

ENFOQUES ENOLÓGICOS PARA LIMITAR LAS INTERACCIONES ENTRE LOS TANINOS Y LOS POLISACÁRIDOS DE LAS PARED CELULARES DE LA UVA

Andrea Osete-Alcaraz, Ana Belén Bautista-Ortín, Encarna Gomez-Plaza

Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España

encarna.gomez@um.es

RESUMEN

Los taninos son uno de los principales compuestos responsables de la calidad del vino tinto. Estos compuestos están presentes en la piel y las semillas de la uva y se transfieren al mosto-vino durante la etapa de maceración de la vinificación, pero esta transferencia está lejos de ser completa. Esto podría deberse, entre otras causas, a que los taninos extraídos se unen a los polisacáridos de las paredes celulares de la pulpa y la piel, que están presentes en altas concentraciones en el mosto. Para limitar estas interacciones, nuestra investigación se ha centrado en algunos enfoques enológicos. Un enfoque estudiado ha sido la optimización del uso de enzimas deconstrutoras de la pared celular, que podrían reducir estas interacciones y aumentar la cantidad de taninos, estudiando diferentes combinaciones y formas de adición (individualmente, en serie o secuencial) de diferentes enzimas hidrolíticas. También el uso de polisacáridos solubles puede ser una estrategia que se ha estudiado. El uso de la aplicación de la tecnología de ultrasonidos en bodega puede ser, asimismo, una herramienta interesante para limitar estas interacciones.

INTRODUCCIÓN

Los antocianos y las proantocianidinas, más conocidas en el mundo enológico como taninos, son los compuestos más directamente responsables del color y cuerpo de los vinos. Los antocianos son responsables del color rojo del vino, mientras que los taninos, aunque no presentan color rojo, participan en la estabilización del color del vino a través de la formación de nuevos compuestos tales como los formados por un enlace directo entre antocianos y taninos, los ligados por puente de etilo y la formación de flavanil-piranoantocianos. Además, los taninos contribuyen a otras características sensoriales de los vinos, sobre todo el cuerpo, la astringencia y el amargor. La gran importancia sensorial ha quedado demostrada en los estudios de Mercurio et al. (2010), Kassandra y Kennedy (2011) y Saenz-Navajas et al. (2011), donde se ha puesto de manifiesto que la aceptación de vinos "Premium" por catadores expertos y el precio previsto para algunos vinos está directamente ligado con el contenido en polifenoles y proantocianidinas de los vinos.

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

Dado su fuerte influencia en la calidad de los vinos tintos, se han realizado muchos estudios para determinar cómo funcionan los mecanismos de su extracción de la uva al mosto. Está claro que durante la maceración se requiere que se rompan las paredes celulares para que se extraigan los compuestos de las vacuolas, y, por lo tanto, dos de los factores que condicionarán su presencia en el vino serán la cantidad de estos compuestos en el hollejo en el momento de la vendimia y la facilidad o dificultad para su extracción. Así, se ha demostrado que conocer las cantidades de antocianos y taninos en la piel no es suficiente para estimar lo que va a encontrarse en el vino (Adams y Scholz, 2008; Busse-Valverde et al., 2012; Busse-Valverde et al., 2010; Harbertson et al., 2002), siendo normalmente las cantidades encontradas en los vinos menores que

las esperadas (Busse- Valverde et al., 2012) y esto se ha atribuido de forma habitual a que parte de los compuestos fenólicos no llegan a salir de las células de las pieles por el papel barrera de la paredes celulares (Ortega-Regules et al. 2006).

Pero, en los últimos años se ha estudiado otro fenómeno que también resulta ser responsable de parte de estas observaciones, y es que las paredes celulares no solo actúan como barrera difusional sino que también interaccionan con los compuestos polifenólicos cuando están en solución, adsorbiéndolos. Estas interacciones se han estudiado fundamentalmente con los taninos. Estas interacciones contribuyen a la baja concentración de taninos en los mostos (con respecto a lo encontrado en la uva), no solo por ser las paredes celulares una barrera para la extracción del contenido vacuolar, sino porque las paredes celulares del hollejo y la pulpa (que se encuentran en grandes cantidades en el mosto en suspensión tras el estrujado de la uva) adsorben parte de estos compuestos, y así adsorbidos se pierden posteriormente en el descube y trasiegos.

Tecnológicamente, nuestro interés se centra en limitar su adsorción o en facilitar su desorción, para que esas interacciones no sean un factor limitante de la concentración de antocianos y taninos en los vinos. El desarrollo de técnicas para romper y/o limitar estas interacciones entre las paredes celulares y los compuestos fenólicos durante la vinificación puede llevarnos a un incremento potencial de compuestos fenólicos en el vino.

Para conseguir estos objetivos, planteamos investigar las siguientes posibilidades:

a) Uso de enzimas: Las aplicaciones de los enzimas en la degradación de la pared celular han sido largamente estudiadas. Los enzimas de maceración usados en enología fueron primeramente diseñados para degradar la pared celular, la barrera limitante para la extracción de compuestos fenólicos del interior de la uva, por su papel en la degradación de la red estructural de las paredes, pero también podrían, a su vez, limitar la extensión de las interacciones que se producen entre las paredes ya en suspensión en el mosto y los compuestos polifenólicos, ya que determinados experimentos parecen indicar que las técnicas que manipulan y degradan las fracciones de pectinas, los polisacáridos de la pared celular que tienen la mayor afinidad por los polifenoles y especialmente los taninos (Ruiz- García et al., 2014), podrían hacer que se incrementarán éstos durante la vinificación.

b) Uso de polisacáridos solubles: Estos compuestos, sobre todo en forma de manoproteínas se utilizan en los vinos para estabilizar los taninos, incrementando asimismo el cuerpo del vino. Pero también se ha observado que estos compuestos son capaces de desorber taninos ligados a las paredes celulares (Renard et al., 2001). Estamos interesados en el estudio de su aplicación al inicio de la elaboración para observar estos efectos.

c) Aplicación de técnicas físicas que favorezcan la desorción: aplicación de ultrasonidos: La aplicación de ultrasonidos es una metodología emergente en Tecnología de alimentos (Awad et al., 2012; Tao y Sun, 2015). Según la frecuencia a la que se trabaje tenemos los métodos de baja o alta energía. Los métodos de ultrasonidos de baja energía trabajan a frecuencias mayores de 100 kHz e intensidades por debajo de 1 W/cm², y se utilizan fundamentalmente para análisis no invasivos y para monitorizar procesos en alimentos. Las técnicas de alta energía usan intensidades superiores a las anteriores y frecuencias entre 20 y 100 kHz, e inducen cambios en las propiedades mecánicas, físicas o bioquímicas de los alimentos. Los efectos químicos de los ultrasonidos no ocurren por una interacción directa con las especies moleculares, sino por el fenómeno de la cavitación acústica, donde la formación, crecimiento y colapso implosivo de burbujas de gas en el seno de líquidos libera una alta cantidad de presión y energía. Cuando este colapso ocurre cerca de superficies sólidas se forman "microjets", que provocan efectos sobre esa superficie. Asimismo, las moléculas de agua

se pueden romper para formar radicales que pueden afectar a fenómenos relacionados con la oxidación de determinadas especies moleculares. Se ha estudiado su uso para incrementar la extracción de compuestos fenólicos durante la maceración. Nosotros queremos explorar, por una parte, si las altas temperaturas y presiones que localmente se alcanzan debido al fenómeno de cavitación, pueden ayudar a la liberación de polifenoles adsorbidos a las paredes celulares (bien que se encuentran en suspensión en el mosto, y, por otra parte, como afectan los ultrasonidos a la estructura de la pared celular, si podrían limitar la adsorción y/o incrementar la liberación de polisacáridos de éstas de forma similar al efecto observado sobre las lías de levaduras (Cacciola et al., 2013).

Por todo ello, el objetivo global de este trabajo de investigación es estudiar la aplicación de técnicas bioquímicas y físicas para limitar las interacciones de los taninos y antocianos con las paredes celulares de la uva presentes en el mosto, principales responsables del bajo porcentaje de estos compuestos en el vino, comparando con lo observado en la uva, estudiando la aplicación de estas técnicas tanto a nivel de disoluciones modelo como de vinificaciones reales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayos en disoluciones modelo

Aislamiento de paredes celulares de uva: Se prepararon paredes celulares purificadas (PC) a partir de pieles frescas de *Vitis vinifera* L. cv. uvas Monastrell. Las paredes celulares se obtuvieron por el método de De Vries et al. (1981) adaptado por Apolinar-Valiente et al. (2010).

Ensayos de interacción para taninos, enzimas y paredes celulares de uva: Las reacciones de interacción se realizaron en tubos de plástico de 3 ml. Brevemente, se mezclaron 32,5 mg de PC aislada de pieles de uva Monastrell con 5 mg de un tanino comercial previamente disuelto en 2,5 ml de solución modelo (etanol al 12% y pH 3,6 ajustado con ácido trifluoroacético) en presencia y ausencia de preparaciones enzimáticas purificadas. Los tubos se agitaron en un agitador orbital durante 90 minutos (200 rpm) a temperatura ambiente. Se incluyó un blanco sin tanino y un blanco sin la pared celular, este último para controlar la desorción de taninos la pared. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron (13.000 rpm), los sobrenadantes se concentraron y se secaron al vacío a 35 °C (concentrador de vacío CentriVap, Labconco, MO). Las enzimas purificadas utilizadas incluyeron; celulosa (EC 3.2.1.4, Cel, 100 mg/L) de *Aspergillus niger*, pectinmethylesterase (EC 3.1.1.11, PME, 25 mg/L) de cáscara de naranja, poligalacturonasa (EC 3.2.1.15, PG, 100 mg/L) de *Rhizopus sp.*, pectin-liasa (EC 4.2.2.10 y EC 3.2.1.15, PL, 100 mg/L) de *Aspergillus japonicus* y una xilanasa (EC 3.2.1.8, Xyl, 50 mg/L) de *Thermomyces lanuginosus*. Las enzimas se agregaron individualmente, en un solo conjunto de combinación (ET) o secuencialmente (ESEQ). En experimentos secuenciales, el tiempo entre las adiciones de enzimas fue de intervalos de 20 minutos, a excepción de la celulasa que se dejó trabajar durante 30 minutos. Los diversos métodos de adición se muestran en la Tabla 1.

Ensayos de interacción para taninos, polisacáridos solubles y paredes celulares de uva: Las reacciones de interacción se realizaron en tubos de plástico de 3 ml. Brevemente, se mezclaron 32,5 mg de PC aislada de pieles de uva Monastrell con 5 mg de un tanino comercial de hollejo y semilla previamente disuelto en 2,5 ml de solución modelo (etanol al 12% y pH 3,6 ajustado con ácido trifluoroacético) en presencia y ausencia de tres polisacáridos solubles distintos. Los polisacáridos solubles utilizados de forma individual fueron: pectina (0.1 mg/mL), pectina esterificada (0.1 mg/mL) y manano (8.3 mg/L). Los

tubos se agitaron en un agitador orbital durante 90 minutos (200 rpm) a temperatura ambiente.

Se realizaron además ensayos de interacción entre los polisacáridos solubles y los taninos en ausencia de paredes celulares. También se incluyó un blanco sin tanino y un blanco sin la pared celular, este último para controlar la desorción de taninos la pared celular. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron (13.000 rpm), los sobrenadantes se concentraron y se secaron al vacío a 35 °C (concentrador de vacío CentriVap, Labconco, MO).

Para ambas experiencias se realizaron seis réplicas para cada tratamiento experimental. Los sobrenadantes de tres réplicas se concentraron y luego se disolvieron en 0,250 mL de metanol. Los extractos de metanol se analizaron para determinar el contenido de proantocianidina por HPLC y SEC (cromatografía de exclusión por tamaño). En esos sobrenadantes también se determinaron el contenido en polisacáridos por SEC.

Ensayo de ultrasonidos: Para los ensayos de disoluciones modelo se utilizó un sistema de baño de ultrasonidos (Branson 8800 Ultrasonic cleaner, 25L) que opera a una frecuencia de 40 kHz, una potencia de 280 W y a temperatura controlada de 18±1 °C.

Vinificaciones

Se partió de uva que fue sometida a estrujado, despalillado y sulfitado (80 mg/100 kg). Las vinificaciones con enzimas, polisacáridos solubles y con el uso de ultrasonidos se llevó a cabo en depósitos de 50 L. También se elaboró un vino control para cada tipo de depósito. Las diferentes vinificaciones, realizadas por triplicado, se llevaron a cabo de la siguiente manera:

a) En las vinificaciones con enzimas se utilizaron diferentes actividades enzimáticas puras (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adicionadas conjuntamente: celulasa (100 mg/L), pectin-metilesterasa (25 mg/L), poligalacturonasa (100 mg/L) y xilanasas (50 mg/L) y secuencialmente (cada dos horas). También se elaboró una vinificación donde solo se aplicó la actividad celulasa. Las enzimas fueron añadidas al inicio del proceso de maceración.

b) En las vinificaciones con polisacáridos solubles se adicionaron pectina (100 mg/L), pectina esterificada (100 mg/L) y manano (8,3 mg/L) al inicio del proceso de maceración y estos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

d) La vinificación con aplicación de ultrasonidos se llevó a cabo como una vinificación control y estos fueron aplicados o bien en la masa estrujada y antes de iniciar la maceración o al mosto-vino después de maceración y prensado de los orujos. Los ultrasonidos (MiniPerseo, Agrovin S.A., Alcázar de San Juan, España) se aplicaron durante 20 min a 2500 W y una frecuencia de 20 KHz y con una densidad de potencia de 6,4 W cm⁻².

La fermentación se llevó a cabo a 22°C utilizando Viniferm CT007 (Agrovin SA, España) como levadura de fermentación a una dosis de 25 g/Hl. La maceración duró siete días. Después del fin de fermentación alcohólica los vinos fueron trasegados, embotellados y almacenados a 20°C. Los análisis de los compuestos fenólicos se llevaron a cabo después de 6 meses de envejecimiento del vino en botella.

Composición de taninos

La determinación de la concentración y composición de taninos utilizando la reacción con el floroglucinol se realizó utilizando la metodología propuesta por Busse-Valverde et al. (2012).

También se utilizó la cromatografía de exclusión por tamaño para determinar cómo afectan las diferentes técnicas utilizadas en la distribución de masa del tanino. Se utilizó la adaptación del método de Kennedy y Taylor (2003).

Composición cromática

La intensidad del color (IC) se calculó como la suma de las absorbancias a 620 nm, 520 nm y 420 nm (Glories, 1984), antocianos totales y poliméricos se determinaron mediante el método descrito por Ho et al. (2001), el índice de polifenoles totales (IPT) por el método propuesto por Ribereau-Gayon & Pontallier (1983) y los taninos totales por el método de la metil-celulosa (Smith, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Algunos estudios han demostrado que la velocidad de transferencia de compuestos fenólicos de la uva al mosto puede ser limitada, entre otras razones, debido a las interacciones entre los compuestos fenólicos y la pared celular. Es posible que después de estrujar las uvas para obtener el mosto de fermentación, en ese momento existe una gran cantidad de material vegetal en suspensión que podría adsorber parte de los taninos que están siendo extraídos de las uvas y estos compuestos fenólicos se perderían durante el descube y los trasiegos. Para probar este supuesto en una vinificación real, una vinificación control se comparó con una vinificación del vino tinto modificada, en la que se realizó una etapa de desfangado similar a los utilizados habitualmente para la elaboración de vinos blancos y rosados (Osete-Alcaraz et al., 2019). La medida de las características cromáticas y el contenido de taninos de los vinos reveló que el vino obtenido con el método modificado contenía una cantidad significativamente mayor de compuestos fenólicos (aumento del 23% en la concentración de antocianos y aumento del 43% en concentración de taninos), y una mejora de las características cromáticas lo que demuestra esa adsorción sobre los restos vegetales en suspensión. Nuestro objetivo es, pues, intentar ver si podemos limitar esas adsorciones.

Para abordar el estudio propuesto, se realizaron primero ensayos con paredes celulares aisladas, para poder estudiar el efecto real de adsorción sobre la pared, lo cual no se puede estudiar en vinificaciones reales, donde otros muchos mecanismos (extracción de compuestos fenólicos, oxidaciones, precipitaciones...) están ocurriendo.

Efecto de los diferentes tratamientos en disoluciones modelo

Tratamiento con enzimas. Ensayos de interacción.

Se determinó el grado de interacción entre un tanino comercial y las paredes celulares de la piel de la uva Monastrell, en presencia y ausencia de enzimas (ver Tabla 1). Esto se logró mediante la observación de los cambios en los taninos que permanecieron en solución en comparación con los tratamientos control (Figura 1).

Enzimas individuales	Celulasa (Cel), Xilanasas (Xil), Pectilmetilesterasa (PME), Poligalacturonasa-Pectin liasa (PG-PL)
EJ	Cel+PME+PG-PL+Xil
ES	1º Cel, 2ºPME, 3º PG-PL, 4º Xil

Tabla 1. Tipos de tratamientos enzimáticos.

La reacción de las paredes celulares (PC) con el tanino en solución llevó a una disminución del 54,5% en el contenido de tanino de la solución. La presencia de enzimas

en solución (individual, combinada y secuencial) redujo la adsorción de los taninos en las PC entre 32-46% cuando las enzimas se usaron individualmente, entre 43-45% cuando se agregaron secuencialmente y entre 45 y 53% cuando utilizado en una adición de conjunto combinado. La menor adsorción de taninos se obtuvo con la presencia de PL (que es una mezcla de PG y PL) seguida de PG, Cel y PME, aunque no se encontraron diferencias significativas entre estos últimos tratamientos. Ya anteriormente, los estudios de Castro-Lopez et al. (2016) observado una menor capacidad de retención de los taninos con PC en presencia de PG, Cel y una enzima de maceración compuesta de poligalacturonasa, pectin liasa y pectin metilesterasa.

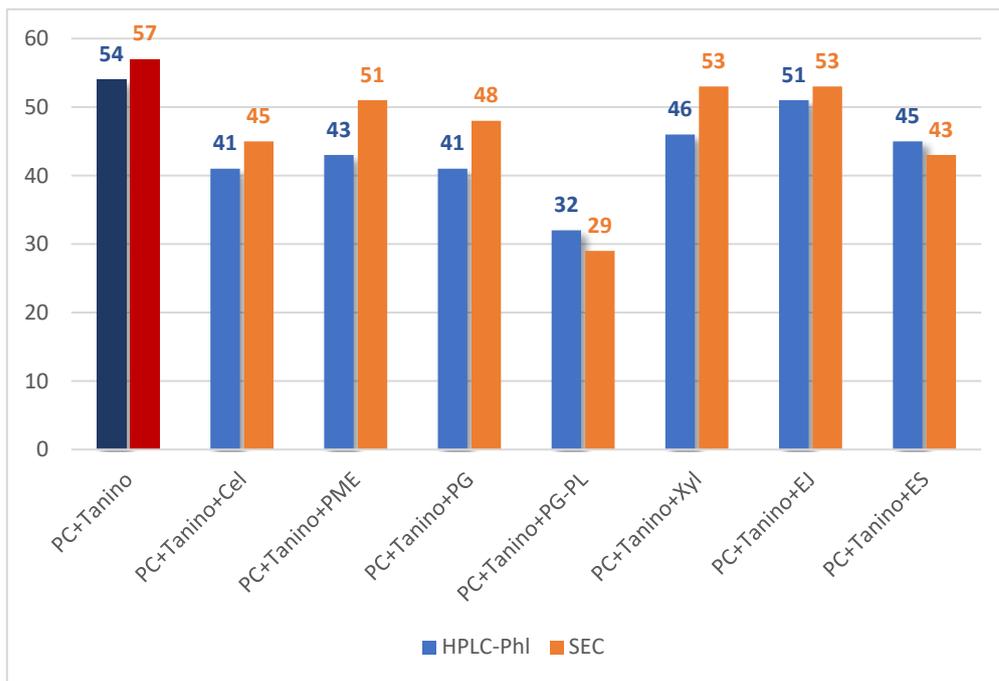


Figura 1. Efecto de la actividad de los enzimas puros utilizados individual, conjunta y secuencialmente en la adsorción de los taninos por parte de las paredes celulares de uva Monastrell. La figura muestra el % de los taninos no retenidos por las paredes celulares en presencia y ausencia de enzimas determinados por HPLC y fluoroglucinolisis y por SEC (cromatografía de exclusión por tamaño).

Ruiz-García, Smith y Bindon (2014) mostraron que más del 54% de las proantocianidinas unidas a la pared celular se encontraron dentro de la fracción péctica. La eliminación de polisacáridos pécticos de las paredes celulares, por lo tanto, redujo significativamente la adsorción de proantocianidinas.

Las enzimas agregadas conjunta o secuencialmente no muestran una menor retención de taninos (en la comparación con los agregados individualmente) debido posiblemente a un aumento en la porosidad de la pared celular provocada por la eliminación de la pectina debido a la acción de las enzimas. La porosidad inducida por enzimas puede mejorar la encapsulación de los taninos dentro de la red celular (Le Bourvellec et al., 2005). Sin embargo, y esta es otra hipótesis, una gran liberación de polisacáridos solubles de la pared celular y proteínas, por acción de los enzimas, podría conducir a una parcial interacción con los taninos presentes en la solución. Los complejos de

tanino-proteínas o tanino-polisacárido-proteína pueden precipitar en la solución y no ser detectados en el medio.

Ensayo de desorción.

Para realizar este ensayo, se pusieron en contacto las PC con el tanino y una vez formados los complejos PC-Tanino, se aislaron, se lavaron intensamente y se reintrodujeron en una solución modelo con enzimas. También se realizó un blanco sin enzima para determinar cuántos taninos se liberan únicamente por la agitación.

Los resultados obtenidos en el análisis de los taninos liberados por el método de la fluoroglucinólisis se pueden observar en la Tabla 2. Según estos, la enzima que mayor porcentaje de taninos liberó fue la PME, seguida de la Xil y PG. Por otra parte, cuando se agregaron PL y CEL, no hubo un aumento en el fenómeno de desorción. La combinación enzimática con mayor poder de desorción fue EJ, presentando diferencias significativas con las demás experiencias. Sin embargo, el efecto de desorción que se observó por la acción de los enzimas fue muy limitado.

Muestras	Taninos totales (mg/L)	% Taninos liberados	GmP
[PC-Tan]	186,03 b	24,87	3,05 bcd
[PC-Tan]+Cel	185,56 b	24,81	3,00 bc
[PC-Tan]+PME	227,44 d	30,40	2,99 b
[PC-Tan]+PG	215,45 cd	28,80	3,07 cd
[PC-Tan]+PL-PG	166,70 b	22,28	3,24 e
[PC-Tan]+Xil	219,65 cd	29,36	3,09 d
[PC-Tan]+EJ	255,26 e	34,12	2,77 a
[PC-Tan]+ES	125,56 a	16,78	3,12 d

Tabla 2. Efecto de los tratamientos con enzimas en el proceso de desorción de los taninos de semilla previamente unidos a las paredes celulares. Caracterización y cuantificación de los taninos liberados.

Abreviaciones: Tan: Tanino, PC: Pared Celular; GmP: Grado medio de polimerización; Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Interacciones en presencia de polisacáridos solubles

Renard et al. (2001) demostraron que los taninos tienen más afinidad para unirse a ciertos polisacáridos solubles estructurales que a las paredes celulares, por lo tanto, podría actuar como competencia en la interacción si estos estuvieran presentes.

La Tabla 3 muestra los resultados de los ensayos de interacción entre un tanino comercial, polisacáridos solubles y paredes celulares.

Los resultados muestran que los taninos reaccionan en disolución modelo con los polisacáridos formando complejos solubles ya que los taninos permanecen en el medio y salvo en el caso de la pectina, no se observan descensos en la concentración. La

pectina es capaz de interactuar con el tanino y hacer que precipite (Renard et al., 2001), mientras que la pectina esterificada y el manano no presentan este efecto negativo ya que no presentan diferencias significativas con el tanino en ausencia de polisacáridos solubles.

Cuando se utilizaron paredes celulares en los medios se vio que efectivamente, en presencia de estos tres polisacáridos se lograba reducir la interacción con las paredes celulares (sobre todo con la pectina esterificada y el manano). También curiosamente hubo un ligero descenso del grado medio de polimerización y de galoilación en presencia de los polisacáridos.

Muestras	Taninos totales (mg/L)	GmP	%G
Tan	708,31 b	3,76 e	2,34 b
Tan+Pectina	627,94 c	3,58 b	2,34 b
Tan+Pectina esterificada	701,32 b	3,63 c	2,31 b
Tan+Manano	715,94 b	3,71 d	2,31 b
PC+Tan	116,10 a	3,08 d	2,34 c
PC+Tan+Pectina	164,58 b	2,61 a	2,23 b
PC+Tan+ Pectina esterificada	190,73 c	2,72 b	2,18 ab
PC+Tan+Manano	202,40 c	2,91 c	2,15 a

Tabla 3. Efecto de la adición de polisacáridos solubles en las interacciones entre un tanino de semilla comercial y paredes celulares de piel de uva Monastrell. Caracterización y cuantificación de los taninos en suspensión (no ligados a las paredes celulares).

Abreviaciones: Tan: Tanino, PC: Pared Celular; GmP: Grado medio de polimerización; Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P <0.05).

Uso de ultrasonidos

Para tener información sobre el efecto de los ultrasonidos de alta potencia sobre la propia estructura del tanino, ya que este método podría provocar una despolimerización del tanino, una disolución modelo de un tanino comercial de uva se sonicó en laboratorio, en un baño de ultrasonidos durante 30 y 60 minutos. Los resultados nos indicaron que no había diferencias significativas en la concentración y solo muy leves en la composición de los taninos.

Muestra	Taninos totales (mg/L)	GmP	%G
Tan	787,29 a	3,54 a	2,56 b
Tan Sonic 30'	752,53 a	3,68 b	1,93 a
Tan Sonic 60'	723,34 a	3,78 b	1,96 a

Tabla 4. Efecto de los ultrasonidos de alta potencia a dos tiempos distintos de tratamiento distintos sobre la estructura de un tanino comercial.

Abreviaciones: Tan: Tanino, GmP: Grado medio de polimerización; Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P <0.05).

Posteriormente, se intentó comprobar si cuando hacíamos reaccionar el tanino con la pared celular y el medio se sonicaba en vez de agitar, se veía modificada la interacción de los taninos con la pared celular y no se observó ninguna diferencia.

Muestra	Taninos totales (mg/L)	GmP	%G
PC+Tan	297,52 a	2,89 a	2,04 b
PC+Tan Sonic 30'	331,65 a	2,85 a	2,01 b
PC+Tan Sonic 60'	337,53 a	2,89 a	1,77 a

Tabla 5. Efecto del tratamiento de ultrasonidos de alta potencia en la liberación de taninos ligados a paredes celulares de piel de uva Monastrell.

Abreviaciones: Tan: Tanino, PC: Pared Celular; GmP: Grado medio de polimerización; Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

El tercer paso de este estudio fue intentar observar si los ultrasonidos eran capaces de desorber lo que ha estado adsorbido, sonicando un complejo pared celular-taninos y comparando con la desorción que se producía si el complejo simplemente se agitaba, observándose que no se produjo ningún incremento en la concentración de taninos en el medio.

Muestra	Taninos totales mg/L	GmP	%G
PC+ Tan (Ag. 90')	45,61 b	3,88 b	2,72 b
PC+ Tan (Son. 90')	35,68 a	3,64 a	2,33 a

Tabla 6. Comparación de la capacidad de los ultrasonidos y la agitación de liberar taninos previamente unidos a las paredes celulares de piel de uva Monastrell.

Abreviaciones: Tan: Tanino, PC: Pared Celular; GmP: Grado medio de polimerización; Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Estos resultados nos indican que esta técnica no modifica la estructura del tanino ni limita la adsorción o favorece la desorción sobre las paredes celulares, en nuestras condiciones de estudio.

Efecto en vinificaciones reales

Después de observar el efecto en disoluciones modelo, donde realmente hemos sido capaces de evaluar el comportamiento aislado de las paredes celulares, en cuanto a su capacidad de adsorción/desorción, decidimos ensayar estas tres prácticas enológicas en vinificaciones reales.

Efecto de los diferentes tratamientos sobre los parámetros cromáticos del vino

La tabla 7 muestra los valores de los parámetros cromáticos presentados por los diferentes vinos. La intensidad de color (IC) es uno de los parámetros con más importancia para los consumidores de vino y aquel que es apreciado inicialmente

(González-Neves et al., 2014). Los antocianos son los compuestos fenólicos responsables del color rojo del vino tinto, éstos se encuentran en las vacuolas de las células vegetales de la piel de las uvas tintas.

Cuando se utilizaron enzimas en la maceración y polisacáridos solubles, todos los tratamientos empleados incrementaron los valores de la intensidad de color, el contenido en compuestos fenólicos totales (IPT) y antocianos totales (AT). Los enzimas no tuvieron ningún efecto en la concentración de antocianos poliméricos del vino (AP); mientras que su contenido se incrementó con el resto de los tratamientos aplicados. Todos los tratamientos ensayados lograron un aumento en la concentración de taninos, aunque en el caso de los polisacáridos solubles no fue un incremento significativo.

Teniendo en cuenta los resultados observados en las disoluciones modelo, el papel de los enzimas debe estar principalmente dirigido a favorecer la degradación de las paredes celulares y la liberación de los compuestos fenólicos, y no tanto a la liberación de aquellos compuestos adsorbidos. En el caso de los polisacáridos, si que es posible, dado lo observado en las disoluciones modelo, que ejerzan una competencia con los polisacáridos de las paredes celulares, limitando la adsorción con este material en suspensión y formando complejos solubles en el medio que incrementan la concentración.

Los análisis sensoriales de estos vinos (datos no mostrados) indicaron una gran preferencia de los catadores frente a los vinos tratados con enzimas y polisacáridos solubles.

	IC	IPT	AT (mg/L)	AP (mg/L)	TT_MC (mg/L)
Testigo	4,4 a	22,0 a	225,5 a	10,9 a	339,5 a
Enzimas Juntos	6,0 bc	28,5 b	264,5 ab	16,7 a	571,9 b
Enzimas Secuencial	5,8 b	27,6 b	284,0 bc	16,9 a	585,9 b
Testigo	4,4 a	22,0 a	225,5 a	10,9 a	339,5 a
Pectina	6,3 b	29,1 b	268,0 b	17,7 b	428,9 a
Pectina Esterificada	7,2 c	32,0 c	299,3 bc	22,1 c	439,8 a
Manano	6,5 b	30,9 c	307,0 c	19,9 bc	388,7 a
Testigo	5,5 a	26,7 a	260,4 b	12,6 a	473,9 a
Sonicado	6,0 a	27,0 a	238,1 a	19,5 b	624,8 b
Testigo	5,7 a	26,1 a	284,5 a	9,6 a	554,2 a
Mosto sonicado	7,4 b	37,6 b	313,2 b	12,8 b	959,1 b

Tabla 7. Efecto de los tratamientos enzimáticos, adición de polisacáridos solubles, ultrasonidos aplicados a vino y mosto/pasta sobre las características cromáticas y la concentración de taninos medidos espectrofotométricamente en vino tras 6 meses en botella.

Abreviaciones: IC: intensidad de color, IPT: índice de polifenoles totales, AT: antocianos totales, AP: antocianos poliméricos, TT: taninos totales

Los dos ensayos de ultrasonidos nos indican que cuando los aplicamos sobre la masa estrujada, la acción de los ultrasonidos claramente facilita la salida de compuestos fenólicos del interior de las vacuolas y la degradación de la pared celular pero cuando se aplican despues del descube, para desorber aquellos en suspensión, no se observó ningún aumento de compuestos fenólicos indicando, tal y como se observó en las disoluciones modelo, que no son capaces de desorber los compuestos.

Efecto de los diferentes tratamientos sobre la concentración y composición de los taninos del vino medidos por HPLC

La concentración y composición de los taninos libres y no oxidados medidos por el método de la fluoroglucinolisis se muestra en la tabla 8.

	Taninos totales (mg/L)	GmP	Epigalocat (μM)	Epicatg total (μM)
Testigo	180,7 a	3,4 a	78,3 a	18,4 a
Enzimas Juntos	325,1 b	4,0 b	145,4 b	27,7 ab
Enzimas Secuencial	369,0 bc	4,0 b	248,6 c	32,1 b
Testigo	180,7 a	3,4 a	78,3 a	18,4 a
Pectina	394,2 bc	4,2 b	192,7 b	35,8 b
Pectina Esterificada	427,0 c	4,1 b	250,5 c	29,0 b
Manano	352,9 b	7,5 c	177,9 b	28,9 b
Testigo	307,6 a	4,0 a	160,6 a	21,7 a
Sonicado	386,5 b	4,1 a	231,4 b	24,8 a
Testigo	262,4 a	3,2 a	100,2	23,9
Mosto sonificado	324,8 b	3,5 b	113,5	41,0

Tabla 8. Efecto de los tratamientos enzimáticos, adición de polisacáridos, y sonicación en vino y mosto/pasta sobre la concentración y composición de taninos tras 6 meses en botella.

Abreviaciones: GmP: Grado medio de polimerización, Epigalocat: Epigalocatequina, Epicatg: Epicatequinagalato.

Con la aplicación de enzimas se incrementó el contenido de taninos siendo además este incremento debido a un aumento de aquellos taninos más polimerizados. Busse-Valverde et al. (2012) reportaron incrementos en el contenido de estos compuestos en el vino tras la adición de enzimas. También los tratamientos en los que se añadieron polisacáridos solubles presentaron valores significativamente mayores en taninos totales y grado medio de polimerización de estos respecto a la vinificación control. Los vinos tratados con ultrasonidos también lograron incrementar la concentración de los taninos en el vino, y principalmente de aquellos ricos en epigalocatequina. Sin embargo, el grado medio de polimerización de los taninos no se incrementó. En muchos estudios se ha demostrado que los ultrasonidos son capaces, más bien, de disminuir el peso molecular de moléculas de gran tamaño, como ciertos polisacáridos (Muñoz-Almagro et al., 2017) o proteínas (Jambrak et al., 2009) aunque nosotros no hemos encontrado estos resultados en disoluciones modelo.

CONCLUSIONES

Nuestros estudios previos indicaron que la eliminación de material suspendido del mosto provoca un aumento en la concentración final de compuestos fenólicos en el vino, confirmando así el papel de las paredes celulares en la retención y eliminación de compuestos fenólicos durante la vinificación. La extracción efectiva de compuestos fenólicos de uvas durante la maceración fermentativa, por lo tanto, depende de tener la capacidad de interrumpir o reducir estas asociaciones. De las tres prácticas enológicas ensayadas en este trabajo se puede concluir que:

- a) Los enzimas de maceración no tienen efecto sobre la desorción, y tienen un efecto limitado sobre la reducción de la adsorción. Cuando son usados en vinificación mejoran las características cromáticas, efecto más atribuible a la

- facilitación de la salida de los compuestos fenólicos contenidos en las vacuolas que a la limitación de la adsorción de los compuestos ya liberados.
- b) Los polisacáridos solubles sí que limitan la adsorción de taninos, compitiendo con los de la pared celular. Su uso podría mejorar las características cromáticas durante la vinificación.
 - c) Ultrasonidos: No ejercen ningún papel apreciable en la desorción de los compuestos fenólicos y no limitan la adsorción. Durante la vinificación mejoraron las características cromáticas de los vinos cuando se utilizan sobre la uva estrujada, debido a su efecto de extracción, pero no mejoran apreciablemente el color del vino si se aplican sobre el mosto-vino, una vez efectuado el descube.

REFERENCIAS

- Adams, D.O. y Scholz, R.C. (2008). Tannins – the problem of extraction. Proceedings of the 13th Australian Wine Industry Technical conference (Blair, R.J. et al. eds.), (Australian Society for Viticulture and Oenology: Adelaide) pp. 160–164.
- 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 of grapes cv. Monastrell. *Analytica Chimica Acta*, 660, 206-210.
- Awad, T.; Moharram, H.; Shaltout, O.; Asker, D.; Youssef, M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48, 410–427
- Bautista-Ortín, A. B., Fernández, J. I. F., Regules, A. O., Roca, J. M. L., & Plaza, M. E. G. 2006. Aplicación de diferentes técnicas enológicas para mejorar el color de los vinos de Monastrell. *In: Enólogos*, (41), 40-45.
- 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.
- 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.
- Busse-Valverde, N., Bautista-Ortín, A. B., Gómez-Plaza, E., Fernandez-Fernandez, J. I., & Gil-Munoz, R. 2012. Influence of skin maceration time on the proanthocyanidin content of red wines. *In: European Food Research and Technology*, 235(6), 1117-1123.
- Cacciola, V.; Ferran Batllo, I.; Ferraretto, P.; Vincenzi, S., Celotti, E. (2013). Study of the ultrasound effects on yeast lees lysis in winemaking. *European Food Research and Technology*, 236, 311–317
- 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. *In: Food chemistry*, 196, 526-532.
- Cheyrier, 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. *In: American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 298-305.

- Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges: 2e. Partie: mesure, origine et interpretation. *In: Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18.
- González-Neves, G., Favre, G., & Gil, G. 2014. Effect of fining on the colour and pigment composition of young red wines. *In: Food chemistry*, 157, 385-392.
- Harbertson, J.F.; Kennedy, J.A.; Adams, D.O. (2002). Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 54–59.
- Ho, P., Silva, M. D. C. M., & Hogg, T. A. 2001. Changes in colour and phenolic composition during the early stages of maturation of port in wood, stainless steel and glass. *In: Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(13), 1269-1280.
- Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G., & Badanjak, M. 2009. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *In: Journal of Food Engineering*, 93(4), 386-393.
- Kassara, S., & Kennedy, J. A. (2011). Relationship between red wine grade and phenolics. 2. Tannin composition and size. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(15), 8409-8412.
- Le Bourvellec, C.; Bouchet, B.; Renard, C.M. (2005). Noncovalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III. Study on model polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725, 10–18.
- Mercurio, M. D., Damberg, R. G., Cozzolino, D., Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2010). Relationship between red wine grades and phenolics. 1. Tannin and total phenolics concentrations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(23), 12313-12319.
- Muñoz-Almagro, N., Montilla, A., Moreno, F. J., & Villamiel, M. 2017. Modification of citrus and apple pectin by power ultrasound: Effects of acid and enzymatic treatment. *In: Ultrasonics sonochemistry*, 38, 807-819.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J.M., Lopez-Roca, J.M. and 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.
- Osete-Alcaraz, A., Bautista-Ortín, A. B., Ortega-Regules, A., & Gómez-Plaza, E. (2019). Elimination of Suspended Cell Wall Material in Musts Improves the Phenolic Content and Color of Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 70(2), 201-204.
- Renard, C. M., Baron, A., Guyot, S., & Drilleau, J. F. 2001. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *In: International Journal of Biological Macromolecules*, 29(2), 115-125.
- Ribéreau-Gayon, P., Pontallier, P., & Glories, Y. 1983. Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation. *In: Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34(5), 505-516.
- Ruiz-García, Y., Smith, P. A., & Bindon, K. A. 2014. Selective extraction of polysaccharide affects the adsorption of proanthocyanidin by grape cell walls. *In: Carbohydrate polymers*, 114, 102-114.
- Saenz-Navajas, 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.

Smith, P. A. 2005. Precipitation of tannin with methyl cellulose allows tannin quantification in grape and wine samples. *In: AWRI Technical Review, 158*, 3-7.

Tao, Y. y Sun, D. (2015). Enhancement of food processes by ultrasound. *Critical reviews in Food Science and Nutrition, 55*, 570-594.