amargor. Por tanto, todos los OP de las variedades estudiadas realizan un aporte beneficioso de polisacáridos al medio.

Los vinos tratados con OP son positivamente evaluados en el gusto y el aroma, en su calidad e intensidad, a excepción del vino tratado con los OP de CS que resultan peor valorado. La astringencia mostrada por los vinos tratados con OP permanece invariable con respecto al vino testigo, en el caso de adicionar los OP de CS, mientras que al utilizar los OP de Monastrell, Macabeo y Syrah esta se ve incrementada.

4.6 EFECTO DEL AFINAMIENTO CON ORUJOS PURIFICADOS DE MONASTRELL Y MACABEO EN VINO ROSADO

4.6.1 Introducción

Considerando el incremento de popularidad del vino rosado ([Wang et al., 2016a](#)), es importante para la industria y para las perspectivas científicas entender de qué manera mediante el uso de afinantes se pueden conseguir vinos más estables en el tiempo y con color duradero, sin que otros parámetros del vino se vean negativamente afectados, como por ejemplo, los aromas. El vino rosado es producido a partir de variedades tintas con un tiempo de maceración corto, posee un ligero color rojo y notas frutales, florales, y más especiadas, con un contenido de azúcares variable dependiendo de la acidez del vino.

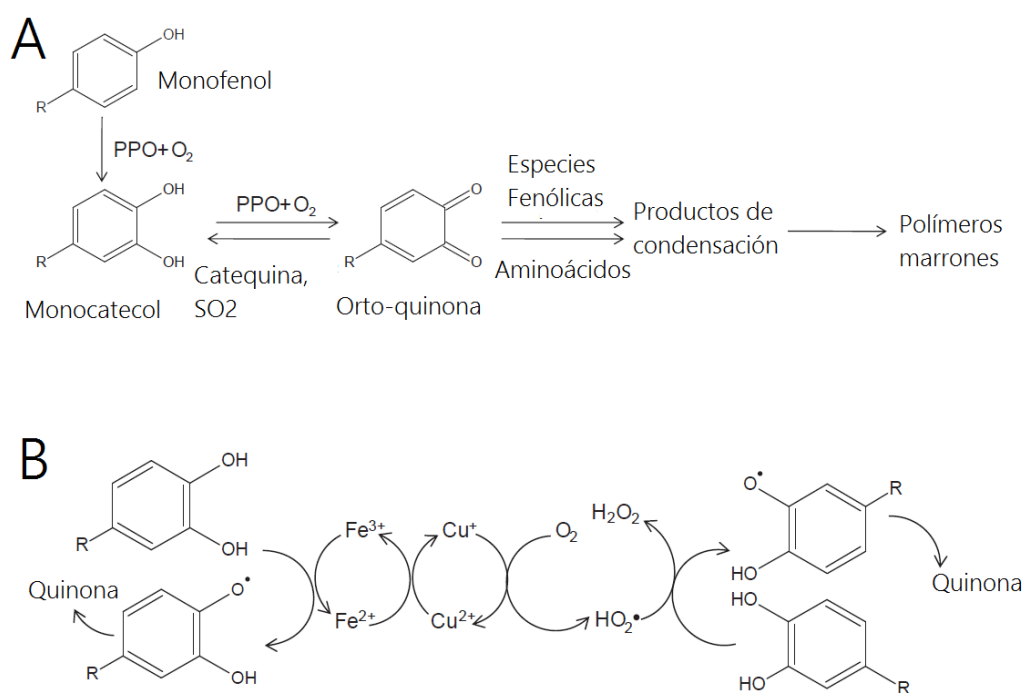
Las buenas prácticas en la elaboración del vino pueden evitar o disminuir factores que puedan contribuir al pardeamiento del color del vino y la formación de enturbiamientos debido a la inestabilidad proteica, reduciendo la oxidación y eliminando material como pectinas y proteínas del vino, lo que puede, a su vez, incrementar la calidad global del aroma ([Gambutí et al., 2016](#)).

La formación de turbios en el vino rosado es un problema para la industria enológica, la turbidez causada por proteínas y compuestos en suspensión se relaciona con una baja calidad del vino, y por tanto, hay un rechazo de los consumidores frente a este fenómeno, de ahí la importancia de proporcionar al vino una cierta estabilidad antes del embotellado ([Jaeckels et al., 2017](#)).

Después del prensado de la uva estrujada y despalillada pueden ocurrir muchas reacciones de oxidación, tanto enzimáticas como no-enzimáticas. La oxidación enzimática, ocurre en el mosto, y está relacionada en gran parte por el contenido de hidroxicinamatos, como el ácido cafeico, el tartárico y el *p*-cumaril tartárico, y por los flavan-3-oles. La oxidación química del vino, oxidación no enzimática, sucede en el mosto y en el vino durante la fermentación, así como en el vino terminado, y comienza con la oxidación de los polifenoles que contienen un grupo catecol o gálico. Ambos tipos de oxidaciones van

a dar lugar a las quinonas, formas oxidadas de los polifenoles que le dan un color pardo al vino. En la oxidación no enzimática, el oxígeno no reacciona directamente con los compuestos polifenólicos, sino que es activado mediante iones de los metales de transición como el hierro, el cobre o el manganeso, pues el oxígeno triplete tiene una reactividad limitada (Oliveira et al., 2011). A parte, otros aldehídos presentes en el vino, resultantes de la oxidación del ácido tartárico y otros compuestos del vino, reaccionan directamente con polifenoles como los flavanoles, dando lugar a la formación de compuestos amarillos-anaranjados.

Figura 4.6.1 Reacciones de oxidación de los compuestos polifenólicos. A: oxidación enzimática, B: oxidación no enzimática.



Al vino normalmente se añade dióxido de azufre y, menos frecuentemente, ácido ascórbico para protegerlo frente a la formación de quinonas y por tanto, evitar su pardeamiento. En la actualidad, se usan, además, agentes afinantes tanto para afinar como para eliminar compuestos fenólicos ya oxidados, mejorando la estabilidad y las características organolépticas del vino. PVPP, bentonita, caseinato potásico, proteínas derivadas del guisante y extractos de levaduras tienen la habilidad de eliminar estos compuestos fenólicos, y también pueden hacer que el color del vino sea más estable (Cosme et al., 2012).

Investigadores como Razmkhab et al. (2002) y Fernandes et al. (2015) encontraron que las paredes celulares de levaduras también tienen capacidad para retener derivados

de los flavan-3-oles y productos coloreados resultantes de la oxidación o condensación de compuestos fenólicos. En vista a estos resultados, y a los numerosos estudios realizados en los últimos años por investigadores sobre la interacción de las paredes celulares de la uva con compuestos fenólicos y otras sustancias de interés, en este capítulo se ensaya el uso de los orujos purificados como afinante del vino rosado, y se estudia su capacidad para reducir tanto compuestos que puedan dar lugar por oxidación a quinonas o compuestos ya oxidados, así como proteínas, cuya presencia puede dar lugar a vinos con problemas de limpidez.

La capacidad de ceder polisacáridos al medio por parte de los orujos puede también resultar beneficioso, pues pueden actuar como coloides protectores, interaccionar con compuestos aromáticos y jugar un papel importante en la estabilidad proteica del vino, evitando la precipitación de algunos componentes, y mejorar así su estabilidad en el tiempo (Apolinar-Valiente et al., 2013). Los polisacáridos actúan limitando la floculación de partículas en suspensión mediante su carácter adsorbente, por obstrucción y mediante el fenómeno de repulsión, previniendo a las partículas de aproximarse (Doco et al., 2007).

El efecto que los orujos puedan tener sobre el perfil aromático del vino es, asimismo, importante ya que agentes afinantes comerciales eficientes y utilizados normalmente en la práctica enológica, tienen un gran poder de retirar proteínas del medio para no dar lugar a vinos turbios, pero reducen muchos compuestos aromáticos esenciales, como por ejemplo, el uso de bentonita (Fernandes et al., 2015). Los agentes afinantes interaccionan con sustancias que pueden tener asociados aromas, y esto puede traducirse en pérdidas organolépticas después de los tratamientos de afinamiento y estabilización (Lambri et al., 2013) aunque la naturaleza química de los compuestos aromáticos, su hidrofobicidad, y la concentración inicial de proteínas presentes en el vino, son factores matrices que pueden modular la eliminación de compuestos de olor (Lambri et al., 2010). Así, el objetivo de este estudio no solo es investigar si los afinantes cambian el perfil aromático de vino, sino también comprobar si algunos de estos agentes afinantes tienen la capacidad de enmascarar la expresión de aquellos compuestos que aportan notas aromáticas positivas en los vinos.

4.6.2 Descripción de la experiencia

Un volumen de 100 mL de vino rosado de Monastrell (2016), se mezclaron con orujos purificados (OP) con etanol al 70% de dos variedades, Monastrell y Macabeo, ensayándose dos dosis (4 y 8 mg/mL). Además, los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos con otros afinantes comerciales usados habitualmente en enología

(bentonita, caseinato, bentonita+caseinato, PVPP, Ictioclar y Proveget) y aplicados a la dosis máxima recomendada por el fabricante. Los agentes afinantes se mantuvieron en contacto con el vino durante 3 días en reposo, sin aplicar agitación. Para evitar oxidaciones se aplicó N₂ gas en el espacio de cabeza de los botellines y fueron cubiertos con papel de aluminio. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y también se hizo un control sin la adición de los diferentes agentes afinantes. Trascurrido el tiempo de contacto, las muestras se prepararon para realizar sus análisis por espectrofotometría y CG-MS. Para ver la cesión de polisacáridos al medio por parte de los orujos se utilizó un vino modelo, y se utilizaron las mismas dosis que en los análisis anteriores, estando en contacto los OP con el vino durante tres días, para posteriormente analizar las muestras por SEC.

4.6.3 Resultados y discusión

4.6.3.1 Efecto de las paredes celulares sobre los parámetros espectrofotométricos del vino

Después de tres días de contacto de los diferentes afinantes con el vino (tabla 4.6.1) se observó que el índice de polifenoles totales (IPT) desciende de forma significativa con respecto al testigo con la aplicación individual o conjunta de bentonita y caseinato. Estos afinantes provocan una disminución importante en el contenido de antocianos y taninos en el vino. La bentonita, debido a su carga negativa en su estructura, tiene gran capacidad para retirar antocianos, los cuales presentan carga positiva al pH del vino, mientras que el caseinato, cargado positivamente, tiene una mayor capacidad para interaccionar con los taninos, de ahí que usados conjuntamente presenten un gran descenso de los valores de IPT. De hecho, su acción conjunta provoca las mayores reducciones de color, IPT y antocianos totales. Sin embargo, la mayor reducción de taninos totales es causada por el uso individual de caseinato. El resto de afinantes comerciales no provocan disminuciones significativas con respecto al testigo, a excepción de PVPP, pues disminuye el contenido de antocianos y el índice de polifenoles totales, viéndose esto reflejado en la reducción del color. La estructura del PVPP es muy parecida a los aminoácidos de prolina, y además, por su grupo pirrolidona y su cadena vinílica, puede establecer enlaces por puente de hidrogeno ([Ghanem et al., 2017](#)) y desarrollar interacciones hidrofóbicas, de ahí que se compare su uso con agentes proteicos utilizados tradicionalmente. Además, en la reducción de antocianos y del IPT, el comportamiento del PVPP es muy parecido al caseinato, menos en la reducción de taninos, el que en este estudio no se observe un gran efecto del PVPP sobre el descenso de taninos puede ser debido a que este tenga capacidad para interaccionar principalmente con taninos monoméricos, los cuales no responden al método de la metil celulosa aplicado para el análisis de etos compuestos, como indicaron

Verza et al. (2008), al observar que el PVPP era capaz de reducir el contenido de catequina de forma muy efectiva, debido a su gran capacidad de establecer puentes de hidrógeno. Ictioclar, tiene un comportamiento similar al uso conjunto de caseinato y bentonita, y a la aplicación de esta última, sobre la interacción con los taninos, pues disminuye significativamente el contenido de taninos con respecto al testigo. Ortiz-Barrera et al. (2015) concluyeron que los colágenos de la piel y vejiga natatoria de los peces producen una precipitación específica de polifenoles, mayores incluso que las precipitaciones experimentadas con otros afinantes comerciales como la ovoalbúmina. Otros autores (Cosme et al., 2009) señalan que la proteína del pescado es selectiva para los flavanoles de alto peso molecular, causantes de la astringencia, siendo mayor el efecto cuanto mayor sea el peso molecular de la misma.

Tabla 4.6.1 Efecto de los diferentes agentes afinantes sobre las características cromáticas del vino rosado tras tres días de contacto.

Muestras	IC	IPT	AT (mg/L)	TT (mg/L)	Ab 320 nm	Turb (UNT)
Vino Testigo	1,37 h	13,51 cd	138,3 d	139,6 f	4,36 g	6,68 c
Vino + Bentonita	1,08 b	12,24 b	113,6 b	100,8 bc	3,99 c	7,97 d
Vino + B + C	0,98 a	11,43 a	108,2 a	75,7 b	3,74 a	7,35 cd
Vino + Caseinato	1,13 c	11,85 ab	131,6 c	49,8 a	3,86 b	4,86 b
Vino + V.Forte	1,37 gh	13,28 c	136,7 d	134,7 def	4,29 fg	5,02 b
Vino + PVPP	1,23 d	12,41 b	131,5 c	116,2 cdef	3,84 b	4,93 b
Vino + Ictioclar	1,36 h	13,39 cd	136,6 d	99,4 bc	4,34 g	4,25 ab
Vino + Proveget	1,30 ef	13,11 c	135,9 d	119,4 cdef	4,21 ef	6,31 c
Vino + OP Ma1	1,36 h	13,89 cd	137,2 d	136,2 ef	4,33 g	3,57 a
Vino + OP Ma2	1,28 e	13,57 cd	130,4 c	110,2 cd	4,13 de	4,16 ab
Vino + OP Mo1	1,32 fg	13,31 cd	132,2 c	111,1 cde	4,17 de	8,25 d
Vino + OP Mo2	1,32 fg	13,25 c	129,1 c	120,6 cdef	4,11 d	8,59 d

Abreviaciones: IC: intensidad de color, IPT: índice de polifenoles totales, AT: antocianos totales, TT: taninos totales, Ab: absorbancia Turb: turbidez, B: bentonita, C: caseinato, OP: orujos purificados, Ma: Macabeo, Mo: Monastrell, 1: dosis 4 mg/mL y 2: dosis de 8 mg/mL. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

Los orujos purificados de Monastrell y Macabeo no disminuyen de forma significativa el índice de polifenoles totales. Con respecto a los antocianos, los orujos de Monastrell a ambas dosis y los de Macabeo a la dosis más alta reducen su contenido, observándose descensos en el color, un comportamiento similar es encontrado también para los taninos. [Guerrero et al. \(2013\)](#), al aplicar una dosis de 5 mg/mL de paredes celulares de orujos de CS en vino tinto también observaron descensos significativos en el IPT, el color, los antocianos y en los flavanoles. Investigadores como [Bautista-Ortín et al. \(2016\)](#) utilizando paredes celulares de Monastrell, y [Bindon & Smith \(2013\)](#), de CS y Syrah para afinar el vino tinto, observaron mayor retención de compuestos fenólicos al aumentar la dosis de paredes celulares, fenómeno que no se observa a los tres días de contacto con los OP de Monastrell, pero si con los OP de Macabeo, pues un incremento de la dosis, de 4 a 8 mg/mL, provoca una mayor retención de antocianos y taninos, junto con un descenso del color significativamente mayor que con el uso de la dosis más baja, 4 mg/mL.

Una ventaja que presentan los OP de ambas variedades, es que los descensos en el parámetro del color no son muy grandes, hecho que puede resultar beneficioso, ya que el color es uno de los parámetros más reclamados por los consumidores.

La absorbancia a 320 nm es debida principalmente a los ácidos hidroxicinámicos, y de igual modo que en los parámetros comentados anteriormente, las mayores reducciones son obtenidas con la acción conjunta de bentonita y caseinato, seguido del uso individual de caseinato, PVPP y bentonita. La capacidad del PVPP para retirar ácidos hidroxicinámicos se puede deber a su eficacia de interacción con grupos carboxílicos ([Verza et al., 2008](#)). Proveget muestra la menor disminución, siendo significativa con respecto al testigo, mientras que el resto de afinantes comerciales no muestran ningún efecto. En cuanto a los OP, solo los de Monastrell a ambas dosis y los de Macabeo a la dosis más alta reducen los valores de absorbancia a 320 nm en cantidades ligeramente superiores a Proveget, aunque entre la aplicación de los OP de ambas variedades a las dosis citadas, no se observan diferencias significativas entre ellas. Algunos investigadores como [Fernandes et al. \(2015\)](#) también comprobaron la eficacia de las paredes celulares de levaduras para prevenir el pardeamiento del vino, por lo que los orujos purificados, por su similitud en su compleja composición, pueden resultar una buena alternativa como afinantes y estabilizantes del vino. Una reducción de esta absorbancia es un reflejo de la disminución de los ácidos hidroxicinámicos, que podrían dar lugar a la formación de quinonas y con el ello el pardeamiento de los vinos, lo que puede hacer que el color del vino pase de un rosa frambuesa a piel de cebolla, haciéndolo menos atractivo para el consumidor.

En cuanto al efecto de los diferentes afinantes sobre la turbidez del vino, esta se reduce principalmente con la adición de los OP de Macabeo, independientemente de la dosis utilizada; Ictiolar, PVPP, V.Forte y caseinato, también producen una reducción importante pero no tan elevada. [Granato et al. \(2014\)](#) comprobaron que la proteína del guisante podía reducir hasta un 70% la turbidez de un vino, no observándose por el contrario este fenómeno en los resultados de este estudio, al no mostrar Proveget diferencias significativas en la turbidez con respecto al vino testigo. Por otro lado, la adición de bentonita, sola o junto con caseinato, y los OP de Monastrell, incrementan la turbidez. En el caso de los orujos de Monastrell, esto puede ser debido a que, a diferencia de los de Macabeo, estos no precipitan rápidamente, quedándose partículas pequeñas en suspensión que pueden afectar a la claridad. Una explicación similar podría ser utilizada para la bentonita. Además, los orujos de Macabeo tienen una mayor flexibilidad debido a su menor contenido de lignina y celulosa frente a los de Monastrell, permitiéndoles este hecho mayor facilidad de acomodarse, quedando precipitados en el fondo. En el caso de la bentonita, [Gambuti et al. \(2016\)](#) enunciaron que su origen puede inducir o no, la floculación y sedimentación, experimentándose que a dosis bajas produce un enturbiamiento del vino o una etapa de floculación incompleta, por lo que son requeridas altas dosis de bentonita (500 g/hL) para que afine el vino, no olvidando que éstas pueden producir cambios importantes en otros parámetros del vino. Los resultados de otros autores como [Jaeckels et al. \(2016\)](#) corroboran que es necesario el uso de altas dosis de bentonita (400-300 g/hL) para reducir las proteínas contenidas en el vino en un 81-96%, de lo contrario el vino queda turbio.

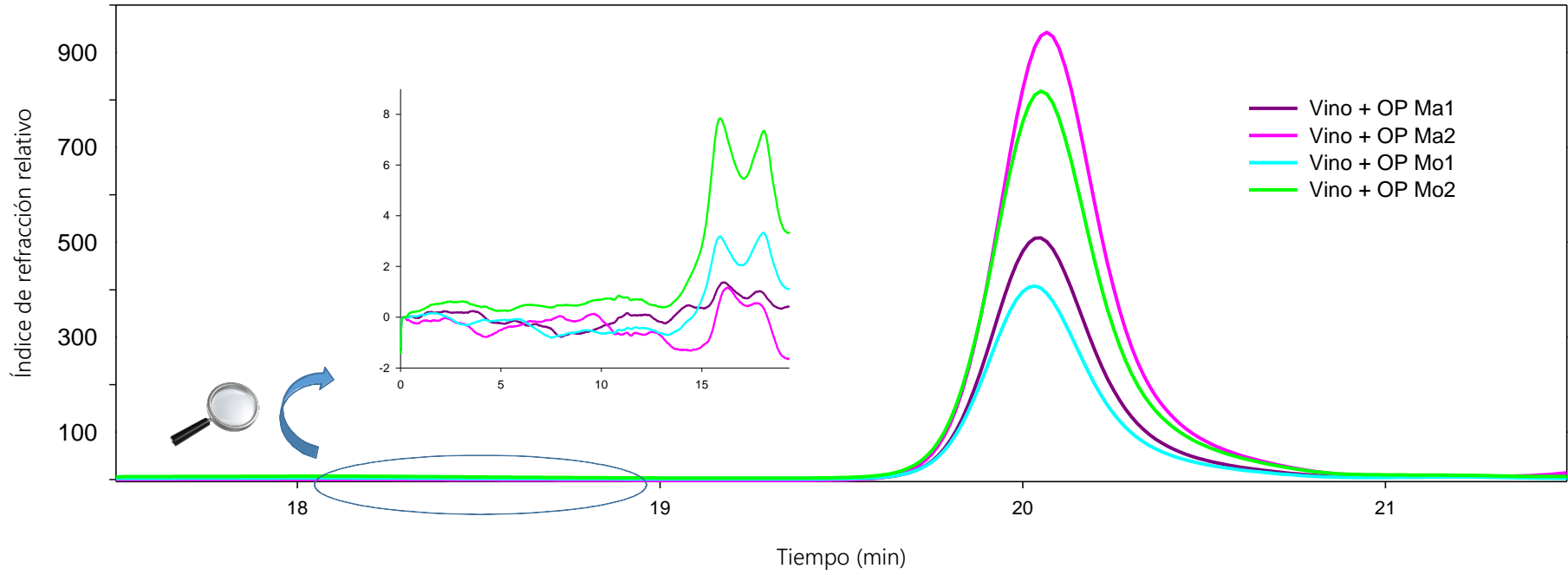
En conjunto se observa que, después de tres días de contacto, el efecto de los OP de Macabeo es mayor al aplicar la dosis de 8 mg/mL, mientras que los OP de Monastrell no parecen mostrar una dependencia de la dosis, pues no hay diferencias significativas en los parámetros estudiados al aplicar la dosis más baja, 4 mg/mL o la más alta, 8 mg/mL. La diferencia entre la adición al vino de los OP de una variedad u otra, se puede experimentar en que los OP de Macabeo reducen de una manera muy importante la turbidez, pues los OP de Monastrell enturbian el vino, y producen una disminución del color un poco mayor.

4.6.3.2 Capacidad de las paredes de ceder polisacáridos al vino

La figura 4.6.2 muestra la distribución del peso molecular de los polisacáridos liberados por los orujos en un vino modelo después de 3 días de contacto, pues se consideró que era tiempo suficiente para que hubiera difusión de estos desde los orujos al vino modelo utilizado.

Con los OP de Monastrell se liberan las mayores cantidades de las dos primeras fracciones, mientras que los de Macabeo liberan un mayor contenido de polisacáridos correspondientes a la fracción III. Además, para ambas variedades, la cantidad de polisacáridos liberados se incrementa con el aumento de la dosis. [Apolinar-Valiente et al. \(2014\)](#), observaron como un vino Monastrell control frente a vinos de CS y Syrah mostraban una mayor cantidad de polisacáridos de alto peso molecular, por lo que al igual que sucede en esta experiencia, la variedad Monastrell puede destacar por ceder este tipo de polisacáridos, y por tanto los OP de esta variedad también. Las diferencias encontradas en la cesión de polisacáridos de la última fracción entre los OP de ambas variedades puede ser debido al mayor contenido de ácidos urónicos presentados por los OP de Macabeo frente a los de Monastrell, como se reflejó en los datos de su composición (tabla 4.5.1), pues eso indica que los orujos de la variedad Macabeo tienen mayor cantidad de polisacáridos pectídicos y polisacáridos ricos en galactosa, como los galacturónicos y ramnogalacturónicos, todos ellos de bajo peso molecular ([Apolinar-Valiente et al., 2014](#)). Este fenómeno también se observó en capítulos anteriores donde los OP de Macabeo ceden mayor cantidad de esta fracción de polisacáridos que los OP de Monastrell. Una cantidad mayor de la tercera fracción de polisacáridos refleja más facilidad de degradarse la pared durante la vinificación, por lo podría relacionarse con un material celular más susceptible a ceder polisacáridos ([Apolinar-Valiente et al., 2014](#)). Todos los grupos de polisacáridos ocasionan un aporte de suavidad al vino que hace disminuir la astringencia, destacado las manoproteínas, por interactuar con los agregados de polifenoles y estabilizarlos estéricamente, y el RG-II, por ser uno de los polisacáridos complejos más ramificados, que crea una red estructural que provoca una disminución de esta característica del vino ([Quijada-Morín et al., 2014](#)).

Figura 4.6.2 Cromatogramas de SEC donde se refleja la distribución de pesos moleculares de los polisacáridos cedidos al vino por los orujos de las distintas variedades utilizadas. Abreviaciones: OP: orujos purificados, Ma: Macabeo, Mo: Monastrell, 1: dosis 4 mg/mL y 2: dosis de 8 mg/mL.



4.6.3.3 Efecto de los orujos sobre la composición aromática del vino

Los resultados del análisis semicuantitativo de los compuestos volátiles del vino rosado, al utilizar los diferentes agentes afinantes comerciales y los orujos purificados de Monastrell y Macabeo, durante un tiempo de contacto de tres días son mostrados en la figura 4.6.3 y en las tablas 4.6.2 y 4.6.3. Las familias de compuestos identificados son alcoholes, compuestos carbonílicos, ésteres, terpenos y norisoprenoides (estos últimos derivan de la degradación química o enzimática de los carotenoides de la uva), y ácidos. El contenido total de los diferentes compuestos aromáticos disminuyen con la aplicación de los diferentes agentes afinantes, aunque solo se observan diferencias significativas con respecto al testigo con el uso de los orujos de Macabeo y Monastrell, y con bentonita. [Braga et al. \(2007\)](#), al igual que en este estudio, no observaron al usar una gelatina de 43,0 kDa un descenso en el aroma del vino en el análisis sensorial. También se observa que los OP de Monastrell producen una reducción más importante en el contenido de compuestos aromáticos que los de Macabeo. Posiblemente la presencia de OP en suspensión en el caso de Monastrell durante el tiempo de contacto con el vino, a diferencia de los de Macabeo que se depositan rápidamente en el fondo del recipiente, favorezca una mayor interacción que provoque el descenso de estos compuestos, aunque no hay que olvidar que este comportamiento también puede ser debido a diferencias a nivel de estructura entre ambas variedades.

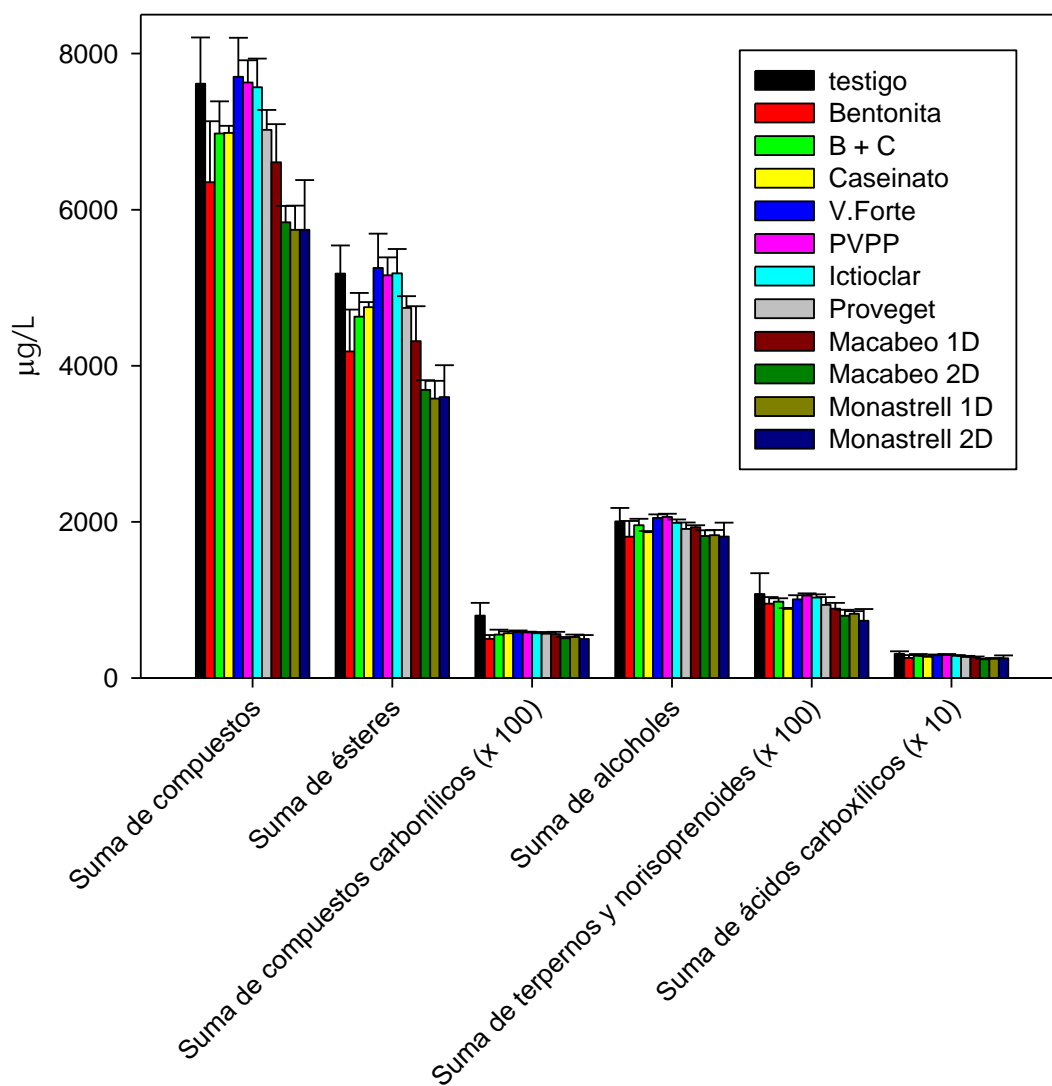
La fracción de alcoholes está principalmente compuesta por cuatro compuestos, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 2-feniletanol y 1-hexanol, compuesto que aparece por la oxidación del ácido linolénico después del prensado en ausencia de oxígeno. En menor proporción, pero que destaca por estar también en una cantidad importante, encontramos el 3-metiltio-1-propanol, un compuesto azufrado derivado de las levaduras. Las cantidades de los compuestos principales se ven reducidas con el uso de los afinantes comerciales, sobre todo con bentonita, y los OP de Macabeo, en especial con la dosis más alta, y con los OP de Monastrell a ambas dosis. El compuesto azufrado, presente en cantidades importantes, 3-metiltio-1-propanol, puede dar lugar a defectos organolépticos pues su aroma es a coliflor y papata cruda, pero también puede facilitar, junto con la adición de otros compuestos aromáticos al vino, la intensificación de notas "tostadas" y "afrutadas", y disminuir las notas a "piracina" y "eucalipto". Este ve reducido con los OP de Macabeo y Monastrell en un 43% y con la dosis más alta de los OP de Monastrell en un 50%, con lo cual, los OP a la dosis más alta podrían jugar un papel importante a la hora de retirar precursores o defectos organolépticos del vino, pero a la misma vez se reduce esa capacidad de este compuesto por aumentar ciertas notas aromáticas positivas para el vino, por lo que la dosis más baja sería más adecuada para que la reducción del 3-metiltio-1-propanol fuese menor. La concentración total de alcoholes experimenta su mayor disminución con bentonita y los OP de Monastrell y Macabeo, sobre todo al incrementar la

dos. Otros clarificantes como V.Forte y PVPP no producen cambios importantes en la concentración total de estos compuestos. Algunos autores como [Lisanti et al. \(2017\)](#), indican que los alcoholes son poco hidrofóbicos, y de ahí que no varíen mucho sus cantidades con el uso de PVPP.

Solo tres compuestos carbonílicos han sido identificados en el vino rosado, 2-nonanona, γ -butirolactona y n-amilbutirolactona. Los tres compuestos disminuyen, en mayor o menor medida, con los agentes afinantes, pero sobre todo con bentonita y la dosis más alta de los OP de Monastrell, al igual que en la suma total de estos compuestos. La 2-nonanona disminuye también con la dosis más alta de los OP de Macabeo y Monastrell, por lo que este compuesto es sensible cuando se emplea un mayor contenido de estos orujos. La disminución de los compuestos carbonílicos, sobre todo de γ -lactonas, es importante puesto que estas tienen un efecto negativo sobre la calidad de los vinos si se encuentran en niveles elevados, aunque eso depende del balance general de los aromas y de la diferencia de volatilidad, muchas veces causada por la matriz del vino ([San Juan et al., 2012](#)).

Los ésteres son derivados de las levaduras durante la fermentación alcohólica, y los que proporcionan un olor afrutado en los vinos jóvenes ([Lisanti et al., 2017](#)). En el vino rosado estudiado, siete compuestos de tipo éster destacan en la composición de esta familia de compuestos: acetato de 3-metil-1-butanol, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, nonanoato de metilo, decanoato de etilo, 9-decenoato de etilo y dodecanoato de etilo. El uso de todos los afinantes tiene efectos sobre cada uno de los ésteres detectados, en la mayoría de las aplicaciones se observan reducciones significativas de las proporciones con respecto al testigo, en mayor o menor medida. En ocasiones, el uso de afinantes incrementa algún compuesto, sin ser significativa la diferencia con respecto al vino testigo, sobre todo con el empleo de PVPP y la acción conjunta de bentonita y caseinato, sin embargo, con los orujos de ambas variedades no se elevan las cantidades de estos compuestos. [Parish et al. \(2016\)](#), también observaron incrementos en algunos esterres etílicos al usar una mezcla de bentonita, PVPP y proteína del pescado, en este caso lctioclar. Los OP de Macabeo y Monastrell son los afinantes que más reducen las fracciones de los compuestos estudiados, siendo mayor cuando se emplea la dosis más alta para ambas variedades, e incluso el efecto que provocan en la mayoría de las ocasiones es similar al de la bentonita. Contrariamente, [Burín et al. \(2016\)](#) observaron que bentonita no disminuye mucho la familia de los ésteres etílicos al aplicarla en un vino blanco antes de fermentación. En el balance total de ésteres, los OP de ambas variedades son los que mayor reducción ocasionan, siendo la variedad Macabeo y a la dosis más alta la más afín a estos compuestos, puesto que con una dosis inferior (4 mg/mL), el efecto es similar al provocado por el uso conjunto de bentonita y caseinato. La disminución en exceso de los ésteres del vino es perjudicial para su calidad, algo que puede resultar negativo para el uso de los OP, pues presentan una mayor afinidad por estos compuestos debido a su carácter hidrofóbico ([Lisanti et al. 2017](#)), causando disminuciones del 30%.

Figura 4.6.3 Efecto de los diferentes agentes afinantes sobre la composición aromática del vino. Abreviaciones: B: bentonita, C: caseinato, OP: orujos purificados, Ma: Macabeo, Mo: Monastrell, 1: dosis de 4 mg/mL y 2: dosis de 8 mg/mL.



En el vino estudiado han sido identificados siete tipos de compuestos pertenecientes a la familia de terpenos y norisoprenoides, estos al igual que los ésteres se caracterizan por tener un carácter hidrofóbico. Generalmente tienen notas florales, a excepción de la β -damascenona que tiene una connotación importante por dar notas frutales, es una de las fracciones aromáticas más interesante en el vino (Lisanti et al., 2017). Bentonita se caracteriza por disminuir mucho esta fracción, e inclusive la aplicación de bentonita ha eliminado la presencia de algunos terpenos, como el geraniol, cuando se usa para afinar mostos (Burin et al., 2016), no coincidiendo con los resultados mostrados en este estudio. PVPP, al igual que comprobaron Lisanti et al. (2017), no disminuye significativamente los terpenos y norisoprenoides. En el balance total, la mayor disminución de esta fracción es producida con los OP aplicados a la dosis más alta de ambas variedades, mientras que el efecto con una dosis inferior y para ambas variedades, es comparable con el uso de caseinato y Proveget, mientras que el resto de los afinantes disminuyen de forma poco significativa esta fracción con respecto al vino testigo. Los porcentajes de reducción provocados por los OP a la dosis más alta son de un 26,3% para la variedad Macabeo, y un 32,0% para Monastrell, mientras que con la dosis más baja son del 17,6% y 23,6% respectivamente, valores a tener en cuenta, ya que si los orujos purificados son capaces de actuar sobre la compuestos aromáticos como otros afinantes comerciales que se utilizan normalmente, su uso como agentes afinantes podría revalorizarse. También es importante destacar que la β -damascenona, con aromas a manzana, rosa y miel, y cuya presencia se relaciona con vinos de calidad (Wang et al., 2016b), no desciende en exceso al aplicar los orujos purificados, así, este agente afinante, a excepción de los de la variedad Monastrell usada a la dosis más alta, incrementa o mantiene la cantidad de β -damascenona.

El ácido acético, el isobutírico, el metil-decanoico, el ácido octanoico y el decenoico son los ácidos mayoritarios que comprenden esta fracción. El empleo de los OP de Macabeo con la dosis más alta y los de Monastrell para ambas dosis, junto con bentonita producen el mayor descenso de estos compuestos. Lambri et al. (2010) experimentaron grandes reducciones del ácido octanoico al usar distintos tipos de bentonita, la disminución de este compuesto es importante pues tiene un olor a mantequilla y almendra que puede afectar a la calidad del vino, en este caso, con los OP se reduce su contenido alrededor de un 15%. En el balance total de ácidos, a excepción de los orujos purificados, los afinantes comerciales se comportan de una manera similar a lo que experimentan con los alcoholes.

Tabla 4.6.2 Efecto de los agentes afinantes y los OP de Macabeo y Monastrell sobre las fracciones aromáticas de alcoholes, compuestos carbonílicos y ácidos (µg/L).

Compuestos (µg/L)	TRATAMIENTOS											
	Vino TESTIGO	BENTONITA	B + C	CASEINATO	VFORTE	PVPP	ICTIOCLAR	PROVEGET	OP Ma1	OP Ma2	OP Mo1	OP Mo2
ALCOHOLES												
1-propanol	9,73 e	7,72 b	9,00 cde	8,86 cd	9,13 cde	9,60 de	8,67 c	8,38 bc	8,35 bc	7,76 b	7,82 b	6,81 a
2-metil-1-propanol	91,64 de	79,21 b	88,17 cde	85,28 bcde	91,64 de	93,36 e	87,95 bcde	84,50 bcde	84,35 bcd	79,50 bc	79,45 bc	67,91 a
1-butanol	3,20 d	1,64 a	2,28 c	2,37 c	2,07 bc	2,06 bc	2,04 bc	1,77 ab	1,81 ab	1,57 a	1,61 a	1,55 a
3-metil-1-butanol	849,69 de	760,27 ab	825,46 cde	792,18 bcd	864,96 e	865,62 e	833,82 de	802,91 bcde	809,12 bcde	766,07 abc	763,71 abc	717,10 a
4-metilpentanol	2,93 c	2,73 bc	2,85 bc	2,74 bc	2,94 c	2,89 c	2,81 bc	2,73 bc	2,77 bc	2,63 ab	2,64 ab	2,42 a
3-metil-1-pentanol	6,84 e	6,25 bcd	6,58 cde	6,31 bcde	6,78 de	6,63 de	6,47 bcde	6,30 bcde	6,36 bcde	6,02 ab	6,04 abc	5,53 a
1-hexanol	64,58 f	56,05 abc	61,02 def	58,84 bcde	62,51 ef	60,44 cdef	59,42 cde	57,17 bcd	57,56 bcd	54,24 ab	54,32 ab	51,73 a
1-octanol	2,60 c	2,41 bc	2,43 bc	2,35 ab	2,42 bc	2,36 ab	2,34 ab	2,27 ab	2,32 ab	2,19 a	2,23 ab	2,35 ab
3-metil-1-propanol	29,09 i	16,21 abc	22,89 h	23,99 h	22,15 gh	20,04 ef	20,60 fg	18,37 de	18,02 cd	16,54 bcd	16,11 ab	14,46 a
1-decanol	4,43 e	3,68 cd	3,87 cd	3,66 bc	4,08 cde	4,21 de	4,20 de	3,69 cd	3,15 b	2,35 a	2,34 a	2,08 a
2-feniletanol	930,30 abc	869,00 a	918,57 abc	868,85 a	964,14 bc	971,20 c	945,88 abc	910,44 abc	922,20 abc	871,79 ab	885,56 abc	933,01 abc
1-dodecanol	1,50 e	1,05 d	0,83 abcd	0,96 cd	0,76 abc	0,80 abcd	0,76 abc	0,65 ab	0,67 ab	0,66 ab	0,62 a	0,89 bcd
m-cresol	5,61 abcd	0,32 a	7,35 abcde	4,43 abcd	12,98 de	15,68 e	9,41 bcde	6,03 abcd	10,06 cde	5,81 abcd	3,13 abc	1,09 ab
2.4-bis(1.1-dimetil) fenol	4,85 ab	4,11 ab	6,42 abc	7,31 bc	5,33 ab	9,02 c	5,14 ab	5,52 ab	4,11 ab	3,39 a	3,51 a	5,31 ab
Suma de alcoholes	2007,01 cd	1810,13 a	1957,72 abc	1868,13 ab	2051,89 c	2063,92 c	1989,52 bc	1910,73 abc	1930,87 abc	1820,51 a	1829,08 a	1812,25 a
COMPUESTOS CARBONÍLICOS												
2-nonanona	3,33 e	2,71 abc	2,91 bcd	2,97 cd	3,18 de	3,10 de	3,01 cde	3,05 de	2,94 cd	2,53 a	2,59 ab	2,48 a
gamma butirrolactona	2,58 b	0,86 a	0,86 a	1,09 a	0,86 a	0,87 a	0,84 a	0,85 a	0,87 a	0,84 a	0,93 a	0,86 a
n-amilbutirolactona	2,09 c	1,44 a	1,80 bc	1,67 ab	1,85 bc	1,87 bc	1,88 bc	1,78 b	1,82 bc	1,71 ab	1,72 ab	1,66 ab
Suma de compuestos carbonílicos	8,00 c	5,01 a	5,57 ab	5,73 ab	5,89 b	5,83 ab	5,73 ab	5,68 ab	5,63 ab	5,08 ab	5,24 ab	5,00 a
Suma de compuestos carbonílicos (x 10)	80,00 c	50,14 a	55,70 ab	57,32 ab	58,86 b	58,34 ab	57,33 ab	56,77 ab	56,26 ab	50,84 ab	52,42 ab	50,01 a
ÁCIDOS												
ácido acético	56,86 d	41,86 a	51,40 cd	50,98 bcd	48,06 abc	50,27 bcd	44,38 ab	45,07 abc	46,64 abc	43,23 a	44,14 ab	45,80 abc
ácido isobutírico	10,91 c	9,68 ab	10,28 bc	10,16 bc	10,19 bc	10,23 bc	9,59 ab	9,60 ab	9,86 abc	9,54 ab	9,56 ab	8,94 a
ácido metil-decanoico	8,15 f	5,28 bc	6,36 cd	6,83 de	7,68 ef	7,15 def	7,72 ef	6,23 cd	4,72 b	3,36 a	3,12 a	2,95 a
ácido 2-hexenoico	1,96 abc	2,01 bc	2,01 bc	1,89 abc	1,98 bc	2,02 e	1,94 abc	1,83 ab	1,90 abc	1,79 a	1,82 ab	1,82 ab
ácido octanoico	209,97 e	180,74 abc	197,05 bcde	183,54 abcd	202,50 cde	204,17 de	201,83 cde	189,15 abcde	186,31 abcd	169,13 a	173,62 a	178,53 ab
ácido nonanoico	3,72 b	2,43 a	2,34 a	2,53 a	2,62 a	2,77 ab	2,70 a	2,45 a	2,50 a	2,36 a	2,15 a	2,34 a
ácido decenoico	14,08 def	12,58 bc	14,29 cde	13,05 bc	15,08 def	15,97 f	15,61 ef	13,68 bcd	12,43 b	9,79 a	10,25 a	9,97 a
ácido benzoico	1,93 c	1,00 ab	1,06 ab	1,21 b	0,97 ab	0,98 ab	0,92 ab	0,89 ab	0,91 ab	0,91 ab	0,94 ab	0,66 a
ácido dodecanoico	1,55 de	1,37 cde	1,43 cde	1,40 cde	1,55 de	1,72 e	1,54 de	1,22 bcd	1,04 abc	0,82 ab	0,67 a	0,69 a
ácido 2,4,6-trimetil-benzoico	0,80 b	0,11 a	0,21 a	0,27 a	0,18 a	0,14 a	0,14 a	0,11 a	0,08 a	0,09 a	0,09 a	0,13 a
Suma de ácidos	309,93 e	257,05 abc	286,43 de	271,86 cd	290,80 de	295,43 de	286,38 de	270,23 cd	266,38 bc	241,01 a	246,36 ab	251,82 ab

Abreviaciones: B: bentonita, C: caseinato, OP: orujos purificados, Ma: Macabeo, Mo: Monastrell, 1: dosis 4 mg/mL y 2: dosis de 8 mg/mL. Letras diferentes en la misma columna y para cada familia de compuestos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con el test LSD.

Tabla 4.6.3 Efecto de los agentes afinantes y los OP de Macabeo y Monastrell sobre las fracciones aromáticas de ésteres, terpenos y norisoprenoides y total (µg/L).

Compuestos (µg/L)	TRATAMIENTOS											
	VinoTESTIGO	BENTONITA	B + C	CASEINATO	VFORTE	PVPP	ICTIOCLAR	PROVEGET	OP Ma1	OP Ma2	OP Mo1	OP Mo2
ÉSTERES												
Butanoato de etilo	21,85 cd	19,07 ab	19,40 bc	20,73 bcd	22,11 d	22,13 d	20,73 bcd	20,30 bcd	19,89 bcd	18,25 ab	18,28 ab	16,76 a
2-metil butanoato de etilo	42,39 d	17,40 a	53,89 e	39,45 d	21,89 c	21,71 c	20,75 bc	19,39 abc	19,79 abc	18,89 abc	18,20 ab	19,82 abc
3-metil-butanoato de etilo	3,28 bcd	3,09 ab	3,07 ab	3,18 bc	3,57 cde	3,81 e	3,49 bcde	3,62 cde	3,64 de	3,40 bcde	3,55 cde	2,71 a
acetato de 3-metil-1-butanol	312,61 d	284,24 abcd	278,80 abc	290,26 abcd	311,10 cd	313,61 d	296,41 bcd	289,17 abcd	285,52 abcd	261,72 a	264,23 ab	269,76 ab
pentanoato de etilo	6,09 b	6,48 b	4,79 b	7,41 b	7,07 b	7,74 b	6,66 b	6,71 b	4,85 b	6,85 b	6,81 b	0,62 a
propionato de pentilo	4,25 d	3,84 bcd	3,64 bcd	4,01 bcd	4,12 cd	4,08 cd	3,76 bcd	3,82 bcd	3,69 bcd	3,23 bc	3,30 abc	2,57 a
hexanoato de etilo	430,51 e	383,18 abcd	387,45 abcd	403,25 cde	430,95 e	431,31 e	411,77 de	399,74 bcde	394,88 abcde	357,30 a	361,31 ab	367,79 abc
acetato de hexilo	34,38 e	30,34 cd	30,22 bcd	32,42 de	34,13 e	33,61 de	32,22 de	31,08 de	30,00 bcd	25,87 a	26,59 abc	26,46 ab
3-hexenoato de etilo	1,13 c	1,05 abc	1,06 abc	1,07 bc	1,15 c	1,14 c	1,10 c	1,08 bc	1,07 bc	0,97 ab	0,98 ab	0,96 a
heptanoato de etilo	6,43 d	4,58 a	5,37 b	5,95 bcd	6,20 cd	6,12 cd	5,94 bcd	5,74 bc	5,41 b	4,57 a	4,64 a	4,46 a
2-hexenoato de etilo	18,40 de	17,34 d	17,42 de	17,75 de	19,06 e	18,82 de	18,15 de	17,57 de	17,21 cd	15,37 b	11,45 a	15,57 bc
octanoato de etilo	1645,25 e	1204,02 ab	1398,85 c	1481,59 de	1612,18 ef	1618,10 de	1598,45 de	1475,45 cd	1357,09 bc	1137,35 a	1146,00 a	1110,78 a
octanoato de 3-metilbutilo	35,00 fg	24,86 bc	29,47 cde	30,28 defg	32,44 efg	29,69 cdef	30,03 cdef	25,77 bcd	22,09 ab	17,22 a	17,04 a	17,84 a
nonanoato de metilo	651,80 abc	636,19 abc	609,21 ab	629,47 abc	654,81 abc	682,48 c	670,12 c	665,63 bc	666,45 bc	641,93 abc	604,85 a	673,36 c
nonanoato de etilo	23,39 de	15,52 ab	21,44 cde	21,64 cde	24,76 e	23,72 e	24,51 e	22,47 cde	20,10 cd	18,94 bc	16,38 ab	13,61 a
metilpropanoato de etilo	1,10 e	0,74 ab	0,91 d	0,91 d	0,89 d	0,85 cd	0,84 cd	0,79 bc	0,79 bc	0,74 ab	0,73 ab	0,69 a
decanoato de etilo	1358,68 e	1002,10 bc	1169,02 cd	1206,40 de	1354,00 e	1287,24 de	1356,69 e	1163,06 cd	944,66 b	731,82 a	680,23 a	656,12 a
E-4 decenoato de etilo	0,95 d	0,11 ab	0,80 d	0,71 cd	0,42 cd	0,18 ab	0,21 ab	0,14 ab	0,16 ab	0,15 ab	0,11 ab	0,02 a
9-decenoato de etilo	345,41 d	276,30 bc	318,91 d	316,79 cd	354,13 d	349,12 d	355,53 d	318,64 d	271,94 b	219,17 a	203,22 a	198,65 a
fenilacetato de etilo	10,10 abcde	9,47 a	10,69 cde	9,87 abc	10,88 e	10,85 e	10,81 de	10,38 bcde	10,48 bcde	9,77 ab	9,96 abcde	9,47 a
4-OH-butanoato de etilo	2,81 e	2,06 a	2,71 e	2,65 de	2,64 de	2,62 de	2,54 cde	2,39 bcd	2,29 abc	2,12 ab	2,27 abc	2,11 ab
acetato de 2- feniletilo	85,51 abcd	83,15 abc	88,68 bcd	82,52 ab	91,81 d	90,70 bcd	90,90 cd	85,45 abcd	85,43 abcd	78,48 a	79,21 a	83,62 abcd
dodecanoato de etilo	114,12 de	88,28 cd	111,26 de	111,74 de	135,18 e	108,72 de	136,51 e	97,24 cd	75,81 bc	53,46 ab	41,46 a	46,65 ab
2-metil-propanoato de 2,2-dimetil-1-(1-metiletil)-3-(1-metiletioxicarbonilo)	2,45 c	1,95 abc	1,64 abc	2,00 abc	2,32 bc	1,14 abc	1,54 abc	0,90 a	1,83 abc	1,85 abc	1,56 abc	1,81 abc
tetradecenoato de etilo	4,00 a	5,01 ab	9,03 e	8,02 de	9,08 e	9,25 e	8,05 de	6,97 cd	6,72 bcd	7,13 cd	4,52 a	5,58 abc
2-etilbutirato de 2-feniletilo	6,97 a	9,55 bc	9,73 bcd	8,06 ab	11,60 de	13,19 e	12,77 e	11,35 cde	10,31 cd	7,87 ab	6,21 a	6,51 a
hexadecanoato de etilo	5,29 a	12,31 de	7,61 abc	5,96 ab	11,00 cde	14,14 e	11,55 de	11,76 de	12,56 de	14,34 e	9,30 bcd	12,76 de
9-hexadecanoato de etilo	2,14 a	38,22 bcd	28,03 bc	1,88 a	79,11 e	48,09 d	47,41 d	41,28 cd	36,34 bcd	28,30 bc	27,97 bc	26,69 b
succinato de etilo	5,50 a	4,44 a	5,62 a	4,78 a	4,55 a	5,62 a	4,82 a	4,55 a	4,78 a	4,57 a	5,00 a	5,26 a
Suma de ésteres	5181,80 ef	4184,87 bc	4628,75 cd	4750,74 def	5253,13 f	5159,77 ef	5184,24 ef	4742,40 def	4315,78 cd	3691,63 ab	3575,37 a	3599,01
TERPENOS Y NORISOPRENOIDES												
linalool	5,24 f	3,44 ab	4,02 c	4,43 bc	4,97 e	4,52 d	4,86 d	4,21 d	3,33 d	2,58 d	2,40 d	2,24 a
alfa-terpineno	1,91 ab	1,80 a	2,14 bc	1,85 a	2,34 cd	2,61 ef	2,47 de	2,62 ef	2,72 f	2,50 def	2,73 f	1,74 a
beta-damascenona	2,12 bc	2,21 cde	2,12 bc	1,87 ab	2,25 cde	2,42 de	2,38 cde	2,45 e	2,48 cd	2,25 cde	1,75 a	1,75 a
(+)-citronelol	84,27 c	71,45 abc	74,59 bc	67,21 ab	75,60 bc	79,09 bc	76,93 bc	71,42 abc	69,73 ab	59,05 a	58,51 a	58,43 a
geraniol	1,75 f	1,65 ef	1,54 def	1,45 def	1,45 def	1,39 bcd	1,40 bcde	1,21 abc	1,20 ab	1,06 a	1,02 a	1,40 bcd
trans - nerolidol	10,21 bc	12,61 de	12,02 cde	10,27 bc	12,67 e	13,74 e	13,57 e	10,63 cd	8,53 b	6,03 a	5,18 a	4,52 a
farnesol	2,22 a	2,08 b	1,41 a	1,50 a	1,53 a	1,90 a	1,58 a	1,12 a	0,77 a	6,32 a	10,25 c	3,14 ab
Suma de terpenos	107,72 f	95,23 bcdef	97,84 cdef	88,63 abcd	100,80 def	105,67 ef	103,19 def	93,61 bcde	88,74 abcd	79,73 ab	82,34 abc	73,21 a
SUMA total	7614,46 def	6352,29 ab	6976,30 bcd	6985,09 bcd	7702,49 f	7630,62 ef	7569,06 def	7022,64 cde	6607,40 bc	5837,96 a	5742,60 a	5741,30 a

Abreviaciones: B: bentonita, C: caseinato, OP: orujos purificados, Ma: Macabeo, Mo: Monastrell, 1: dosis 4 mg/mL y 2: dosis de 8 mg/mL. Letras diferentes en la misma columna y para cada familia de compuestos indican diferencias significativas (p<0,05) de acuerdo con el test LSD.

4.6.4 Conclusiones

Con los resultados obtenidos se puede concluir que la adición de los OP al vino rosado como agentes afinantes es comparable al de los afinantes comerciales utilizados habitualmente, a excepción del efecto conjunto provocado por bentonita y caseinato que es más acusado.

A los 3 días de contacto se logró un descenso ligero de taninos, antocianos y ácidos hidroxicinámicos, estos últimos compuestos pueden dar lugar a la formación de quinonas y consecuente pardeamiento del vino. La cesión de polisacáridos y el comportamiento de los compuestos aromáticos durante el proceso de afinamiento también fue estudiado a los tres días, observándose un aporte de polisacáridos de bajo peso molecular por parte de los orujos purificados de ambas variedades, aunque hay mayor cesión con los de la variedad Macabeo, pero también se ha observado una reducción de compuestos volátiles del vino principalmente con los orujos purificados de Monastrell.

Únicamente con los OP de Macabeo se observó un descenso considerable de la turbidez del vino, igualándose su efecto al tratamiento realizado con Ictioclar, que es uno de los afinantes comerciales que más grado de limpidez ocasionan en el vino, mientras los OP de Monastrell enturbiaron el vino. Dado que también los OP de Macabeo son los que ceden más polisacáridos al medio y los que retienen menos compuestos aromáticos, parece más ventajoso su uso que los orujos de Monastrell en el caso de los vinos rosados.

La dosis a utilizar de OP no tiene un efecto marcado sobre los parámetros espectrofotométricos estudiados pero sí sobre los polisacáridos cedidos al medio y la retención de compuestos olíferos del vino, siendo estos fenómenos más acusados cuando se utiliza la dosis más alta.

Por todo ello, serían los OP de Macabeo, a la dosis más alta, la elección más deseable, ya que disminuyen la turbidez, ceden polisacáridos de bajo peso molecular, que podrían ayudar a estabilizar el vino y darle más cuerpo y untuosidad, junto con una menor retención de los compuestos aromáticos, para mantener las características olíferas del vino rosado tras su afinamiento.



5. CONCLUSIONES

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar el uso de los orujos de la uva como agente afinante del vino, comparando su acción con la de algunos agentes comerciales normalmente utilizados en vinificación. En un primer ensayo, se utilizaron paredes celulares de orujo de uva, aisladas y purificadas encontrando que:

- Las paredes celulares purificadas extraídas de orujos obtenidos tras la etapa de maceración fermentativa de una vinificación en tinto tienen una alta capacidad de retener compuestos fenólicos y las condiciones de la vinificación de la cual se obtuvieron no parecen jugar un papel determinante. De las dos variedades ensayadas, las paredes celulares de Monastrell retuvieron más compuestos fenólicos que las de Cabernet Sauvignon y ambas más que los compuestos afinantes comerciales normalmente utilizados.

Puesto que la purificación de las paredes celulares de orujos resulta ser un proceso laborioso, se probó un proceso más sencillo, purificando directamente los orujos para su uso en el vino, realizando la purificación con etanol y acetona. Los resultados mostraron que:

- Al aplicar los orujos purificados de Monastrell a cuatro vinos tintos de diferente perfil fenólico se observó que en todos ellos, al comparar su efecto con agentes afinantes comerciales, los orujos purificados eran los que mayor reducción de taninos y antocianos provocaban, siendo entre los afinantes comerciales bentonita y caseinato los más similares a la forma de actuación de los orujos. Los efectos se ven aumentados con la aplicación de orujos purificados con acetona. Los orujos mostraron no ser selectivos con respecto al tamaño de tanino con el que interaccionan.
- Los orujos purificados también se mostraron efectivos en la reducción de ocratoxina A, histamina y los minerales calcio y potasio, una efectividad muy superior a los agentes comerciales.
- En el análisis cuantitativo de aromas se observó que estos orujos, a la dosis utilizada, provocan una reducción de los compuestos aromáticos del vino tinto, reducción superior en algunos casos a la observada por los agentes afinantes comerciales con los que se compararon, aunque las notas florales y afrutadas podrían verse incrementadas, compensando el descenso de otros compuestos.

Conclusiones

- La purificación de los orujos con etanol se considera más adecuada por tratarse de un producto de uso alimentario y porque la retención de compuestos fenólicos y aromáticos puede ser excesiva cuando se usan orujos purificados con acetona.

Los descensos de color y de compuestos fenólicos encontrados en los vinos han sido excesivos en algunos casos. Por ello, se procedió a optimizar la dosis y el tiempo de contacto utilizando orujos purificados con etanol, concluyendo que:

- Una dosis de 6 mg/mL y 5 días de contacto podría ser suficiente para una reducción significativa de taninos y antocianos, lo que reduciría su astringencia sin una pérdida significativa de color. Además, los orujos son capaces de ceder polisacáridos al medio, pudiendo aumentar la redondez y untuosidad del mismo, y disminuyendo la sensación de astringencia.

Una vez optimizada la dosis y el tiempo de contacto se procedió a ensayar sobre un vino tinto orujos de diferentes variedades purificados con etanol, concluyendo que:

- Los orujos purificados de las tres variedades tintas, Cabernet Sauvignon, Syrah y Monastrell, tienen efectos similares sobre el color, los antocianos y los taninos en el vino tinto, aunque los de la variedad Monastrell presentan menor interacción por aquellos taninos más sencillos.
- Los orujos de todas las variedades estudiadas realizan aportes beneficiosos de polisacáridos al vino.
- Los orujos de la variedad blanca Macabeo destaca con respecto a las variedades tintas por ser los que mayor descenso de la turbidez provocaron, sin embargo, los efectos sobre el color, los antocianos y taninos, son menores.
- Desde el punto de vista sensorial, el afinado de un vino tinto con orujos purificados tuvo un resultado positivo en la calidad e intensidad del gusto y el aroma, excepto cuando se utilizaron los de la variedad Cabernet Sauvignon, ya que en este caso el vino fue peor valorado.

Por último, también se ensayaron los orujos en un vino rosado, utilizando orujos de la variedad Monastrell y Macabeo, a dos dosis diferentes, concluyendo que:

- Los orujos de la variedad Macabeo, a una dosis de 8 mg/L, son los que mejor resultado han dado para afinar un vino rosado, pues logran un descenso importante en la turbidez y en la cantidad de taninos, antocianos y ácidos hidroxicinámicos. Estos aportan al final una cantidad benéfica de polisacáridos y no reducen demasiado los compuestos aromáticos. Además, su uso es comparable al de los agentes afinantes comerciales utilizados habitualmente en el vino rosado.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Alcalde-Eon, C., Boido, E., Carrau, F. M., Dellacasa, E., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Different formation of anthocyanin-derived pigments in Tannat, Caladoc, Marselan, Marzemino and Cheveñasco monovarietal wines produced in Uruguay. *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*, 449-459.
- Amghouz, Z., Ancín-Azpilicueta, C., Burusco, K. K., Garcia, J. R., Khainakov, S. A., Luquin, A., Nieto, R., & Garrido, J. J. (2014). Biogenic amines in wine: individual and competitive adsorption on a modified zirconium phosphate. *Microporous and Mesoporous Materials*, *197*, 130-139.
- Andujar-Ortiz, I., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., & Pozo-Bayón, M. A. (2009). Analytical performance of three commonly used extraction methods for the gas chromatography-mass spectrometry analysis of wine volatile compounds. *Journal of Chromatography A*, *1216*, 7351-7357.
- Apolinar-Valiente, R., Gómez-Plaza, E., Terrier, N., Doco, T., & Ros-García, J. M. (2017). Composition of cell walls from grape skin in *Vitis vinifera* intraspecific hybrids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(12), 4029-4035.
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Williams, P., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., & Doco, T. (2014). Effect of winemaking techniques on polysaccharide composition of Cabernet Sauvignon, Syrah and Monastrell red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *20*, 62-71.
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., & Ros-García, J. M. (2015a). Cell wall compounds of red grapes skins and their grape marcs from three different winemaking techniques. *Food Chemistry*, *187*, 89-97.
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., & Ros-García, J. (2015b). The composition of cell walls from grape marcs is affected by grape origin and enological technique. *Food Chemistry*, *167*, 370-377.
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., López-Roca, J. M., Gómez-Plaza, E., & Ros-García, J.M. (2010). Application and comparison of four selected procedures for the isolation of cell-wall material from the skin grapes cv. Monastrell. *Analytica Chimica Acta*, *660*, 206-210.
- Apolinar-Valiente, R., Williams, P., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., & Doco, T. (2013). Polysaccharide compositions of Monastrell red wines: effect of winemaking techniques and terroir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 2538-2547.

- Apolina-Valiente, R. (2012). *Pared celular de uva y polisacáridos de vinos de distinta procedencia, elaborados mediante tecnologías enzimáticas y de frío*. Tesis Doctoral: Universidad de Murcia.
- Arrieta, M. P., & Prats-Moya, M. S. (2012). Free amino acids and biogenic amines in Alicante Monastrell wines. *Food Chemistry*, *135*, 1511-1519.
- ASTM. (2004). Standard definitions of terms relating to sensory evaluation of materials and products. En: Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Bautista-Ortín, A. B., Busse-Valverde, N., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R., & Gómez-Plaza, E. (2014). Grape seed removal: effect on phenolics, chromatic and organoleptic characteristics of red wine. *International Journal of Food Science and Technology*, *49*, 34-41.
- Bautista-Ortín, A. B., Cano-Lechuga, M., Ruiz-García, Y., & Gómez-Plaza, E. (2014). Interactions between grape skin cell wall material and commercial enological tannins. Practical implications. *Food Chemistry*, *152*, 558-565.
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Hernández, A., Ruiz-García, Y., Gil-Muñoz, R., & Gómez-Plaza, E. (2016). Anthocyanins influence tannin-cell wall interactions. *Food Chemistry*, *206*, 239-248.
- Bautista-Ortín, A. B., Molero, N., Marín, F., Ruiz-García, Y., & Gómez-Plaza, E. (2015a). Reactivity of pure and commercial grape skin tannins with cell wall material. *European Food Research and Technology*, *240*, 645-654.
- Bautista-Ortín, A. B., Ruiz-García, Y., Marín, F., Molero, N., Apolinar-Valiente, R., & Gómez-Plaza, E. (2015b). Remarkable proanthocyanidin adsorption properties of Monastrell pomace cell wall material highlight its potential use as an alternative fining agent in red wine production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 620-633.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., & Lebrihi, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*, *97*, 1038-1044.
- Bidlack, J., Malone, M., & Benson, R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of Oklahoma Academy of Sciences*, *72*, 51-56.
- Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., Baltra-Brouma, K., Lymperopoulou, T., & Oreopoulou, V. (2015). Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage. *Food Chemistry*, *178*, 164-171.
- Bindon, K. A., & Kennedy, J. A. (2011). Ripening-Induced changes in grape skin proanthocyanidins modify their interaction with cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 2696-2707.

- Bindon, K. A., & Smith, P. A. (2013). Comparison of the affinity and selectivity of insoluble fibres and commercial proteins for wine proanthocyanidins. *Food Chemistry*, *136*, 917-928.
- Bindon, K. A., Bacic, A., & Kennedy, J. A. (2012). Tissue-specific and developmental modifications of grape cell walls influence the adsorption of proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(36), 9249-9260.
- Bindon, K. A., Smith, P. A., & Kennedy, J. A. (2010a). Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 1. Effect on proanthocyanidin composition and molecular mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 2520-2528.
- Bindon, K. A., Smith, P. A., Holt, H., & Kennedy, J. A. (2010b). Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 2. Implications for vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 10736-10746.
- Boido, E., Alcalde-Eon, C., Carrau, F., Dellacassa, E., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). The aging effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. Cv. Tannat wines. Contribution of the main pigment families to wine color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 6692-6704.
- Bornet, A., & Teissedre, P. L. (2008). Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *European Food Research and Technology*, *226*, 681-689.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254.
- Braga, A., Cosme, F., Ricardo-da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2007). Gelatine, casein and potassium caseinate as distinct wine fining agents: different effects on colour, phenolic compounds and sensory characteristics. *Journal International Sciences de la Vigne et du Vin*, *41*(4), 203-214.
- Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C., & Steinhart, H. (2005). Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Letters*, *46*(35), 5845-5850.
- Burin, V. M., Caliar, V., & Bordignon-Luiz, M. T. (2016). Nitrogen compounds in must and volatile profile of white wine: influence of clarification process before alcoholic fermentation. *Food Chemistry*, *202*, 417-425.
- Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R., & Bautista-Ortín, A. B. (2011). The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 5450-5455.

- Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R., & Fernández-Fernández, J.I., Bautista-Ortín, A.B. (2010). Effect of different enological practices on skin and seed proanthocyanidins in three varietal wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11333-11339.
- Cacho, J., Castells, J. E., Esteban, A., Laguna, B., & Sagristá, N. (1995). Iron, copper, and manganese influence on wine oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 380-384.
- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344, 1879-1900.
- Cai, Y., Gaffney, S. H., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1989). Carbohydrate-polyphenol complexation. En: R.W. Hemingway, et al. (Eds.). *Chemistry and significance of condensed tannins*, Plenum Press, Nueva York, pp. 307-332.
- Candi, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89, 417-422.
- Cano-López, M., Pardo-Minguez, F., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2006). Effect of microoxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 325-331.
- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3, 1-30.
- Castellari, M., Fabbri, S., Fabiani, A., Amati, A., & Galassi, S. (2000). Comparison of different immunoaffinity cleanup procedures for the high-performance liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in wines. *Journal of Chromatography A*, 888, 129-136.
- Castellari, M., Versari, A., Fabiani, A., Parpinello, G. P., & Galassi, S. (2001). Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3917-3921.
- Castillo-Sánchez, J. J., Mejuto, J. C., Garrido, J., & García-Falcón, S. (2006). Influence of wine-making protocol and fining agents on the evolution of the anthocyanin content, colour and general organoleptic quality of Vinhao wines. *Food Chemistry*, 97, 130-136.
- Castillo-Sanchez, J. X., Garcia-Falcon, M. S., Garrido, J., Martinez-Carballo, E., Martins-Dias, L. R., & Mejuto, X. C. (2008). Phenolic compounds and colour stability of Vinhao wines: influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chemistry*, 106, 18-26.

- Castro-López, L., Gómez-Plaza, E., Ortega-Regules, A., Lozada, D., & Bautista-Ortín, A. B. (2016). Role of cell wall deconstructing enzymes in the proanthocyanidin-cell wall adsorption-desorption phenomena. *Food Chemistry*, *196*, 526-532.
- Cayla, L., Cottureau, P., & Renard, R. (2002). Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V. standard. *Revue des Oenologues*, *193*, 84-87.
- Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T., & Gunata, Z. (2007). Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chemistry*, *100*, 22-30.
- Chatonnet, P., Boidron, J. N., & Pons, M. (1990). Élevages des vins rouges en fûts de chêne: évolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. *Sciences des Aliments*, *10*, 565-587.
- Chavez-Muñoz, M. (2012). Uso de virutas de roble como sistema alternativo al envejecimiento en barricas de vinos Sherry tipo oloroso. Tesis Doctoral: Universidad de Córdoba.
- Cheynier, V. (2003). El color de los vinos tintos. *Wine Internet Technical Journal*, *4*, 1-9.
- Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *Journal of Enology and Viticulture*, *57*(2), 298-305.
- Cheynier, V., Prieur, C., Guyot, S., Rigaud, J., & Moutounet, M. (1997). The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins. En: I. T. Watkins (ed.), *Wine nutritional and therapeutic benefits*, American Chemical Society Symposium Series, *661*, pp. 81-93.
- Chinnici, F., Sonni, F., Natali, N., Galassi, S., & Riponi, C. (2009). Colour features and pigment composition of Italian carbonic macerated red wines. *Food Chemistry*, *113*, 651-657.
- Chira, K., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2012). Cabernet Sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. *European Food Research and Technology*, *234*, 253-261.
- Clark, A. C., Wilkes, E. N., & Scollary, G. R. (2015). Chemistry of copper in white wine: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *21*, 339-350.
- Comménil, P., Brunet, L., & Audran, J. C. (1997). The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. *Journal of Experimental Botany*, *48*, 1599-1607.
- Cosgrove, D. J. (2001). Plant cell walls: wall-associated kinases and cell expansion. *Current Biology*, *14*(11), 558-559.

- Cosme, F., Capao, I., Filipe-Ribeiro, L., Bennett, R. N., & Mendes-Faia, A. (2012). Evaluating potential alternatives to potassium caseinate for white wine fining: effects on physicochemical and sensory characteristics. *Food Science and Technology*, *46*, 382-387.
- Cosme, F., Ricardo-da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2007). Protein fining agents: characterization and red wine fining assay. *Italian Journal of Food Science*, *19*, 39-56.
- Cosme, F., Ricardo-da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2009). Effect of various proteins on different molecular weight proanthocyanidin fractions of red wine during wine fining. *American Journal of Enology Viticulture*, *60*, 74-81.
- De Torres, C., Díaz-Maroto, M. C., Hermosín-Gutiérrez, I., & Pérez-Coello, M. S. (2010). Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin. *Analytica Chimica Acta*, *660*, 177-182.
- De Torres, C., Schumacher, R., Alañon, M. E., Pérez-Coello, M. S., & Díaz-Maroto, M. C. (2015). Freeze-dried grape skins by-products to enhance the quality of white wines from neutral grape varieties. *Food Research International*, *69*, 97-105.
- De Vries, J. A., Voragen, A. G., Rombouts, F. M., & Pilnik, W. (1981). Extraction and purification of pectins from alcohol insoluble solids from ripe and unripe apples. *Carbohydrate Polymers*, *1*, 117-127.
- Del Barrio-Galán, D. (2012). Crianza sobre lías y uso de preparados comerciales derivados de levadura en la calidad de vinos blancos y tintos. Tesis Doctoral: Universidad de Salamanca.
- Del Barrio-Galán, R., Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Guadalupe, Z., & Ayesterán, B. (2012). Polysaccharide characterization of commercial dry yeast preparations and their effect on white and red wine composition. *Food Science and Technology*, *48*, 215-223.
- Del Barrio-Galán, R., Sánchez-Iglesias, M., Ortega-Heras, M., González-Huerta, C., & Pérez-Magariño, S. (2010). Efecto de la aplicación de diferentes derivados de levadura comerciales sobre la calidad de vinos blancos. *Enovicultura*, *3*, 14-22.
- Dippong, T., & Mihali, C. (2016). Analysis of heavy metal content of different varieties of wine. *Scientific Bulletin of North University Center of Baia Mare Series D, Mining, Mineral Processing, Non-ferrous Metallurgy, Geology and Environmental Engineering*, *30*(1), 77-87.
- Doco, T., Patrick, V., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2003). Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees. *American Journal of Enology and Viticulture*, *54*, 150-157.

- Doco, T., Williams, P., & Cheynier, V. (2007). Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 6643-6649.
- Doco, T., Williams, P., Pauly, M., O'Neill, M. A., & Pellerin, P. (2003). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, *53*, 253-261.
- Doering, A., Lathe, R., & Persson, S. (2012). An update on xylan synthesis. *Molecular Plant*, *5*(4), 769-771.
- Dufour, C., & Bayonove, C. I. (1999). Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 671-677.
- Ertan-Anli, R., Vural, N., & Mustafa Bayram, M. (2011). Removal of ochratoxin A (OTA) from naturally contaminated wines during the vinification process. *Journal of the Institute of Brewing*, *117*(3), 456-461.
- Fernandes, J. P., Neto, R., Centeno, F., De Fátima-Teixeira, M., & Gomes, A. C. (2015). Unveiling the potential of novel yeast protein extracts in white wines clarification and stabilization. *Frontiers in Chemistry*, doi: 10.3389/fchem.2015.00020.
- Ferreira, R. B., Picarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., & Teixeira, A. R. (2002). The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology*, *12*, 230-239.
- Ficarra, R., Tommasini, S., Raneri, D., Calabro, M. L., Di Bella, M. R., Rustichelli, C., Gamberini, M. C., & Ficarra, P. (2002). Study of flavonoids/B-cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FTIR, DSC, X-ray investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *29*, 1005-1014.
- Gambutì, A., Rinaldi, A., & Moio, L. (2012). Use of patatin, a protein extracted from potato, as alternative to animal proteins in fining of red wine. *European Food Research and Technology*, *235*, 753-765.
- Gambutì, A., Rinaldi, A., Romano, R., Manzo, N., & Moio, L. (2016). Performance of a protein extracted from potatoes for fining of white musts. *Food Chemistry*, *190*, 237-243.
- Garcia-Moruno, E., San Lorenzo, C., Boccaccino, B., & Di Stefano, R. (2005). Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *56*, 73-76.
- Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Food Science and Technology*, *17*, 438-447.

- Ghanem, C., Taillandier, P., Rizk, Z., Nehme, N., & Souchard, J. P. (2017). Analysis of the impact of fining agents types, oenological tannins and mannoproteins and their concentrations on the phenolic composition of red wine. *Food Science and Technology*, 83, 101-109.
- Giese, E. C., Chacón-Ocaña, M., Barrajón-Simancas, N., Briones-Pérez, A. I., Dekker, R. F., & Barbosa, A. M. (2016). Evaluation of the components released by wine yeast on protein haze formation in white wine. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, 8(6), 307-313.
- Gil, M., Cabellos, J. M., Arroyo, T., & Prodanov, M. (2006). Characterization of the volatile fraction of young wines from the denomination of origin "Vinos de Madrid" (Spain). *Analytica Chimica Acta*, 563, 145-153.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 1^o Partie. Les equilibres des anthocyanes et des tannins. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18, 253-271.
- Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., & García-Moreno, E. (2007). Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 608-613.
- Gómez-Plaza, E., Mestre-Ortuno, L., Ruiz-García, Y., & López-Roca, J.M. (2012). Effect of benzothiadiazole and methyl jasmonate on the volatile compound composition of *Vitis vinifera* L. Monastrell grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(3), 394-401.
- González-Centeno, M. R., Roselló, C., Simal, S., Garau, M. C., López, F., & Femenia, A. (2010). Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *Food Science and Technology*, 43, 1580-1586.
- González-Neves, G., Favre, G., & Gil, G. (2014). Effect of fining on the colour and pigment composition of young red wines. *Food Chemistry*, 157, 385-392.
- González-Royo, E., Esteruelas, M., Kontoudakis, N., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2017). The effect of supplementation with three commercial inactive dry yeasts on the colour, phenolic compounds, polysaccharides and astringency of a model wine solution and red wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 172-181.
- González, A., Llorens, A., Cervera, M. L., Armenta, S., & de la Guardia, M. (2009). Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. *Food Chemistry*, 112, 26-34.
- Granato, T. M., Nasi, A., Ferranti, P., Iamanti, S., & Bonomi, F. (2014). Fining white wine with plant proteins: effects of fining on proanthocyanidins and aroma components. *European Food Research and Technology*, 238, 265-274.

- Granato, T. M., Piano, F., Nasi, A., Ferranti, P., Iametti, S., & Bonomi, F. (2010). Molecular basis of the interaction between proteins of plant origin and proanthocyanidins in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 11969-11976.
- Grazioli, B., Fumi, M. D., & Silva, A. (2006). The role of processing on ochratoxin A content in Italian must and wine: a study on naturally contaminated grapes. *International Journal of Food Microbiology*, *111*(Suplemento 1), S93-S96.
- Grossmann, M., Smit, I., Loehnertz, O., & Ansorge, A. (2007). Biogenic amines and grapes: effect of microbes and fining agents. En: *International Symposium of Microbiology and Food Safety of Wine*, Villafranca, España.
- Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2008). Effect of commercial mannoproteins addition on polysaccharide, polyphenolic, and color composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 9022-9029.
- Guadalupe, Z., Palacios, A., & Ayestarán, B. (2007). Maceration enzymes and mannoproteins: a possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 4854-4862.
- Guadalupe, Z., Martínez, L., & Ayestarán, B. (2010). Yeast mannoproteins in red winemaking: effect on polysaccharide, polyphenolic, and color composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, *61*(2), 191-200.
- Guerrero, R. F., Smith, P., & Bindon, K. A. (2013). Application of insoluble fibers in the fining of wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 4424-4432.
- Gugliucci, A. (2004). Polyamines as clinical laboratory tools. *Clinica Chimica Acta*, *344*, 23-35.
- Haslam, E. (1974). Polyphenol-protein interactions. *Biochemical Journal*, *139*(1), 285-288.
- Haslam, E., & Lilley, T. H. (1988). Natural astringency in foodstuffs. A molecular interpretation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *27*, 1-40.
- Haslam, E. (1998). Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press, New York.
- Hatfield, R. D., Rancour, D. M., & Marita, J. M. (2017). Grass cell walls: a story of cross-linking. *Frontiers in Plant Science*, doi.org/10.3389/fpls.2016.02056.
- Healy, T., & James, R. (1972). Adsorption of hydrolyzed metal ions at the oxide water interface. I. Co(II) adsorption on SiO₂ and TiO₂ as model systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, *40*, 42-52.
- Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2005). Analysis of grape and wine tannins: methods, applications and challenges. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*, 205-214.

- Hernández-Hierro, J. M., Quijada-Morín, N., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayesterám, B., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailó, M. T. (2014). Relationship between skin cell wall composition and anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo at different grape ripeness degree. *Food Chemistry*, *146*, 41-47.
- Hrmova, M., Farkas, V., Harvey, A. J., Lahnstein, J., Wischmann, B., Kaewthai, N., Ezcurra, I., Teeri, T.T., & Fincher, G.B. (2009). Substrate specificity and catalytic mechanism of a xyloglucan xyloglucosyl transferase HvXET6 from barley (*Hordeum vulgare* L.). *The FEBS Journal*, *276*(2), 437-456.
- Hunter, R. (1993). *Foundations of Colloid Science*. Oxford University Press, New York.
- Ishii, T. (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, *127*, 111-127.
- Iturmendi, N., Durán, D., & Marín-Arroyo, M.R. (2010). Fining of red wines with gluten or yeast extract protein. *International Journal of Food Science and Technology*, *45*, 200-207.
- Jaeckels, N., Meier, M., Dietrich, H., Will, F., & Fronk, P. (2016). Influence of polysaccharides on wine protein aggregation. *Food Chemistry*, *200*, 38-45.
- Jaeckels, N., Tenzer, S., Meier, M., Will, F., Dietrich, H., Decker, H., & Fronk, P. (2017). Influence of bentonite fining on protein composition wine. *Food Science and Technology*, *75*, 335-343.
- Jiménez-Martínez, M. D., Gómez-Plaza, E., Molero, N., & Bautista-Ortín, A. B. (2017). Fining of red wines with pomace cell material: effect on wine phenolic composition. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(8), 1531-1539.
- Kallay, M., & Body-Szalkai, M. (1996). Ammine biogene nei vini ungheresi. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, *3*, 29-38.
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M. N., & Vallis, L. (2001). Correlations between saliva protein composition and some T-I parameters of astringency. *Food Quality and Preference*, *12*(2), 145-152.
- Kassandra, S., & Kennedy, J. (2011). Relationship between red wine grade and phenolics. 2. Tannin composition and size. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 8409-8412.
- Kawamoto, H., & Nakatsubo, F. (1997). Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry*, *46*(3), 479-483.
- Kennedy, J. A., & Taylor, A. W. (2003). Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*, *995*, 99-107.

- Kosmerl, T., Šucur, S., & Prosen, H. (2013). Biogenic amines in red wine: the impact of technological processing of grape and wine. *Acta Agriculturae Slovenia*, 101(2), 249-261.
- Kruyt, H. (1952). *Colloid Science I*. Elsevier, Amsterdam.
- Kvasnicka, F., & Voldrich, M. (2006). Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1103, 145-149.
- Lagune, L. (1994). Étude des gélatines oenologiques et des mécanismes du collage dans les vins rouges. Thèse Doctorat: Université de Bordeaux II.
- Lambri, M., Dordoni, R., Silva, A., & De Faveri, D. M. (2010). Effect of bentonite fining on odor-active compounds in two different white wine styles. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(2), 225-233.
- Lambri, M., Dordoni, R., Silva, A., & De Faveri, D. M. (2013). Odor-active compound adsorption onto bentonite in a model white wine solution. *AIDIC Conference Series*, 11, 201-210.
- Lasanta, C., & Gómez, J. (2012). Tartrate stabilization of wines. *Trends in Food Science & Technology*, 28, 52-59.
- Lataste, C., Guérin, L., Solanet, D., Berger, J., Cottureau, P., & Molot, B. (2004). Évolution de la contamination en ochratoxine A du vignoble Français au vin. *Progrès Agricole et Viticole*, 121, 57-64.
- Le Bourvellec, C., Bouchet, B., & Renard, C. M. (2005). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725, 10-18.
- Le Bourvellec, C., Gouble, B., Bureau, S., Loonis, M., Ple, Y., & Renard, C. M. (2013). Pink discoloration of canned pears: Role of procyanidin chemical depolymerization and procyanidin/cell wall interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6679-6692.
- Le Bourvellec, C., Guyot, S., & Renard, C. (2009). Interactions between apple (*Malus x domestica* Borkh.) polyphenols and cell walls modulate the extractability of polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 75, 251-261.
- Le Bourvellec, C., Guyot, S., & Renard, C. M. (2004). Noncovalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1672, 192-202.
- Leong, S-L. L., Hocking, A. D., & Scott, E. S. (2006). The effect of juice clarification, static or rotary fermentation and fining on ochratoxin A in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(3), 245-251.

- Lisanti, M. T., Gambuti, A., Genovese, A., Piombino, P., & Moio, L. (2017). Treatment by fining agents of red wine affected by phenolic off-odour. *European Food Research and Technology*, 243, 501-510.
- Lochbühler, B., Manteau, S., Morge, C., Caillet, M.M., Charpentier, C., Schnell, S., Grossmann, M., & Rauhut, D. (2015). Yeast protein extracts: an alternative fining agent for red wines. *European Food Research and Technology*, 240, 689-699.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Lawrence-Zipursky, S., & Darnell, J. (2005). Biología celular y molecular. En: *Tejidos vegetales*, Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 231-234
- Lubbers, S., Charpentier, C., Feuillat, M., & Voilley, A. (1994). Influence of yeast walls on the behavior of aroma compounds in a model wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(1), 29-33.
- Ma, W., Guo, A., Zhang, Y., Wang, H., Liu, Y., & Li, H. (2014). A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends in Food Science & Technology*, 40, 6-19.
- Manetta, A. C., Di Giuseppe, L. T., Martuscelli, M., Schirone, M., Giammarco, M., & Suzzi, G. (2016). Evaluation of biogenic amines in wine: determination by an improved HPLC-PDA method. *Food Control*, 62, 351-356.
- Mannino, M., Vassanelli, G., & Triulzi, G. (2006). Trattamenti al vino per ridurre il contenuto in ammine biogene e loro quantificazione. *Vignevini*, 1-2, 72-75.
- Mateus, N., Carvalho, E., Luís, C., & De Freitas, V. (2004). Influence of tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta*, 513, 135-140.
- Maury, C., Sarni-Manchado, P., Lefebvre, S., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2001). Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 140-145.
- Maury, C., Sarni-Manchado, P., Lefebvre, S., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2003). Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 105-111.
- Maury, C., Sarni-Manchado, P., Poinssaut, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2016). Influence of polysaccharides and glycerol on proanthocyanidin precipitation by protein fining agents. *Food Hydrocolloids*, 60, 598-605.
- Mayer, K., & Pause, G. (1978). Bentonitbehandlung von Wein: Einfluß auf den Gehalt an biogenen aminen: a. *Schweiz. Z. Obst-Weinbau*, 114, 544-547.

- McManus, J. P., Davis, K. G., Beart, J. E., Gaffney, S. H., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1985). Part I. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *Journal Chemical Society, Perkin Transactions II*, 9, 1429-1438.
- McRae, J. M., Falconer, R. J., & Kennedy, J. A. (2010). Thermodynamics of grape and wine tannin interaction with polyproline: implications for red wine astringency. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58, 12510-12518.
- Mekoue-Nguela, J., Poncet-Legrand, C., Sieczkowski, N., & Vernhet, A. (2016). Interactions of grape tannins and wine polyphenols with a yeast protein extract, mannoproteins and β -glucan. *Food Chemistry*, 210, 671-682.
- Mekoue-Nguela, J., Sieczkowski, N., Roi, S., & Vernhet, A. (2015). Sorption of grape proanthocyanidins and wine polyphenols by yeasts, inactivated yeasts, and yeast cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 660-670.
- Mekoue-Nguela, J., Vernhet, A., Sieczkowski, N., & Brillouet, J. M. (2015). Interactions of condensed tannins with *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells and cell walls: tannin location by Microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 7539-7545.
- Mercurio, M. D., Damberg, R. G., Cozzilino, D., Herderich, M. J., & Simth, P. A. (2010). Relationship between red wine grades and phenolics. 1. Tannin and total phenolics concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12313-12319.
- Mierczynska-Vasilev, A., & Smith, P. A. (2015). Current state of knowledge and challenges in wine clarification. *Australian Journal of Grape and Wine*, 21, 615-626.
- Milheiro, J., Filipe-Ribeiro, L., Cosme, F., & Nunes, F. M. (2017). A simple, cheap and reliable method for control of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wines. Screening of fining agents for reducing volatile phenol levels in red wines. *Journal of Chromatography B*, 1041-1042, 183-190.
- Mitropoulou, A., Hatzidimitriou, E., & Paraskevopoulou, A. (2011). Aroma release of a model wine solution as influenced by presence of non-volatile components. Effect of commercial tannin extracts, polysaccharides and artificial saliva. *Food Research International*, 44, 1561-1570.
- Morata, A., Gómez-Cordoves, M. C., Suberviola, L., Bartolomé, B., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003). Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4084-4088.
- Muhlack, R. A., O' Neill, B. K., Waters, E. J., & Colby, C. B. (2016). Optimal conditions for controlling haze-forming wine protein with bentonite treatment: investigation of matrix effects and interactions using a factorial design. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 936-943.

- Mutanen, J., Raty, J., Gornov, E., Lehtonen, P., Peiponen, K. E., & Jaaskelainen, T. (2007). Measurement of color, refractive index, and turbidity of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(3), 387-392.
- Jaeckels, N., Meier, M., Dietrich, H., Will, F., Decker, H., & Fronk, P. (2016). Influence of polysaccharides on wine protein aggregation. *Food Chemistry*, 200, 38-45.
- Noguerol-Pato, R., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Martínez, M. C., Santiago, J. L., & Simal-Gándara, J. (2012). Floral, spicy and herbaceous active odorants in Gran Negro grapes from shoulders and tips into the cluster, and comparison with Brancellao and Mouratón varieties. *Food Chemistry*, 135, 2771-2782.
- Noriega-Domínguez, M. J., Durán, D. S., Virseda, P., & Marín-Arroyo, M. R. (2010). Non-animal proteins as clarifying agents for red wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 44(3), 179-189.
- O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P., & Darvill, A. G. (2004). Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review Plant Biology*, 55, 109-39.
- Oliveira, C. M., Silva-Ferreira, A. C., De Freitas, V., & Silva, A. M. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44, 1115-1126.
- O'Neill, M., & York, M. (2003). The composition and structure of primary cell walls. En: Rose JKC (ed.), *The Plant Cell Wall*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Ordóñez, J. L., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C., & Callejón, R. M. (2016). Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages - a review. *Analytica Chimica Acta* (939), 10-25.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta*, 563, 26-32.
- Ortega-Regules, A., Ros-García, J. M., Bautista-Ortín, A. B., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2007). Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis vinifera* L.). Technological implications. *European Food Research and Technology*, 227, 223-231.
- Ortiz-Barrera, E., Macías-Carranza, V., & Cabello-Pasini, A. (2015). Precipitación de polifenoles de vino utilizando colágeno de piel y vejija natatoria de peces. *CyTA - Journal of Food*, 13(4), 597-602.
- Otteneder, H., & Majerus, P. (2000). Occurrence of ochratoxin A in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives & Contaminants*, 17, 793-798.

- Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Zabarar, D., Mikkelsen, D., & Gidley, M. (2012). Binding of polyphenols to plant cell wall analogues. Part I. Anthocyanins. *Food Chemistry*, *134*, 155-161.
- Parish, K. J., Herbst-Johnstone, M., Bouda, F., Klaere, S., & Fedrizzi, B. (2016). Pre-fermentation fining effects on the aroma chemistry of Marlborough Sauvignon blanc press fractions. *Food Chemistry*, *208*, 326-335.
- Pastor del Rio, J. L., & Kennedy, J. A. (2006). Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*, 125-132.
- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., & Xiong, G. (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, *238*, 627-642.
- Peñas, E., di Lorenzo, C., Uberti, F., & Restani, P. (2015). Allergic proteins in enology: a review on technological applications and safety aspects. *Molecules*, *20*, 13144-13164.
- Pérez, S., & Mazeau, K. (2005). Conformations, structures, and morphologies of celluloses. En: S. Dumitriu (eds.), *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*. Marcel Dekker, New York.
- Pérez-Coello, M. S., Sanz, J., & Cabezudo, M. D. (1999). Determination of volatile compounds in hydro alcoholic extracts of French and American oak wood. *American Journal of Enology and Viticulture*, *50*, 162-165.
- Pérez-Prieto, L. J., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., Pardo-Mínguez, F., & Gómez-Plaza, E. (2002). Maturing wines in oak barrels. Effects of origin, volume, and age of the barrel on the wine volatile composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 3272-3276.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., & Piva, G. (2001). Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives & Contaminants*, *18*, 647-654.
- Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, *17*, 579-590.
- Pogorzelski, E., & Wilkowska, A. (2007). Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: a review. *Flavour and Fragrance Journal*, *22*, 251-254.
- Pohl, P. (2007). What do metals tell us about wine?. *Trends in Analytical Chemistry*, *26*(9), 941-949.
- Poncet-Legrand, C., Bernard, C., Bautista-Ortin, A. B., Carrillo, S., Fucrand, H., Pérex, J., & Vernhet, A. (2010). Tannin oxidation: intra - versus intermolecular reactions. *Biomacromolecules*, *11*, 2376-2386.

- Poncet-Legrand, C., Doco, T., Williams, P., & Vernhet, A. (2007). Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: effect of polysaccharide molecular weight. *American Journal of Enology and Viticulture*, *58*(1), 87-91.
- Porter, L. J., Hrstich, L. N., & Chan, B. G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, *25*, 223-230.
- Pozo-Bayon, M. A., Andújar-Ortiz, I., & Moreno-Arribas, M. V. (2009a). Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Research International*, *42*, 754-761.
- Pozo-Bayon, M. A., Andújar-Ortiz, I., Alcaide-Hidalgo, J. M., Martín-Álvarez, P., & Moreno-Arribas, M. V. (2009b). Characterization of commercial inactive dry yeast preparations for enological use based on their ability to release soluble compounds and their behaviour toward aroma compounds in model wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 10784-10792.
- Quijada-Morín, N., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2015). Extractability of low molecular mass flavanols and flavonols from red grape skins. Relationship to cell wall composition at different ripeness stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 7654-7662.
- Quijada-Morín, N., Williams, P., Rivas-Gonzalo, J. C., Doco, T., & Escribano-Bailón, M. T. (2014). Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chemistry*, *154*, 44-51.
- Quintela, S., Villarán, M. C., López-de-Armentia, I., & Elejalde, E. (2013). Ochratoxin A removal in wine: a review. *Food Control*, *30*, 439-445.
- Razmkhab, S., López-Toledano, A., Ortega, J. M., Mayen, M., Mérida, J., & Medina, M. (2002). Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 7432-7437.
- Renard, C. M., Baron, A., Guyot, S., & Drilleau, J. (2001). Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules*, *29*, 115-125.
- Ribereau-Gayon, P., & Pontallier, P. y. (1983). Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *34*, 505-516.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2002). Tratado de enología, volumen 2. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). Handbook of enology, volumen 2: the chemistry of wine stabilization and treatments. John Wiley & Sons, Chichester.

- Ricardo-Da-Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J. M., Moutounet, M., Cabanis, J. C., & Bourzeix, M. (1991). Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *57*, 111–125.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, *57*, 929–967.
- Rinaldi, A., Gambuti, A., & Moio, L. (2012). Precipitation of salivary proteins after the interaction with wine. the effect of ethanol, pH, fructose, and mannoproteins. *Journal of Food Science*, *77*(4), 485–490.
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine - effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *26*, 17–23.
- Rolle, L., Torchio, F., Ferrandino, A., & Guidoni, S. (2012). Influence of wine-grape skin hardness on the kinetics of anthocyanin extraction. *International Journal of Food Properties*, *15*, 249–261.
- Rosi, I., Gheri, A., Domizio, P., & Fia, G. (1999). Production of parietal macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* and their influence on malolactic fermentation. *Lallemand Technical Meeting, I, Montreal*.
- Rustioni, L., Fiori, S., & Failla, O. (2014). Evaluation of tannins interactions in grape skins. *Food Chemistry*, *159*, 323–327.
- Sáenz-Navajas, M. P., Campo, E., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Valentín, D., & Ferreira, V. (2010). Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 5574–5585.
- Saenz-Navas, M. P., Martín-López, P., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2011). Sensory properties of premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *17*, 9–19.
- San-Juan, F., Cacho, J., Ferreira, V., & Escudero, A. (2012). Aroma chemical composition of red wines from different price categories and its relationship to quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 5045–5056.
- Sarni-Manchado, P., Deleris, A., Avallone, S., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by proteins used as fining agent in enology. *American Journal of Enology and Viticulture*, *50*, 81–86.
- Saucier, C. (1993). Approche colloïdale de l'interaction tanins-polysaccharides dans les vins. *Mémoire pour le Diplôme d'Études Approfondies*. Université de Bordeaux II.
- Saucier, C. (1997). Les tannins du vin: étude de leur stabilité colloïdale. *Thèse Doctorat*: Université de Bordeaux II.

- Saucier, C., Glories, Y., & Roux, D. (2000). Interactions tanins-colloides: nouvelles avancées concernant la notion de "bons" et de "mauvais" tanins. *La Revue des Oenologues*, *94*, 7-8.
- Sauvageot, F., & Feuillat, F. (1999). The influence of oak wood (*Quercus robur* L., *Q. petraea* Liebl.) on the flavor of Burgundy Pinot noir. An examination of variation among individual trees. *American Journal of Enology and Viticulture*, *50*, 447-455.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Plant Biology*, *61*, 263-289.
- Scollary, G. R., Pásti, G., Kállay, M., Blackman, J., & Clark, A. C. (2012). Astringency response of red wines: potential role of molecular assembly. *Trends in Food Science & Technology*, *27*, 25-36.
- Scott, R. W. (1979). Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Analytical Chemistry*, *51*, 936-941.
- Selli, S., Canbas, A., Cararoglu, T., Erten, H., & Günata, Z. (2006). Aroma components of cv. Muscat of Bornova wines and influence of skin contact treatment. *Food Chemistry*, *94*, 319-326.
- Silva, A., Galli, R., Grazioli, B., & Fumi, M. D. (2003). Metodi di riduzione di residui di ocratossina A nei vini. *Industria delle Bevande*, *32*, 467-472.
- Smith, P. A. (2005). Precipitation of tannin with methyl cellulose allows tannin quantification in grape and wine samples. *AWRI Technical Review*, *158*, 3-7.
- Solfrizzo, M., Avantaggiato, G., Panzarini, G., & Visconti, A. (2010). Removal of ochratoxin A from contaminated red wines by repassage over grape pomaces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 317-323.
- Stankovic, S., Jovic, S., Zivkovic, J., & Pavlovic, R. (2012). Influence of age on red wine colour during fining with bentonite and gelatin. *International Journal of Food Properties*, *15*(2), 326-335.
- Sudraud, P. (1958). Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges. *Annals de Technologie Agricole*, *7*, 203-208.
- Togeres, J. H. (2011). Tratado de enología. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid-México.
- Tschiersch, C., Nikfardjam, M. P., Schmidt, O., & Schwack, W. (2010). Degree of hydrolysis of some vegetable proteins used as fining agents and its influence on polyphenol removal from red wine. *European Food Research and Technology*, *231*, 65-74.
- Valenta, H. (1998). Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A*, *815*, 75-92.

- Valentín, E., Herrero, E., Pastor, F. I., & Sentandreu, R. (1984). Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, *130*, 1419-1428.
- Van Sluyter, S. C., McRae, J. M., Falconer, R. J., Smith, P. A., Bacic, A., Waters, E. J., & Maragon, M. (2015). Wine protein haze: mechanisms of formation and advances in prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 4020-4030.
- Varga, J., & Kozakiewicz, Z. (2006). Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science & Technology*, *17*, 72-81.
- Vassilopoulou, E., Karathanos, A., Siragakis, G., Giavi, S., Sinaniotis, A., Douladiris, N., Fernandez-Rivas, M., Clausen, M., & Papadopoulos, N. G. (2011). Risk of allergic reactions to wine, in milk, egg and fish-allergic patients. *Clinical and Translational Allergy*, doi.org/10.1186/2045-7022-1-10.
- Versari, A., Barbanti, D., Potentini, G., Mannazzu, I., Salvucci, A., & Galassi, S. (1998). Physico-chemical characteristics of some oenological gelatins and their action on selected red wines components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *78*, 245-250.
- Versari, A., Barbanti, D., Potentini, G., Parpinello, G. P., & Galassi, S. (1999). Preliminary study on the interaction of gelatin-red wine. *Italian Journal of Food Science*, *11*, 231-239.
- Verza, S. G., Pavei, C., & Ortega, G. G. (2008). Study of the specificity of cross-povidone (PVPP) as binding agent in the quantification of polyphenolic compounds. *Journal of Brazilian Chemical Society*, *9*(8), 1627-1633.
- Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., & Cheynier, V. (2004a). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preferences*, *15*(3), 209-217.
- Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. (2004b). The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry*, *85*, 519-525.
- Vincenzi, S., Panighel, A., Gazzola, D., Flamini, R., & Curioni, A. (2015). Study of combined effect of proteins and bentonite fining on the wine aroma loss. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 2314-2320.
- Vincezi, S., Dinnella, C., Recchia, A., Monteleone, E., Gazzola, D., Pasini, G., & Curioni, A. (2013). Grape seed proteins: a new fining agent for astringency reduction in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *19*, 153-160.
- Visconti, A., Pascale, M., & Centonze, G. (1999). Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *864*(1), 89-101.

- Wang, J., Capone, D. L., L., W. K., & Jeffery, D. W. (2016b). Chemical and sensory profiles of rosé wines from Australia. *Food Chemistry*, 196, 682-693.
- Wang, J., Capone, D. L., Wilkinson, K. L., & Jeffery, D. W. (2016a). Rosé wine volatile composition and the preferences of Chinese wine professionals. *Food Chemistry*, 202, 507-5017.
- Wang, J., Capone, D. L., Wilkinson, K. L., & Jeffery, D. W. (2016b). Chemical and sensory profiles of rosé wines from Australia. *Food Chemistry*, 196, 682-693.
- Yokotsuka, K., & Singleton, V. L. (1995). Interactive precipitation between phenolic fractions and peptides in wine-like model solutions: turbidity, particle size, and residual content as influenced by pH, temperature, and peptide concentration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 329-338.
- Zea, L., Moyano, L., & Medina, M. (2010). Changes in aroma profile of sherry wines during the oxidative ageing. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 2425-2432.
- Zietsman, A. J., Moore, J. P., Fangel, J. U., Willats, W. G., & Vivier, M. A. (2017). Combining hydrothermal pretreatment with enzymes de-pectinates and exposes the inner most xyloglucan-rich hemicellulose layers of wine grape pomace. *Food Chemistry*, 232, 340-350.

UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Tecnología de Alimentos,
Nutrición y Bromatología

