



***CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE  
LOS FACTORES QUE AFECTAN LA  
ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO***

*Memoria presentada por  
María del Carmen Llaudy Fernández  
Para optar al grado de Doctora por  
La Universitat Rovira i Virgili*

*Tarragona, Noviembre de 2006*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

Esta tesis ha sido financiada por el CICYT (AGL-2001-0716 y AGL 2004-02309) y el Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**  
**Departament de Bioquímica i Biotecnologia**

El Dr. FERNANDO ZAMORA MARÍN, Professor Titular d'Universitat, i el Dr. JOAN MIQUEL CANALS BOSCH, Professor Titular d'Escola Universitària, membres del Departament de Bioquímica i Biotecnologia, a la Facultat d'Enologia de Tarragona de la Universitat Rovira i Virgili,

### CERTIFIQUEN

Que el treball aquí presentat i que duu per títol "CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO", ha estat realitzat per Na MARÍA DEL CARMEN LLAUDY FERNÁNDEZ, sota la direcció dels sota-signants, en el grup de Tecnologia Enològica del Departament de Bioquímica i Biotecnologia d'aquesta Universitat i que tots els resultats presentats són fruit de les experiències per ella realitzades.

Tarragona, 4 de setembre del 2006

Dr. Fernando Zamora Marín

Dr. Joan Miquel Canals Bosch

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

*Cuando he pensado en escribir los agradecimientos a todos los que de una forma u otra han contribuido a la realización de este trabajo no he podido evitar pensar en la primera vez que vine a la Facultat d'Enologia, a la antigua que tanto encanto tenía. En aquel momento no imaginaba, viniendo yo de una tierra de ron y mojitos, que el vino fuese un mundo lleno de misteriosas interacciones y equilibrios.*

*Es por ello, que ante todo quiero agradecer al Dr. Fernando Zamora, el haberme abierto las puertas al mundo de la Enología y al Dr. Joan Miquel Canals, la oportunidad de acercarme a la degustación y a las proteínas de la saliva. A ambos doy gracias por la dedicación y constancia en el trabajo, pero sobre todo por la comprensión y paciencia mostrada durante estos años.*

*Sirvan estas líneas para mostrar mi reconocimiento a todos los profesores del Departamento de Bioquímica y Biotecnología que siempre han estado dispuestos a aclarar cualquier duda y compartir sus conocimientos, especialmente a aquellos con los que he compartido en la finca, el laboratorio o he disfrutado de sus conferencias: Dra. Montse Poblet, Dra. Francesca Fort, Dra. Montse Nadal, Dr. Nicolas Rozés, Dr. José M. Guillamón, Dr. Albert Mas, Dr. Gerard Pujadas.*

*Del mismo modo, agradezco a Santiago Moreno, cuya disposición y experiencia son un pilar importante para los que estamos en los laboratorios.*

*Al Sr. René Barbier, por privarse de unas uvas excelentes a fin de que realizáramos el experimento de madurez.*

*A Alberto Pascual por su ayuda en el trabajo informático.*

*Al Sr. Guillem Roig, representante de AZ3, Grupo Oenodev, agradezco todo el soporte técnico, la constancia en el proceso de degustación y el seguimiento de los vinos microoxigenados.*

*Al Dr. Celestino Santos y Susana González-Manzano, del Laboratorio de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca, por el análisis de antocianos y nuevos pigmentos.*

*A los técnicos de la bodega Mas de Frares: Josep Anguera, Josep Alsina y Pedro Cabanillas, gracias por toda la ayuda y enseñanzas en las vendimias y el trabajo de bodega.*

*Doy gracias a todos mis compañeros de doctorado, los que ahora están aquí y los que ya son doctores, por el día a día, por todas las horas compartidas... a las verdes y a las maduras.*

*Agradezco, de todo corazón, a los compañeros de nuestro grupo de trabajo,*

*A Javier Argaya, por su contribución en el tiempo que estuvo con nosotros.*

*A Mireia Esteruelas, por su ayuda e intercambio de opiniones en todo lo referente a proteínas, hipotecas, catalán y política migratoria.*

*A Roser Canals, por compartir no sólo experimentos, sino horas, comidas, vivencias y preocupaciones.*

*Noies, compartir aquest anys amb vosaltres ha sigut una escola de cara a entendre les costums i manera de pensar de aquí. Ara sóc una mica catalana.*

*Por último, agradezco a mi familia,*

*A mis padres que, aunque lejos, me han alentado a que siga adelante e intente aprender un poco más cada día.*

*A Pau, por las correcciones de inglés en tiempo record. Gracias por animarme en las horas bajas.*

*A Arturo por tanta comprensión y ayuda, por tanto amor y tanta entrega.*

*A Cynthia que, a pesar de su corta edad, ha entendido la importancia y la dedicación que requiere el doctorado.*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

*A Cynthia y Arturo*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

## INDICE

Objetivos y Justificación	1
Capítulo I. Introducción	
1. Los compuestos fenólicos del vino tinto	3
1.1. No Flavonoides	3
1.1.1. Ácidos fenoles	4
1.1.2. Estilbenos	4
1.2. Flavonoides	5
1.2.1. Flavonoles	5
1.2.2. Flavononoles y flavonas	6
1.2.3. Flavanoles	6
1.2.4. Antocianos	10
1.3. La copigmentación	11
1.4. Los antocianos oligoméricos	12
1.5. Combinaciones Antocianos-Flavanoles y nuevos pigmentos	13
1.5.1. Uniones Directas	13
1.5.2. Uniones por Puente Etilo	13
1.5.3. Nuevos Pigmentos	14
2. El color del vino tinto	17
2.1. Métodos de medida del color del vino	18
3. Astringencia	23
3.1. Interacciones Taninos-Proteínas	24
3.2. Las proteínas de la saliva	26
3.3. Factores que influyen sobre la sensación de astringencia	31
3.4. Métodos para la determinación y estudio de la astringencia	36
4. La vinificación en tinto	39
4.1. Madurez	39
4.2. Descripción del proceso de vinificación en tinto	41
4.3. Maceración	45
5. Crianza en barrica de roble	49
5.1. Influencia de la barrica en los compuestos fenólicos del vino	54
6. Microoxigenación	56
7. Lías	60
Bibliografía	63
Capítulo II. Metodología para evaluar la astringencia y estudios relacionados	
1. Nueva Metodología para evaluar la astringencia en vino tinto	77
2. Influencia de las variaciones en la matriz sobre la astringencia	85
3. Comparación de la reactividad del ácido tánico con la ovoalbúmina y la saliva, como proteínas modelos para evaluar la astringencia	99
4. Influencia de variaciones en la composición monomérica y grado de polimerización de las proantocianidinas sobre la astringencia	121
Capítulo III. Influencia de la madurez y la maceración en los compuestos fenólicos y la astringencia de los diferentes componentes del racimo de uva	139
Capítulo IV. Efectos del uso de la microoxigenación antes de la crianza en barrica de roble	155
Capítulo V. Conclusiones	163
Anexo I. Materiales y Métodos	167

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

# JUSTIFICACIÓN

---

## Y OBJETIVOS



*Bacco, Caravaggio (1573-1610)*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El mercado actual del vino tinto de alta calidad demanda vinos de gran intensidad de color y alta concentración tánica, pero que no sean excesivamente astringentes. Este tipo de vino no es fácil de producir ya que requiere que la materia prima, la uva, presente los niveles de madurez y calidad necesarios. Sin una adecuada madurez fenólica de las uvas, los vinos acostumban a ser demasiado duros.

De hecho, en ocasiones los elaboradores al tratar de obtener vinos de gran color y cuerpo, fuerzan la extracción de los compuestos fenólicos lo que origina vinos extremadamente astringentes. Es muy posible que este problema cobre mayor importancia durante los próximos años, en los que el calentamiento global acelera la acumulación de azúcares en las bayas. Este fenómeno obliga a avanzar las fechas de vendimia cada vez más y obliga a vinificar uvas que no están completamente maduras a nivel de los hollejos y las semillas.

Por otra parte, la medida de la astringencia del vino de forma objetiva y reproducible no es fácil. El análisis sensorial esta sujeto a una cierta subjetividad, que además en el caso de la astringencia se agrava por el efecto acumulativo que ejercen los compuestos astringentes sobre la percepción del degustador. A su vez, el método químico habitualmente utilizado para la determinación de la astringencia, el índice de gelatina, es un método lento, laborioso y en ocasiones impreciso.

Por estas razones nos planteamos abordar el estudio de la astringencia del vino tinto a fin de comprender mejor los factores que la condicionan.

Concretamente nos planteamos inicialmente los siguientes objetivos:

1. Desarrollar una metodología utilizando una proteína de fácil disponibilidad que permita la determinación objetiva y reproducible de la astringencia del vino tinto.
2. Comparar la interacción de la proteína seleccionada con la del conjunto de proteínas salivares frente a diferentes taninos.
3. Estudiar cómo se ve influenciada la astringencia por factores tales como la composición monomérica de las proantocianidinas, su grado de polimerización y algunos de los componentes no fenólicos de la matriz "vino".

Una vez alcanzados dichos objetivos, nos planteamos aplicar la metodología desarrollada para abordar un tema, clave a nuestro entender, para comprender mejor la elaboración de vinos tintos del perfil previamente descrito. Se trataría de responder a la pregunta de cómo afectan la madurez de la uva y la duración de la maceración sobre la astringencia que aportan al vino los diferentes componentes del racimo de uva.

Por otra parte, existen diferentes técnicas vinícolas destinadas a disminuir la astringencia de los vinos excesivamente duros. De entre ellas, la clarificación, la crianza en barricas de roble y la microoxigenación, son posiblemente las más

### Justificación y Objetivos

utilizadas. La primera implica la eliminación de aquellos taninos más astringentes, mientras que las otras dos técnicas persiguen la transformación de dichos compuestos para disminuir su agresividad. La microoxigenación es una técnica relativamente novedosa que esta implementándose en la mayor parte de las bodegas como una alternativa más barata a la crianza en barricas de roble. De hecho existen ya diversos estudios al respecto. No obstante, nosotros nos planteamos la utilización de esta técnica, no como alternativa, sino como complemento a la crianza en barricas, para estudiar mediante nuestro método de determinación de la astringencia, la influencia de ambas técnicas.

Concretamente, los objetivos de la segunda fase de la tesis fueron los siguientes:

4. Estudiar la influencia de la madurez y la maceración sobre los compuestos fenólicos y la astringencia de los diferentes componentes del racimo de uva.
5. Estudiar la influencia del uso de la microoxigenación antes de la crianza en barrica sobre la astringencia del vino tinto.



# CAPITULO I

---

## INTRODUCCIÓN



*La Vendimia. Goya (1746-1828)*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

## 1. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO TINTO

Los compuestos fenólicos de la uva determinan la sensación de astringencia y el color en los vinos tintos. Muchas investigaciones del campo de la enología estudian los compuestos fenólicos con el propósito de mejorar la calidad de los vinos y conocer propiedades de interés nutricional y farmacológico.

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos se caracterizan por presentar un núcleo aromático acompañado de uno o varios grupos hidroxilo. Su clasificación está basada en la distinción entre compuestos no flavonoides y flavonoides (Figura 1).

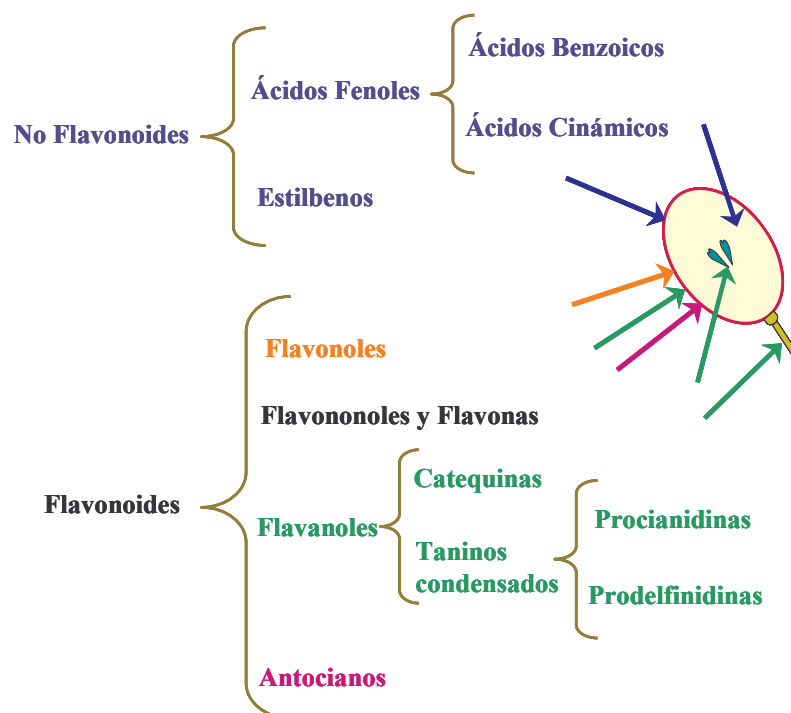


Figura 1: Clasificación de los compuestos fenólicos (extraído de Zamora, 2003) y localización en la uva.

La uva contiene compuestos no flavonoides en la pulpa, piel, semilla y raspón. Mientras que los compuestos flavonoides se encuentran fundamentalmente en piel, semilla y raspón. Estos últimos de gran influencia en el color, estructura y capacidad de crianza de un vino.

### 1.1. No Flavonoides

Esta denominación abarca los ácidos fenoles, que se dividen en ácidos benzoicos y ácidos cinámicos, y estilbenos.

### 1.1.1. Ácidos fenoles

Los ácidos fenoles podemos encontrarlos tanto en forma libre como esterificados con el ácido tartárico u otros componentes del vino. Estos compuestos no afectan directamente el color en el vino tinto, aunque si pueden participar en el color mediante fenómenos de copigmentación. Desde el punto de vista organoléptico no parecen tener impacto sobre el sabor del vino tinto. Sin embargo la degradación de los ácidos fenoles da lugar a fenoles volátiles que pueden provocar defectos en el vino a nivel olfativo (Zamora, 2003<sub>a</sub>).

Los ácidos fenoles se subdividen en ácido benzoicos y ácidos cinámicos (Figura 2).

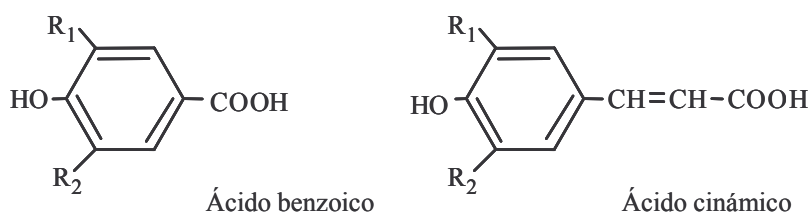


Figura 2: Estructura química de los ácidos fenoles.

Los ácidos benzoicos están compuestos por un núcleo bencénico con sustituciones en C<sub>6</sub>- C<sub>1</sub>. En el vino están presentes mayoritariamente en forma de ácido p-hidroxibenzoico (R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H), ácido siríngico ( R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>) y ácido gálico (R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= OH). El ácido gálico en su forma dimérica, ácido elágico, forma parte de los vinos de crianza y provenientes mayoritariamente de la madera.

Durante la crianza, también pasan a formar parte del vino estructuras poliméricas llamadas taninos hidrolizables, que son poliésteres de ácido gálico (galotaninos) o de ácido elágico (elagitaninos) y sus derivados. Tras su hidrólisis, con el tiempo; pueden ser también una fuente de ácidos gálicos y elágicos.

Por su parte, los ácidos cinámicos están compuestos por un núcleo bencénico con una cadena lateral insaturada y sustituciones en los carbonos C<sub>6</sub>- C<sub>3</sub>. Están principalmente presentes en el vino el ácido p-cumárico (R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub>= H), ácido ferúlico (R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H) y el ácido cafeíco (R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub> = H). Este último en su forma esterificada es el no flavonoides que se encuentra en mayor concentración en los vinos jóvenes poco oxidados, derivándose en nuevos compuestos al exponerse a la oxidación (Cheynier y col., 1986).

### 1.1.2. Estilbenos

Los Estilbenos se encuentran mayoritariamente en la piel de la uva, aunque se han encontrado concentraciones de hasta 43 µg/g en semillas (Ector y col., 1996).

Estos compuestos están formados por dos anillos bencénicos unidos por una cadena etanol o eventualmente etileno, la estructura química aparece en la Figura 3.

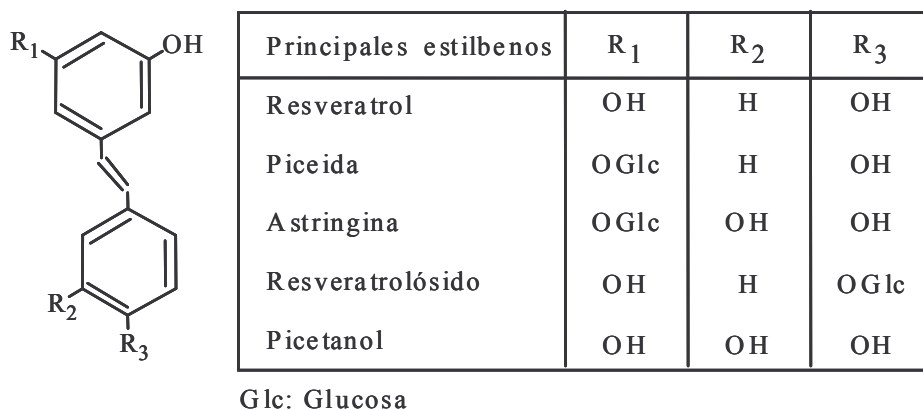


Figura 3: Estructura química de los estilbenos

Los estilbenos no interfieren ni en el color ni el sabor del vino, sin embargo es muy conocido y estudiado el estilbeno denominado resveratrol, por su importancia en la salud humana (protector del aparato circulatorio, antioxidante, anticancerígeno). Este se encuentra en la vid formando numerosos oligómeros que participan en la respuesta a ataques fúngicos. (Langcake y Price, 1976).

## 1.2. Flavonoides

Los flavonoides están caracterizados por un esqueleto con base de 15 átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) de tipo 2- fenil- benzopirona . Para su estudio se dividen en cuatro familias: los Flavonoles, los Flavonoles y Flavonas, los Flavonoles, que incluyen a los taninos condensados o procianidinas; y por último los Antocianos.

### 1.2.1. Flavonoles

Los Flavonoles son sustancias de color amarillo que se encuentran en la piel de la uva, tanto en forma de heterósidos como de agliconas (Figura 4).

No contribuyen de modo importante en el color de los vinos tintos, si bien, influyen levemente en la componente amarilla.

Los Flavonoles que están presentes en los vinos tintos son el kampferol (R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H), la quercitina (R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H), la miricetina (R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OH) y la isoramnetina (R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H).

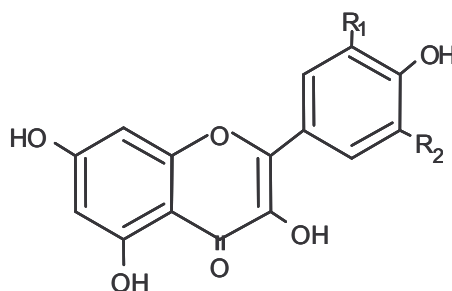


Figura 4: Estructura química de los flavonoles

### 1.2.2. Flavonoles y flavonas

Los flavonoles y las flavonas son compuestos similares a los Flavonoles, diferenciándose de estos en que no poseen el doble enlace del heterociclo (Ribéreau-Gayon y col., 2003<sub>a</sub>).

### 1.2.3. Flavanoles

Los flavanoles constituyen una compleja familia dentro de los compuestos fenólicos. Se encuentran en elevadas concentraciones en la uva y juegan un papel muy importante en propiedades organolépticas del vino como son el color, la sensación de cuerpo y estructura en boca y la astringencia.

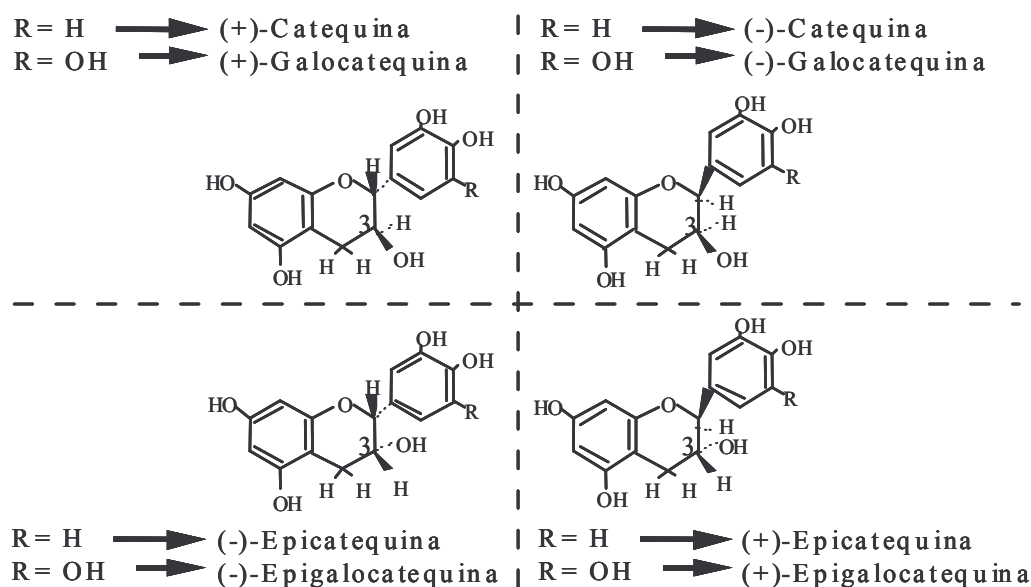


Figura 5: Estructura química de los monómeros de flavanol (extraído de Zamora, 2003)

Los flavanoles están compuestos por las formas isoméricas de la catequina y sus polímeros, los taninos. En la Figura 5 se observa la estructura química de los monómeros de flavanol. La estructura básica de la catequina presenta dos carbonos asimétricos por lo que existen 4 isómeros (+)/(-) catequina y (+)/(-)epicatequina. Además puede presentar un tercer grupo OH en el anillo aromático externo que da lugar a las correspondientes (+)/(-) galocatequinas y (+)/(-)epigallocatequinas. También puede encontrarse sustituido el grupo OH de la posición 3 del heterociclo por una molécula de ácido gálico, dando lugar a los 3-galatos de (+)/(-) (galo) catequina y de (+)/(-) epi (galo) catequina.

En la uva, los monómeros de flavanol aparecen únicamente en una pequeña proporción ya que la mayor parte están en forma de polímeros.

Los taninos condensados están presentes en la uva y son un grupo heterogéneo formado por la condensación de dos ó más unidades de diversos monómeros de flavanoles unidos por enlaces C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> ó C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> (enlaces tipo B) o con una unión suplementaria de tipo éter entre el C<sub>3</sub> y los C<sub>5</sub> y C<sub>7</sub> (enlace tipo A) (Xie y Dixon, 2005)

Los taninos condensados también son llamados proantocianidinas o procianidinas debido a que en medio fuertemente ácido hidrolizan para dar lugar a Cianidina, sin embargo si el polímero está formado también por unidades de galocatequinas o epigalocatequinas, entonces la hidrólisis ácida dará lugar a delfinidinas. Y por tanto se les conoce como prodelfinidinas. No obstante en términos generales a los taninos condensados se les llaman procianidinas.

En la uva podemos localizar procianidinas y prodelfinidinas en la piel, mientras en la semilla localizaremos solo procianidinas parcialmente galoiladas. La mayor parte de los dímeros y trímeros de procianidinas identificados en la uva se unen mediante enlaces tipo B. Se describen en la piel la procianidina B1, mientras en la semilla encontraremos las procianidinas B3, B4 y B2 como la más abundante (González-Manzano y col., 2004). La presencia de dímeros de la serie A en el vino se han descrito recientemente y aparecen en muy baja concentración (Vivas de Gaulejac y col., 2001).

Tanto los monómeros de flavanol como las procianidinas, presentan una clara tendencia a la polimerización. Las reacciones que conducen a la polimerización pueden llevarse a cabo de forma directa o con la ayuda del oxígeno y catalizadores como el hierro y el cobre (Cheynier y col., 2000):

- De forma directa las procianidinas forman un carbocatión en medio ácido (Figura 6) que reacciona con otra molécula de flavanol o con cualquier otra molécula presente en el medio. Estas reacciones tienen carácter reversible por tanto las moléculas van reaccionando siguiendo el mismo mecanismo y llevando a cabo un proceso de ruptura y recombinación que a largo del tiempo produce un incremento de la polimerización. (Ribéreau-Gayon y col., 2003<sub>a</sub>) Este proceso no requiere de la presencia de oxígeno por lo que puede ocurrir tanto en cuba, en bodega o en botella.

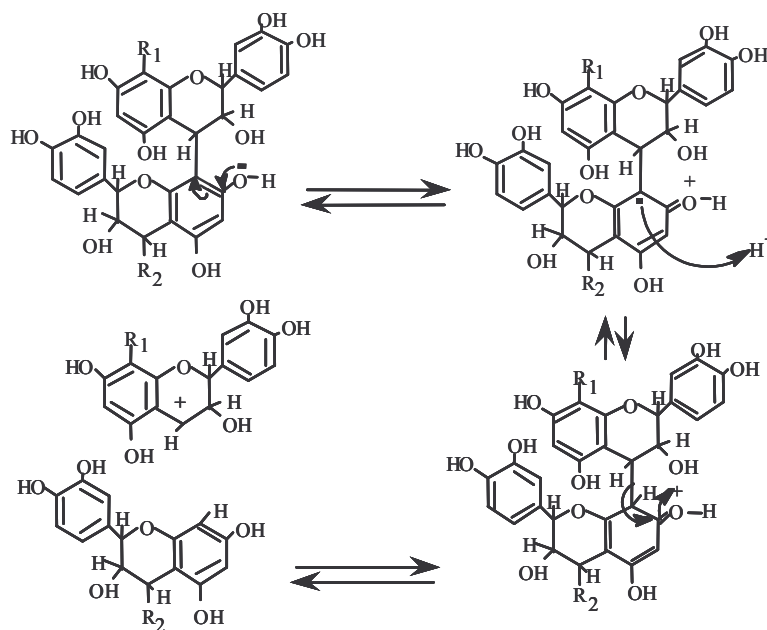


Figura 6: Formación del carbocatión en medio ácido. (extraído de Zamora, 2003)

La polimerización lineal de las procianidinas dará lugar a vinos con tonalidades más amarillas, más astringentes y menos amargos (Arnold y col., 1980). No obstante el incremento de la polimerización conduce a moléculas menos solubles que tienden a precipitar.

- La formación de polímeros con la participación del oxígeno como sustrato en presencia de hierro o cobre como catalizadores. Consiste en la formación de una semiquinona, que formará un enlace estable mediante un mecanismo de tipo radicalario, dando lugar a la unión colateral de dos moléculas de procianidinas (Figura 7).

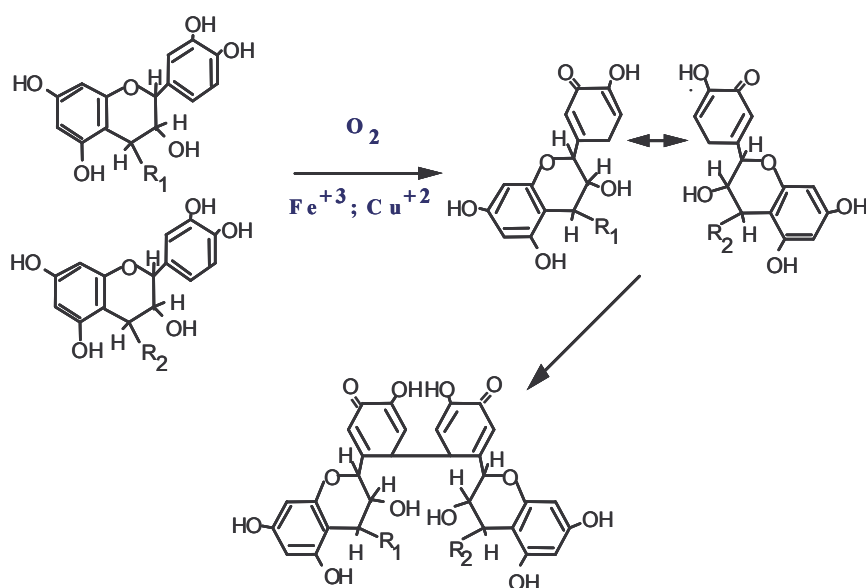


Figura 7: Polimerización de procianidinas mediante la formación de semiquinonas. (extraído de Zamora, 2003)

- Otro mecanismo de polimerización de las procianidinas proviene de la participación del etanal activado (Figura 8). Este carbocatión se produce al oxidarse el etanol en presencia de cationes de hierro o cobre en medio ácido. El etanal activado actúa uniendo dos moléculas de flavanol mediante puente etilo. Estas uniones pueden también romperse, dejando libres moléculas flavanol-etilo que a su vez, podrán reaccionar con otra molécula de flavanol. También este mecanismo, con el tiempo, traerá la formación de grandes polímeros de uniones colaterales.

Se ha descrito que el mecanismo de polimerización mediante el etanal compite con la formación de ácido glioxílico como intermediario muy reactivo con los flavanoles, a partir de la oxidación del ácido tartárico en presencia de hierro como catalizador (Fulcrand y col., 1997). Esta reacción ocurre en presencia de monómeros de catequina y/o epicatequina dando lugar a compuestos de color amarillo llamados sales de xantilio. Muchas estructuras de sales de xantilio y sus derivados se han identificado y caracterizado: NJ2, etil NJ3, metil NJ3, NR1, NR2. Se plantea que la reacción mediada por acetaldehído será más rápida y ocurrirá en mayor proporción que la mediada por ácido glioxílico, por lo que se formarán mayor cantidad de polímeros de



color rojo, o no coloreado, que de color amarillo (Es- Safi y col., 1999, 2000<sub>a,b</sub>, 2002).

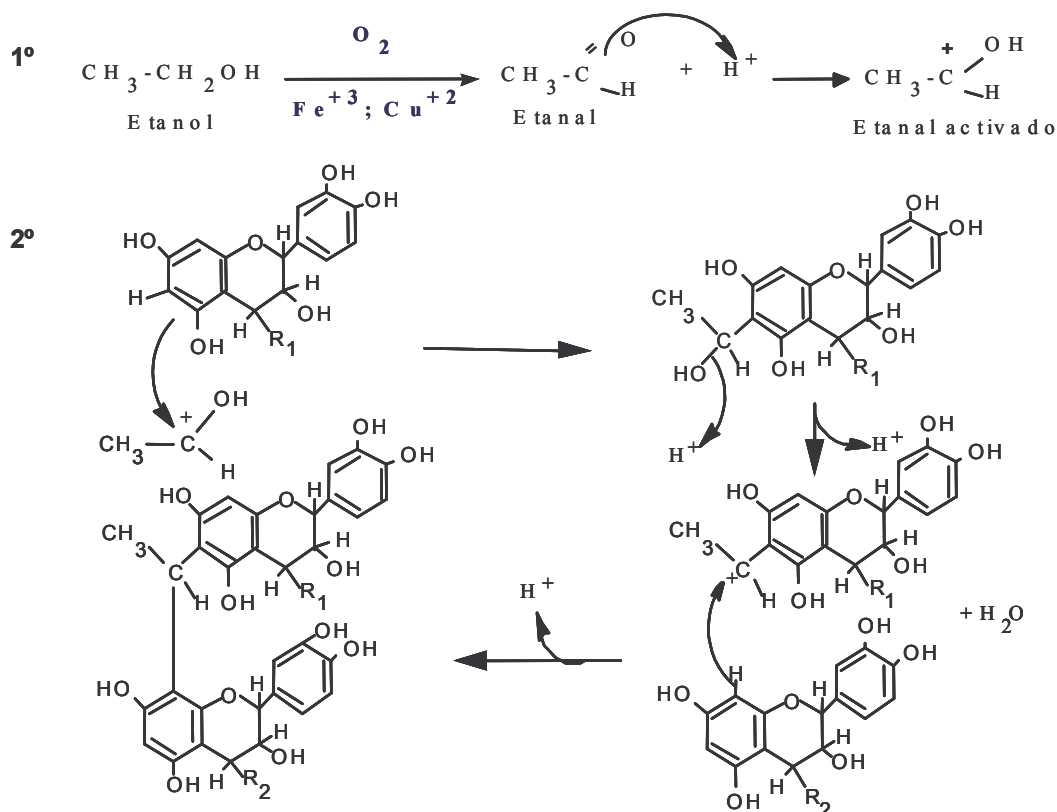


Figura 8: Polimerización de las procianidinas por medio del etanal. (extraído de Zamora, 2003)

Las uniones colaterales ocurren en el vino cuando existe contacto con el aire, es decir, durante trasiegos, o a través de las duelas de la barrica durante la crianza, o durante la microoxigenación. Según algunos autores, las uniones colaterales permiten la polimerización cruzada, puesto que una procianidinas polimerizadas de forma lineal, formando macromoléculas que por su configuración espacial evitan la interacción de los grupos OH con las proteínas con lo cual disminuyen la astringencia de los vinos. También en este caso, si la polimerización es muy alta, las macromoléculas precipitarán (Galvin, 1993).

Actualmente las investigaciones se encaminan a conocer la estructura y especialmente el grado de polimerización (DPM) de las procianidinas. Para conocer el DPM de las procianidinas se utilizan tanto métodos colorimétricos como el Índice DMACH (Nagel y col., 1991) o el ensayo de la vainillina (Sun y col., 1998) como cromatografía líquida (Ricardo da Silva y col. 1991<sub>a</sub>; Rigaud y col 1993; Yanagida y col. 2003), ó ruptura de los polímeros mediante tiólisis o catálisis ácida para luego analizar por HPLC y espectrofotometría de masas los aductos resultantes (Souquet y col 1996; Saucier y col 2001; Kennedy y col. 2001; Alcalde Eon y col., 2004).

Las procianidinas también pueden formar complejos con proteínas, péptidos, polisacáridos y antocianos. De estos complejos trataremos más detalladamente en los apartados dedicados a combinaciones antocianos-flavanoles, la astringencia, crianza en barrica y microoxigenación.

### 1.2.4. Antocianos

Los Antocianos (del griego *anthos* flor y *kyanos* azul) son compuestos solubles en agua, responsables del color de frutas, vegetales y flores. Están presentes en la piel de las uvas tintas y otorgan el color a los vinos tintos y rosados.

Su estructura (Figura 9) comprende dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado, insaturado y catiónico, el catión flavilio, que deriva del núcleo 2- fenil benzopirilio (Ribéreau-Gayon y col., 2003<sub>a</sub>).

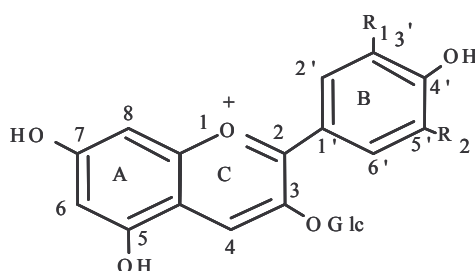


Figura 9: Estructura química básica de los antocianos

Se distinguen en la uva y el vino, según la sustitución del núcleo lateral, cinco moléculas definidas con dos o tres sustituyentes (OH y OCH<sub>3</sub>). Estas agliconas son la Cianidina, la Peonidina, la Delfinidina, la Petunidina y la Malvidina. (Tabla 1).

Principales Agliconas	R1	R2	3-Monoglucósidos	Esteres de los ácidos		
				Acético	Cumárico	Caféico
Cianidina	OH	H	-----Presentes en <i>Vitis</i> -----			NO
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	-----Presentes en <i>Vitis</i> -----			
Delfinidina	OH	OH	-----Presentes en <i>Vitis</i> -----			NO
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	-----Presentes en <i>Vitis</i> -----			NO
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	-----Presentes en <i>Vitis</i> -----			

Tabla 1: Antocianos presentes en la uva y el vino.

Los antocianos presentan color y se encuentran solo en la piel de la uva, excepto en las variedades tintoreras que parecen también en la pulpa del grano de uva. En *Vitis vinifera* los encontramos en forma de monoglucósidos en la posición C<sub>3</sub>. Generalmente, la malvidina es el antociano mayoritario en la uva. La glucosa puede encontrarse acilada, es decir esterificada en posición C<sub>6</sub> con otros ácidos, principalmente acético, p-cumárico, y caféico.

Los antocianos presentan un equilibrio en función del pH entre diferentes formas químicas (Figura 10). A pH muy ácido la forma mayoritaria es el catión flavilio o forma A<sup>+</sup> que presenta coloración roja y, a medida que el pH del medio aumenta, el catión flavilio se transforma en base quinona o forma AO de color violáceo o en la

forma AOH o carbinol que es incolora. Ambas reacciones ocurren simultáneamente de acuerdo con las constantes de equilibrio. Por otra parte la forma AOH, a temperaturas elevadas, puede transformarse en las calconas cis y trans de ligero color amarillo. La forma trans puede oxidarse a ácidos fenólicos con la pérdida irreversible del color (Brouillard, 1982; Glories, 1984<sub>a</sub>; Furtado y col., 1993).

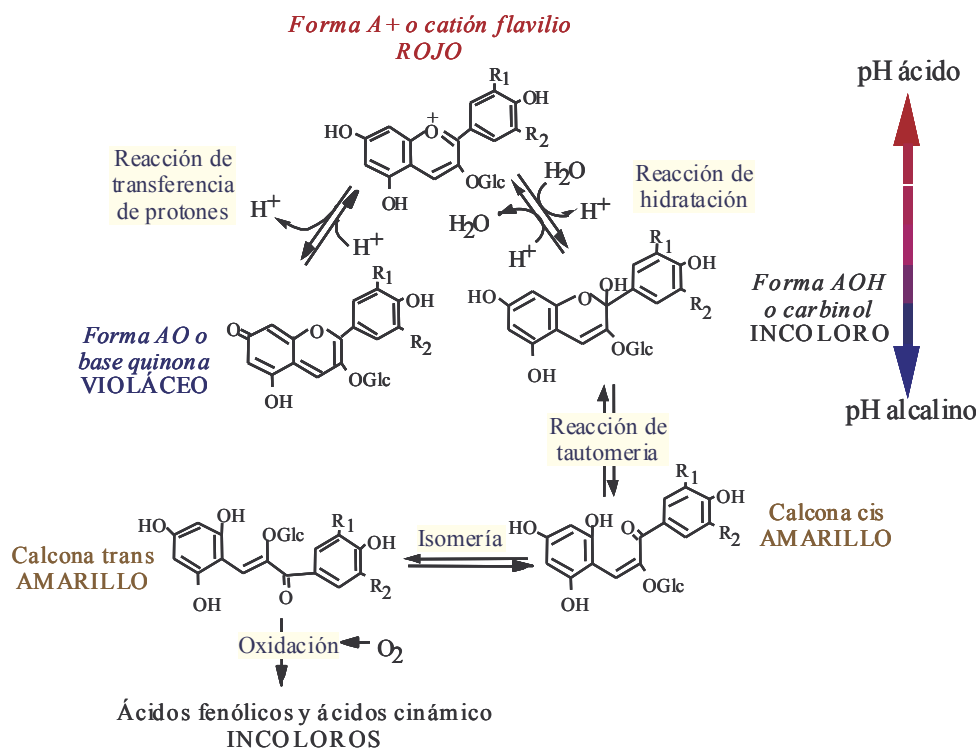


Figura 10: Equilibrio de los antocianos en función del pH. (extraído de Zamora, 2003)

Al pH del vino tinto (3,5 - 4,1) podemos decir que existe un equilibrio entre las formas rojas, incoloras y azules de los antocianos, contribuyendo al color entre un 20- 30% de los antocianos. No obstante, la estabilidad de los antocianos no solo está amenazada por los cambios de pH y temperatura, sino también depende de la estructura y concentración de los mismos, así como, de la presencia de agentes con los que combinarse (Bakowska, 2003). Básicamente hay tres fenómenos que modifican este equilibrio: la copigmentación, la existencia de antocianos oligoméricos y las combinaciones de los antocianos con los flavanoles. Estos fenómenos, de los cuales se hablará en los puntos 1.3, 1.4 y 1.5 de este capítulo, modificarán la intensidad y la tonalidad de los vinos tintos.

### 1.3. La copigmentación

El fenómeno de copigmentación de antocianos se considera uno de los principales mecanismos de estabilización del color. Se fundamenta en que las moléculas de antocianos son planas y pueden formar asociaciones, mediante uniones de tipo débil (interacciones hidrofóbicas o de tipo Van der Waals), entre ellas o con otras

moléculas denominadas copigmentos dando lugar a estructuras en forma de sándwich. Estas estructuras generan un entorno hidrofóbico que, si se incrementa el pH, impiden el acceso de las moléculas de agua a los cationes flavilio de los antocianos. De este modo se protegen las moléculas de antocianos de la transformación en carbinol, y por tanto de la decoloración.

Tanto el copigmento como la estructura y concentración del antociano son esenciales para describir los cambios de color ya sea por cambios en la intensidad colorante o en la tonalidad (Bultón, 2001). La estructura del antociano formará copigmentos más estables a mayor grado de glicosilación, y de acilación.

En el proceso de copigmentación intervienen diversos copigmentos o cofactores como son los ácidos fenoles, derivados de flavonoles, flavonas, flavonoides, polisacáridos y aminoácidos, así como otras moléculas de antocianos (Torskangerpoll y col., 2005). Los Flavonoles forman los principales copigmentos, otros como los flavan-3-ols son menos efectivos pero son los que se encuentran en mayor proporción en los vinos, excepto la (-) epicatequina que por su estructura prácticamente plana forma copigmentos con los antocianos con gran facilidad (Hermosín y col., 2005).

La estabilidad de los copigmentos también dependerá del aumento de la temperatura. Temperaturas elevadas en el vino, rompen las interacciones hidrofóbicas y por tanto los copigmentos. Entonces los antocianos desprotegidos se hidratarán y pasarán a la forma carbinol con la consiguiente decoloración.

La copigmentación disminuirá la magnitud de su efecto a medida que vaya acumulándose el etanol en el mosto/vino y disminuyendo la concentración de agua durante la fermentación (Canals y col., 2005). En vinos jóvenes la copigmentación envuelve prácticamente a la mitad de los antocianos, protegiéndolos ante la adición de bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) y los cambios de pH. En vinos equilibrados llevados a crianza la copigmentación protegerá a los antocianos de la oxidación.

Desde el punto de vista organoléptico, la copigmentación permite mayor color lo cual se traduce en mayor calidad de los vinos.

#### **1.4. Antocianos Oligoméricos**

Los antocianos oligoméricos son estructuras evidenciadas recientemente mediante las técnicas de espectrofotometría de masas. Estos compuestos provienen de las vacuolas de la piel de la uva, aunque cabe la posibilidad de que puedan también formarse durante la fermentación y crianza. Se proponen dos mecanismos para la formación (aún no definidos rigurosamente) similares a los mecanismos de formación de las procianidinas: el tipo A de uniones C-C y uniones éter donde el antociano terminal estará en forma Flavan y Tipo B de uniones C-C en la que el antociano terminal estará en forma Flavene (Monagas y col., 2005).

Los antocianos oligoméricos absorben a 520 nm, son resistente a la decoloración con sulfuroso de manera similar a los piranoantocianos y a la catálisis ácida de manera similar a la resistencia que muestran las procianidinas tipo B, los dímeros

antocianos-flavanol con uniones tipo A y los dímeros procianidinas-antocianos con uniones tipo B (Asenstorfer y col., 2001; Monagas y col., 2005).

Se sugiere que en el vino interaccionan los antocianos oligoméricos, procedentes de las vacuolas de la piel, con los flavanoles formando aductos Antociano-Flavanol. (Vidal y col., 2004<sub>a</sub>)

## **1.5. Combinaciones Antocianos - Flavanoles y Nuevos pigmentos.**

Los antocianos se combinan con los flavanoles para dar lugar a estructuras más estables. Se describen diferentes mecanismos de unión. Siendo unos mediante uniones directas y otros mediante uniones por puente etilo.

### **1.5.1. Uniones directas.**

Las uniones directas pueden ser de dos formas:

- **Antociano-Flavanol:** Por adición nucleofílica de una forma flavilio de antociano a un flavanol para dar lugar a una unión Antociano-Flavanol incolora que se oxidará a una forma flavilio combinado de color rojo que se mantendrá en equilibrio en función del pH con su forma incolora carbinol combinada, o su forma quinona combinada de color malva. También la forma flavilio combinada puede reestructurarse y formar iones xantilio de color amarillo (Remy Tanneau y col., 2003). Estas reacciones requieren de la presencia de oxígeno por lo que se plantea que tenga lugar durante la crianza en barricas o la microoxigenación.
- **Flavanol-Antociano:** Se basa en que las procianidinas, y no los monómeros, tienen la capacidad de formar carbocatión (Haslam, 1977; Quintana, 2001). Este carbocatión actuaría como electrófilo atacando los C<sub>6</sub> y C<sub>8</sub> del antociano en forma carbinol, esto formaría una unión Flavanol-Antociano incolora que, en función del pH, establecerá equilibrio con su correspondiente forma coloreada. Este mecanismo no requiere del oxígeno por lo que puede ocurrir en cuba o en botella (Ribéreau- Gayon y col., 2003<sub>a</sub>).

Los mecanismos de uniones directas son motivo de estudio, pues los productos de estas reacciones son responsables del cambio de coloración de los vinos jóvenes con la crianza a tonalidades rojas- anaranjadas, siendo menos sensibles a los cambios de pH y a la decoloración por sulfuroso. Recientemente se ha demostrado la existencia de este tipo de reacción en vinos y su correspondiente simulación en solución sintética (Remy y col., 2000; Salas y col., 2004)

### **1.5.2. Uniones por Puente Etilo.**

La adición mediante puente etilo es un mecanismo similar al planteado en la formación de las procianidinas y se plantean dos mecanismos posibles:

- El antociano en su forma flavilio reacciona primero con el etanal, posteriormente el carbocatión formado reacciona con el flavanol (Dournel, 1985).
- El flavanol reacciona con el etanal activado, posteriormente se une a la molécula de antociano (Timberlake y Bridle, 1976).

Los dos mecanismos de reacción tendrán lugar en el vino de forma simultánea, al tiempo que se produce la polimerización de las procianidinas mediadas por etanal, por lo que estas reacciones compiten entre ellas. También los antocianos podrán reaccionar con moléculas de flavanol-etilo (vinilflavanol), procedentes de la depolimerización de los polímeros de flavanol. (Rivas- Gonzalo y col., 1995)

La disponibilidad de etanal depende, durante la fermentación alcohólica, del metabolismo de las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* produce en su citoplasma acetaldehído durante el catabolismo de los azúcares (Morata y col., 2003). Una vez acabada la fermentación alcohólica, la disponibilidad de etanal dependerá de la presencia de oxígeno. La crianza en barrica y/o la microoxigenación, permiten una oxigenación moderada que favorece la presencia de suficiente etanal. Por el contrario, un exceso de aireación provocaría la aparición de mucho etanal que llevará a la polimerización exagerada de los flavanoles y a su precipitación. Además se oxidarán antocianos libres.

La estabilidad de las uniones Antociano-Flavanol por puentes etilo es muy discutida. Algunos autores plantean que son muy estables y que es uno de los mecanismos que ayudan a la evolución del color durante la crianza (Ribéreau-Gayon y col., 2003<sub>b</sub>) otros, en cambio, plantean que estas uniones son inestables y que conducen a la continua reestructuración de los compuestos formados (Escribano- Bailón y col., 2001).

### **1.5.3. Nuevos Pigmentos.**

En la descripción de las uniones que tienen lugar entre antocianos y flavanoles se han ido sumando nuevos pigmentos derivados de antocianos. Entre ellos se encuentran los piranoantocianos o vitisinas, que contribuyen al color rojo anaranjado de los vinos de crianza y a la resistencia a la decoloración por sulfuroso. Estos pigmentos se forman por un mecanismo cicloadición (Figura 12) que incorpora el ácido pirúvico, vinilflavanol, vinilfenol o acetaldehído al anillo flavilio del antociano, formándose un nuevo anillo condensado (Mateus y col., 2001). En los vinos se han detectado la carboxi-piruvato-malvidina-3-glucósido, llamada Vitisina A y sus derivados acilados 3-acetilvitisina A y 3 p-cumarilvitisina A, por cicloadición del ácido pirúvico; y la Vitisina B (4-vinil-malvidina-3 glucósido) y su derivado acetilado, que provienen de la cicloadición con acetaldehído (Mateus y col., 2002, 2003<sub>a</sub>; Salas y col., 2005). Actualmente se sintetizan muchos de estos nuevos pigmentos con vistas a estudiar sus características cromáticas, estabilidad y resistencia a la decoloración (Oliveira y col., 2006)

En los vinos de Oporto se han detectado numerosos nuevos pigmentos. En estos vinos se añade aguardiente para detener la fermentación cuando aún existe azúcar en

el medio. El aguardiente añadido contiene numerosos aldehídos que se suman a los aldehídos formados durante la fermentación alcohólica (Romero y Bakker, 2000). Así encontraremos, además del ácido pirúvico, el etanal y el ácido glioxílico (que también interviene en la formación de sales de xantilio), otros aldehídos como son el furfuralaldehído, hidroximetilfurfuralaldehído, isobutiraldehído, formaldehído y benzaldehído. Todos ellos contribuyen a la formación de nuevos pigmentos por interacción de los antocianos y procianidinas, llamados antocianos-alquil/aryl-flavanol (Pissarra y col., 2004<sub>a, b</sub>).

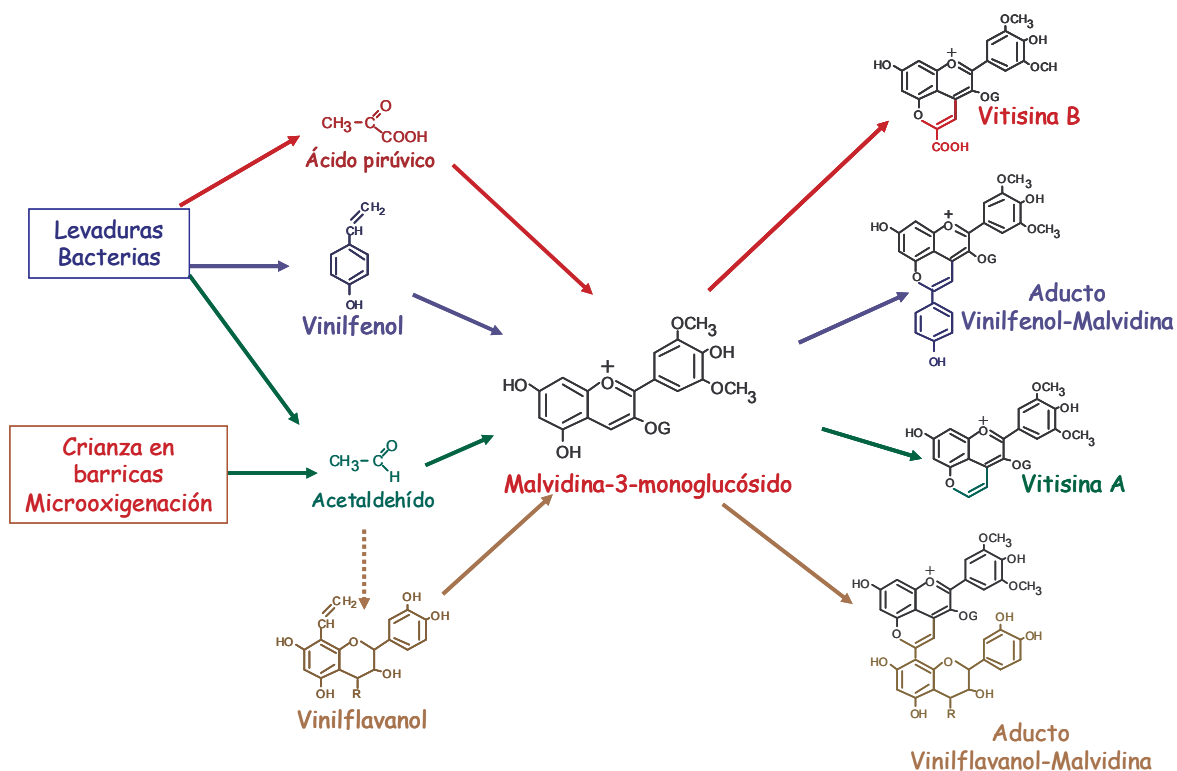


Figura 11: Posibles mecanismos de formación de piranoantocianos (extraído de Zamora, 2004)

También han sido descritos otros nuevos de pigmentos derivados de antociano de color azul, llamados vinil-pirano-antocianos-flavanol, que se forman al unirse un aducto de piranoantociano a un aducto de vinilflavanol, (Mateus y col., 2003<sub>b</sub>). Mediante un mecanismo similar se describe la formación de la vinil-pirano-malvidina-3-O-glucosa fenol, de color púrpura en medio ácido (Mateus y col., 2005).

Otras nuevas estructuras llamadas oaklinas se han detectado en vinos de crianza, como resultado del contacto del vino con la madera de roble. En este caso los aldehídos cinámicos extraíbles procedentes de la madera (coniferaldehído y sinapaldehído) pueden interaccionar con las catequinas y/o los antocianos del vino. Específicamente se ha descrito la formación de derivados catequinpirilium, pigmentos rojo-anaranjado que contribuyen a los cambios de color durante la crianza (de Freitas y col., 2004; Sousa y col., 2005).

---

*Capítulo I. Introducción*

---

En general, todos estos mecanismos convierten los antocianos y flavanoles extraídos de la uva en nuevos compuestos que contribuyen a la evolución y estabilización del color del vino de crianza.



## 2. EL COLOR DEL VINO TINTO

El color es la carta de presentación de un vino tinto. Observándolo obtenemos información sobre su edad y estado de conservación. La intensidad color, aun no siendo un criterio absoluto de calidad, nos revela detalles de la estructura, cuerpo del vino y sabor en boca. El color va unido a sensaciones gustativas y táctiles (Cacho, 2003).

El color de los vinos está determinado por su composición fenólica. En el apartado 1 hemos descrito de manera general como intervienen los compuestos fenólicos de la uva en la composición de los vinos. La intervención de los compuestos fenólicos estará condicionada por numerosos factores como son la edad del vino, que se detallan en el apartado 5 referente a crianza y envejecimiento; la copigmentación, proceso que hemos descrito anteriormente; el pH y la utilización del dióxido de azufre.

- **pH**

El vino tinto presenta pHs comprendidos entre 3 y 4 por lo que hay un equilibrio entre las formas rojas, incoloras y azules de los antocianos. Cuanto más ácido sea un vino más predominará el color rojo por el desplazamiento del equilibrio a la forma flavilio de los antocianos libres (Heredia y col., 1998, Ribéreau-Gayon y col., 2003<sub>a</sub>).

Un pH bajo favorece la protonización del acetaldehído para formar el etanal activado que permite la formación de procianidinas y la combinación de moléculas de procianidinas y/o flavanoles con los diferentes antocianos presentes en el medio (Bakker, 1993; Vivas y col., 2004).

Las combinaciones de antocianos-flavanoles, así como los pigmentos derivados de antocianos, son mucho más estables a pequeñas variaciones de pH que los antocianos libres (Sarni-Manchado y col., 1996; Garcia-Viguera y col., 1994; Escribano-Bailón y col., 1999). Por otra parte, las combinaciones entre antocianos y procianidinas evitan la formación de grandes polímeros de flavanol que presentan tonalidades amarillas y tienen tendencia a la precipitación (Cheynier y col., 2000; Ribéreau-Gayon y col., 2003<sub>a</sub>).

- **Utilización del dióxido de azufre.**

El dióxido de azufre en los vinos tiene un importante papel como agente antimicrobiano, antioxidásico y antioxidante. Antimicrobiano, para inhibir bacterias lácticas, bacterias acéticas y levaduras salvajes no-*Saccharomyces* que presentes, tanto en el mosto como en los equipos de la bodega, pueden deteriorar fácilmente el vino (Lafon-Lafourcade y col., 1974; Beech y col., 1979). Antioxidásico para inhibir las enzimas polifenoloxidasas, que pueden degradar notablemente el color del vino tinto (Sayavedra-Soto y col., 1986). Y antioxidante por su capacidad de combinarse con el oxígeno protegiendo de este modo al vino (Poulton, 1970).

La aplicación del SO<sub>2</sub> depende del pH del vino, que definirá la proporción entre SO<sub>2</sub> molecular, el HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el sulfito (SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>). Las fluctuaciones en los intervalos de pH

del vino no afectarán la formación de grandes cantidades de  $\text{HSO}_3^-$  y muy pequeñas cantidades de  $\text{SO}_3^{-2}$ , pero si la formación del  $\text{SO}_2$  molecular que es el responsable de la actividad antimicrobiana.

Otro aspecto a señalar es que el  $\text{HSO}_3^-$  se combina con el etanal. Esto traerá como consecuencia la formación, por una parte, del anhídrido sulfuroso combinado que carece de efectos antioxidasicos y antioxidantes y muy poco efecto antimicrobiano. (Delteil, 2000<sub>a</sub>). Por otra parte, la combinación con etanal hace que disminuya la disponibilidad del etanal para formar puentes etilo y por tanto, disminuyan las combinaciones entre antocianos y flavanoles y polimerización de flavanoles. Esto afectaría el vino tanto desde el punto de vista de la estabilidad del color como a nivel sensorial (Zamora, 2005<sub>a</sub>).

En presencia de  $\text{HSO}_3^-$  las soluciones de antocianos quedan fuertemente descoloridas, porque el  $\text{HSO}_3^-$  reacciona con el catión flavilio de forma análoga a la reacción de hidratación formando un producto incoloro (Figura 12). Un vino equilibrado y rico en combinaciones estará mucho más protegido de la decoloración por  $\text{SO}_2$  y cambios de pH. (Vivas y col., 2004).

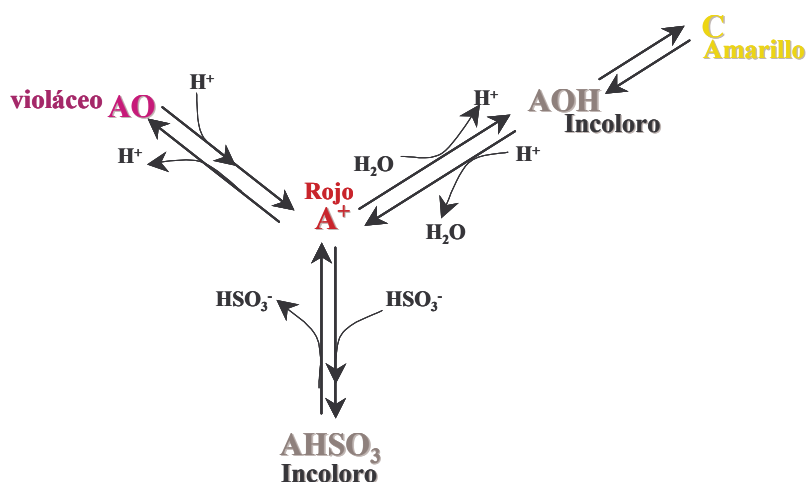


Figura 12: Decoloración de los antocianos bajo el efecto del pH y la aplicación de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . (extraído de Ribéreau Gayon, 2003)

Otros trabajos apuntan a que la dosis de  $\text{SO}_2$  ha de ser acorde con el pH del vino, pero también con las condiciones de almacenaje de los mismos (temperaturas aproximadas de  $20^\circ\text{C}$ ) para evitar el pardeamiento y aromas con notas de sulfuroso (Sims y Morris, 1994; Bakker y col., 1998). Por lo tanto, los niveles de  $\text{SO}_2$  libre influyen sobre el color del vino y debería tenerse en consideración cuando se evalúa este parámetro.

## 2.1. Métodos de medida del color del vino

El color del vino es la característica más inmediata que reconoce el consumidor y representa el elemento que, muchas veces, define la aceptación del vino a ingerir. Es

de gran ayuda para los enólogos definir de manera objetiva el color de vino y valorarlo según sus componentes.

Desde el punto de vista físico el color resulta de la absorción selectiva de ciertas radiaciones elementales que constituyen el espectro visible. La Figura 13 proporciona una correspondencia aproximada entre la longitud de onda de las radiaciones absorbidas y el color aparente.

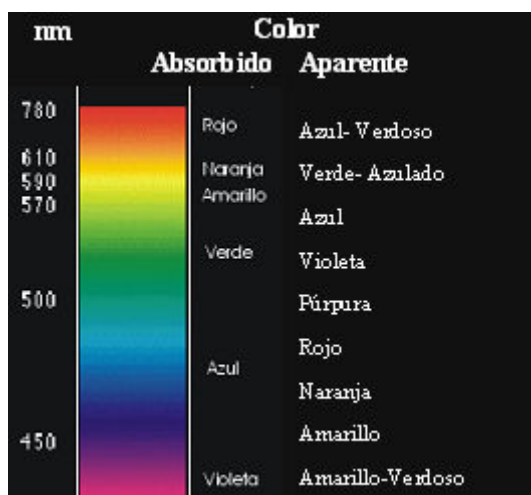


Figura 13: Correspondencia aproximada entre la longitud de onda absorbida y el color aparente.

En Enología se utilizan tres métodos totalmente instrumentales para “medir” objetivamente el color del vino. Estas metodologías son el Método Glories, El Método CIE, y el Método CIELAB.

- **Método desarrollado por el Profesor Glories.**

Glories en 1984<sup>(b)</sup>, a partir de trabajos previos de Sudraud (1958), desarrolló fórmulas simples donde, utilizando las absorbancia a 420, 520 y 620 nm del vino centrifugado y sin diluir, se podían obtener parámetros de color (Intensidad colorante, los porcentajes de rojo, azul y amarillo y la tonalidad). Es necesario tener en cuenta que se ha de utilizar la cubeta de 1 mm de camino óptico y se multiplicarán por 10 los resultados.

$$\text{Intensidad Colorante (IC)} = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$\text{Tonalidad (T)} = (A_{420} / A_{520}) \times 100$$

$$\% \text{ Amarillo} = (A_{420} / \text{IC}) \times 100$$

$$\% \text{ Rojo} = (A_{520} / \text{IC}) \times 100$$

$$\% \text{ Azul} = (A_{620} / \text{IC}) \times 100$$

- **Método CIE**

En 1931, CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*) desarrolló un sistema para especificar los estímulos cromáticos basándose en valores triestímulos de tres primarios imaginarios. Estos se definieron como **X** (rojo virtual), **Y** (verde virtual) y **Z** (azul virtual). También se definieron las características de los iluminantes y las condiciones de observación. El iluminante usado en enología es el D65 y las condiciones de observación son las de 10° de ángulo visual como se definió por la CIE en 1964.

Las coordenadas **X**, **Y**, **Z** representan la proporción relativa de cada color para reproducir el color concreto del objeto analizado en el ojo del observador. La CIE aconseja hacer un barrido a intervalos de 10 nm de la totalidad del espectro. No obstante, la OIV, basado en el método de la CIE pero intentando buscar una forma más sencilla y que se ajustase a los espectrofotómetros sin barrido que se utilizan en muchas bodegas, utiliza cuatro medidas de transmisión, en cubeta de 2 mm, para calcular los valores triestímulos del color y con ello las coordenadas cromáticas en el espacio CIE (Perez- Caballero y col., 2003).

$$X = 19,7171 T_{450} + 1,884 T_{520} + 42,539 T_{570} + 32,474 T_{630} - 1,841$$

$$Y = 7,950 T_{450} + 34,764 T_{520} + 42,736 T_{570} + 15,759 T_{630} - 1,180$$

$$Z = 103,518 T_{450} + 4,190 T_{520} + 0,251 T_{570} + 1,831 T_{630} + 0,818$$

Existen dificultades en la especificación de colores en términos de valores triestímulos y espacio cromático, dado que esta especificación de los colores no es fácilmente interpretable en términos de dimensiones psicofísicas de percepción del color; es decir, brillo, tono y coloración. Además el sistema XYZ y los diagramas de cromaticidad asociados no son uniformes, lo cual dificulta el cálculo de las diferencias entre dos estímulos de color.

La necesidad de un espacio de color uniforme condujo a la transformación de una serie de transformaciones no lineales del espacio CIE xyz que concluyeron en la especificación concreta de una de estas transformaciones conocidas como espacio de color CIE ( $L^* a^* b^*$ ) definido por la CIE en 1976 (Negueruela, 1999).

- **Método CIELAB**

El espacio CIELAB, como se muestra en la Figura 14, permite especificar estímulos de color en un espacio tridimensional.

El eje  $L^*$  es el de claridad y va de 0 (negro) a 100 (blanco). Los otros dos ejes de coordenadas son  $a^*$  y  $b^*$ , y representan variación entre rojizo-verdoso, y amarillento-azulado, respectivamente. Aquellos casos en los que  $a^* = b^* = 0$  son acromáticos; por eso el eje  $L^*$  representa la escala cromática de grises que va de blanco a negro.

Las proporciones de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (utilizando el iluminante D65 y 10° de ángulo visual) se obtienen de los valores triestímulos de acuerdo con las siguientes transformaciones:

$$L^* = 116(Y/100)^{1/3} - 16$$

$$a^* = 500[(X/94,825)^{1/3} - (Y/100)^{1/3}]$$

$$b^* = 200[(Y/100)^{1/3} - (Z/107,383)^{1/3}]$$

Para simplificar aún más la expresión del color y correlacionarla mejor con la respuesta visual, el CIELAB establece las coordenadas esféricas C\*(croma) y H\*(tono). Estas se calculan a partir de las coordenadas a\* y b\*:

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \qquad H^* = \arctg(b^*/a^*)$$

La diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) entre dos vinos (1 y 2) se calcula utilizando la expresión:

$$\Delta E_{1,2}^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Donde,  $\Delta L^* = (L^*_1 - L^*_2)$ , y  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  se definen similarmente.

Se plantea que las diferencias de color entre dos copas de cristal que contienen dos vinos diferentes sólo son percibidas por el ojo humano si el  $\Delta E_{1,2}^*$  tiene un valor mayor de 5 unidades (Pérez-Magariño y González-SanJosé, 2003<sub>a</sub>).

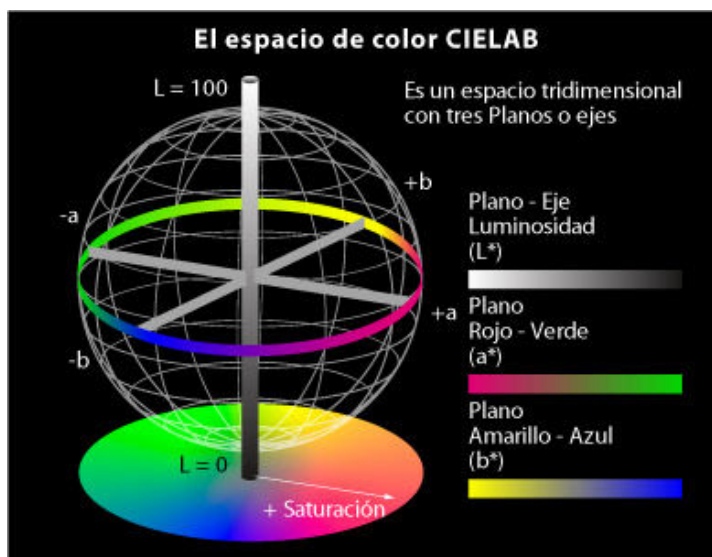


Figura 14: Coordenadas cromáticas. Espacio CIELAB

El uso de las coordenadas cromáticas y el espacio CIELAB permiten una definición más precisa del color del vino. Aún así la aplicación de este método en bodega se ha visto frenada por la complejidad del cálculo y la dificultad de relacionar las coordenadas cromáticas con la calidad del vino.

Numerosas investigaciones en el mundo de la enología se encaminan a intentar que con el uso de pocos valores de absorbancia y con espectrofotómetros simples se

---

*Capítulo I. Introducción*

---

pueda estimar de modo fiable el color en términos CIELAB. Así como, comprobar la estrecha correlación existente entre el CIELAB y el Método Glories, más usado en bodega (Bakker y Arnold, 1993; Ayala y col., 1999; Pérez- Magariño y González-SanJosé, 2003<sub>a</sub>). En este sentido, el Grupo de Color de la Universidad de La Rioja ha desarrollado el programa **MSCV**. Este es un programa para Windows 95/98 y NT que calcula las coordenadas del color de vinos y brandies utilizando sólo 4 valores de absorbancia. Se puede descargar en la pagina web de la Universidad de la Rioja: [www.unirioja.es/dptos/dq/grupos/color/servicios.shtml](http://www.unirioja.es/dptos/dq/grupos/color/servicios.shtml).

### 3. LA ASTRINGENCIA

La astringencia es una sensación táctil descrita como la sequedad en boca, generada por la reducción de la lubricación en la cavidad bucal. La *American Society for Testing and Materials* definió en 1989 la astringencia como “un complejo de sensaciones de sequedad y aspereza en el epitelio por la exposición a sustancias como la alumbre o los taninos” (ASTM, 1989).

La astringencia, también se define como un complejo de sensaciones, las cuales se pueden sub-clasificar. Lee y Lawless (1991) utilizaron la discusión sensorial en grupos para definir terminologías relativas a la astringencia. Se establecieron así varios términos para describir las sensaciones obtenidas al degustar el alumbre, el ácido tánico y el ácido tartárico. Los términos incluidos fueron: sequedad, aspereza y rugosidad. También se utilizan términos como intensidad y persistencia para definir aspectos relacionados al término astringencia.

La percepción de astringencia es determinante para la aceptación de muchos alimentos. En enología, es un elemento imprescindible en el análisis sensorial y define en gran medida la calidad del vino.

La sensación de astringencia es un proceso sumamente dinámico y va cambiando continuamente durante la ingestión y sobre todo después de tragar o expectorar (Noble, 1995). También aumenta con la ingestión repetida, incrementándose si se acorta el tiempo entre ingestiones. El aumento de la astringencia con la ingestión repetida permanece inalterado cuando se permite “descansar” la mucosa bucal, generalmente utilizando el sistema de enjuagues durante 5–10 segundos con agua, pectina, etc. (Colonia y col., 2004). Esto demuestra la necesidad de diseños cuidadosos del análisis sensorial debido a los posibles efectos de desgaste en los catadores. (Valentova y col., 2002).

La astringencia en los vinos tintos puede manifestarse de modo severo o sutil. De aquí que los catadores deben estar entrenados para garantizar la reproducibilidad y poder distinguir intensidades entre los diferentes compuestos astringentes obtenidos de vinos tintos (Gawel y col., 2001). Los catadores experimentados usan términos descriptivos específicos para relacionar los diferentes matices percibidos de la sensación astringente. No obstante, la percepción de astringencia, como otros atributos sensoriales, varía enormemente entre individuos (Fischer y col., 1994).

El mecanismo de percepción de astringencia aún no está del todo dilucidado. Se ha descrito la posibilidad de que la sensación de astringencia sea una respuesta de los nervios gustativos (Suggs y Simon, 1992). También se ha definido como una sensación táctil inducida químicamente en áreas orales que carecen de receptores del gusto (Breslin y col., 1993). O específicamente una sensación táctil percibida por las papilas filiformes inervadas al nervio trigémino (Jackson, 1994). Dado que la sensación de astringencia no se limita a una región particular de la boca o la lengua, es percibida como un estímulo difuso, y requiere tiempo para su desarrollo. Generalmente se acepta que la sensación de astringencia se aprecia cuando proteínas lubricantes salivales precipitan como un complejo de tanino-proteína y se pierde el efecto lubricante. Es posible que la presencia de este precipitado sobre la lengua y el

paladar contribuya a la sensación de sequedad en toda la boca. Otra posibilidad consiste en que la fracción del material astringente que permanece en la solución contribuya a la sensación de amargor, al menos en algunos casos, al interactuar con receptores del gusto (Bate-Smith, 1973; Gawel, 1998; Prinz y Lucas, 2000).

Por una parte, la astringencia puede ser provocada por sustancias tan variadas como son los metales, (particularmente las sales de aluminio) agentes deshidratantes (etanol), ácidos minerales y orgánicos, azúcares y compuestos fenólicos. Aunque en los vinos tintos la sensación de astringencia estará marcada fundamentalmente por los compuestos fenólicos de cada vino en particular (Chung y col. 1998).

Por otra parte, la sensación astringencia que percibimos al degustar un vino es el resultado de la formación de complejos entre los polifenoles del vino y de un grupo de proteínas presentes en la saliva. Estas proteínas, principalmente las ricas en Prolina (PRP), pueden asociarse a los taninos mediante puentes hidrógenos e interacciones hidrofóbicas (Hagerman y Butler, 1980; Hagerman y col., 1998). Aunque también desaparece parte de la mucina de la mucosa oral, contribuyendo a la pérdida de la lubricación (Lyman y Green, 1990).

Dado que el trabajo realizado durante el período experimental se enmarca fundamentalmente en el estudio de la astringencia, antes de adentrarnos en los factores que puedan influir en la percepción de astringencia, describiremos más detenidamente las interacciones taninos- proteínas y las proteínas de la saliva.

### **3.1. Interacciones Taninos-Proteínas**

La naturaleza de las interacciones taninos-proteínas es objeto de numerosos estudios. En principio, pueden tener lugar mediante puentes hidrógenos, o interacciones hidrofóbicas, o enlaces covalentes (Haslam y col., 1991). Estas últimas interacciones se producen en proporciones muy pequeñas (Hagerman and Butler, 1978).

Las interacciones hidrofóbicas taninos-proteínas se han evidenciado usando taninos condensados y gelatina. La formación de los complejos taninos- proteínas crece con el aumento de la temperatura y la fuerza iónica (Oh y col., 1980). También se ha utilizado un tanino gálico, la pentagalolil glucosa (PGG) que precipita la seroalbúmina bovina (BSA) formando una capa hidrofóbica alrededor de la proteína (Hagerman y col., 1998). A nivel molecular se evidencian interacciones hidrofóbicas al hacer reaccionar péptidos derivados de Proteínas Ricas en Prolina (PRPs) de ratas con PGG, debido a la interacción de los grupos fenoles del tanino con el anillo pirrolidínico de la prolina en la proteína (Murray y col., 1994; Charlton y col. 2002).

Se plantea el efecto cooperativo entre las uniones mediante puentes hidrógenos e interacciones hidrofóbicas sugiriendo que, en el caso de las proteínas salivares ricas en prolina, la unión con los taninos resulta principalmente de las interacciones hidrofóbicas entre las dos estructuras planas y rígidas que constituyen el anillo de prolina y el núcleo aromático del tanino. Este efecto es reforzado por otras interacciones mediante puentes hidrógenos e hidrofóbicas con el carbonilo de la unión peptídica adyacente, muy buen aceptor de protones o con otros aminoácidos vecinos



que poseen, a la vez, una cadena lateral hidrófoba y un grupo terminal donante de protones (Hagerman and Klucker, 1986; Murray y col., 1994; Cheynier y col., 2000).

Hagerman y Butler (1981) mediante ensayos de competición demostraron que la habilidad de los taninos para precipitar proteínas, varía considerablemente. La mayor afinidad se encuentra en proteínas y polipéptidos con alto contenido de prolina, tales como las proteínas de la saliva. La afinidad es muy baja en proteínas globulares muy compactas como la lisozima, ribonucleasa A, mioglobina o el citocromo C; aumentando en proteínas globulares menos compactas como la BSA. En general, las proteínas precipitadas por taninos suelen ser de masa molecular elevada y presentan un alto contenido de prolina.

La capacidad de los taninos para precipitar proteínas depende de su peso molecular y de su flexibilidad. Esto se ha demostrado en numerosos estudios como el realizado en series de n- Galoil-D-Glucosa donde el incremento de grupos galoilados (n) aumenta la unión a BSA (Mc Manus y col., 1985). También Ricardo-da-Silva y colaboradores en 1991<sup>(b)</sup>, utilizaron dímeros y trímeros de procianidinas de semillas de uva, galoilados y no galoilados haciéndolos reaccionar con poli-L-prolinas, gelatinas, caseínas y arabinogalactano-proteínas procedentes de uvas. En general, con el grado de polimerización aumentó la formación de complejos taninos-proteínas, siendo las poli-L-prolinas las que presentaban mayor afinidad por las procianidinas. Los experimentos de Baxter y colaboradores en 1997 demostraron que la afinidad de interacciones de fragmentos de PRP con polifenoles aumenta con la complejidad del polifenol (Procianidina B-2 > PGG > trigaloil glucosa >> (-) epicatequina).

Se plantea que la formación de complejos taninos-proteínas son pH dependientes. La mayor formación de precipitados ocurrirá en la zona cercana al punto isoeléctrico de la proteína. Este fenómeno se atribuye a que en esta zona de pH decrece la repulsión electrostática de las moléculas de proteína (Hagerman y Butler, 1978, 1981). Los trabajos de Siebert y Lynn (2003) indican que el pH y el contenido de etanol en cervezas influye en la turbidez provocada por las interacciones taninos- proteínas y en el tamaño de las partículas formadas.

Estudios en BSA con fenoles simples y polifenoles (también ácido tánico) sugieren que los polifenoles son ligandos multivalentes con capacidad para reaccionar con dos o más moléculas de proteínas. La estequiometría y tamaño del complejo taninos-proteína formado depende de las concentraciones y los ratios de polifenol/ proteína. Mediante turbidimetría Mc Manus y colaboradores (1981) plantean tres hipótesis posibles:

- 1) Baja concentración de proteína: El polifenol se asocia a uno o más sitios de la proteína formando una capa con mayor o menos grado de hidrofobicidad que puede quedar como agregado o precipitar.
- 2) Alta concentración de proteína: Se forman enlaces cruzados entre polifenoles y varias moléculas de proteínas, precipitando.
- 3) Fenoles simples: Se unen varias moléculas a una misma proteína limitando la solubilidad de la misma.

Estas hipótesis han sido respaldadas por Hagerman y Robbins (1987) al adicionar BSA a concentraciones fijas de taninos y Siebert y Lynn (2000) en estudios realizados en cerveza.

Jöbs y colaboradores (2004) basados en estudios con  $\beta$  caseína bovina y EGCG plantean que los complejos se producen en tres fases:

Primero, cuando los polifenoles están a concentraciones bajas, se unen a diversos puntos de la proteína.

Segundo, al incrementar la cantidad de polifenoles, estos unirán mediante enlaces cruzados a diferentes proteínas.

Tercero, si el incremento de polifenoles es aun mayor, la agregación formará estructuras de gran tamaño que terminarán por precipitando.

Muchas de las interacciones taninos-proteínas son reversibles y se sugieren equilibrios entre los complejos solubles y los reactantes. Los complejos solubles pueden seguir incrementando su tamaño y precipitar. A muy altos o muy bajos ratios taninos/ proteínas la cantidad de precipitado puede disminuir. Otras interacciones que conducen a la precipitación se describen como reversibles (Luck y col., 1994). Este no es el caso de las uniones de proteínas de la saliva con taninos, que forman complejos insolubles y permanecen insolubles independientemente de la adición de más cantidad de proteínas (Poncet - Legrand y col. 2005).

### **3.2. Las Proteínas de la Saliva**

Muchos estudios hablan en general de las proteínas salivales al referirse al flujo o caudal de saliva, planteando que la intensidad máxima de acidez y el flujo salival disminuyen con el aumento del dulzor (concentración constante de ácido). Sugiriendo que los flujos salivales están dados tanto por el proceso de respuesta cognoscitiva del gusto, como por los estímulos de concentración (Bonnans y Noble, 1994).

En cuanto a la intensidad y persistencia de la astringencia se plantea que individuos con poco caudal de saliva perciben con mayor intensidad y duración la astringencia que los que poseen un flujo salival alto (Ishikawa y Noble, 1995). Los catadores que tienen altos caudales de saliva, experimentan primero la sensación amarga y la astringencia más tarde, a diferencia, de los catadores que tienen caudales inferiores de saliva (Fischer y col., 1994). Otros estudios utilizando alimentos demuestran que no hay diferencias de percepción entre hombres y mujeres, pero concluyen que existe correlación entre el flujo salival y la percepción de la textura (Guinard y col., 1997).

Las proteínas salivales se describen como familias de isoformas que desempeñan variadas funciones, y a la vez muchas de ellas redundan realizando la misma función. Dentro de las proteínas presentes en la saliva encontramos las histatinas, las estaterinas, la lisozima, las proteínas ricas en prolinas, amilasas, peroxidasa, lactoferrinas, mucinas e inmunoglobulinas de tipo A (Oppenheim y col., 1971;

Hatton y col., 1985; Iemura, 1983; Kauffman y col., 1979, 1986). En la bibliografía relacionada con el estudio de la saliva aparecen constantemente la identificación de nuevos péptidos o proteínas.

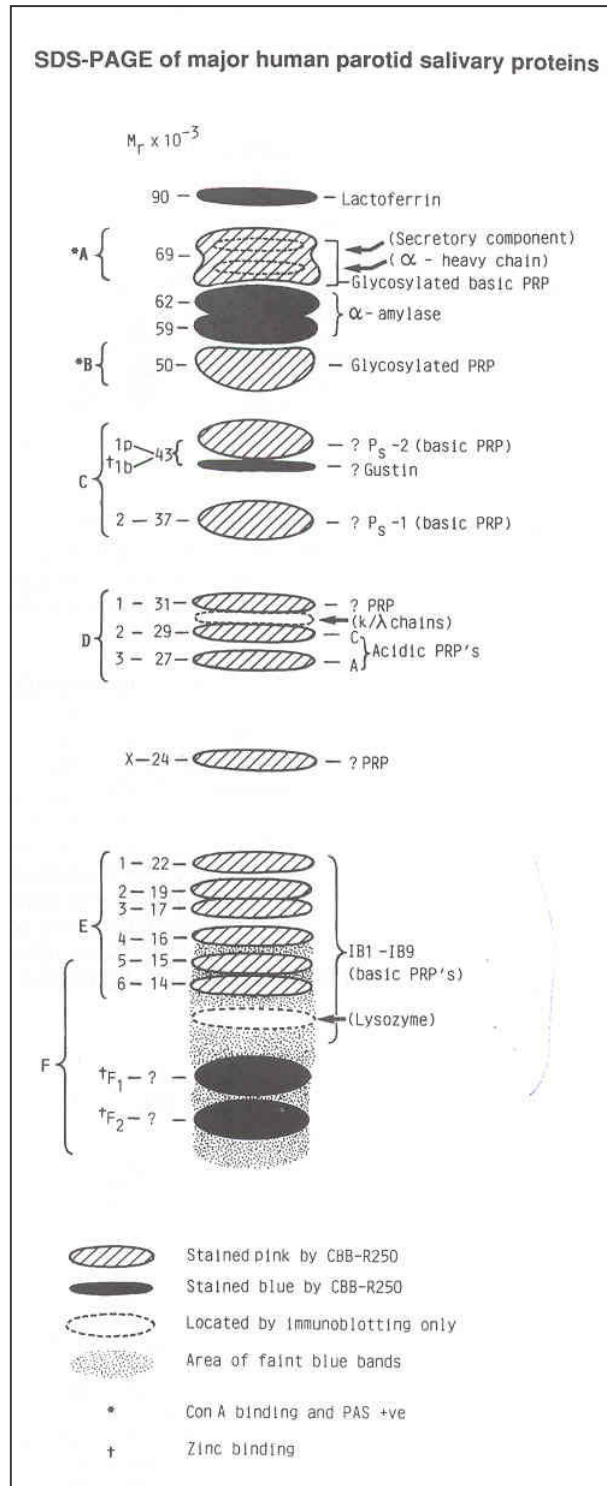


Figura 15: Migración de las proteínas salivales en SDS-PAGE. (extraído de Beeley y col. 1991)

*Capítulo I. Introducción*

Mediante técnicas de electroforesis se pueden visualizar las diferentes proteínas de la saliva. Entre los más usadas están los geles de poliacrilamidas desnaturizando la proteína con el uso del duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) con tinciones como azul de Coomassie R-250 (CBB), tinción de plata, tinción de Schiff o inmunoblotting (Steiner y Séller, 1868; Minagushi y Bennic. 1989; Beeley y col. 1991<sub>a</sub>, 1996; Van Seuningen y Davril, 1992, 1996; Schwartz y col., 1995; Banderas- Tarabay y col. 2002). En otros trabajos se utiliza la técnica de electroforesis nativa, isoelectroenfoque (IEF) o electroforesis en dos dimensionales (2-D) (Doerner y White, 1990; Beeley y col. 1991<sub>b</sub>; Beeley, 1993). En la Figura 15 se muestra un esquema representativo de la migración de las proteínas de la saliva en SDS- Page. Y en la Tabla 2, se observan las masas moleculares y los puntos isoeléctricos de las proteínas de la saliva según la bibliografía. En esta tabla también se puede apreciar la masa molecular y punto isoeléctrico de la ovoalbúmina, a fin de que el lector de este escrito tenga en una sola tabla el conjunto de proteínas que aparecerán a lo largo de este trabajo.

<b>Proteína</b>	<b>kDa</b>	<b>PI</b>	<b>Técnica</b>	<b>Bibliografía</b>
Mucina	100-200			
MG1	>200		SDS PAGE	Banderas-Tarabay y col., 2002
MG 2	110			
Lactoferrina	90-94		SDS PAGE	Beeley y col., 1991,96
	80			Schwartz y col., 1995
bPRP/ gPRP	69			Beeley y col., 1991,96
	66-45	>8	SDS PAGE	Schwartz y col., 1992
PRPbg 1/PRPbg 2	66-60			Carpenter y col., 1996
			SDS PAGE	Bennick, 1998
				Gambutti y col., 2005
Amilasa	62- 59			Beeley y col., 1991,96
	56-59	6,47	Proteomic +140isoform	Hirtz y col., 2005
Gustin	43			Beeley y col., 1991
bPRP	43-37	>8	SDS PAGE	Beeley y col., 1991,96
PRPb1/ PRPb2				Schwartz y col., 1992
aPRP	31- 27		SDS PAGE	Gambutti y col., 2005
			SDS PAGE	Beeley y col., 1991,96
	<36	3,5-4,5		Schwartz y col., 1992
PIF	24-20		SDS PAGE	Gambutti y col., 2005
bPRP (IB1-IB9)	20- 14			Lu y Bennick 1998
IB 1	20-14			Beeley y col., 1991,96
IB 4	20-14			Schwartz y col., 1992
IB 6	20-24	8,7-9	SDS PAGE	
IB 8b	14,2			
IB1- IB4	33-22			Gambutti y col., 2005
Lisosima	13		SDS PAGE	Beeley y col., 1991
	30			Schwartz y col., 1992
				Beeley y col 1991,
Histatina	10	7	SDS PAGE	Beeley, 93
	4,3-7	>9,5		Peter y Azen, 1977
				Li- Chan y Nakai, 1989;
Ovoalbúmina	45	4,5	SDS PAGE	Croguennec y col., 2000;
		4,75-4,9	IEF	Desert y col., 2001

Tabla 2. Proteínas de la saliva, masas moleculares y puntos isoeléctricos.  
 (Dadas las características de nuestro trabajo, situamos en esta tabla la masa molecular y el punto isoeléctrico de la ovoalbúmina)

Las familias más estudiadas de las proteínas de la saliva, respecto a la precipitación de taninos y la astringencia, son las de las mucinas, amilasas, proteínas ricas en prolina y las histatinas.

- Mucinas

Las mucinas son glicoproteínas producidas de forma predominante por las glándulas sublinguales y sudmandibulares. Estas proteínas son las responsables de la viscosidad de la saliva.

Las mucinas se dividen en dos grupos según su masa molecular:

- De bajo peso molecular (entre 120-150 KDa), monoméricas, llamadas MG2 y que son producidas por un solo gen (MUC7).
- De peso molecular mayor que  $10^3$  KDa, oligoméricas, llamadas MG1. Aunque se acepta que se produce en un gen (MUC5B) no se descarta que sea producto de otros genes (Thornton y col., 1998).

- $\alpha$  Amilasas

Las  $\alpha$  Amilasas se describen como enzimas multifuncionales. Tienen actividad hidrolítica durante la masticación inicial de alimentos que contiene almidones. Además pueden unirse a bacterias interviniendo así en la progresión de las caries dentales (Kandra y col., 2004).

Las  $\alpha$  amilasas de la saliva (amy1) se dividen en dos familias:

- Glicosiladas con peso molecular de aproximadamente 62 KDa.
- No-glicosiladas con peso molecular de aproximadamente 56 KDa.

Las proteínas de la familia glicosilada pueden deglicosilarse y pasar a formar parte de las no-glicosiladas. Existen también amilasas pancreáticas (amy2) con composición similar pero diferente peso molecular y punto isoelectrico. Se plantea que las amy1 y las amy 2 son sintetizadas por genes o grupos de genes diferentes (Minagushi y Bennick, 1989; Beeley, 1993).

Las  $\alpha$  amilasas reaccionan con las procianidinas procedentes de semillas de uvas. A medida que el peso molecular de la procianidina es mayor, mayor será la afinidad de la fracción  $\alpha$  amilasa por la procianidina. Se requiere mucha menos concentración de proteínas ricas en prolina para reaccionar con taninos que proteínas  $\alpha$  amilasa o proteínas globulares como la BSA (Freitas y Mateus, 2002).

- Proteínas Ricas en Prolina (PRPs)

Las PRPs han sido encontradas en las glándulas salivares de diferentes animales tales como cerdos, ovejas, ratas y conejos. Muchas de las proteínas salivales encontradas en humanos proceden de las parótidas pero también pueden proceder de las glándulas sublinguales y submandibulares, todas ellas pertenecen a la familia multigénica de

las PRPs. (Azen y Maeda, 1988). También encontraremos PRPs en las lágrimas y en el tracto respiratorio (Dickinson y Thiesse, 1995; Warner y Azen, 1984).

Las PRPs se caracterizan por un alto contenido de prolina que oscila entre un 20 y 40%. Y en unión de la glicina y la glutamina son entre el 70 y el 80% del total de los aminoácidos que forman estas proteínas. (Bennick, 1982).

Existen más de 20 PRPs en humanos y están codificadas por 6 genes. Estas se dividen en ácidas (aPRPs) que son codificadas por 2 genes (PRH1 y PRH2), básicas (bPRPs) y glicosiladas (gPRPs) que son codificadas por cuatro genes (PRB1, PRB2, PRB3 y PRB4) (Levine y col. 1969; Levine y Séller, 1977; Bennick y Connel, 1971; Friedman y col., 1971; Shibata y col., 1984; Maeda, 1985).

Antes de la secreción, las pro-proteínas codificadas por estos genes se fijan mediante pro-protein convertasas, dando lugar a la secreción de un variado número de PRPs.

Los investigadores Kauffman y Keller en 1979 propusieron la nomenclatura de las PRPs básicas y glicosiladas como IB1, IB4, IB5, IB6, IB7, IB8a, IKB8b, IB8c, IB9, II-1, II-2 y GPRP.

La enorme variabilidad de las PRPs, se ha explicado gracias a la identificación de varios alelos para cada gen (Maeda, 1985; Minaguchi y Bennick, 1989) o dada la capacidad de adoptar diferentes formas como es el caso de la IB7 que se encuentra adoptando estructura secundaria de hélice una tercera parte de su concentración, mientras el resto se enrolla de modo arbitrario (Simon y col., 2003).

La síntesis de PRPs en ratas y ratones puede ser inducida por taninos, mostrando gran afinidad en la formación de complejos tanino-proteína. Estos experimentos demuestran el importante papel de las PRPs como primera línea defensiva contra los posibles daños que pueden provocar los taninos en el tracto intestinal uniéndose a enzimas digestivas y proteínas presente en los alimentos (Hagerman y Butler, 1981; Mehansho, 1983, 1987). Chalton y colaboradores (1996) demostraron que las PRPs de la saliva en su conjunto presentan mayor afinidad con los taninos que una sola PRP.

Además de la función de las PRPs de unirse a taninos también tienen la capacidad de unirse al calcio, en este caso las aPRPs. Poseen actividad antiviral (bPRPs) y lubrican y aglutinan bacterias orales (gPRPs) (Gibbons y col., 1988; Gu y col., 1995; Murray y col., 1992).

Trabajos de Lu y Bennick del 1998 sugieren que las bPRPs son las más efectivas al unirse a taninos condensados y ácido tánico. Mientras las aPRPs y las gPRPs se unen en muy poca cuantía. Estos investigadores encuentran muy pequeñas diferencias en la habilidad de unirse a los taninos entre bPRPs de diferentes tamaños o secuencias, indicando que, aunque haya variaciones considerables en el fenotipo de las bPRPs, esto probablemente no cause variaciones marcadas en la capacidad individual de la proteína para precipitar taninos. Se ha demostrado mediante deglicosilación que las cadenas de carbohidratos de las gPRPs limitan la unión de estas a los taninos. En el caso de las aPRPs influye la región N-terminal altamente ácida.

Trabajos publicados a finales del 2004 y el 2005 describen proteínas y péptidos de bajo peso molecular que pudiesen ser fruto de la desfosforilación o la pérdida del residuo de arginina del C terminal de la IB-1, la IB-8a glicosilada y la Zn- $\alpha$ -2 glicoproteína. La identificación de estas proteínas son el resultado de la combinación de técnicas como SDS-PAGE en dos dimensiones, HPLC, espectrofotometría de masa y ultrafiltración (Messana y col., 2004; Wilmarth y col., 2004; Hardt y col., 2005).

- Histatinas (HrPs)

Las Histatinas comprenden un grupo de pequeñas proteínas ricas en histidina que se han encontrado sólo en humanos y en algunos primates. Procedentes fundamentalmente de las glándulas sublinguales y submandibulares, en una proporción aproximada de 2,6% de las proteínas totales (Sugiyama y Ogata, 1993). Se han aislado más de 12 HrPs en saliva humana, aunque generalmente son llamadas HRP1 al 12 (Troxler y col. 1990; Xu y col., 1993) En estas proteínas en general no encontramos prolina (excepto en HRP1 y 2) y aproximadamente el 25% de aminoácidos lo constituye la Histidina.

Las histatinas que predominan son la HRP 1, 3 y 5. Dada su estructura enrollada, que puede transformarse en helicoidal en medio hidrofóbico, se plantea que están asociadas a la actividad antimicrobiana (Oppenheim y col., 1986; Raj y col., 1990). La HRP5 se une con gran facilidad a taninos condensados y al ácido tánico, incluso con mayor afinidad que la gelatina. Se ha demostrado que existen diferencias en cuanto a la precipitación de taninos por las HrPs, a bajas concentraciones de taninos condensados o ácido tánico estas proteínas reaccionan fácilmente (Yan y Bennick, 1995). En estudios realizados por Naurato y colaboradores en 1999, se demostró que las HRP1, 3 y 5 se unen de modo diferente a EGCG, PGG y taninos condensados.

### **3.3. Factores que influyen en la sensación de astringencia.**

Algunos componentes del vino tienen capacidad astringente, ya sea por ellos mismos o porque indirectamente afectan la percepción de astringencia. La percepción de astringencia también está condicionada por el caudal salival y la composición de la saliva de cada individuo. (Guinard y col., 1997; Condelli y col. 2005).

Los flavanoles (taninos) por si mismos tienen gran capacidad de provocar astringencia, pero presentan diferencias entre ellos. Así, los taninos extraídos de las pieles reaccionan menos con las proteínas que aquellos que provienen de semillas y tallos. La diferencia consiste no sólo en que las procianidinas de la semilla poseen unidades galoiladas, sino en el grado de polimerización de las procianidinas, que varía dependiendo de la madurez de las uvas. El equilibrio tánico de un vino tinto depende de una buena armonía entre los taninos provenientes de semillas y pieles. Sin embargo, hay un alto riesgo de astringencia excesiva si los taninos de semilla son los predominantes, mientras que el amargor es típico del dominio de taninos extraídos de las pieles, sobre todo si la uva no está lo suficientemente madura (Peleg y col., 1999; Vidal, 2004<sub>b</sub>). Sarni-Manchado y colaboradores (1999) analizaron las interacciones de las proteínas de la saliva con los taninos procedentes de semillas, mediante técnicas tanto de tiólisis para el posterior análisis de las procianidinas, como de SDS-PAGE de las proteínas precipitadas y del sobrenadante. Concluyeron

que los taninos de la semilla muy polimerizados precipitan junto a las proteínas, mientras que los de bajo peso molecular permanecen en solución.

Los vinos a medida que evolucionan contienen menos cantidad de antocianos libres y presentan más antocianos combinados, recordemos que, muchas de estas combinaciones se producen con flavanoles, con lo cual habrá una pérdida de astringencia.

En el caso de vinos de crianza, deberá tenerse muy en cuenta el equilibrio entre los polifenoles del vino a envejecer antes de llevarlo a barrica. La madera libera taninos hidrolizables que también pueden incidir en la astringencia del vino. Este proceso ha de suceder de modo tal que la sensación de astringencia al salir el vino de la barrica no haya crecido desmesuradamente. Trabajos de Bacon y Rodes (2000) concluyen que todas las PRPs (ácidas, básicas y glicosiladas) poseen alta capacidad para unirse a los taninos hidrolizables, pero presentan una estrecha gama de afinidad en dependencia del número de unidades galoidadas, la esterificación y el grado de polimerización de estos taninos.

Otros componentes del vino que influyen sobre la percepción sensorial de la astringencia y el amargor son el pH, la concentración de etanol, la presencia de glicerol y de polisacáridos. Estos últimos intervienen en la viscosidad del vino.

Las investigaciones sobre la astringencia en relación con el **pH** son variadas. Muchas de ellas se basan en el análisis sensorial haciendo referencia a la intensidad y duración de la astringencia. Todos concluyen que la astringencia es pH dependiente (Straub y Mc Daniel, 1989; Lee y Lawless, 1991; Rubico y McDaniel, 1992; Ilegal, 1996).

Bate-Smith (1954, 1973) planteó la posibilidad de que los ácidos precipitaran proteínas de la saliva o provocasen cambios en la conformación de la saliva que se tradujeran en la disminución de la lubricación. Lawless y colaboradores (1994) plantearon dos hipótesis posibles al respecto. La primera se basa en la contribución directa de los protones. La segunda de la capacidad de formar puentes de hidrógeno de los grupos hidroxilos en el anión o el ácido no disociado.

Mediante análisis sensorial en soluciones modelos, Kallithraka y colaboradores (1997<sub>a</sub>) estudiaron la influencia del ácido láctico y el ácido málico sobre la astringencia. Concluyendo que hay un aumento de la sensación de astringencia, intensidad y duración de la misma al disminuir el pH, pero no se observan diferencias de percepción cuando la bajada del pH se produce por adición de ácido málico o ácido láctico.

Peleg y colaboradores (1998) experimentaron en soluciones modelos que contenían compuestos fenólicos de semillas de uva, ácido tánico, catequina y ácido gálico, a las que se le adicionaron diferentes concentraciones de ácidos málico, láctico, cítrico o clorhídrico. Ante la adición de ácidos siempre hubo incrementos en la sensación de astringencia. Mientras si se adicionaba alumbre se reducía la capacidad de los polifenoles de interactuar con las proteínas salivales.



Otros estudios, (utilizando concentraciones de taninos similares a los encontrados en vino tinto) comparan soluciones modelos y vino tinto en relación con la disminución de pH. Estos demuestran, que no tienen el mismo impacto sobre la astringencia la degustación de vino tinto que la degustación de solución sintética. Se sugiere que este comportamiento se deba a que al vino tinto se le ha de adicionar mucha cantidad de ácido para disminuir el pH, dada la alta capacidad tampón del vino en comparación con las soluciones modelos (Kallithraka y col., 1997<sub>b</sub>).

Resultados similares obtienen Thomas y Lawless (1995) en trabajos realizados con ácidos orgánicos, mientras en ácidos inorgánicos muestran que el ácido clorhídrico es un potenciador importante de la astringencia.

En estudios hechos por turbidimetría (Siebert y Chassy, 2003), se demuestra que las interacciones taninos-proteínas son mucho más fuertes por debajo del punto isoelectrico de la mayoría de las PRPs. Otros estudios utilizando esta metodología muestran una estrecha relación entre la disminución del pH y la astringencia (Cuernos, 2002; Hornes, 2002).

Las interacciones taninos-proteínas dependen en parte de la característica de los taninos; en parte de las características de proteína (PRP) y el pH; pero estas interacciones pueden ser disminuidas en presencia de solventes apolares como lo es el **etanol** en los vinos tintos.

Martin y Pangborn (1971) observaron la disminución de la astringencia en presencia del etanol, explicándolo como la pérdida de astringencia por un aumento de la lubricación en la mucosa bucal. Más tarde Asano y colaboradores (1982) y Sieber y colaboradores (1996) observaron la inhibición de las interacciones entre proteínas y compuestos fenólicos en presencia de solventes apolares o aceptores de hidrógeno.

La concentración de etanol en los vinos presenta una relación lineal con la reducción de las interacciones taninos-BSA, utilizando concentraciones de proteínas similares a las de la saliva. Las interacciones químicas tanino-PRPs podrían verse afectadas por las interacciones hidrofóbicas, o por modificación en las estructuras de hélices, o por el enrollado arbitrario de las PRPs. Como consecuencia, los grupos carbonilos de la proteína se ocultan y se reduce la afinidad de la proteína por los taninos (Serafín y col., 1997).

También se ha demostrado que el etanol tiene un efecto importante en la disminución de la precipitación de los complejos formados por tanino condensado y PRPs. Probablemente por incrementarse la solubilidad del complejo tanino-proteína (Yokotsuka y Singlenton, 1987).

Otros estudios consideran que el etanol contribuye, junto a otros componentes, a la viscosidad del vino; con la correspondiente disminución de la astringencia por acción física. (Gawel, 1998). Por su parte, Noble (1990) mediante análisis sensorial concluye que el etanol aumenta la sensación de amargor pero, suprime la astringencia de polifenoles.

El vino tinto contiene componentes que contribuyen a su viscosidad entre los cuales además del etanol encontraremos el glicerol, polisacáridos y monosacáridos que

ayudarán a aumentar la viscosidad reduciendo la astringencia, pero sin que se afecte la sensación de amargor (Ishikawa y Noble, 1995).

El **glicerol** es un polialcohol presente en el vino en concentraciones entre 5 y 10 g/L. Es producido durante la fermentación alcohólica por la *Saccharomyces cerevisiae*. La producción de glicerol depende del potencial redox del mosto, y de la temperatura óptima de fermentación (mayores de 22°C) (Scanes y col., 1998). La contribución del etanol y el glicerol en la viscosidad y la densidad del vino ha sido estudiada en soluciones modelos, observándose ligeros incrementos de la viscosidad y de la densidad percibidas al aumentar las concentraciones de etanol (3, 7, 15% v/v) y de glicerol (5, 20, 50 g/L) (Nurgel y Pickering, 2005).

Los **polisacáridos** son considerados como coloides protectores, destinados a prevenir o limitar la agregación, floculación, así como la turbidez y la formación de precipitados en el vino. Los polisacáridos del vino tienen naturaleza y origen variado. Pueden proceder de las paredes celulares (arabinanos lineales insolubles, arabinogalactanos y arabinogalactan-proteínas de tipo II, ramnogalacturonano II) O ser producidos por microorganismos como son los glucanos fúngicos en uvas contaminadas por *Botritis cinerea*; polisacáridos bacterianos producidos por bacterias lácticas de los géneros *Oenococcus*, *Streptococcus*, o *Pediococcus*; o manoproteínas liberadas por las levaduras. También el enólogo puede añadir polisacáridos al vino como es el caso de la goma arábica. (Pellerin y Cabanis, 2000).

Los polisacáridos del vino pueden modular la interacción entre proteínas salivales y taninos. El fenómeno de la inhibición de la precipitación de los complejos taninos-proteínas por parte de los polisacáridos puede explicarse según Luck y colaboradores (1994) por la unión del polifenol a moléculas de polisacáridos “encapsulándolos”; o por la asociación de polisacáridos a proteínas; o porque el polisacárido forma un complejo ternario con la proteína y el polifenol. Esto último aumenta la solubilidad del complejo en medio acuoso.

Las **manoproteínas** son polímeros que contienen manosa y que poseen masas moleculares desde  $5 \times 10^3$  hasta  $4 \times 10^5$  (Gonçalves y col., 2002). Procedentes de las paredes celulares de las levaduras, basan su estructura en un núcleo proteico al que están unidas dos tipos de cadenas: Cadenas cortas lineales de manosa unidas a la parte proteicas a nivel de los residuos de serina o de treonina. O cadenas polimanosídicas, ramificadas con cadenas laterales de manosa, que se unen a la parte peptídica mediante una N-acetil-quitobiosa unida al residuo de asparragina (Waters y col., 1994).

Se han definido dos tipos de manoproteínas en los vinos:

1º Tipo: Se corresponde con las manoproteínas secretadas durante la fase exponencial de crecimiento de las levaduras. Se acumulan durante la fermentación (Llaubères, 1987).

2º Tipo: Se corresponde con las manoproteínas liberadas durante la autólisis celular de las levaduras. Y se acumula en los vinos almacenados o envejecidos sobre lías. Estas presentan propiedades protectoras frente a turbios proteicos y precipitación tartárica (Ledoux y col., 1992).

Se ha postulado que las manoproteínas liberadas durante la autólisis pueden unirse a los taninos formando macroestructuras estables que, al no poder reaccionar con las proteínas de la saliva, no generarían la sensación de astringencia. Estos complejos también contribuyen a la estabilidad del color (Saucier y col., 1995, 2000; Fuster y col., 2002).

En muchos casos los vinos envejecidos en barrica o usando micro-oxigenación son mantenidos sobre sus lías. Las lías tienen capacidad para consumir grandes cantidades de oxígeno, y esto irá en decremento del consumo del mismo por los compuestos fenólicos para combinarse mediante puentes etilo (Fornairon-Bonnefond y Salmon, 2003). Por otra parte algunos autores han verificado que la crianza del vino tinto en presencia de lías comporta una disminución de la astringencia (Fornairon y col. 2000, Feulliat y col., 2001, Vidal y col., 2004<sub>c,d</sub>, Rodríguez y col., 2005). Asimismo, se ha descrito que el consumo de oxígeno por parte de las lías puede actuar protegiendo los antocianos y ciertas aromas de la oxidación (Chatonnet, 2001).

Por su parte, la **goma arábica** es un polisacárido formado por unidades de arabinogalactan-proteína tipo II y arabinogalactanos con un peso molecular  $10^3$  KDa, y estructura en forma de red (Hidalgo, 2003<sub>a</sub>). Este exudado de *Acacia senegal* es usado en vinos estabilizados, como tratamiento preventivo contra precipitaciones o formación de coloides.

La adición de goma arábica produce una disminución clara de astringencia (Maury, 2001; Comuzzo, 2002). El mecanismo implicado en la disminución de la astringencia está basado en dos hipótesis:

1. La asociación molecular en solución de los polisacáridos y taninos que, compiten con la agregación de taninos.
2. La adsorción de polisacárido sobre partículas formadas por taninos, lo cual previene el crecimiento de estas partículas y por tanto su precipitación (Riou y col., 2002).

Como otros polisacáridos la goma arábica contribuye a estabilizar el color y a preservar las aromas (Zanardelli, 2004).

Mediante turbidimetría, Mateus y colaboradores (2004) basándose en resultados previos de Freitas y colaboradores (2003); estudiaron el efecto de diferentes polisacáridos (goma xantán, pectina y goma arábica) en la formación de complejos taninos-proteínas. En este caso, se ha utilizado como proteína la BSA y fracciones de procianidinas de semillas de diferentes grados de polimerización. Los resultados revelan que los tres polisacáridos estudiados tienen una tendencia similar, interrumpiendo la formación de complejos taninos-BSA. Con el aumento del grado de polimerización de las procianidinas este efecto disminuye. El carbohidrato más efectivo en este experimento fue la goma xantán y el menos efectivo la goma arábica.

### **3.4. Métodos para la determinación y estudio de la astringencia**

Existen un gran número de metodologías, ensayos y modelos para el estudio de las interacciones táninos-proteínas. Muchos de estos métodos utilizan taninos modelos como la catequina, epicatequina, EGCG, EGC, ácido tánico, penta-O-galoil-D-glucosa, o fracciones de diferente grado de polimerización obtenidos a partir de semillas, pieles de uva, o de numerosas plantas. También se utilizan diferentes proteínas modelos como la BSA, poli-L-prolina, fracciones de proteínas salivales, ovoalbúmina, gelatinas, etc. En este apartado describiremos brevemente las metodologías ensayos y modelos más encontrados en la bibliografía.

Se han desarrollado numerosos ensayos siguiendo los estudios de Bate-Smith (1973), relacionando la astringencia de los taninos con su eficacia para precipitar proteínas. Bate-Smith determinó la concentración de taninos utilizando proteínas de sangre hemolizada, mediante colorimetría de la hemoglobina residual.

El método analítico más usado en enología para conocer la astringencia es el Índice de Gelatina diseñado por el Profesor Glories (1984), en el cual el vino se hace reaccionar con gelatina en frío durante tres días. Después de los cuales se determinan los taninos por hidrólisis ácida. Los resultados se expresan como porcentaje o concentración de taninos agresivos, es decir como los taninos capaces de provocar la sensación de astringencia.

Hagerman y Butler (1978) han desarrollado métodos para determinar fenoles precipitables por proteínas en plantas. Los ensayos de precipitación de taninos por proteínas se han llevado a geles (Hagerman, 1987), o se le han incorporado radioisótopos marcados con el fin de minimizar interferencias con los pigmentos de las plantas (Hagerman y Butler, 1980). También se han aplicado métodos basado en el principio del teñido de las proteínas unidas a los polifenoles (protein-dye-binding) desarrollado por Bradford en 1976 y utilizado para el análisis de taninos por Asquish y Butler en 1985. Muchos de estos ensayos de precipitación se acompañan de ensayos como el Lowry o la Ninhidrina para proteínas o la Vainillina-HCl, Folin-Denis, Azul de Prusia, Cloruro Férrico, o Butanol-HCl para taninos. (Swain y Hillis, 1959; Mole y Waterman, 1987; Price y col., 1978; Porter y col, 1986; Lowry y col, 1951; Makkar y col., 1987) Otros estudios se dedican a los complejos solubles tanino-proteína, en este caso se miden mediante ensayos de competición (Beart y col., 1985).

Otras metodologías usadas son las diálisis (Barbeau y Kinsella, 1983; McManus, y col., 1985) y las técnicas calorimétricas (Mc Manus y col., 1981) que se describen como un método que permite medir las propiedades termodinámicas de las interacciones proteínas-taninos (Pierce y col., 1999). También Frazier y colaboradores (2003) han desarrollado una metodología de titulación microcalorimétricas en taninos hidrolizables utilizando BSA y gelatinas como modelos proteicos.

Muchos ensayos se basan en la turbidimetría, (Calderon y col., 1968; Mc Murrough y Hennigan, 1984; Chapon, 1993; Freitas y Mateus, 2001; Hornes y col, 2002; Carvalho y col., 2004). Los nefelómetros no sólo han sido una herramienta

importante en el estudios de las interacciones taninos-proteínas, sino que han servido para establecer modelos de superficie que permiten predecir la turbidez en cerveza (Siebert, 1999). O para desarrollar modelos predictivos de astringencia basándose en curvas de astringencia versus turbidez (Monteleone y col., 2004).

Prinz y Lucas (2000) utilizaron una técnica muy novedosa para estudiar la pérdida de lubricación de la mucosa oral. Utilizando una polea de goma y un motor eléctrico (Boothroyd Friction Tester) calcularon las variaciones de coeficientes de fricción al utilizar como lubricante saliva con un 5% de agua destilada o saliva con un 5% de una solución de ácido tánico saturada.

Edelman y Lendl (2002) diseñaron una superficie de agarosa unida a prolina, que simula una lengua, a la cual por inyección automática continua se le aplicaron patrones de ácido tánico, diferentes procianidinas y vinos. La lectura se realizó mediante espectrofotometría de infrarrojos, caracterizándose de forma diferente los taninos hidrolizables de los condensados. Se observó que las sustancias no astringentes no eran retenidas en la gelatina, por el contrario la gelatina interaccionó con el vino tinto.

Kanaeda y colaboradores (2003) perfilaron dos métodos para medir la astringencia usando una microbalanza de cristal de cuarzo. En el cristal de cuarzo se inmovilizaba lípido o gelatina, comprobando que los taninos eran adsorbidos por la membrana lipídica en presencia de péptidos, y la membrana de gelatina respondía específicamente a los polifenoles. Estos resultados se correlacionaron satisfactoriamente con vinos tintos, tés verdes japoneses y cervezas.

Otros estudios han usado la cromatografía en papel, aplicando luego la tinción de Ponceau para medir los complejos taninos-BSA mediante espectrofotometría (Dawra y col., 1988). La cromatografía mediante HPLC se ha utilizado para analizar los sobrenadantes de mezclas de flavanoles y /o procianidinas con saliva (Kallithraka y col., 2000) o correlacionado la composición proteica de la saliva con la intensidad de la astringencia por análisis sensorial (Kallithraka y col., 2001). También mediante HPLC Kawamoto y colaboradores (1995) cuantificaron precipitados de diferentes series de procianidinas galoiladas unidas a BSA y un año más tarde los mismos autores publicaron un estudio estequiométrico de estas reacciones (Kawamoto y col., 1996)

El uso de ensayos enzimáticos (ELISA) también han contribuido a cuantificar las proteínas precipitada por polifenoles, usando BSA conjugada con benzidina y ácido tánico como patrón (Ratnavanthi y Sashidhar, 1998) O mediante ensayos de competición en placas basados en el marcaje de taninos con peroxidasa (Bacon y Rodees, 1998). También usando proteínas marcadas con yodo 125 (Ginger y col., 2004). O utilizando métodos indirectos en microplacas, basados en la inhibición de la tripsina por los taninos y la pérdida de esta inhibición al adicionar el tanino unido a proteína (Fickel y col., 1999).

El uso de la electroforesis ha sido otra herramienta en el estudio de las interacciones taninos-proteínas, ya sea de forma nativa (Austin y col., 1989; Hagerman y Robbins, 1993) o desnaturalizando la proteína en el SDS-PAGE. Mediante SDS-PAGE, Wu y Lu (2004) compararon las reacciones entre taninos, proteínas de uva, BSA y

gelatina. Mientras Gambuti y colaboradores (2005), utilizan saliva humana total con procianidinas de piel y semilla. En estos casos la astringencia se mide por cuantificación de las bandas en el gel.

También se han utilizado técnicas de “time average nuclear overhauser effects”(NOE) para estudiar la estructura espacial de los complejos PRPs-polifenoles (Charlton y col., 2001).

Se han realizado estudios con Resonancia Magnética Nuclear (NMR) acompañado de dicroísmo circular y espectrofotometría de masas, con el fin de establecer modelos dinámicos tridimensionales de los complejos formados por los taninos del vino y las proteínas de la saliva; relacionando los resultados con los niveles de astringencia (Simon y col., 2003<sub>a,b</sub>).

Otros investigadores han elegido técnicas de dispersión de luz (Light scattering) para cuantificar de modo directo los agregados de taninos y BSA a pH neutro (Lin y col., 2004).

Finalmente, se trabaja en el desarrollo de modelos predictivos de astringencia como el modelo matemático desarrollado por Cliff y colaboradores (2002) a partir de correlacionar estadísticamente el análisis sensorial con el análisis del color. O modelos moleculares que describen paso a paso las interacciones a partir de técnicas de microscopía electrónica de transmisión, ultracentrifugación analítica, barrido de rayos X, o láser (Jöbstl y col., 2004<sub>a,b</sub>). Así como también, la predicción de la astringencia producida por diferentes compuestos fenólicos, basados en ensayos como el Índice de Mucina (MIA) (Monteleone, 2005).

A pesar de todo lo expuesto la determinación objetiva de la astringencia del vino es un tema abierto. En ocasiones existen discrepancias entre los resultados analíticos y los sensoriales. Es por ello que autores como Kallithraka y colaboradores (2000) exhortan al estudio más exhaustivo tanto del análisis sensorial como analítico en aras a desarrollar métodos cuantitativos de análisis de astringencia.

## 4. LA VINIFICACIÓN EN TINTO

En este apartado se explica brevemente los pasos de una vinificación convencional en tinto. Simultáneamente al proceso de vinificación tiene lugar la maceración que permite la extracción de los compuestos fenólicos contenidos en las partes sólidas de la uva. La cinética de extracción y los diferentes tratamientos para mejorarla serán tratados en el apartado 4.3.

Para comprender la importancia de la correcta madurez de la uva en relación con la extracción, comenzamos explicando muy brevemente la evolución de los compuestos fenólicos durante la maduración.

### 4.1. Madurez

El proceso de vinificación comienza con el correcto estado sanitario de la uva y con una correcta madurez de la misma. Para una correcta madurez de la uva es importante que la variedad se encuentre adaptada al microclima y al suelo, con baja disponibilidad de agua y de nitrógeno durante la maduración. También cuenta la edad del viñedo y los sistemas de poda en verde elegidos en cada caso (Asseling y Ballester, 1992; Jackson y Lombard, 1993; Yuste y col., 1997).

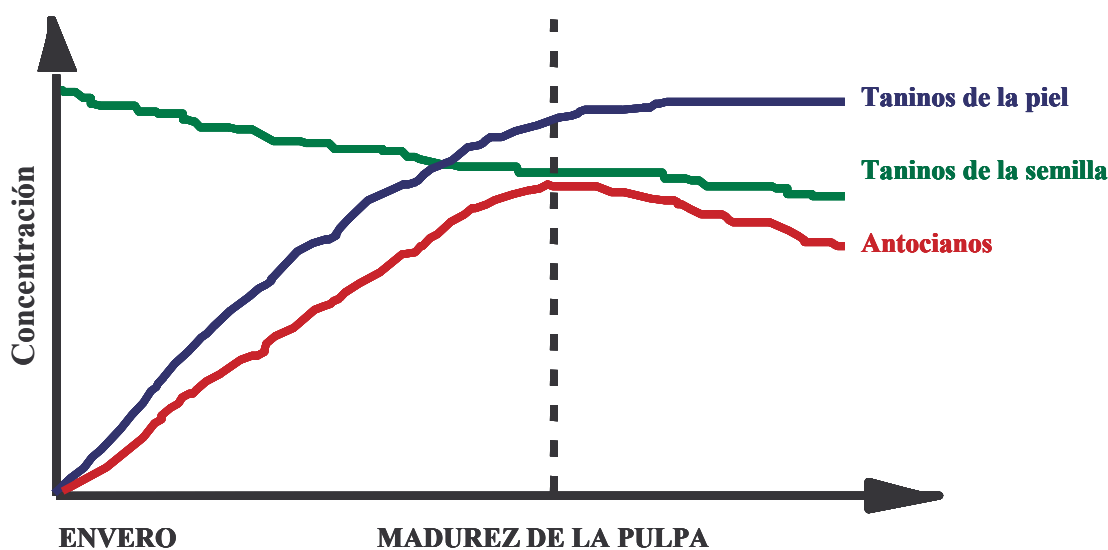


Figura 16: Evolución de los compuestos fenólicos durante la maduración (extraído de Ribéreau- Gayon y col., 2003)

Durante la maduración de la uva tinta se produce un aumento de los azúcares y una disminución de la acidez, al mismo tiempo que los compuestos fenólicos se incrementan desde el envero hasta el momento de la vendimia, que teóricamente ha de coincidir con el momento en que la uva llega a la madurez fenólica.

En la Figura 16 se muestra la evolución de los compuestos fenólicos a lo largo del proceso de maduración. Se puede apreciar que la concentración de las proantocianidinas (taninos) de las pieles va en aumento con la madurez, mientras las

proantocianidinas de las semillas disminuyen. Las proantocianidinas son responsables de la sensación de astringencia (ver: Astringencia). Pero se ha de tener en cuenta que a lo largo de la maduración los taninos de la semilla son siempre astringentes, mientras que los de la piel disminuyen su capacidad de astringencia con la madurez (Peleg y col., 1999; Vidal, 2004<sub>b</sub>). No menos importante es la influencia del grado de madurez de la uva sobre la extractibilidad de los compuestos fenólicos (Ribéreau- Gayon y col., 2003<sub>a</sub>; Habertson y col., 2002).

En uva verde no sólo la concentración de compuestos fenólicos será muy baja, sino que la cara interna de la piel está recubierta por una capa de células de la pulpa muy gruesa que dificulta la solubilización de los compuestos fenólicos en las primeras etapas de maceración, cuando aún no hay etanol en el medio y la extracción de estos compuestos sólo puede tener lugar por la cara interna de la piel. A medida que la uva madura, esta capa será más fina permitiendo mayor extracción por la cara interna de la piel. La presencia de etanol y el aumento de la temperatura durante la fermentación permiten la solubilización de la cubierta de pruina de la cara externa de la piel, con lo cual habrá intercambio por las dos caras (Zamora, 2003<sub>b</sub>). En las pieles hay un incremento del DPM de las proantocianidinas y de la proporción de (-) epigallocatequina, junto al incremento del nivel de antocianos desde el envero hasta la madurez fenólica (Kennedy y col., 2002). La acumulación de antocianos se describe con un aumento muy marcado durante las primeras tres semanas después del envero, luego el incremento es gradual con un ligero descenso de la concentración de antocianos en uvas sobremaduras (González- San José y col., 1990). Durante la maduración los niveles de malvidina-3-glucósido, Peonidina-3-glucósido y antocianos acilados aumentan. Al final de la madurez disminuyen los antocianos monoglucósidos (Ryan y Revilla, 2003; Canals y col., 2005).

Por su parte, las semillas, con la madurez, endurecen su superficie con una cutícula y una envoltura lignificada que dificultará la extracción en ausencia de etanol (Romeyer, y col., 1986). La presencia de etanol posibilita la solubilización de la cutícula y con ello podría aumentarse la extracción en maceraciones largas (Singleton y Draper, 1964). Kennedy y col. (2000<sub>a, b</sub>) sugieren que la disminución de la extractibilidad de las semillas con la madurez también esté asociada a los cambios en la composición de las mismas y a procesos de oxidación. En cuanto a los cambios de composición de la semilla durante el proceso de maduración la bibliografía describe que se produce una disminución de los monómeros de flavanol-3-ols, mientras tiene lugar un incremento de los dímeros de proantocinidinas (Romeyer, y col., 1986). Jordao y col. (2001<sub>a</sub>) describen un rápido descenso de los flavanoles durante los primeros 20 días después del envero para luego disminuir de forma gradual, mientras algunas procianidinas (B2, B4; entre otras) presentan un ligero incremento durante los últimos días de maduración. Estudios de localización de taninos en la semilla explican que, durante la maduración, el DPM y la proporción de epicatequina galato es mayor en las células de la pared de la semilla que en las fracciones celulares interiores (Geny y col., 2003).

Existen vinificaciones en las que se incluye el raspón de modo parcial o total aumentando la concentración de compuestos fenólicos con vistas a mejorar la sensación de cuerpo al vino de variedades poco tánicas como lo es el *Pinot noir* (Peynaud, 1984). En general, se describe que la concentración de taninos en el raspón representa aproximadamente un 21% del total en el racimo de uvas (Hidalgo,



2003<sub>b</sub>). El principal inconveniente del uso del raspón viene dado por los sabores y aromas vegetales y herbáceos, con una marcada sensación de astringencia (Peynaud, 1984, 1988; Hashizume y col., 1997; Delteil, 2000; Hidalgo, 2003<sub>b</sub>). Los raspones están constituidos fundamentalmente por ácidos fenólicos, flavonoles y flavanonoles, así como polímeros de proantocianidinas compuestos mayormente por (-) epicatequina y en menor proporción (+) catequina, epicatequin galato y (-) epigallocatequina (Souquet y col., 2000). Jordao y col. (2001<sub>b</sub>) han estudiado la evolución de los taninos de los raspones durante el proceso de maduración y han observado que la concentración de flavonoles va disminuyendo, mientras las fracciones poliméricas se incrementan seguidas de las fracciones oligoméricas.

## **4.2. Descripción del proceso de vinificación en tinto**

El proceso de vinificación comienza con los controles de madurez, técnica que se realiza en cada parcela del viñedo. Cuando la uva posee la madurez necesaria se realiza la vendimia.

- Despalillado y Estrujado

Al llegar la uva a la bodega se procede al despalillado eliminando el raspón (total o parcialmente según el criterio de vinificación), quedando así desgranadas las uvas. Este procedimiento se realiza por las máquinas despalilladoras, pero en sus inicios se realizaba manualmente (Peynaud, 1988).

Con la eliminación del raspón se descartan en gran medida las notas herbáceas y vegetales, pero también se elimina un gran aporte de compuestos fenólicos. Además, se plantea que los raspones facilitan el proceso de fermentación, absorbiendo calorías y limitando los excesos de temperatura, también posibilitan que el sombrero sea menos compacto facilitando la extracción de compuestos fenólicos y el prensado. En contraposición el despalillado economiza espacio en los tanques de fermentación pues el raspón representa aproximadamente un 30% del volumen de la vendimia. El raspón contiene gran cantidad de agua y no contiene azúcares por lo cual disminuye el grado alcohólico del vino y a la vez en el raspón se fija parte de la materia colorante por lo que, de manera inmediata, el vino tendrá menos color (Peynaud, 1984, 1988).

El estrujado consiste en romper los granos de uva formando la pasta de vendimia o mosto. Actualmente se realiza fundamentalmente mediante las estrujadoras, aunque también puede realizarse la técnica ancestral del pisado de la uva. El estrujado facilita la maceración por aumento de las superficies de contacto entre el mosto y las partes sólidas de la uva, y ayuda a la aireación favorable para la multiplicación de las levaduras y la activación de la fermentación (Jackson, 1994).

Hoy en día en muchas bodegas optan por las máquinas despalilladoras- estrujadoras, pudiendo realizarse el estrujado con diferentes sistemas de rodillos: cilíndricos, cónicos o de perfiles conjugados. También existen estrujadoras centrífugas que por la acción de la fuerza centrífuga se van estrellando los granos de uva contra una superficie perforada, quedando los raspones retenidos en el interior del tambor. Estas

últimas realizan un tratamiento agresivo de la vendimia, y a menudo se trituran en exceso las semillas y las pieles por lo que apenas se utilizan.

El mosto es trasladado a los tanques de fermentación donde de inmediato se procede a agregar el anhídrido sulfuroso con fines antimicrobiano y antioxidásico. Dosis elevadas de anhídrido sulfuroso contribuyen a activar la maceración pero pueden comprometer más tarde la fermentación maloláctica. En este momento pueden aplicarse, dependiendo del estado y tipo de uva, diferentes técnicas para la mejora de la extracción de la materia colorante contenidas en las partes sólidas de la uva antes de dar inicio a la fermentación alcohólica. A esta etapa de maceración se le denomina Pre- fermentativa.

- Fermentación Alcohólica.

Durante la vinificación tiene lugar simultáneamente la fermentación alcohólica y la maceración. Estos dos fenómenos condicionan la cinética de extracción de los compuestos fenólicos.

Al inicio de la fermentación alcohólica, generalmente, se adicionan levaduras al mosto, garantizando así la biomasa necesaria en buen estado fisiológico para el desarrollo de la fermentación. Las levaduras se seleccionan según los vinos y tradiciones teniendo en cuenta el perfil aromático y gustativo de los vinos (Delteil, 2000<sub>b</sub>), así como la actividad  $\beta$ -glucosidasa (Sponholz, 1997). Últimamente también se estudia la influencia de la cepa de levadura seleccionada en la composición fenólica final del vino (Caridi y col., 2004; Morata y col., 2005<sub>b</sub>) Es común añadir activadores de fermentación y factores de crecimiento y desarrollo de levaduras, para garantizar el adecuado crecimiento de las mismas.

Durante el proceso de fermentación las levaduras consumen azúcares reductores y liberan al medio etanol, dióxido de carbono y en menor cuantía otros productos tales como el glicerol, ácidos orgánicos, alcoholes superiores, ésteres, acetoina y compuestos azufrados (Barre y col., 2000). A medida que evoluciona la fermentación alcohólica se incrementa la concentración de etanol en el medio. La presencia de etanol supone una mayor extracción de compuestos fenólicos por la degradación celular, lo que implica que se acentúa la extracción de antocianos y comienza la liberación de sustancias menos accesibles como proantocianidinas con mayor grado de polimerización, o proantocianidinas unidas a proteínas o polisacáridos de las paredes celulares. Las proantocianidinas extraídas pueden reaccionar entre ellas o con los antocianos disueltos en el medio, para formar complejos que permanecen en solución. En esta fase, todos los parámetros que condicionan la dinámica de la fermentación (pH, temperatura, oxígeno, etc.) repercuten en la extracción. A esta etapa de maceración se le denomina Maceración Durante la Fermentación.

- Descube y Prensado

El descube es la operación que da continuación a la fermentación alcohólica, pero no siempre coincide con el final de ésta. En función del tipo de vino a elaborar y de la calidad de la vendimia el descube puede realizarse (Hidalgo, 2003<sub>c</sub>):

- Antes de terminar la fermentación alcohólica, destinado a vinos jóvenes con sensaciones gustativas de gran suavidad. Estos terminan la fermentación alcohólica en ausencia de pieles y semillas.
- Recién terminada la fermentación alcohólica, destinado a vinos jóvenes más equilibrados.
- Después de dos o tres semanas de terminada la fermentación alcohólica, en vinos destinado a envejecer. (Maceración Post Fermentativa)

El vaciado de los depósitos se realiza mediante el sangrado o escurrido del vino y a continuación se realiza el prensado. El sangrado se realiza habitualmente a través de las válvulas laterales o del fondo de los tanques de fermentación. El descube se puede realizar de modo manual, con operarios que sacan con palas y otros utensilios los hollejos y pepitas fermentados, o automatizado ya sea por gravedad o con el uso de cubas autovaciantes o incluso provistas de sistemas extractores (Delteil y col., 2000<sub>b</sub>).

Los hollejos fermentados dejan escurrir un importante volumen de vino con calidad similar al vino obtenido durante el sangrado. Después se prensan y se obtiene el llamado vino de prensa. Este vino suele representar un 15% de la totalidad del vino, con una graduación alcohólica algo inferior al vino de sangrado y una mayor concentración de compuestos fenólicos. Mediante las prensas de jaula vertical u horizontales de membrana se logra un prensado suave a baja presión, que evita que se rompan las semillas (Hidalgo, 2003<sub>c</sub>).

Cuando el vino es destinado a crianza se suele mezclar el vino de sangrado con las primeras fracciones del vino de prensa (Hidalgo, 2003<sub>c</sub>).

- Fermentación Maloláctica

La fermentación maloláctica es la transformación del ácido málico contenido en el vino en ácido láctico como producto final. Este proceso se realiza de manera espontánea con la intervención de las bacterias lácticas existentes en el mosto, perteneciente a los géneros *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*. A medida que avanza la vinificación la flora bacteriana se reduce en número y variedad, favoreciéndose las cepas resistentes al etanol y al pH. Al iniciarse la fermentación maloláctica, generalmente se encuentra la especie *Oenococcus oeni*. Actualmente se comercializan bacterias lácticas liofilizadas que pueden ser utilizadas como inóculo, si bien en la mayoría de las bodegas aún se realiza la fermentación maloláctica espontánea (Cavin y col., 2000).

La fermentación maloláctica produce una desacidificación en el vino que le confiere ligereza. Algunos autores ( Kallithraka y col., 1997<sub>a</sub>; Harwing y Mc Daniels, 1997) en experimentos mediante análisis sensorial, apenas han encontrado diferencias entre la presencia del ácido láctico o el ácido málico en soluciones sintéticas. Sin embargo, a la transformación del ácido málico, en ácido láctico se le confieren sensaciones gustativas más suaves, pues además del pequeño incremento de pH, durante la fermentación maloláctica se acumulan manoproteínas en el vino, procedente de la

autólisis de las levaduras y otros polisacáridos procedentes de las bacterias lácticas (Cavin y col., 2000).

También se plantea que la fermentación maloláctica modifica los aromas del vino, con una disminución de aromas varietales por degradación o hidrólisis de compuestos aromáticos de la uva y por la atenuación de aromas producidas durante la fermentación alcohólica. El compuesto aromático característico de esta fermentación es el diacetilo, formado a partir de la degradación del ácido cítrico. El diacetilo presenta olor a mantequilla y en concentraciones inferiores a 5mg/L contribuye positivamente al aroma del vino (Rankine y col., 1969; Hidalgo, 2003<sub>d</sub>).

Otra de las ventajas que se atribuyen a la fermentación maloláctica es la de asegurar en el vino estabilidad biológica frente a las bacterias lácticas, al desaparecer el ácido málico y empobrecerse el medio de nutrientes (Cavin y col., 2000).

Entre los inconvenientes de la fermentación maloláctica están la pérdida de color debida al aumento de pH. Se plantea que al aumentar el pH después de la fermentación maloláctica puede tener lugar una pequeña pérdida de color por desplazamiento de cationes fávlicos (rojo) a bases quinonas (azul) y carbinol (incolores), pero se ha de tener en cuenta que la variación de pH que se atribuye a la fermentación maloláctica es muy pequeña (0,1-0,2 unidades de pH) (Zamora, 2003<sub>b</sub>). Por su parte, Vrhovsek y col. (2002) sugieren la posibilidad de que la fermentación maloláctica reduzca las reacciones de polimerización de proantocianidinas.

Otros inconvenientes son la eventual formación de polisacáridos extracelulares (*Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus brevis*) que confieren al vino un aspecto viscoso conocido como “ahilado” (Hidalgo, 2003<sub>d</sub>). Y la degradación de aminoácidos produciendo aminor biógenas. En este sentido trabajos de Roure (2005) estudian el uso de la lisozima antes de la fermentación maloláctica para eliminar las bacterias lácticas del vino y facilitar así el desarrollo de bacterias seleccionadas.

En vinos jóvenes, destinados al consumo rápido y con niveles de ácido málico reducido, no es aconsejable la fermentación maloláctica pues, desde el punto de vista organoléptico, es imprescindible mantener la acidez (Hidalgo, 2003<sub>d</sub>). En estos casos ha de añadirse anhídrido sulfuroso y/o lisozima, para evitar que la fermentación maloláctica tenga lugar espontáneamente (Roure, 2005). Por el contrario, en vinos destinados a envejecer o con altos niveles de ácido málico es imprescindible la fermentación maloláctica.

Los vinos tintos que se consumen jóvenes destacan organolépticamente por su frescura y toques afrutados. Pero los vinos tintos por excelencia han de pasar por un proceso de envejecimiento donde tienen lugar una serie de combinaciones y condensaciones que le otorgan gran complejidad organoléptica, enriqueciéndolos en notas aromáticas y estabilizando el color de los mismos. Este proceso se lleva a cabo en barricas de roble (ver apartado 5. Crianza) y en los últimos años se alterna o se combina con la microoxigenación (ver apartado 6. Microoxigenación).

El momento en que el vino sea introducido en la barrica condicionará su concentración de sulfuroso libre y la presencia o no de lías. Algunos enólogos pasan el vino a barricas para realizar la fermentación maloláctica, planteando que mejora la

calidad aromática del vino, dando lugar a vinos con color más estable y más volumen en boca. En estos casos el vino pasa a barrica con niveles casi nulos de anhídrido sulfuroso y realiza la fermentación maloláctica en presencia de lías. Cuando termina la fermentación maloláctica el vino es sulfitado.

El vino también puede ser destinado a envejecer al terminar la fermentación maloláctica, justo después de adicionar el anhídrido sulfuroso. En este caso el vino ira a crianza cargado de lías y con sulfuroso libre (Hidalgo, 2003<sub>d</sub>).

- Decantación/ Clarificación/ Filtración

En los vinos nuevos, si se dejan un cierto tiempo después de añadir el anhídrido sulfuroso, se produce una clarificación espontánea. Esto implica que las lías se depositan en el fondo de los depósitos. A este proceso se le denomina decantación natural. Posteriormente el vino se trasiega a barrica o depósitos de microoxigenación, donde el proceso de envejecimiento se hará con muy pocas lías (Zamora, 2003<sub>c</sub>).

También se puede realizar el proceso de clarificación que consiste en agregar al vino una sustancia de naturaleza coloidal (vegetal o animal). Estas sustancias arrastran hacia el fondo del depósito las lías y otras partículas en suspensión. También pueden realizarse procesos de filtración (Boulet y Escudier, 2000<sub>a</sub>). Entonces el vino irá a envejecer sin lías y en presencia de sulfuroso libre desde el inicio de la crianza en barrica o la microoxigenación.

Otro método utilizado consiste en separar el vino de sus lías por decantación y almacenar las lías en barricas para que pierdan su alto poder reductor y luego añadir al vino las lías decantando las lías más gruesas (Zamora, 2003<sub>c</sub>). En este caso se realizará el envejecimiento sobre lías finas, con sulfuroso libre desde el inicio.

### 4.3. Maceración

El proceso de maceración en los vinos se desarrolla de manera simultánea a la fermentación. En la figura 17 se observa la cinética de extracción de los compuestos fenólicos.

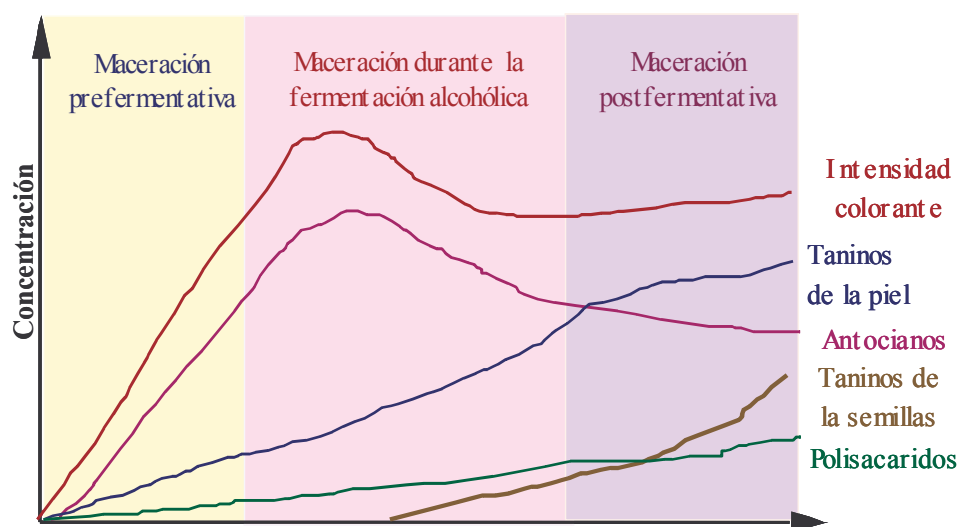


Figura 17: Cinética de extracción de los compuestos fenólicos.  
(extraído de Ribéreau- Gayon y col., 2003)

## *Capítulo I. Introducción*

---

El aporte de cada uno de los compuestos fenólicos de la uva y los fenómenos de combinación, condensación, polimerización, etc. que se producen durante la maceración tienen gran influencia en las propiedades organolépticas y varían en función de la madurez y naturaleza de la uva.

La maceración se puede dividir en tres fases:

La maceración Pre Fermentativa que es la extracción que se produce desde el llenado del depósito de fermentación hasta el comienzo de la fermentación alcohólica, es decir, con un 0% de etanol en el medio y a temperaturas moderadas. En esta etapa hay mayoritariamente extracción de antocianos y también de proantocianidinas y polisacáridos de la piel. Comenzarán los fenómenos de copigmentación.

Entre las técnicas habituales para mejorar la maceración Pre-Fermentativa están:

- Refrigeración antes del despalillado: Permite “fragilizar” las membranas celulares, facilitando la extracción de compuestos fenólicos y de precursores de aromas. Evita el arranque anticipado de la fermentación alcohólica y los riesgos de oxidación y de picado acético al ser muy baja la temperatura de la uva al entrar en el tanque de fermentación. El inconveniente es que se precisa disponer de cámaras frigoríficas que permitan realizar el tratamiento (Revilla, 2006).
- Maceración Pre-fermentativa en Frío: Alarga la fase pre-fermentativa permitiendo mayor extracción de compuestos fenólicos en fase acuosa. Así al comienzo de la fermentación alcohólica hay un alto nivel de antocianos y proantocianidinas disueltos en el medio, que favorece la combinación y la estabilidad del color (Asselin y col., 1999). Este tratamiento se puede realizar enfriando las cubas de fermentación a través de sistemas de camisas refrigeradas o utilizando nieve carbónica. Si este tratamiento se realiza utilizando nieve carbónica, además de las ventajas antes expuestas, al saturarse el medio se inhibirá la acción de polifenoloxidasas y de las bacterias acéticas y levaduras oxidativas, incluso al recuperarse la temperatura en el mosto (Feulliat, 1997; Cuasnon, 1999).
- “Flash Détente”: Esta técnica consiste en calentar rápidamente y a alta temperatura la vendimia, seguido de un enfriamiento instantáneo a vacío intenso, con lo que se consigue la fragilización de las paredes de las pieles. Por tanto, habrá una extracción mucho más rápida, el sombrero será mucho más ligero y caerán mucho más rápido las semillas al fondo del tanque de fermentación, lo que condicionará el tiempo de maceración (Boulet y Escudier, 2000<sub>b</sub>).
- Tratamiento Térmico (Termovinificación): Consiste en calentar el mosto a temperaturas de alrededor de 70°C. Se aplica fundamentalmente en uva algo podrida, desactivando así las enzimas lacasas. Esta técnica elimina los microorganismos presentes en el mosto y solubiliza muchos nutrientes presentes en la uva, facilitando luego el desarrollo de la levadura inoculada para la fermentación alcohólica. Mejora la extracción de compuestos fenólicos, incrementando el color (Fisher y col., 2000).
- Sangrado o Doble Pasta: Permite incrementar la proporción de pieles y semillas respecto al mosto, esto mejora la calidad del vino final desde el punto de vista de cuerpo, estructura y color (Zamora y col., 1994).

- Adición de Enzimas Pectolíticas: Permiten hidrolizar las pectinas de las paredes celulares de las capas de pulpa próximas a la piel favoreciendo la extracción de antocianos (Ducruet y col., 1997; Bernard y col., 2005).
- Adición de Taninos Enológicos: Sirve para aumentar el cuerpo y estructura del vino. En el caso de los taninos condensados, por su naturaleza similar a la de las procianidinas pueden participar en los procesos de combinación, y por tanto de la estabilización del color (Poinsaut y col., 2000; Khan y Bertrand, 2005).

La maceración durante la Fermentación Alcohólica ocurre simultáneamente al aumento de la concentración de etanol y de la temperatura del medio. En esta fase también hay extracción de antocianos y de taninos de la piel. La extracción de taninos de la piel se produce de forma más prolongada. En el caso de los taninos de semilla se inicia la extracción cuando la cutícula se ha disuelto por la presencia del etanol. Evidentemente, a mayor concentración de etanol, más rápida será la solubilización. En esta etapa comienza la formación de combinaciones proantocianidina- antocianos. El etanol provoca la disminución de la copigmentación y la precipitación de muchos de los polisacáridos que se van disolviendo en el medio.

Durante la Fermentación se forma el sombrero que es la acumulación de semillas y pieles en la parte superior de los tanques de fermentación empujados por el dióxido de carbono liberado por las levaduras como parte de su metabolismo. Durante esta fase se utilizan diferentes técnicas destinadas a aumentar el contacto vino/ mosto y por tanto la extracción de polifenoles:

- Remontado: Consiste en enviar el líquido desde la parte inferior de las cubas de fermentación a la parte superior distribuyéndolo sobre el sombrero. Este proceso facilita la extracción de los compuestos fenólicos de la piel y la semilla que se acumulan en el sombrero; pero también permiten oxigenar el mosto, libera CO<sub>2</sub>, resuspende las levaduras al final de la fermentación y homogeniza la temperatura del mosto (Feulliat y Peyron, 2000<sub>a</sub>; Sacchi y col., 2005).
- Bazuqueos: Consiste en el hundimiento del sombrero para descompactarlo, por tanto mejora la extracción de los compuestos fenólicos (Feulliat y Peyron, 2000<sub>a</sub>; Sacchi y col., 2005).
- Inundación: Se remonta gran cantidad de líquido a un recipiente por encima de la cuba de fermentación y se deja caer el líquido de golpe. De este modo el sombrero queda descompactado completamente (Hidalgo, 2003<sub>d</sub>; Zamora, 2003<sub>d</sub>).
- Sombrero sumergido: Utilizando un entramado dentro de la cuba de fermentación que no permita que la pasta suba a la superficie incluso con el desprendimiento del gas carbónico (Hidalgo, 2003<sub>d</sub>; Zamora, 2003<sub>d</sub>).
- Délestage: Consiste en vaciar el tanque de fermentación completamente e incluso se recomienda que se deje escurrir el líquido remanente del sombrero y al cabo de unas horas se devuelve el mosto/ vino al tanque de fermentación. Esto no sólo permite descompactar el sombrero sino que muchos granos quedarán aplastados liberando compuestos fenólicos. Esta técnica se puede utilizar en uvas poco maduras o muy astringentes para eliminar semillas durante la fermentación (Revilla 1998; Bosso y col., 2000).

## *Capítulo I. Introducción*

---

- Maceración dinámica: Se realiza en depósitos maceradores rotativos, ya sean de cuba giratoria o fija, permiten un movimiento de pequeñas rotaciones a lo largo del día que mueven los hollejos suavemente y sustituyen un buen bazuqueo (Hidalgo, 2003<sub>d</sub>; Revilla, 2006).

Por último, la fase de maceración Post Fermentativa, que transcurre entre el final de la fermentación alcohólica y el descube. En esta etapa continua la extracción de los taninos de la semilla, las transformaciones en las moléculas de antocianos, por combinación con proantocianidinas, y los procesos de polimerización de las proantociadinas. También se liberan polisacáridos y manoproteínas producto de la autólisis de las levaduras. Cabe señalar que en este período se producen procesos de absorción de materia colorante por partes sólidas (levaduras) y eventualmente reacciones de degradación.

En la etapa Post Fermentativa se utiliza:

- Alargar el período de maceración: Con lo cual aumentará la concentración de proantocianidinas del vino. Aumenta la estabilidad del color por la formación de combinaciones y la estructura en boca. Es necesario ser cuidadosos y macerar sólo el tiempo en que el vino mejore sensorialmente (Scudamore y col., 1990; Yokotusha y col., 2000; Sacchi y col., 2005, Kelebek y col., 2005).
- Maceración final en caliente: Se realiza calentando el vino a temperaturas entre 35-40°C al terminar la fermentación alcohólica. Este proceso incrementa la extracción de compuestos fenólicos (Ribéreau-Gayon y col., 2003<sub>b</sub>).

En todas las etapas de maceración se debe escoger la técnica apropiada para no provocar la sobre extracción de compuestos fenólicos que llevará a obtener vinos duros, herbáceos y astringentes. La concentración de los polifenoles aportados por la uva durante los procesos de maceración/ vinificación; dependerán del grado de madurez de la uva y del empleo de técnicas de maceración y vinificación apropiadas.



## 5. CRIANZA EN BARRICA DE ROBLE

El roble ha sido utilizado desde hace siglos para la elaboración de las barricas donde originariamente se almacenaba y transportaba el vino. Hoy en día los vinos tintos más preciados son aquellos que han estado en contacto con la madera de roble, en el interior de las barricas. La madera enriquece el vino en sabores y aromas al tiempo que, al ser una materia porosa, permite una oxigenación continua y moderada del vino (Jarauta y col., 2005). El aporte de oxígeno al vino da lugar a procesos de combinación que estabilizan la materia colorante y suavizan la astringencia (Glories, 1990, 1999; Pomar y col. 2001).

Por el término roble se conocen hasta 150 especies del género *Quercus*. Solo tres especies se utilizan normalmente en la elaboración de barricas. Se trata de *Quercus petraea* (también llamado *Q. sessilis*), *Quercus robur* (también llamado *Q. pedunculata*) y *Quercus alba* (Aiken y col., 1984; Fernández-Golfín y Cabadahia, 1999).

El género *Quercus* se halla ampliamente distribuido a lo largo Europa, América del norte, central y Sudamérica, el Sudeste Asiático y en menor medida, en el norte de África (Keller, 1987). Actualmente, se realizan trabajos de investigación con barricas elaboradas con especies de *Quercus* que crecen en los bosques españoles (Fernández de Simón y col., 2003<sub>a</sub>). No obstante, las principales zonas productoras de las tres especies de roble destinadas a la elaboración de barricas están en Francia y los Estados Unidos de América. Por eso, en tonelería, se habla corrientemente de roble francés o de roble americano (Fernández de Simon y col., 1996, 2003<sub>b</sub>).

El término roble americano hace referencia a la especie *Quercus alba*, mientras que en el término roble francés se incluyen las especies *Quercus robur* y *Quercus petraea*. Aunque, si no se especifica que su origen es Limusín, se suele hacer referencia a *Quercus petraea* (Feulliat y col., 2000<sub>b</sub>).

### • Propiedades y composición de la madera de la madera del roble

La madera de roble tiene propiedades que le hacen idóneas para la construcción de barricas. Entre ellas destacan la poca conducción del calor, la resistencia frente a golpes y la composición de la madera. También, la porosidad y la permeabilidad, que depende del sentido de colocación de las fibras, ha de tenerse en cuenta en el momento de construir la barrica.

La madera de roble esta formada mayoritariamente por:

- Polisacáridos (60- 85%) compuestos por celulosa y hemicelulosa
- Lignina (15- 35%).

Y otros componentes minoritarios, que varían en su concentración según la especie (Chatonnet, 1998):

- Polifenoles de bajo peso molecular: Ácidos y aldehidos benzóicos y alcoholes bencílicos (aldehidos y ácidos vainílico y siringico) y cinámicos (coniferaldehido, sinapaldehido, eugenol y sus derivados) y ácidos cinámicos en su forma aglicona (aesculina, sabor amargo, escopolina, sabor ácido).
- Lignanos, flavonoides y Estilbenos.
- Taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos que pueden encontrarse en su forma libre o unidos a polisacáridos).
- Taninos condensados en muy poca cantidad.
- Compuestos alifáticos (ácidos, oleico, linoléico y palmítico).
- Compuestos aromáticos terpénicos, furánicos, (furfural, 5-hidroxi-metilfurfural) lactonas ( $\beta$ -metil- $\gamma$ -octolactona,  $\beta$ -nonalactona, y  $\beta$ -decalactona).
- Carotinoides y derivados de su degradación.
- Esteroides.
- Oleoserinas.
- Ceras y minerales.

(Vivas, 2000; Hidalgo, 2003<sub>e</sub>)

#### • El tamaño de grano

El roble se diferencia por el tamaño de grano. Se entiende por grano al tamaño y regularidad de los círculos de crecimiento anual del árbol. Así el roble de grano fino es aquel que presenta un crecimiento de los círculos anuales pequeño, y roble de grano grueso aquel que lo presenta grande. El tamaño y la regularidad del grano dependen del tipo de roble, la edad, las condiciones climatológicas y el terreno donde esté plantado (Feulliat y col., 1992, 1993).

Los círculos de crecimiento anual se componen de madera de primavera, porosa y rica en grandes vasos, que contiene unas estructuras denominadas tílides. Las tílides son abolladuras de la membrana celular que penetran más o menos profundamente dentro del vaso leñoso y pueden llegar a obstruirlo. Los vasos de primavera presentan una cierta permeabilidad a los líquidos y en el caso de que no estén lo suficientemente obturados por las tílides como para impedir el paso del líquido, pueden originar que las barricas tengan fugas (Zamora, 2003<sub>e</sub>).

Los robles europeos presentan unas tílides poco abundantes (Chatonnet y Dubourdieu, 1998) por lo que son más permeables a los líquidos y el riesgo de fugas es alto. Por tanto, los tablones o duelas para confeccionar las barricas se realizan mediante hendido. De este modo, las duelas presentarán una superficie de contacto con el vino paralela a los radios medulares lo que disminuye la posibilidad e fugas.

Por el contrario, el roble americano presenta unas tílides muy abundantes y espesas (Chatonnet y Dubourdieu, 1998). Los vasos de primavera son poco permeables al líquido y el riesgo de fugas es mínimo. Por lo que el roble americano se procesa mediante aserrado, lo que condicionará que las duelas presenten los radios medulares mayoritariamente oblicuos respecto de la superficie de contacto con el vino.

Por lo general, el *Quercus petraea* presenta un grano que se clasificaría entre fino (1-2 mm) y medio (2-4 mm), el *Quercus robur* presenta generalmente un grano grueso (mayor de 4 mm), y finalmente el *Quercus alba* presenta un grano de medio a grueso (2-5 mm) (Chatonnet, 1998).

Se considera que cuanto más fino es el grano mayor es la porosidad. Los robles de grano fino poseen un mayor número de círculos de crecimiento y por tanto presentan una mayor proporción de vasos leñosos de primavera por unidad de superficie. Por esta razón son más porosos que los robles de grano grueso (Feulliat y col. 1993; Vivas, 1997).

El tipo de grano influirá relativamente poco sobre el aporte de oxígeno ya que la proporción que entra atravesando la propia estructura de la madera no es, en modo alguno, la parte principal. Se considera que a través de la propia madera entra únicamente el 16 % del total del oxígeno (Vivas, 1997). El resto entraría cruzando las juntas interduelas (63%) y por el esquivo (21%). Además, los trasiegos también contribuyen de forma considerable en la cantidad total de aporte de oxígeno durante la crianza.

Por el contrario el tamaño de grano, independientemente de la especie de roble de que se trate, es muy importante en lo que respecta a la aportación de aromas y de taninos elágicos. Al aumentar el tamaño del grano, se incrementa el aporte de extracto seco y taninos elágicos, mientras que disminuyen la concentración de Eugenol y  $\beta$ -Metil- $\gamma$ -octolactona que aportan al vino las aromas de clavo y de nuez y coco, respectivamente (Vivas, 1995).

En resumen, el grano puede afectar los tres procesos fundamentales que tienen lugar durante la crianza del vino: la microoxigenación natural que favorece la estabilización de la materia colorante y suavizan la astringencia, el aporte de aromas propios de la madera que enriquece la intensidad y la complejidad aromática, y finalmente, el aporte de taninos elágicos que contribuyen a la sensación de estructura (Moutounet y col., 1999).

#### • **Secado**

Después de ser cortados los troncos, ya sea por hendido o aserrado, se procede al secado de la madera donde la madera ha de perder humedad desde un 35- 60% cuando está recién cortada hasta un 12-18%, con lo cual tendrá lugar una contracción de las fibras y reducción de volumen.

El secado se puede realizar de modo:

- Natural: A la intemperie durante 2 o 3 años, donde la madera sufrirá lavados naturales y la proliferación de hongos (*Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma kominii*) hasta los 4 mm de profundidad que producen reacciones de origen enzimático. Con el secado natural se reduce el color y la astringencia de la madera por la disminución de taninos elágicos y se hidrolizan las cumarinas glicosiladas de sabor amargo (aesculina y escopolina) transformándose en

sus agliconas de sabor más suave (aesculetina, escopoletina) y aumenta la concentración de compuestos aromáticos (vainillina, eugenol, aldehído siringico y  $\beta$ -metil- $\gamma$ -octolactona) (Vivas, 1991).

- Artificial: Recibiendo corrientes de aire caliente entre 30-60 °C durante 3 ó 4 semanas. Donde apenas se mejoran las características sensoriales de la madera.
- Mixto: Donde se mantiene la madera en secado natural durante 12-15 meses y luego se realiza el secado artificial. En ocasiones se sumerge la madera en agua para aumentar los lavados y disminuir taninos.

### • Curvado y Tostado

Una vez secada la madera, las duelas serán vaciadas y bojadas. Luego se colocarán en posición circular (para cada barrica entre 29 y 36 duelas) y se fijarán con los aros de montajes. El doblado de las duelas se realiza combinando la acción de calentamiento al fuego y humedad, aumentando así la flexibilidad de la madera. Al adquirir las duelas la forma deseada se fijan otros aros de montaje y se procede al tostado de afinado.

Grado de Tostado	Duración (minutos)	Temperatura Superficial (°C)	Espesor afectado de la madera (mm)
Ligero	5	120-180	2- 3
Medio	10	190- 200	3- 4
Fuerte	15	200- 210	4- 5
Muy Fuerte	20	215- 230	> 5

Tabla 3: Tipos de tostado. (extraído de Hidalgo, 2003)

Los diferentes grados de tostado se observan en la Tabla 3. El grado de tostado influye en las características físicas de la barrica pero, también aparecerán una serie de compuestos químicos derivados del calentamiento que afectarán en mayor o menos medida las propiedades organolépticas de los vinos contenidos en las mismas.

El tostado influye sobre sustancias susceptibles de ser liberadas al vino por la madera de roble, especialmente las aromas generadas a partir de la celulosa y la hemicelulosa durante el tostado como son las notas de almendras tostadas producidas por los furanos, o de caramelo, café y avellana tostados; producidos por el maltol y la dimetilpirazina respectivamente. Algunas unidades xilosa de la hemicelulosa presenta grupos acetilos que se hidrolizan durante el tostado a ácido acético, lo cual aumenta la acidez volátil en barricas nuevas, por lo que se precisa de una correcta preparación de estas barricas antes comenzar la crianza (Vivas y col., 1995).

Otras aromas podrían producirse por la degradación térmica de los lípidos presentes en la madera originando las  $\beta$ -metil- $\gamma$ -octolactona con aromas de nuez y coco.

Por último, a partir de la termólisis parcial de la lignina se producen diferentes reacciones que dan lugar a aldehídos fenoles y fenil cetonas con aromas de vainilla, o

a los aromas de tostado, clavo de especias, o el desagradable olor animal producido por los fenoles volátiles. Estos últimos también pueden generarse por descarboxilación de ácidos fenoles en la uva o el vino, fundamentalmente en presencia de *Brettanomyces* (Zamora, 2005<sub>b</sub>).

A medida que aumenta el grado de tostado disminuyen los taninos elágicos, pero a la vez habrá una disminución de aromas, desplazándose el equilibrio aromático hacia los aromas tostados, especiados y ahumados y disminuyendo los aromas de nuez y coco. El aroma de vainilla se incrementará hasta el tostado medio y por encima de éste comienza a disminuir (Chatonnet, 1992; Matějček y col. 2005). En general se recomienda un tostado medio para complementar tanto la estructura con los taninos del roble como el aroma. (Moutounet, 1992).

- **Edad de la barrica**

El roble de las barricas aporta al vino compuestos fenólicos que contribuyen a la astringencia, amargor y acidez, como son los taninos. También sustancias volátiles que liberan aromas, como son los furanos, heterociclos volátiles, ácido acético, aldehídos fenoles, fenil cetonas, fenoles volátiles y  $\beta$ -metil- $\gamma$ -octolactona. Es de destacar que estos aportes disminuirán con la edad de la barrica, al tiempo que los poros de la misma se obturan, disminuyendo el aporte de oxígeno al vino y con ello las reacciones de combinación y oxidación-reducción que se desean con la crianza (Vivas, 1999).

- **Otros aspectos**

La crianza en barrica se ha de realizar con un riguroso manejo de las mismas, acondicionando las barricas nuevas antes de su primera utilización y limpiando y preparando las barricas usadas para su reutilización. En general se llevan a cabo protocolos establecidos para estos fines (Vivas y col., 1995).

Otro aspecto no menos importante es la sala de crianza donde las temperaturas han de oscilar entre 10 y 18°C de temperatura y la humedad relativa debe ser la máxima posible sin llegar a la condensación, que podría provocar la proliferación de hongos. Los cambios de temperatura y humedad provocarán mermas en las barricas con lo cual deberá procederse al rellenado de las mismas sistemáticamente (Feulliat y col., 1994<sub>a</sub>).

Las barricas han de estar bien tapadas y pueden colocarse con el tapón (de madera con arpillera o silicona) hacia arriba (12.00h) o giradas (2.00h) (Moutounet y col., 1993). En cualquier caso han de almacenarse de modo tal que permitan el rellenado y la extracción de muestra necesaria para verificar los niveles de sulfuroso libre (Chatonnet, 2000).

El tiempo de crianza es un tema muy discutido. En algunos países están regulados por Ley y en otros los enólogos deciden el tiempo óptimo de estancia en barricas. La mejor manera de determinar el tiempo en barrica de un vino es una cuidadosa cata sistemática del mismo. En crianzas cortas, la extracción de aldehídos furánicos será

alta pero, en crianzas largas estas concentraciones decrecerán por la conversión en los alcoholes correspondientes (Garde- Cerdán y Ancín- Azpilicueta, 2006). En estos casos los compuestos furánicos no tendrán un papel importante en el aroma del vino, pero sí incrementarán la percepción de las lactonas del roble (Reazin, 1981). Los aldehidos fenólicos, de manera similar a los furánicos, se extraen en los primeros meses de crianza y en crianzas largas pueden disminuir por transformación en alcohol o pueden mostrar pequeñas fluctuaciones. Los alcoholes fenólicos como el guaiacol se extraen durante los primeros 9 meses de crianza para luego permanecer prácticamente constantes (Scarbet y col., 1994; Garde- Cerdán y Ancín- Azpilicueta, 2006).

### 5.1. Influencia de la crianza en los compuestos fenólicos del vino.

El carácter poroso y permeable de la madera permite que se desarrollen fenómenos de intercambios líquido, gas y extraíbles. En la Figura 18 se observa un esquema de los procesos que ocurren durante la crianza en barrica.

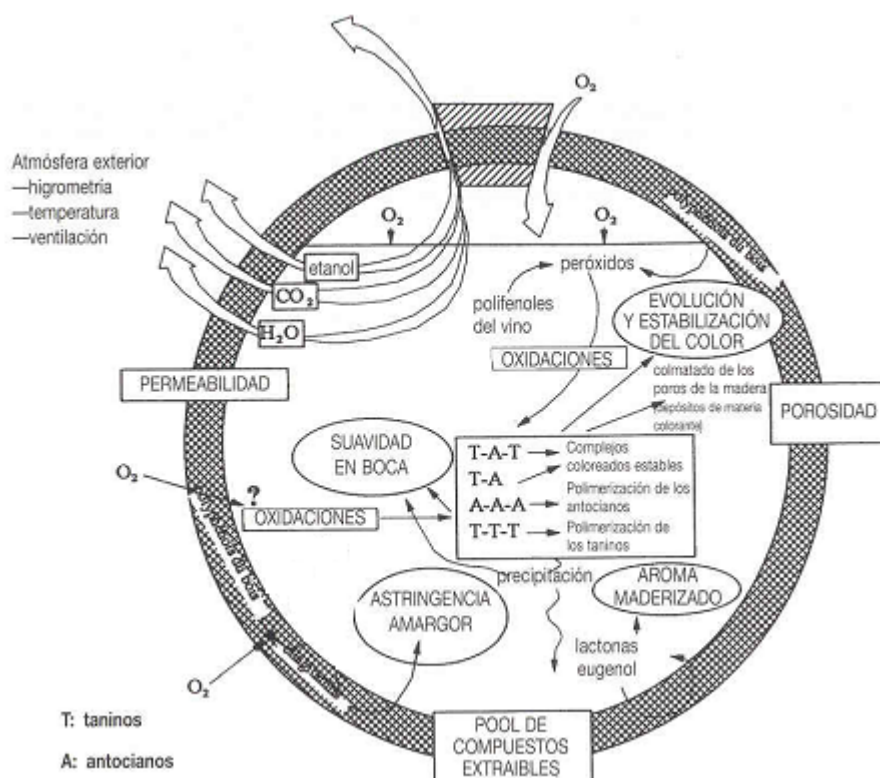


Figura 18: Esquema de los intercambios madera- líquido-atmósfera implicados en los procesos de envejecimiento del vino en barricas de robles nuevas.(adaptado de Feulliat, 1996)

Durante el tiempo que el vino permanece en la barrica no sólo el vino recibirá el aporte de las aromas y compuestos fenólicos del roble, mejorando su aroma y gusto, sino que se producen, además, numerosas reacciones directas o mediadas por la oxigenación moderada a través de los poros de la madera, juntas interduelas y el esquivo (Vivas y Glories, 1996; Glories, 2000).

Parte de las reacciones que se producen en la bodega a causa de la presencia de oxígeno han sido descritas en los apartados dedicados a flavanoles y antocianos, donde se explicaba que el oxígeno en presencia de cationes hierro y/o cobre puede intervenir en la polimerización de procianidinas mediante la formación de semiquinonas o oxidarse a etanal, el cual, en medio ácido, da lugar a un carbocatión (etanal activado). El etanal activado provoca la polimerización de las procianidinas mediante puentes etilo, pero también permite las combinaciones entre los antocianos y flavanoles (Jones y col., 2004).

En las reacciones que tienen lugar en bodega intervienen los taninos elágicos y los taninos gálicos que en los inicios de la crianza aportarán al vino notas astringentes y amargas. Los taninos gálicos con la crianza hidrolizarán a ácido gálico, contribuyendo con notas ácidas al vino. Por su parte, los taninos elágicos se hidrolizan a ácido elágico, pero además tienen una alta capacidad para captar el oxígeno, protegiendo así los antocianos de la oxidación. Y, según algunos autores, al mismo tiempo inducen a la formación de etanal que permite la polimerización de los taninos de la uva y las combinaciones, favoreciendo la estabilidad del color (Vivas y col., 1996; Puech y col., 1999).

Las reacciones mediadas por etanal se producen de manera simultánea y compiten entre ellas, por lo que la proporción de antocianos y flavanoles definirá el predominio de unas u otras reacciones. En un vino desequilibrado el efecto de la oxigenación moderada traerá consigo o bien la polimerización desproporcionada de los flavanoles llevando a la precipitación de los mismos o bien la oxidación de los antocianos con la correspondiente pérdida irreversible del color.

Algunos autores plantean la inestabilidad de los puentes etilo, y la reestructuración del vino después de la crianza en bodega y/o microoxigenación (Escribano- Bailón y col., 2001). Además, se ha de considerar la formación de vitisinias, oalklinas y otros nuevos pigmentos por mecanismo de cicloadición con etanal, aldehídos cinámicos, u otros compuestos (Mateus y col., 2002, 2003, de Freitas y col., 2004; Salas y col. 2005). Y también las combinaciones directas entre flavanoles y/ o antocianos y formación de complejos con péptidos y polisacáridos por parte de las proantocianidinas, fundamentalmente en el caso de la crianza sobre lías, que se detallará más adelante.

Todos estos procesos contribuyen a la evolución armoniosa de los compuestos fenólicos y, unido a los aportes tánicos y de compuestos volátiles que aporta la bodega, llevarán a la transformación estructural y la mejora de la calidad del vino.

En dependencia de la composición del vino, la bodega y las condiciones de la crianza, se modificará el color desde los tonos rojos vivos con matices violáceos hasta los tejas anaranjados. Cambiarán los aromas, desde los matices varietales a matices más complejos y especiados extraídos de la madera, y tendrá lugar una mejora del gusto aumentando las sensaciones de redondez y volumen al tiempo que disminuyen las de astringencia y amargor (Vivas y col., 1997; Hidalgo, 2003, Pérez Magariño y González San José, 2004).

## 6. MICROOXIGENACIÓN

A principio de los años 90, Patric Ducournau y la familia Laplace, viticultores de la denominación de origen Madiran, que utiliza la variedad de uva Tannat, muy rica en taninos y antocianos, decidieron investigar sobre el aporte de oxígeno en la crianza. Aquí comenzaron los ensayos con el fin de conservar las sensaciones de grasa y fruta de los vinos criados en barricas y/ o en depósito.

En barricas, la cantidad de oxígeno disuelto en los vinos es de 15- 40 mg/L aproximadamente al año (Ribéreau-Gayon, 1931). En los vinos mantenidos en recipientes de acero inoxidable se han de realizar trasiegos a fin de que estos estén en contacto con el aire y disuelvan cantidades de oxígeno similares a los recibidos en barrica (Pontallier, 1981). Por esta razón, y simulando estos aportes, se diseñaron los microoxigenadores que consisten en una bombona de oxígeno y un panel de control en el que se ajustan las pequeñas cantidades de oxígeno que se aportarán de forma continua a través de un microdifusor de porcelana porosa. Estos dos últimos elementos pueden observarse en la Figura 19 (Ducournau y Laplace, 1993).



Figura 19: Panel de control dosificador de oxígeno y microdifusor.  
(extraído de [www.oenodev.com](http://www.oenodev.com), modelo: visio6)

La microoxigenación se define como un aporte lento y constante de oxígeno, de forma tal que la velocidad de aporte sea siempre menor que la velocidad de consumo. De este modo se evita la acumulación del oxígeno disuelto a diferencia del trasiego, en el que el oxígeno se añade de manera brusca, provocando fenómenos de evolución y oxidación (Boulet y Mountounet, 2000). El control del aporte de oxígeno contribuye a armonizar la estructura de los vinos, estabilizando el color y modificando el aroma al eliminar notas herbáceas y vegetales y potenciar caracteres afrutados y varietales (Rodanmza, 2003). Las reacciones que tienen lugar durante la microoxigenación son aquellas en las que interviene el etanal para la formación de puentes etilo entre las moléculas de antocianos y proantocianidinas, la polimerización de proantocinidinas y



formación de nuevos pigmentos (Parish y col., 2000). Dichas reacciones están descritas en apartados anteriores.

La técnica de microoxigenación se puede emplear en las diferentes etapas de la elaboración de un vino:

- Durante la fermentación alcohólica se hace necesario cierto aporte de oxígeno para favorecer la multiplicación celular de las levaduras. A nivel práctico se recomiendan dosis entre 3-5 ml de O<sub>2</sub> /L cuando la densidad ha descendido 20 puntos, cubriendo así las necesidades de oxígeno en el período de población máxima de levaduras. En este sentido Castellari y colaboradores (1998) al degustar, después de seis meses de almacenaje, vinos elaborados sin y con diferentes dosis de oxígeno, encontraron que los vinos más equilibrados y menos astringentes eran aquellos que se habían fermentado en presencia de bajas dosis de oxígeno (75ml/Kg). En general se acepta el beneficio de la aplicación de la microoxigenación durante la fermentación (Lemaire, 1995; Silva y col., 2005). Otros autores no encuentran efectos beneficiosos en la adición de oxígeno a los mostos de vinos tintos, planteando que disminuye la concentración de compuestos fenólicos y aparición de pigmentos marrones (Ho y col., 1999; Pérez Magariño y González SanJosé, 2003<sub>b</sub>).
  
- Al final de la fermentación alcohólica, en vinos sangrados o en maceración y antes de la fermentación maloláctica. La microoxigenación permite una polimerización tanino-antociano muy efectiva que lleva a una mayor intensidad colorante sobre todo en vinos a pH muy bajo, donde los antocianos se encuentran en su forma flavilio muy reactiva. En análisis sensorial desaparecen los aromas con carácter vegetal. Las dosis de oxígeno en esta etapa es comúnmente entre 10-25 ml/L/mes pero han de aplicarse según criterios basados en la degustación, siguiendo de cerca la formación y consumo de etanal y con muy bajas dosis de sulfuroso libre (2-3 g/hL) para retrasar la fermentación maloláctica pero sin que el sulfuroso libre consuma grandes cantidades del etanal disponible. Generalmente la microoxigenación antes de la fermentación maloláctica se aplica durante un mes, para luego inocular las bacterias lácticas. (Hidalgo, 2003<sub>f</sub>; Roig y Yerle, 2003). Las experiencias de Silva y col., (2005) muestran que los vinos oxigenados antes de la fermentación maloláctica, son más afrutado, suaves y con más contenido de polisacáridos.
  
- La microoxigenación durante la crianza es una alternativa para aquellos vinos que no pueden envejecer en barricas. Generalmente, en las bodegas existen muchos más depósitos de fermentación que barricas disponibles. Por lo que en muchas bodegas se estructura el vino mediante la microoxigenación y luego se pasa a una crianza corta en barrica que aporte toques aromáticos y complejidad al vino. La microoxigenación, en estos casos, permite alargar la crianza y no lleva a la evolución ni oxidación del vino, sino a vinos con más color, más ricos y redondos,

perdiendo las notas herbáceas en y mejorando desde el punto de vista organoléptico (Moutounet, 2003).

Los cambios en la estructura del vino durante la microoxigenación se observan en períodos comprendidos entre 2- 6 meses. Es conveniente que la temperatura de los vinos este entre 12 y 17°C para la correcta disolución del oxígeno (Moutounet y col., 2001).

El tiempo de microoxigenación está condicionado por:

- La concentración de polifenoles totales y equilibrio de las estructuras fenólicas. Como en la crianza, es necesario llevar a microoxigenar vinos equilibrados y con cantidades de taninos y antocianos suficientes para que el etanal producido en el medio sea consumido en las reacciones de polimerización de proantocianidinas y combinación proantocianidinas-antocianos.
- El aporte de oxígeno y el momento de estos aportes. Durante el período de crianza no debe sobrepasarse el nivel de oxígeno disuelto a 0,03 ppm de este modo se respetará el aroma del vino, el potencial de guarda y la estabilidad microbiológica. Por lo general se aplica 1-3 mL/L/mes, con dosis más elevadas para vinos con estructuras fenólicas fuertes o excesivas, de 2mL/L/mes para aquellos vinos con notas vegetales pronunciadas y dosis menores de 0,75 mL/L/mes para vinos con bajo contenido fenólico. Estas dosis son orientativas varían según la evolución del vino (Boulet y Moutounet, 2000).

Los efectos de la microoxigenación referentes al color están encabezados por un aumento en la intensidad colorante, con menos cantidad de antocianos libres y mayor estabilidad del color (Bosso y col., 2000; Ferrarini, y col., 2001; Pérez Magariño y González San José, 2002). Estos efectos se han estudiado en soluciones modelos de malvidina-3-glucósido, catequinas y anhídrido sulfuroso donde la presencia o no de etanal condiciona la pérdida de los antocianos y el aumento de la polimerización (Picinelli y col., 1994). La formación de complejos antociano-proantocianidina y de polímeros de proantocianidinas mediante puentes etilo están influenciados por el pH, siendo más rápidas las reacciones a pHs más bajos (García Viguera y col., 1994). Atasanova y colaboradores (2002), con técnicas de espectrofotometría de masas, han comprobado la formación de diversos complejos antocianos-proantocianidinas, piranoantocianos, y polímeros de proantocianidinas mediados por puentes etilo en vinos microoxigenados.

Desde el punto de vista aromático, al final de la microoxigenación habrá una disminución de los gustos herbáceos, astringentes y ásperos atribuidos a los taninos. También disminuyen los gustos reducidos que aparecen en los vinos que se mantienen en recipientes de acero inoxidable (Boulet y Moutounet, 2000; Sullivan y col., 2002).

Lemaire (1995) describe que los cambios organolépticos que tienen lugar en los vinos microoxigenados se pueden separar en dos fases:

- ⇒ Fase de estructuración: Se caracteriza por un aumento de la agresividad de las proantocianidinas en boca y un descenso de las aromas del vino. Al final de esta etapa ocurre una inversión de este comportamiento.
- ⇒ Fase de armonización: En esta fase los taninos serán mucho más suaves en boca y aumentará la complejidad, desapareciendo las notas vegetales y reducidas.

Experimentos realizados Nikfardjam y Dykes (2002<sup>a,b</sup>, 2003) observaron que el comportamiento de los vinos microoxigenados se correspondía a las fases antes descritas. El análisis sensorial manifestó muy pocas diferencias en las primeras nueve semanas para luego disminuir la astringencia y el amargor. Los índices de DPM aumentaron bruscamente de la semana 3 a la 5, para luego seguir aumentando pausadamente hasta la semana 11 en que comenzaron a decrecer.

Durante el envejecimiento mediante la microoxigenación se han de controlar periódicamente los niveles de sulfuroso libre y seguir de cerca la disminución de los antocianos libres. Es fundamental llevar a cabo un cuidadoso y sistemático análisis sensorial siguiendo con prudencia los parámetros relacionados con el aroma, como son el exceso de etanal o las notas acéticas (Blouin y col., 2000).

## 7. LÍAS

La crianza en barrica y la microoxigenación sobre lías es una práctica reciente en vinos tintos. Durante la crianza en barricas las lías consumen oxígeno protegiendo al vino de la oxidación de los antocianos. En el caso de la microoxigenación las lías consumen grandes cantidades de oxígeno, y esto irá en decremento del uso del mismo por los compuestos fenólicos. Lo más usual es poner el vino a envejecer sobre lías finas para evitar un exceso de reducción y notas sulfhídricas. Actualmente, se pueden utilizar levaduras especialmente seleccionadas para facilitar el envejecimiento sobre lías. Estas levaduras han de ser de rápida autólisis, que liberen polisacáridos con peso molecular suficiente para mejorar la estructura y con baja capacidad de adsorción de antocianos por las paredes celulares (Morata y col., 2005<sub>a</sub>).

El oxígeno puede tener efecto favorable sobre la sedimentación y clarificación natural de las lías que acaban por disolverse, aportando polisacáridos y manoproteínas al vino (Fornairon y col. 2000). Estas manoproteínas evitarán la formación de partículas coloidales en suspensión entre los polisacáridos del vino y los taninos procedentes de la semilla (Riou y col., 2002). La capacidad de las manoproteínas para prevenir la inestabilidad por la formación de coloides entre polisacáridos y taninos está asociado a los fenómenos de redondez y volumen en boca (Fuster, 2001). Degustaciones de soluciones sintéticas mostraron incremento en la sensación de cuerpo y redondez de boca y la disminución del amargor al añadir fracciones que contenían manoproteínas procedentes del vino (Vidal y col., 2004<sub>c,d</sub>).

El potencial de consumo de oxígeno por parte de las lías es mucho más alto que el de los polifenoles del vino. Se considera que las lías consumen entre 1- 4  $\mu\text{M}$  de  $\text{O}_2$  /H X  $10^{10}$  células desde el segundo mes hasta el tercer año de envejecimiento del vino (Foraniron y Salmon, 2003). Las lías competirán con los compuestos fenólicos por el oxígeno; no obstante la reactividad de las lías disminuyen al estar mezcladas con polifenoles, dadas las fuertes interacciones entre los polifenoles y los componentes de las lías (López-Toledano y col., 2002, 2004; Salmon, 2005).

Las peculiaridades que las lías aportan a los vinos tienen origen en la autólisis de las levaduras que consiste en la ruptura y degradación de las estructuras celulares de las mismas, mediante sus propias enzimas. Cediendo al vino una serie de compuestos, provenientes de las estructuras celulares, durante el período de crianza o de microoxigenación.

La autólisis se inicia con la actividad de las enzimas glucanasas que liberan polisacáridos y cadenas cortas olisacáridicas. Una parte de estos polisacáridos son manoproteínas unidas covalentemente a glucanos de la pared celular de la levadura. Luego tiene lugar la hidrólisis parcial del glucano desestabilizando la estructura de la pared celular y liberando manoproteínas de la zona periplasmática, caracterizadas por su alto peso molecular y bajo contenido en glucosa. La hidrólisis del glucano continúa por parte de las enzimas en los restos de la pared y en el medio extracelular. Finalmente las enzimas glucanasas disueltas en el medio degradan los glucanos unidos a las manoproteínas, y éstas a la vez pueden ser hidrolizadas por manosidasas

y otras proteasas que liberarán peptidomananos de menos tamaño (Charpentier y Freyssinet, 1989).

Todos estos procesos liberarán al medio (Morata y col., 2005<sub>a</sub>):

- Contenido Celular: Nucleósidos, nucleótidos, aminoácidos y péptidos. Que actúan como precursores de aroma, algunos pueden presentar sabores.
- Pared Celular: Glucanos y manoproteínas. Interaccionan con compuestos aromáticos, modifican el volumen y la sensación de estructura y redondez en boca, actúan como protectores estabilizando la materia colorante.

Chalier y colaboradores (2005) observan diferencias entre las manoproteínas liberadas por diferentes cepas de levaduras comerciales, lo cual conlleva a diferencias en los aromas y calidad de los vinos según el análisis sensorial. La retención de aromas por el conjunto de todas las manoproteínas ensayadas, no fue igual que por el conjunto de manoproteínas provenientes de cada cepa por separado, ni por cada fracción, sugiriendo que la interacción de las manoproteínas con los compuestos aromáticos depende tanto de la estructura conformacional como de la composición de las macromoléculas liberadas por las lías.

La presencia de lías influye sobre los polifenoles del vino. Como hemos explicado en el apartado relacionado con manoproteínas, los polifenoles interaccionan con coloides, proteínas y polisacáridos formando precipitados o complejos. Estudios recientes de simulación de crianza en vinos tintos (Mazauric y Salmón, 2005) mostraron muy poca adsorción de compuestos fenólicos monoméricos por parte de las lías, mientras los compuestos poliméricos fueron adsorbidos sin que existiesen tendencias respecto a la adsorción de taninos con alta o baja polimerización. En este estudio también se analizaron los taninos condensados restantes en el vino, los cuales contenían menos epigallocatequina respecto a los iniciales. Lo cual indica que las lías adsorbieron preferentemente los taninos condensados apolares. La adsorción de los antocianos por parte de las lías no ha sido relacionada con la polaridad de los mismas.

En vinos microoxigenados en presencia de lías hay una pérdida rápida de los antocianos monoméricos, aumentando los poliméricos con gran rapidez (Morata y col., 2005<sub>a,b</sub>). Durante la crianza en barrica sobre lías los polisacáridos liberados durante la autólisis interaccionan, además de con los polifenoles del vino, con la fracción polifenólica proveniente de la barrica consiguiendo que no aumente la astringencia.

La repercusión de las lías sobre el perfil aromático ha sido ampliamente estudiado:

- ⇒ Por una parte, las lías contribuyen con compuestos volátiles al vino. (Chung, 1986; Lubbers y col., 1994). En vinos modelos, después de la autólisis de levaduras se detectaron ésteres, fundamentalmente ésteres etílicos de ácidos grasos relacionados con aportes de notas frutales. Alcoholes terpénicos, relacionados con aromas de moscatel y alcoholes

## *Capítulo I. Introducción*

---

superiores relacionados con aromas medicinales y florales. Aldehídos como el metil-3-butanal y el benzaldehído. Compuestos azufrados con aromas que recuerdan al eucalipto. Y lactonas como el sotolón que aparece en crianzas largas y otras con aromas de nuez y coco.

⇒ Por otra parte, las lías durante la crianza en barricas de robles pueden modificar los contenidos de compuestos volátiles procedentes de la madera. En este sentido Blanchard y colaboradores (1999) relacionaron la intensidad de los caracteres afrutado en el vino con la presencia de lías que protegen al 3-mercaptohexanol, responsable de las aromas afrutadas de la oxidación. Las lías favorecen la síntesis del furfuriol, con agradables aromas a café tostado (Blanchard y col., 2001). Estudios en medios sintéticos y vinos que contenían 4-etilguaicol, aroma de madera quemada, y 4-etilfenol, aroma de sudor de caballo; concluyen que la presencia de lías y su autólisis reducen el contenido de estos compuestos aromáticos desagradables. La disminución de estos fenoles volátiles está condicionada por factores como son el contenido de etanol, pH y temperatura (Chassagne y col., 2005). Otros ensayos realizados en vinos con lías, en presencia o no de oxígeno, no se encontraron diferencias en la composición final de los vinos ni de las lías excepto en el contenido de ergosterol, que disminuyó en presencia de oxígeno (Fornairon y Salmon, 2003).

En vinificaciones en tinto el uso de las lías durante la crianza por períodos desde dos meses hasta alrededor de 18 meses da lugar a vinos más suaves y equilibrados con mayor complejidad y riqueza aromática. (Rodríguez y col., 2005). La combinación del uso de lías y microoxigenación va utilizándose cada vez más con buenos resultados, reservándose a vinos con alto contenido fenólico (Lemaire, 2006).

## BIBLIOGRAFÍA

- Aiken, J.W., Noble, C. Composition and sensory properties of Cabernet sauvignon wine aged in french versus american oak barrels. *Vitis*, **1984**, 23, 27- 36.
- Alcalde- Eon, C., Escribano- Bailón, T., Santos- Buelga, C., Rivas- Gonzalo, J.C. Separation of pyranoanthocyanins from red wine by column chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 513, 305- 318.
- Arnold, R.A, Noble, A.C., Singleton, V.L. Bitterness and astringency of phenolic fractions in wines. *J. Agric. Food Chem.*, **1980**, 26, 675- 678.
- Asenstorfer, R., Hayasaka, Y., Jones, G. Isolation and structure of oligomeric wine pigments by bisulphite mediated ion Exchange chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 5957- 5963.
- Asquith, T.N y Butler, L.G. Use of dye labelled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *J. Chem. Ecol.*, **1985**, 11, 1535- 1544.
- Asseling, C, Brossaud, F, Cheynier, V., Moutounet, M. Influence of temperature and time maceration on flavonoid composition and incidence on sensory characteristics of wines of cabernet franc of differents terroirs in Val de Loire. Contribution for an objective definition of typicity. *Bull. O.I.V.*, **1999**, 821-822, 518-531.
- Asseling, C., Ballester, J.F. Une caracterisation polyphenolique des raisins et des vins de cabernet franc. Importance de l'effect terroir, *P.A.V.* 109e année, **1992**, 19, 415- 420.
- Atanasova V, Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M. Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine making. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 458, 15-27.
- ATSM. Standard Definitions of terms relating to sensory evaluation of materials and products. *Annual Book of ATSM. Standards American Society of testing and materials*. Philadelphia. PA. **1989**, 2
- Austin, P.J., Suchar, L.A., Robbins, C.T., Hagerman, A.E., Tannin-binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle. *J. Chem. Ecol.*, **1989**, 15,1335–1347.
- Ayala, F., Echávarri, J.F., Negueruela, A.I. Método simplificado del color del vino. *Jornadas Científicas de Grupos de Investigación Enológica.*, Zaragoza, **17-19 de mayo de 1999**, 25.
- Azen, E.A., Maeda, N., Molecular genetics of human salivary proteins and their polymorphisms. In: *Advances in human genetics*. Harris H, Hirschorn K, editors. New York: Plenum, **1988**, 141-199.
- Bacon, J.R., Rhodes, M.J., Development of a competition assay for the evaluation of the binding of human parotid salivary proteins to dietary complex phenols and tannins using a peroxidase labelled tannins. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 5083- 5088.
- Bacon, J.R., Rhodes, M.J., Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 838–843.
- Bakker, J. y Arnold, G.M. Análisis of sensory and chemical data for color evaluation of a range of red port wines. *Am J. Enol. Vitic*, **1993**, 44, 27- 34.
- Bakker, J., Picinelli, A., Bridle, P., Model wine solutions colour and composition changes during aging. *Vitis*, **1993** 32, 11- 118
- Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S.J., García- Viguera, C., Reader, H.P., Watkins, S.J. Effect of sulfur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine. *J. Sci. Food Agric.*, **1998**, 78, 297- 307.
- Bakowska, A., Kurcharska, A.Z., Oszmianski, J. The effect of heating, UV irradiation and storage on stability of anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chem.*, **2003**, 81, 349- 355.
- Banderas-Tarabay, J.A., Zacarias D'oleire, I.G., Garduño-Estrada, R., Aceves Luna, E., González Begné, M. Electrophoresis analysis of whole saliva and prevalence of dental caries. A study in Mexican dental student. *Archives of Medical Research*, **2002**, 33, 499- 505.
- Barre, P., Blondin, B., Dequin, S., Feulliat, M., sabalyrolles, J.M., Salmon, J.M. La levadura de fermentación alcohólica. En *Enología: Fundamentos Científicos Tecnológicos*. Cord. Flanzys. AMV Madrid, **2000**, 274- 293.
- Bate-Smith, E.C., Flavonoid compounds in foods. *Adv Food Res.*, **1954**, 5, 261–300.
- Bate-Smith, E.C. Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochem.*, **1973**, 12, 907- 912.
- Baxter, N.J., Lilley, T.H., Haslam, E., Williamson, M.P., Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry* **1997**, 36, 5566–5577.
- Beech, F.W., Burroughs, L.F., Timberlake, C.F., Whiting, G.C. Progres recents sur l'aspect chimique et antimicobienne de l'anhydride sulfureux. *Bulletin de l'OIV*, **1979**, 52, 1001- 1022.
- Beeley, J.A., Soo Khoo, K., Lamey, P-J., Two dimensional electrophoresis of human parotid salivary proteions from normal and connective tissue disorder subjects using immobilised pH gradients. *Electrophoresis*, **1991**, 12, 493- 499.
- Beeley, J.A., Sweeney, D., Lindsay, J.C.B., Buchana, M.L., Sarna, L., Khoo, K. S., Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human parotid salivary proteins. *Electrophoresis*, **1991**, 12, 1032- 1041.(a)
- Beeley, J. A., Fascinating families of proteins: electrophoresis of human saliva. *Biochemical Society Transactions*, **1993**, 21, 133- 138.

## Capítulo I. Introducción

- Beeley, Newman, F., Wilson, P., Shimmin, I. Sodium Dodecyl Sulphate –polyacrylamide gel electrophoresis of human parotid salivary proteins: Comparison of dasylation, Coomassie Blue R-250 and silver detection methods. *Electrophoresis*, **1996**, 17, 505- 506.
- Bennick, A., Connell, G.E., Purification and partial characterization of four proteins from human parotid saliva. *Biochem J*, **1971**, 123,455–464.
- Bernard, N., Zebic, O., Sieczkowski, N. Raisonnement de l'utilisation des encimes et des tanins oenologiques en fonction du stress hydrique de la vigne. *Revue Française d'Oenologie*, **2005**, 215, 16- 20.
- Blanchard, L., Bouchiloux, P., Darriet, Ph., Tominaga, T., Dubourdiou, D. Caracterisation de la fraction volatile de nature souffrée dans les vins Cabernet sauvignon et Merlot. Etude de son évolution au cours de l'élevage en barriques. *In Actes VI Symp. Int. Enol. Bordeaux*, **1999**.
- Blanchard, L., Tomiaga, T., Dubordieu, D. Formation of furfirlthiol exhibiting a strong coffe aroma during oak barrel fermentation from furfural released by toasted staves. *J. Agric Food Chem.*, **2001**, 49, 4833-4835.
- Blouin, J., Papet, N., Stonestrtr, E. Study of the polyphenolic structure of red wines by physical- Chemical and sensory analices. *J. Int. Sci. Vigen Vin*, **2000**, 34, 33-40.(a)
- Blouin, La vinificación bordelesa de las uvas tintas. En *Enología: Fundamentos Científicos Tecnológicos*. Cord. Flanzys. AMV Madrid, **2000**, 465-467.(b)
- Bonnans, S. y Noble, A.C. Interaction of salivary flow with temporal perception of sweetness, sourness and fruitness. *Physiology & Behavior*, **1995**, 57, 3, 569-574.
- Bosso, a., Panero, L., Cuaita, M., Marulli, C. La técnica del delestaje su vini mMontepulciano d'abruzzo. *Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino*, **2000**, 24, 17- 195.
- Boulet, J.C., Escudier, J.L. Clarificación delos vinos por procedimientos físicos. En *Enología: Fundamentos Científicos Tecnológicos*. Cord. Flanzys. AMV Madrid, **2000**, 470- 480. (a)
- Boulet, J.C y Escudier, J.L. Flash- Expansión. En *Enología: Fundamentos Científicos Tecnológicos*. Cord. Flanzys. AMV Madrid, **2000**, 489- 490. (b)
- Boulet, J.C., Moutounet, M., La microoxigenación de los vinos. *Enología, Fundamentos científicos y técnicos*. Flanzys. AMV Ediciones/ Ed. Mundi- Prensa, España, **2000**, 114-121.
- Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am J. Enol. Vitic*, **2001**, 52, 2, 67-87.
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principe of protein dye binding. *Anal Biochem*. **1976**, 72, 346-352.
- Brossaud, F., Cheyner, V., Noble A.C. 2001. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2001**, 7, 33-39.
- Broulliard, R. Chemical structure of anthocyanins. En “*Anthocyanins as color food*” ED. P. Markakis. Academic Press, New York, **1982**, 1- 40.
- Cacho Palomar, J.F. El vino, su composición y nuestros sentidos. Discurso de ingreso a la Real Academia de las Ciencias Exactas, Física, Química y Naturales de Zaragoza. [www.unizar.es](http://www.unizar.es), 2 de diciembre, **2003**.
- Calderon,P., VanBuren, J., Robinson, W., Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hydrolysable tannins. *J. Agric. Food. Chem.*, **1968**, 16, 479- 482.
- Canals, R., Llaudy, M.C., Valls, J., Canals, J.M., Zamora, F. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seed of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 4019- 4025.
- Caridi, a., Cufari, A., Lovino, R., Palumbo, R., Tedesco, I. Influence of yeast on polyphenol composition of wine. *Food Technol. Biotechnol.*, **2004**, 42, 1, 37- 40.
- Carpenter G.H., Proctor G., Pankhurst C. L., Linden R. W., Shori D.K., Zhang X.S. Glycoproteins in human parotid saliva assessed by lectin probes after resolution by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **1996**, 17, 91- 97.
- Carvalho, E., Mateus, N., de Freitas, V. Flow nephelometric analysis of protein- tannin interactions. *Anal. Chim. Acta.*, **2004**, 513, 97- 101.
- Castellari, M., Arfelli, G., Riponi, C., Amati, A. Evolution of phenolic compounds in red winemaking as affected by must oxygenation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1998**, 49,1, 91- 94.
- Cavin, J.F., Divies, C., Guzzo, J. La Fermentación maloláctica. En *Enología: Fundamentos Científicos Tecnológicos*. Cord. Flanzys. AMV Madrid, **2000**, 326- 343.
- Chapon, L., Nephelometry as a method for studing the relation between polyphenols and proteins. *J. Inst. Brew*, **1993**, 99, 49- 56.
- Charlier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T., Gunata, Z. Interaction between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem.*, **2005**, doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.004
- Charlton, A.J., Baxter, N.J., Lilley, T.H., Haslam, E., McDonald, C.J., Williamson, M.P., Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats. *FEBS Lett*, **1996**, 382, 289– 292.
- Charlton, A. J., Haslam, E., Williamson, M.P., Multiple conformations of the proline-rich protein/ epigallocatechin gallate complex determined by Time average Nuclear overhauser effects. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 9899- 9905.
- Charlton, A., Baxter, N., Lokman, M., Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 1593- 1601.
- Charpentier, C, Freyssinet, M. The mechanism of yeast autolysis in wine. *Yeast*, **1989**, 5, 5181- 5186.



## Capítulo I. Introducción

- Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., Voilley, A. Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chem.*, **2005**, 91, 39- 44.
- Chatonnet, P. Les composés aromatiques du bois de chêne cédés aux vins. Influence des opérations de chauffe en tonnellerie. En "Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie". *J. Inter. Sci. Vigne Vin*, núm Hors de série., **1992**, 81-91.
- Chatonnet, P. Principales origines et caractéristiques des chênes destinés à l'élevage des vins. *Revue des Oenologues*, **1995**, 75, 15-18.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D. Comparative study of the characteristics of american white oak (*Quercus alba*) and european oak (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) for production of barrel aging of wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1998**, 49, 1, 79- 85.
- Chatonnet, P. La contamination des vins par Brettanomyces au cours de la vinification et de l'élevage : incidence, détection et moyens de lutte. *Rev. Fr. Enol.*, **2000**, 96, 23- 26.
- Chatonnet, P. De utilisation du bois de chene pour l'elaboration des grans vins. *II Conferencia Revista de Vinhos*. Porto 25 de junho de **2001**. [www.revistadevinhos.pt/rv\\_2conferencia\\_07.asp](http://www.revistadevinhos.pt/rv_2conferencia_07.asp)
- Cheyrier, V.F., Trousdale, E., Singleton, V.L., Salgues, M., Wylde, R. Characterization of 2-S-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J. Agric. Food. Chem.* **1986**, 34, 217- 221.
- Cheyrier, V., Moutounet, M., Sarni- Manchado, P. Los compuestos fenólicos. En *Enología: fundamentos Científicos tecnológicos*. Coordinador Flanzys, C. AMV Ediciones. Mundiprensa, **2000**, 114- 136.
- Chung, S.H. Contribution à l'étude de la formation des composés volatils au cours de l'autolyse de levures de vinification. *Thèse de doctorat*. Université de Bourgogne. Dijon, **1986**.
- Chung, K., Wong, T.Y., Wie, C.I., Huang, Y.W., Lin, Y. Tannins and human health: A review. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, **1998**, 38, 421- 464.
- Cliff, M., Brau, N., King, M.C., Mazza, G., Development of predictive models for astringency from anthocyanin, phenolic and color analyses of british Columbia red wines. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **2002**, 32, 21- 30.
- Colonna, A.E., Adams, D.O., Noble, A.C. Comparison of procedures for reducing astringency carry-over effects in evaluation of red wines. *Australian Journal Of Grape and Wine Research*, **2004**, 10, 26- 31.
- Comuzzo, P., Tat, L., Battistutta, F., Zironi, R. Dalla stabilizzazione sottrattiva alla conservativa. *Vignevini*. **2002**, 11, 64- 69.
- Condinelli, N., Dinnella, C., Cerone, A., Monteleone, E., Bertuccioli, M. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Quality and Preferences*, 2005, [doi:10.1016/j.foodqual.2005.04.009](https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2005.04.009)
- Cousanon, M. Une nouvelle technique: La macération préfermentaire à froid –Extraction à la neige carbonique. 1ere partie. Resultats oenologiques. *Revue des Oenologues*, **1999**, 92, 26-30.
- Croguennec, T., Nau, F., Pezennec, S., Brule, G. Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1883- 1889.
- de Freitas, V., Mateus, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 940–945.
- de Freitas, V., Mateus, N., Nephelometric study of salivary protein- tannin aggregates. *J. Sci. Food Agric.*, **2001**, 82, 113- 119.
- de Freitas, V., Carvalho, E., Mateus, N., Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chem.*, **2003**, 81, 503- 509.
- de Freitas, V., Sousa, C., Silva, A., Santos- Buelga, C., Mateus, N. Sintesis of a new catechin-pyrylium derived pigment. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 9349- 9352.
- Delteil, D. El sulfitado de las uvas, zumos y de los vinos. En *Enología: fundamentos Científicos tecnológicos*. Coordinador Flanzys, C. AMV Ediciones. Mundiprensa, **2000**, 429- 431.(a)
- Delteil, D. El despalillado de las uvas. El estrujado de las uvas. El prensado de las uvas. En *Enología: Fundamentos Científicos Tecnológicos*. Cord. Flanzys. AMV Madrid, **2000**, 436- 440.(b)
- Desert, C., Guérin-Dubiard, C., Nau, F., Jan, G., Val, F., Mallard, J. Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins. *J. Agric. Food. Chem.*, **2001**, 49, 4553- 4561.
- Dickinson, D.P., Thiesse, M., A major human lacrimal gland mRNA encodes a new proline-rich protein family member. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **1995**, 36, 2020–2031.
- Doerner, K.C., White, B.A. Detection of glycoproteins separated by non denaturing polyacrylamide gel electrophoresis using the periodic acid Schiff Stain. *Analytical Biochemistry*, **1990**, 187, 147- 150.
- Dournel, J.M. Recherches sur les combinaisons anthocyanes- flavanols. Influence de ces réactions sur la couleur des vins rouges. *Tesis doctoral*. Université de Bordeaux II, **1985**.
- Ducournau, P., Laplace, J. *Brevet*, n° 93 11073. **1993**.
- Ducruet, J., Dong, A., Canal- Llauberes, R.M., Glories, Y. Influence des encimes pectolitiques sélectionnés pour l'oenologie sur la qualité et la composition des vin rouges. *Revue Française d'Oenologie*, **1997**, 155, 16- 19.
- Ector, B.J.; Magee, J.B., Hegwood, C.P., Coig, M.J. Resveratrol concentration in Muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds, and wines. *Am. J Enol Vitic*, **1996**, 47, 1: 57-62.
- Edelman, A. y Lendl, B., Toward the optical tongue: flow through sensing of tannin – protein interactions based on FTIR spectroscopy. *J. Am. Chem Soc.*, **2002**, 124, 14741- 14747.

## Capítol I. Introducció

- Escribano- Bailón, M.T., Francia-Aricha, E.M., Rivas- Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C. Influencia del pH y de la concentració relativa de flavanoles sobre el color de los antocianos. *Jornadas Científicas de Grupos de Investigación Enológica.*, Zaragoza, **17-19 de mayo de 1999**, 12-13.
- Escribano- Bailón, T., Alvarez-Gracia, M., Rivas- Gonzalo, J.C., Heredia, F.J., Santos-Buelga, C. Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde mediated condensation between malvidin 3-O-glucoside and (+) catechin. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 1213- 1217.
- Es-Safí, N., Le Guernevé , C., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M. New phenolic compounds with Xanthylum skeletons formed through reaction between (+) catechin and glyoxylic acid. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2096- 2102.
- Es-Safí, N., Le Guernevé , C., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M. Xanthylum salts formation involved in wine colour changes. *International journal of Food Sciences and Technology*, **2000**, 35, 63- 74.(a)
- Es-Safí, N., Le Guernevé , C., Cheynier, V., Moutounet, M. New phenolic compounds formed by evolution of (+) catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic solution and their implication in color changes of grape derived products. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 4233-4240. (b)
- Es-Safí, N., Cheynier, V., Moutounet, M. Role of aldehydic derivatives in the condensation phenolic compounds with emphasis on sensorial properties of fruit derived food. *J. Agric Food Chem.*, **2002**, 50, 5571- 5585.
- Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Conde, E., García Vallejo, M.C. Les composés phenoliques de faible poids moléculaire dans les bois de chene espagnol, francais et américain. *J. Sci. Tech. Tonellerie*, **1996**, 2, 1- 11.
- Fernández de Simón, B., Cadahía, E.,n Jalocho, J. Volatile compounds in a spanish red wine aged in barrels made of spanish, french and american oak wood. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 7671- 7678.(a)
- Fernández de Simón, B., Hernández, T., Cadahía, E.,Dueñas, M., Estrella, I. Phenolic compounds in spanish red wine aged in barrels made of spanish, french and american oak wood. *Eur. Food Res. Technol.*, **2003**, 216, 150- 156.(b)
- Fernández Golfín, J.I., Cadahía, E. Características físicas y químicas de la madera de roble en la fabricación de barricas. Jornada técnica. « La barrica como factor de calidad en la crianza de los vinos tintos ». *Congreso y Jornadas*, Editorial Gobierno de la Rioja, **1999**, 3, 11- 66.
- Ferrari, R., Girardi, F., De Conti, D., Castellari, M. Results of some experience of microoxygenation application as wines ageing technique. *Industria delle Bevande*, **2001**, 30, 172, 116-118.
- Feulliat, F., Huber, F., Keller, R. Mise au point sur: la notion de grain utilisée pour classement des merrains de chene. *Rev. Fr. Œnol.*, **1992**, 139, 65- 69.
- Feulliat, F., Huber, F., Keller, R. La porosité du bois de chene (*Quercus robur*, L., *Quercus petraea* L.) utilisé en tonnellerie. Relation avec la variabilité de quelques caractéristiques physiques et anatomiques du bois. *Rev. Fr. Œnol.*, **1993**, 142, 5- 19.
- Feulliat, F., Keller, R., Huber, F. Structure anatomique et porosité du bois des chêne rouvre et pédoncule. Conséquence sur l'utilisation en tonnellerie. *Revue des Oenologues*, **1994**, 71, 13- 18.(a)
- Feulliat, F., Perrin, J.R., Keller, R., Aubert, D., Gelhaye, P., Houssement, C., Perrin, J. Pierre, M. Simulation expérimentale de l'interface tonneau: mesures des cinétiques d'impregnation du liquide dans le bois et d'évaporation de surface. *J. Int. Sci. Vigne et Vin*, **1994**, 28, 3, 227- 245.(b)
- Feulliat, F. Contribution à l'étude des phénomènes d'échanges bois vin atmosphère à l'aide d'un <<fût>> modèle. Relations avec la structure anatomique du bois de chêne (*Quercus robur* L et *Quercus petraea* Liebl.) *Thèse de Doctorat* ès Scienc de IENGREF, Nancy, **1996**.
- Feulliat, M. Vinification du Pinot Noir en bourgogne par macération préfermentaire à froid. *Revue des Oenologues*, **1997**, 82, 29- 31.
- Feulliat, M y Peyron, D. Influencia del sistema de encubado "bazuqueo/ remontado" en la composició fenólica de los vinos. En *Enología: Fundamentos Científicos Tecnológicos*. Cord. Flanzys. AMV Madrid, **2000**, 473- 478.(a)
- Feulliat, F., Sèller, R., Masson, G., Puech, J.L. Madera de Roble. Los compuestos fenólicos. En: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Flanzys. AMV ediciones Ed. Mundi- Prensa. España. **2000**, 608- 626.(b)
- Feulliat, M., Escots, S., Charpentier, C., Dulau, L. Élevage des vins rouges sur lies fines. Interêt des interactions entre polysaccharides de levure et polyphénols du vin. *Rev. Œnol.*, **2001**, 98, 17-18.
- Fickel, J., Pitra, C., Joest, B.A., Hofmann, R.R. a novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **1999**, 122, 2, 225- 229.
- Fisher, U., Strasser, M., Gutzler, K. Impact of fermentation technology on phenolic and volatile composition of german red wine. *Int. J. Food Sci. and Tech.*, **2000**, 35, 81- 94.
- Fornairon- Bonnefond, C., Salmon, J.M. Impact of oxygen consumption by yeast lees on the autolysis phenomenon during simulation wine aging on lees. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 2584- 2590.
- Fornairon, C. ; Mazauric, J-P.; Moutounet, M.; Salmon, J-M. Consommation d'oxygene par les lies durant l'élevage des vins: conséquences sur l'intégrité des lies et sur la production potentielle d'arômes dans les vins. *Int. Journal of vine and wine sciences*. 32, 2, **2000**, 307-312.
- Frazier, R.A., Papadopoulou, A., Mueller- Harvey, I., Kissoon, D., Green, R. J. Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. *J.Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 5189- 5195.

- Friedman, R., Merritt, A.D., Bixler, D., Immunological and chemical comparison of heterogenous basic glycoproteins in human parotid saliva. *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, 230, 599–602.
- Fulcrand, H., Chynier, V., Oszmianski, J., Moutounet, M. An oxidized tritaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytoch.*, **1997**, 46, 2, 223- 227.
- Furtado, P., Figueredo, P., Chaves, H., Pina, F. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins . *J. Photochem. Photobiol. A.Chem.*, **1993**, 75, 113-118.
- Fuster, A. Les polysaccharides, leur contribution à la qualité du vin. *Rev. Fr. Œnol.*, **2001**, 187, 14-17.
- Fuster, A., Escot, S. Élevage des vins rouges sur lies fines: choix de la levure fermentaire et ses conséquences sur les interactions polysacchariques pariétaux/polyphénols. *Rev. Œnol.*, **2002**, 104, 20-22.
- Galvin, C. Etude de certaines réactions de dégradation des anthocyanes et leur condensation avec les flavanols, conséquences sur la couleur des vins. *Tesis Doctoral*, Université de Bordeaux II, **1993**.
- Gambutì, A., Rinaldi, A., Pessina, R., Moio, L. Evaluation of aglicano grape skin and seed polyphenols astringency by SDS-Page electrophoresis of salivary proteins after binding reaction. *Food Chem.*, **2005**, doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.038 (article in press)
- García- Viguera, C., Bridle, P., Bakker, J. The effect of pH on the formation of coloured compounds in model solution containing anthocyanins, catechin and acetaldehyde. *Vitis*, **1994**, 33, 37- 40.
- Garde-Cerdán, T., Ancín- Azpilicueta, C. Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends in Food Science & Technology*, **2006**, doi:10.1016/j.tifs.2006.01.008.
- Gawel, R. Red wine astringency: a review. *Australian Journal of grape and wine Research*. **1998**, 4, 74-95.
- Gawel, R., Iland, G.P., Leske, A. P., Dunn, C.G. Compositional and sensory differences in Syrah wines following juice run-off prior to fermentation. *J. Wine Research*, **2001**, 12, 5-18.
- Geny L.; Saucier, C.; Bracco, S.; Daviaud, F.; Glories, Y. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 8051-8054.
- Gibbons, R.J., Hay, D.I., Cisar, J.O., Clark, W.B. Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infect Immun.*, **1988**, 56, 2990–2993.
- Glories, Y. La couleur des vins rouges. 1ème partie Les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Conn. Vigne Vin*. **1984**, 18, 195- 217.(a)
- Glories, Y. La couleur des vins rouges. 2ème partie Mesure, origine et interprétation. *Conn. Vigne Vin*. **1984**, 18, 253-271.(b)
- Glories, Y. Oxygène et élevage en barriques. *Rev. Fr. Œnol.*, **1990**, 124, 91- 96.
- Glories, Y. Substances responsible for astringency, bitterness and wine colour. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **1999**, 33, 107- 110.
- Gonçalves, F., Heyraud, A., de Piho, M.R., Rinaudo, M. Characterization of white wine mannoproteins. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 6097- 6101.
- González- Manzano, S., Rivas- Gonzalo, J., Santos- Buelga, C. Extraction of flavan-3-ol from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 513, 283- 289.
- González-Sanjósé, M. L., Barrón, L. J. R., Díez, C. Evolution of anthocyanins during maturation of Tempranillo grape variety (*Vitis Vinifera*) using polynomial regression models. *J. Sci. Food Agric.*, **1990**, 51, 337-343.
- Gu, M., Haraszthy, G.G., Collins, A.R., Bergey, E.J., Identification of salivary proteins inhibiting herpes simplex virus 1 replication. *Oral Microbiol Immunol.*, **1995**, 10, 54–59.
- Guinard, J.X., Zoumas-Morse, C., Walchak, C., Relation between parotid saliva flow and composition and the perception of gustatory and trigeminal stimuli in foods. *Physiology & Behavior*, **1998**, 63, 1, 109- 118.
- Guinard, J.X., Pangborn, R.M., Lewis, M., Preliminary studies on acidity- astringency interactions in model solutions and wines. *J.Sci. Food Agric.*, **1986**, 37, 811-817.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G. Determination of protein in tannin-protein complexes. *J. Agric. Food Chem.*, **1980**, 28, 944–947.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.*, **1978**, 26, 809–812.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 4494–4497.
- Hagerman, A.E., Klucher, K.M., Tannin-protein interactions. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **1986**, 213, 67–76.
- Hagerman, A.E., Robbins, C.T., Implication of soluble tannin-protein complexes for tannin analysis and plant defence mechanisms. *Chem. Ecol.*, **1987**, 13, 1243–1259.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., Choosing appropriated methods and standards for assaying tannins. *Journal of Chemical Ecology*, **1989**, 15, 6, 1795- 1810.
- Hagerman, A.E., Robbins, C.T. Specificity of tannin-binding salivary proteins relative to diet selection by mammals. *Can J Zool.*, **1993**, 71, 628–633.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., Assay of condensed tannins or flavonoid oligómeros and related flavanoids in plants. *Methods in Enzymology*, **1994**, 234, 429- 427.
- Hagerman, A.E., Rice, M.E., Ritchard, N.T. Mechanisms of protein precipitation of two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin 16(4-8) catechin (procyanin). *J Agric Food Chem.*, **1998**, 46, 2590–2595.
- Harbertson, J. F., Kennedy, J.A., Adams, D.O. Tannin in skins and seeds of cabernet sauvignon, Syrah and Pinot noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.*, **2002**, 53, 1, 54- 59.

## Capítulo I. Introducción

- Hart, M., Thomas, L.R., Dixon, S.E., Newport, G., Agabian, N., Prakobphol, A., Witkowska, E., Fisher, S.J. Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS PAGE, Ultrafiltration, HPLC and mass spectrometry. *Biochemistry*, **2005**, 44, 2885-2899.
- Hartwig, P., McDaniel, M.R. Flavor characteristics of lactic, malic, citric and acetic acids at various pH levels. *J. Food Sci.*, **1995**, 60, 2, 384-388.
- Hashizume, K., Samuta, T. Green odorant of grape cluster stem and their ability to cause wine stemmy flavor. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 1333-1337.
- Haslam, E., Polyphenols-Protein interactions. *Biochem. J.*, **1974**, 139, 285-288.
- Haslam, E. Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry. *Phytochemistry*, **1977**, 16, 1625-1670.
- Haslam, E., Lilley, T.H., Warminski, E., Liao, H., Cai, Y., Martin, R., Polyphenol complexation. A study in molecular recognition. In: *Phenolic compounds in food and their effects on health*. I. Analysis, occurrence and chemistry. Ho C-T, Lee CY, Huang M-T, editors. Washington, DC: Am. Chem. Soc., **1991**, 8-49.
- Hatton, M.N., Loomis, R.E., Levine, M.J., Tabak, L.A. Masticatory lubrication. The role of carbohydrate in the lubricating property of a salivary glycoprotein-albumin complex. *Biochem J.* **1985**, 230, 817-820.
- Henson, L. G., Niemeyer, L., Ansong, G., Forkner, R., Makkar, H.P.S., Hagerman, E.E., A modified method for determining protein binding capacity of plant polyphenolics using radiolabelled protein. *Phytochemical Analysis*, **2004**, 15, 3, 159-163.
- Heredia, F.J., Francia- Aricha, E. M., Rivas- Gonzalo, J.C., Vicario, I.M., Santos-Buelga, C. Chromatic Characterization of anthocyanins from red grape- I. PH effect. *Food Chemistry*, **1998**, 63, 4, 491-498.
- Hermosin, I., Sánchez-Palomo, E., Vicario, A. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wine made from cultivars Cabernet sauvignon, Sensible and Syrah. *Food Chem.*, **2005**, 92, 269-283.
- Hidalgo, J. *Tratado de Enología*. Mundi Prensa Ed. Madrid, **2003**, 1206 (a), 125 (b), 757-805 (c), 839-854 (d), 857-908 (e), 912-918 (f).
- Hirtz C., Chevalier F., Centeno D., Rofidal V., Egea J.C, l Rossignol M., Sommerer N., Deville de Périère, D. MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics*, **2005**, 5 (17), 4597-4607.
- Horne, J., Hayes, J., Lawless, T., Turbidity as a measure of salivary protein reaction with astringent substances. *Chem. Senses*, **2002**, 27, 653-659.
- Isemura, T., Asakura, J., Shibata, S., Isemura, S., Saitoh, E., Sanada, K. Conformational study of the salivary proline-rich polypeptides. *Int J Peptide Protein Res.*, **1983**, 21, 281-287.
- Ishikawa, T y Noble, A.C. Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Quality and Preference*, **1995**, 6, 27-33.
- Jackson, D.I., Lombard, P.B. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality. A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1993**, 44, 409-430.
- Jackson, R.S. *Wine Science: Principles and Applications*. Academic Press, New York, **1994**.
- Jarauta, I., Cacho, J., Ferreira, V. Concurrent phenomena contributing to the formation of the aroma of wine during aging in oak wood. An analytical study. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 10, 4166-4177.
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, P.A., Williamson, M.P., Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 942-949.(a)
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, P.A., Williamson, M.P., Astringency: A Molecular model for polyphenol/protein binding. *Fibre Diffraction Review*, **2004**, 12, 66-69 (b)
- Jones, P.R., Kwiatkowski, M.J., Skouroumounis, G.K., Leigh Francis, I., Lattey, K.A., Waters, E. J., Petrorius, I.S., Høj, P.B. Exposure of red wine to oxygen post-fermentation- If you can't avoid it, why not control it? *Wine Industry Journal*, **2004**, 19, 3, 17-24.
- Jordao, A., Ricardo da Silva, J., Laureano, O. Evolution of catechins and oligomeric procyanidins during grape maturation of Castelao Frances and Touriga Francesa. *Am. J. Enol. Vitic.*, **2001**, 52, 3, 230-234. (a)
- Jordao, A., Ricardo da Silva, J., Laureano, O. Evolution of proanthocyanidins in bunch stems during berry development (*Vitis vinifera L.*). *Vitis*, **2001**, 40, 17-22.(b)
- Kahn, N., Bertrand, A. Caractérisation des tannins de pépins du raisin: une diversité au sein des préparations commerciales. *Revue Française d'Oenologie*, **2005**, 211, 5-8
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford M.N. Red wine and model wine astringency as affected by malic and lactic acid. *J. Food Science*, **1997**, 62, 2, 416-420. (a)
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford M.N., Evaluation of bitterness and astringency of (+) catechin and (-) epicatechin in red wine and in model solutions. *J. Sensory Studies*, **1997**, 12, 25-37.(b)
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford M.N. Effect of pH on astringency in model solution and wines. *J. Agric. Food Chem.*, **1997** 45, 6, 2211-2216. (c)
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M.N., Interaction of (+) catechin, (-) epicatechin, procyanidin B2 and procyanidin C1 with pooled human saliva in vitro. *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, 81, 261-268.
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M.N., Vallis, L., Correlations between protein composition and some T-I parameters of astringency. *Food Quality Pref.*, **2001**, 12, 145-152.
- Kandra, L., Gyémánt, G., Zajác, A. Batta, G. Inhibitory effects of tannin on human salivary alpha amylase. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **2004**, 319, 1265-1271.

- Kaneda, H., Watari, J., Takashio, M., Measuring astringency of beverages using a quartz crystal microbalanced. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **2003**, 61, 3, 119-124.
- Kauffman, D.L., Keller, P.J., The basic proline-rich proteins from a single subject. *Arch. Oral Biol.*, **1979**, 24, 249-256.
- Kauffman, D.L., Wong, R., Bennick, A., Keller, P.J. Basic proline-rich proteins from parotid saliva: complete covalent structure of protein IB-9 and partial structure of protein IB-6, members of a polymorphic pair. *Biochemistry*, **1982**, 21, 6558-6562.
- Kauffman, D.L., Hoffman, T., Bennick, A., Keller, P.J. Basic proline-rich proteins from human parotid saliva: complete covalent structures of proteins IB-1 and IB-6. *Biochemistry*, **1986**, 25, 2387-2392.
- Kawamoto, H., Nakatsubo, F., Murakami, K. Quantitative determination of tannin and protein precipitates by high performance liquid chromatography. *Phytochem.*, **1995**, 40, 5, 1503-1505.
- Kawamoto, H., Nakatsubo, F., Murakami, K. Stoichiometric studies of tannin-protein co-precipitation. *Phytochem.*, **1996**, 41, 5 1427-1431.
- Kelebek, H., Canbas, A., Selli, S., Saucier, C., Jourdes, M., Glories, Y. Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wine made from *Vitis vinifera* cvs Bogazkere and Öküzgözü. *J. Food Eng.*, **2005**, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.08.032
- Keller, R. Différents variétés de chène et leur repartition dans le monde. *Conn. Vigne Vin*, **1987**, 21, 191-229.
- Kelly, M., Wollan, D. Micro-oxygenation of wine in barrels. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, Annual Technical Issue, **2003**, 29-32.
- Kennedy, J.A., Mattheus, M.A., Waterhouse, A.L., Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochem*, **2000**, 55, 77-85. (a)
- Kennedy, J.A., Troup, G.L., Pilbrow, J.R., Hutton, D.R., Hewitt, D., Hunter, C.R., Ristic, R., Iland, P.G., Jones, G.P. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2000**, 6, 244-254. (b)
- Kennedy, J. and Jones G. P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 1740-1746.
- Kennedy, J.A., Mathewa, M.A., Waterhouse, A. L. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.*, **2002**, 53, 4, 268-274.
- Lafon-Lafourcade, S., Peynaud, E., Sur l'action antibacterienne de l'anhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée. *Conn. Vigne Vin*, **1974**, 8, 187-203.
- Langcake, J.L., Price, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of Vitaceae as response to infection injury. *Physiol. Plant Pathol.*, **1976**, 9, 77-86.
- Lawless, H.T., Horne, J., Giasi, P., Astringency of organic acid is related to pH. *Chem. Senses*, **1996**, 4, 397-403.
- Ledoux, V., Dulau, L., Dubourdieu, D., Interpretation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies. *J. Inter. Sci. Vigne Vin.*, **1992**, 26, 239-251.
- Lee, C.B., Lawless, T.H., Time-course of astringent sensations. *Chemical Senses*, **1991**, 16, 225-238
- Lemaire, T. *La micro-oxygenation des vins*. Report for the requirement diploma national d'Oenologie, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Montpellier, **1995**, 112.
- Lemaire, T. Principals and Practices of Micro-Oxygenation. Ontario Fruits & Vegetable Convention & Trade show - St Catharines, Ontario - Canada, 16 de Febrero, **2006** (ó a www. Oenodev.com)
- Levine, M.J., Weill, J.C., Ellison, S.A., The isolation and analysis of a glycoprotein from parotid saliva. *Biochim Biophys Acta* **1969**, 188, 165-167.
- Levine M, Keller PJ The isolation of some basic proline-rich proteins from human parotid saliva. *Arch Oral Biol.*, **1977**, 22, 37-41.
- Li-Chan, E., Nakai, S. Biochemical basis for the properties of egg white. *Crit Rev. Poult Biol.*, **1989**, 21-57.
- Lin, H.C., Chen, P.C., Cheng, T.J., Chen, R.L., Formation of tannin-Albumin nano-particles at neutral pH as measured by light scattering techniques. *Anal. Biochem.*, **2004**, 325, 1, 117-120.
- Llaubères, R.M., Exocellular polysaccharides from the yeast *Saccharomyces* in wines. *J. Sci. Food Agric.*, **1987**, 41, 267-286.
- Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. Yeast induced inhibition of (+) catechin and (-) epicatechin degradation in model solution. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 1631-1635.
- Lopez-Toledano, A., Villaño-Valencia, D., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. Interaction of yeast with the product resulting from the condensation reaction between (+) catechin and acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 2376-2381.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.H., Randall, R.J Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 265-275.
- Lu, Y., Bennick, A., Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Arch. Oral Biol.*, **1998**, 43, 717-728.
- Lubbers, S. Charpentier, C., Feulliat, M., Voillet, A. Influence of yeast walls on the behavior of aroma compounds in a model wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1994**, 45, 1, 29-33.
- Luck, G., Liao, H., Murray, N.J., Grimmer, H.R., Warminski, E.E., Williamson, M.P., Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochem.*, **1994**, 37, 357-371.
- Maeda, N., Inheritance of human salivary proline-rich proteins: a reinterpretation in terms of six loci forming two subfamilies. *Biochem. Genet.*, **1985**, 23, 455-464.
- Makkar, H.P., Dawra, R.K., Singh, B. Protein precipitation assay for quantification of tannin: determination of protein in tannin-protein complex. *Anal. Biochem.*, **1987**, 166, 2, 435-439.

## Capítulo I. Introducción

- Martin, S., Pangborn, R. M. Human parotid secretion in response to ethyl alcohol. *Journal of Dental Research* **1971**, 50, 485-490.
- Matějčiček, D., Mikeš, O., Klejduš, B., Štěrbová, D., Kubán, V. Changes in contents of phenolic compounds during maturing of barrique red wines. *Food Chem.*, **2005**, 90, 791- 800.
- Mateus, N., Silva, A.M.S., Vercauteren, J., de Freitas, V. Occurrence of anthocyanin- derived pigments in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 4836- 4840.
- Mateus, N, Silva A.M., Rivas-Gonzalo, J., Santos- Buelga, C., de Freitas, V. Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 2110- 2116.
- Mateus, N., Carvalho, E., Carvalho, A.R.F., Melo, A., Gonzalez-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Silva, A.M.S., de Freitas, V. Isolation and structural characterization of new acylated anthocyanin-vinyl-flavanol pigments occurring in ageing red wines. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 277- 282.(a)
- Mateus, N., Silva, A.M.S., Rivas- Gonzalo, J.C., Santos- Buelga, C., de Freitas, V. A new class of blue anthocyanin- derived pigments isolated from red wines. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 1919- 1923.(b)
- Mateus, N., Carvalho, E., Luis, C., de Freitas, V., Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 513, 135- 140.
- Mateus, N., Oliveira, J., Pissarra, J., González- Paramás, A.M., Rivas- Gonzalo, J.C., Santos- Buelga, C., Silva, A.M.S., Rivas- Gonzalo, J.C., de Freitas, V. A new vinylpyranoanthocyanin pigment occurring in aged red wines. *Food Chem.*, **2005**, doc. 10.1016/j.foodchem.2005.05.051
- Maurry, Ch., Sarni- Machado, P., Lefebvre, S., Cheynier, V. Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *Am.J. Enol. Vitic.*, **2001**, 52 2, 140- 145.
- Mazauric, J.P., Salmon, J.M. Interaction between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: I Análisis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines. *J. Agric Food Chem.*, **2005**, 53, 5647- 5653.
- McManus, J.P., Davis, K.G., Lilley, T.H. Haslam, E., The association of proteins with polyphenols. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1981**, 309- 311.
- McManus, J.P., Davis, K.D., Beart, J.E., Gaffney, S.H., Lilley, T.H., Haslam, E., Polyphenol interactions. Part 1. Introduction: some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *J Chem Soc Perkin Trans II* , **1985**, 1429-1438.
- McMurrough, I.C., Hennigan, G.P. Tanning properties of flavanols in barley and hops measured by reaction with cinchonine sulphate in relation to haze formation in beer. *J. Inst. Brew.*, **1984**, 90, 24-32.
- Mehansho, H., Hagerman, A., Clements, S., Butler, L.G., Rogler, J.C., Carlson, D.M., Modulation of proline-rich protein biosynthesis in rat parotid glands by sorghums with high tannin levels. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1983**, 80, 3948-3952.
- Mehansho, H., Butler, L.G., Carlson, D.M., Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: Induction and defense mechanism. *Ann. Rev. Nutr.*, **1987**, 7, 423- 440.
- Messana, I., Cabras, T., Inzitari, R., Lupi, A., Zuppi, C., Olmi, CH., Fadda, M.B., Cordano, M., Giardina, B., Castagnola, M. Characterization of the human salivary basic Proline Rich Protein complex by a proteomic Approach. *J. Proteome Research*, **2004**, 3, 792- 800.
- Minaguchi, K., Madapallimaitam, G., Bennick, A., The presence and origin of phosphopeptides in human saliva. *Biochem. J.*, **1988**, 250, 171- 177.
- Minaguchi, K., Bennick, A., Genetics of human salivary proteins. *J. Dent. Res.*, **1989**, 68, 2-14.
- Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez- Cordoves, C. Update knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2005**, 45, 2, 85- 118.
- Mole, S. y Waterman, P.G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. I. Techniques biochemically defining tannins. *Oecologia*, **1987**, 72, 137- 147.
- Monteleone, E. Perceived astringency in wines: A predictive model. *International Workshop on advances in grapevine wine research. Book of abstracts*, Venosa, Italia, 15-17 Sept, **2005**, 10.
- Monteleone, E., Condelli, N., Dinnella, C., Beruccioli, M. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality Preferences*, **2006**, 17, 96- 107.
- Morata, A., Gómez- cordoves, M.C., Colomo, B., Suarez, J.A. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with Vitisina A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 7402- 7409.
- Morata, A. Calderón, F., Gonzalez, M.C., Colomo, B., Suarez, A. Crianza sobre lías, chip, microoxigenación, utilización conjunta en el envejecimiento de vinos tintos. Ventajas del uso de levaduras seleccionada. *Enólogos*, **2005**, 34, 52-56.(a)
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Calderón, F., Suárez, J.A. Effects of pH temperature and SO<sub>2</sub> on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, **2005**, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.019.(b)
- Moutounet, M.; Rabier, P.; Sarni, F.; Scalbert, A. Les tannins du bois de chene. Les conditions de leur presence dans les vins. *Vigne et Publications Internationales*. Martillac, **1992**, 33, 75- 79.
- Moutounet, M., Mazauric, J.P., Saint Pierre, B., Micallef, J.P., Sarris, J. Causes et consequences de microdeformations des barriques au cours de l'élevage des vins., Acquisitions récentes sur le bois de chene destiné á l'élevage des vins et des eaux- de- vie. *SITEVI*, Montpellier, **1993**.

- Moutounet, M., Puech, J.L., Keller, R., Feuillat, F. Les caractéristiques du bois de chene en relation avec son utilisation en oenologie. Les phénomènes de duramisation et ses conséquences. *Revue Française Oenologues*, **1999**, 174, 12- 17.
- Moutounet, M.; Mazauric, J.-P.; Ducournau, P.; Lemaire, T. Wine microoxygenation. Principles and technological applications. *Industrie delle Bevande*, **2001**, 30, 173, 253- 258.
- Moutounet, M. L'astringencia del vi. *Jornada Técnica Internacional, Firavi*, abril, **2003**.
- Murray, P.A., Prakobphol, A., Lee, T., Hoover, C.I., Fisher, S.J., Adherence of oral streptococci to salivary glycoproteins. *Infect. Immun.*, **1992**, 60, 31-38.
- Murray, N.J., Williamson, M.P., Conformational study of a salivary proline-rich protein repeat sequence. *Eur. J. Biochem.*, **1994**, 219, 915-921.
- Murray, N.J., Williamson, M.P., Lilley, T.H., Haslam, E., Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by 1H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, **1994**, 219, 923-935.
- Nagel, C.W., Glories, Y. Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1991**, 42, 4, 364- 366.
- Naurato, N., Wong, P., Lu, Y., Wroblewski, K., Bennick, A., Interaction of tannin with human salivary histatins. *J Agric Food Chem.*, **1999**, 47, 2229-2234.
- Neguera, A.I. Colorimetría en vinos. *Jornadas Científicas de Grupos de Investigación Enológica*, Zaragoza, **17-19 de mayo de 1999**, 2-3.
- Nikfardjam, M.P., and Dykes, S. Micro-oxygenation research at Lincoln University. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, **2002**, 66-68.(a)
- Nikfardjam, M.P., and Dykes, S. Micro-oxygenation research at Lincoln University. Part 2 Sensory changes in Pinor Noir. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, **2002**, 88-90.(b)
- Nikfardjam, M.P., and Dykes, S. Micro-oxygenation research at Lincoln University. Part 3 Polyphenolic analysis of Cabernet Sauvignon wine under the application of micro-oxygenation. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, **2003**, 41-44.
- Noble, A.C. Application of time- intensity procedures for the evaluation of taste and mouthfeel. *American Journal of Enology and Viticulture* **1995**, 46, 128- 133.
- Nurgel, C., Pickering, G. Contribution of glycerol, ethanol and sugar to the perception of viscosity and density elicited by model white wines. *Journal of Texture Studies*, **2005**, 36, 3, 303.
- Oh, H. I.I., Hoff, J.E., Armstrong, G.S., Haff, L.A. Hydrophobic interactions in tannin-protein complexes. *J. Agric. Food Chem.*, **1980**, 28, 394-398.
- Oliveira, J., fernandes, V., Miranda, C., Santos-Buelga, C., Silva, A., de Freitas, V., Mateus, N. Color properties of tour cyanidin-pyruvic acid adducts. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, doi: 10.1021/jf061085b
- Oppenheim FG, Hay DI, Franzblau C. Proline-rich proteins from human parotid saliva. I. Isolation and partial characterization. *Biochemistry*, **1971**, 10, 4233-4238.
- Oppenheim, F.G., Yang, Y-C., Diamond, R.D., Hyslop, D., Offner, G.D., Troxler, R.F. The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion. *J Biol Chem.*, **1986**, 261,1177- 1182.
- Parish, M., Wollan, D., Paul, R. Micro-oxygenation-a review. Annual Technical issue. *The Australian Grapegrower & Winemaker*, **2000**, 47-50.
- Peleg, H., Bodine, K.K., Noble, A.C. The influence of acid on astringency of alum and phenolic compounds. *Chem. Senses*, **1998**, 23, 371- 378.
- Peleg, H., Gacon, K., Schilich, P., Noble, A.C., Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agric.*, **1999**, 79, 1123- 1128.
- Pérez- Caballero, V., Ayala, F., Echávarri, J.F., Negueruela, A. Proposal for a New standard OIV Meted for determination of chromatic characteristics of wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **2003**, 54, 1, 59- 62.
- Pérez-Magariño, S., González- San José, M.L. Influencia de aportes controlados de oxígeno sobre la calidad de los vinos tintos de crianza. *Viticultura y Enología Profesional*, **2002**, 82, 49- 54.
- Pérez-Magariño, S., Gonzalez-San Jose, M.L. Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB para meters in red wines. *Food Chem.*, **2003**, 81, 301-306.(a)
- Pérez-Magariño, S., González- San José, M.L. Efecto de la aplicación de la microoxigenación durante la fermentación de vinos tintos. *Tecnología del Vino*, **2003**, Noviembre-Diciembre, 107- 112.(b)
- Pérez-Magariño, S., González- San José, M.L. Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the ageing of red wines elaborated from grape harvested at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 1181- 1189.
- Peters, E.H., Azen, E.A. Isolation and partial characterization of human parotid basic proteins. *Biochem. Genet.* **1977**, 15, 925- 946.
- Peynaud, E. *Connaissance et travail du vin*. Edit. Dunod, Bordas, Paris, **1984**, 133- 135.
- Peynaud, E. *Le vin et les jours*. Edit. Dunod, Bordas, Paris, **1988**, 228- 232.
- Picinelli, A., Bakker, J., Bridle, P Model wine solutions: Effect of sulfur dioxide on colour and composition during ageing. *Vitis*, **1994**, 33, 31- 35.
- Pissarra, J., Lourenço, S., González- Paramás, A.M., Mateus, N., Santos-Buelga, C., Silva, A.M.S., Freitas, V. Structural characterization of new malvidin-3-glucoside-catechin aryl/alkyl linked pigments. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 5519- 5526.(a)
- Pissarra, J., Lourenço, S., González- Paramás, A.M., Mateus, N., Santos-Buelga, C., Silva, A.M.S., Freitas, V. Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl - flavanol pigments in model solutions. *Anal. Chem. Acta*, **2004**, 513, 215- 221.(b)

## Capítulo I. Introducción

- Pomar, M., Gonzalez- Mendoza, L.A. Changes in composition and sensory quality of red wine aged in American and French oak barrels. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **2001**, 35, 1, 41- 48.
- Poncet- Legrand, C., Cartalade, D., Putuaux, J.L., Cheynier, V., Vernhet, A., Flavan-3-ol aggregation in model ethanolic solutions: Incidence of polyphenol structure, concentration, ethanol content and ionic strength. *Langmuir*, **2003**, 19, 10563- 10572.
- Poncet- Legrand, C., Edelman, A., Putuax, J.L., Cartalade, D., Sarni- Manchado, P., Vernhet, A. Poly(L-proline) interactions with flavanol-3-ols units: influence of molecular structure and polyphenol/ protein ratio. *Food Hydrocolloids*, **2005**, doi:10.1016/j.foodhyd.2005.06.009 (article in press)
- Ponsiaut, P. Les tanins oenologiques- propri'etes et applications pratiques. *Revue des Oenologues.*, **2000**, 95, 33- 35.
- Pontallier, P. Recherches sur les conditions d'élevage des vind rouges. Rôle des phénomènes oxydatifs. *Thèse Université de Bordeaux II*, **1981**.
- Porter, L.J., Hrstrich, L.N., Chang, B.C. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidin. *Phytochem*, **1986**, 25, 223- 230
- Poulton, J.R.S., Chemical protection of wine against oxidation. *Die Wynboer*, **1970**, 466, 22- 23.
- Price, M.L., Van Socoyoc, S., Butler, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, **1978**, 26, 1214-1218
- Prinz, J.F., Lucas, P.W., Saliva tannin interactions. *J. Oral Rehabilitation*, **2000**, 27, 991- 994.
- Puech, J.L., Feulliat, F., Mosedale, J.R. The tannin of oak hertwood, structure, properties and their influence on wine flavor. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1999**, 50, 4, 469- 478.
- Quintana, A.M., Fraccionamiento y estudio preliminar de la materia colorante del vino tinto. *Tesis Doctoral*. Universidad de Salamanca. **2001**.
- Raj, P.A., Edgerton, M., Levine, M.J., Salivary histatin 5: dependence of sequence, chain length, and helical conformation for candidacidal activity. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 3898-3905.
- Rankine, B.C., Fornachon, J.C.M., Budson, D.A. Diacetyl in Australian dry red table wine and its significance in wine quality. *Vitis*, **1969**, 8, 129- 134.
- Ratnavathi, C.V. Sashidhar, R.B. Microassay for quantification of protein precipitable polyphenols: use of bovine serum albumin-benzidine conjugate as protein probe. *Food Chemistry*, **1998**, 61, 3, 373- 380.
- Reazin, G.H. Chemical mechanisms of whiskey maturation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1981**, 32, 4, 283- 289.
- Remy, S., Fulcrand, H., Labarbe, B., Cheynier, V. First confirmation in red wine products resulting from direct anthocyanin- tannin reactions. *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, 80, 745- 751.
- Remy- Tanneau, S., Le Guernevé, C., Meudec, E., Cheynier, V. Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 3592- 3597.
- Revilla, E., Ryan, J.M., Kovac, V., Nemanic, J. The effect of the addition of supplementary seeds and skins during fermentation on the chemical and sensory characteristics of red wines. *Food Flavors: Formation, analysis and packaging influences*, **1998**, 583- 596.
- Revilla, E. Impacto de distintas prácticas enológicas sobre el color del vino tinto. *Conferencia en Jornadas de actualización Enológica*, Jumilla, 12-14 Enero, **2006**.
- Ribéreau-Gayon, J. Contribution à l'étude des oxidations et reductions dans les vins. *Thèse Université de Bordeaux*, **1931**.
- Ribéreau-Gayon, J. and Stonestreet, E. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.*, **1966**, 48, 188-196.
- Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of Enology*. Vol. 2. The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments; Wiley: Chichester, U.K., **2000**. (Para copias de figuras y esquemas)
- Ribéreau-Gayon, P. Glories, Y., Mayjean, A., Dubourdieu, D. *Tratado de Enología*. Volumen II. Química del vino, estabilización y tratamientos. Ediciones Mundiprensa., Argentina, **2003**, 177- 247(a), 497- 505(b)
- Ricardo da Silva, J.M., Rigaud, J., Cheynier, V., Cheminat, A., Moutounet, M. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 4, 1259- 1264.(a)
- Ricardo da Silva, M., Cheynier, V., Souquet, J.M., Moutounet, M., Interaction of grape seed procyanidins with various proetins in relation to wine fining. *J. Sci. Food Agric.*, **1991**, 57, 111- 125.(b)
- Rigaud, J., Escribano- Bailon, M.T., Prieur, C., Souquet, J.M., Cheynier, V. Normal- Phase high performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seed. *Journal of Chromatography*, **1993**, 654, 255- 260.
- Riou, V. Vernhet, A., Doco, T., Moutounet, M. Aggregation of grape seed tannin model wine- effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, **2002**, 16, 17- 23.
- Rivas-Gonzalo, J.C., Bravo-Haro, S., Santos-Buelga, C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem*, **1995**, 43, 1444- 1449.
- Rodríguez, M., Lezáun, J., Canals, R. Llaudy, M.C., Canals, J.M., Zamora, F. Influence of the presence of the lees during oak ageing on colour and phenolic compounds composition of red wine. *Food Science and Technology International*, **2005**, 11, 4, 2005, 289-296.
- Roig, G. y Yerle, S. Balance y perspectiva de 10 años de microoxigenación. *ACE de Enología*, **2003**, Feb.
- Romero, C y Bakker, J. Effect of acetaldehyde and several acids on the formation of Vitisin A in model wine anthocyanin and colour. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **2000**, 35, 129- 140.
- Romeyer, F.M., Macheix, J.J., Sapis, J.C., Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seed. *Phytochem.*, **1986**, 25, 1, 219- 221.



- Roure, F. Lysozyme: Une protéine animale qui peut diminuer les doses de SO<sub>2</sub> et les teneurs en amines biogènes. *Revue Française d'Oenologie*, **2005**, 210, 32- 34.
- Ryan, J.M., Revilla, E. Anthocyanin composition of Cabernet sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 3372- 3378.
- Sacchi, K.L., Bisson, L.F., Adams, D. A Review of Effect of Winemaking Techniques on Phenolic Extraction in Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **2005**, 56, 3, 197- 206.
- Salas, E., Atanasova, V., Poncet-Legrand, C., Meudec, E., Mazauric, J.P., Cheynier, V. Demonstration of occurrence of flavanol- anthocyanin adducts in wine and in model solution. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 513, 325- 332.
- Salas, E., Dueñas, M., Schwarz, M., Winterhalter, P., Cheynier, V., Fulcrand, H. Characterization of pigments from different high speed countercurrent chromatography wine fractions. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 4536- 4546.
- Salmon, J.M., Fornairon- Bonnefond, C., Mazauric, J.P., Moutounet, M. Oxygen consumption by wine lees : impact on lees integrity during wine ageing. *Food Chem.*, **2000**, 71, 519- 528.
- Salmon, J.M. Interactions between yeast oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations : Practical Implications. *LWT*, **2005**, doi :10.1016/j.lwt.2005.11.005
- Sarni- Manchado, P., Fulcrand, H., Souquet, J.M., Cheynier, V., Moutounet, M. Stability and color of unreported wine anthocyanin- derived pigments. *J. Food Science*, **1996**, 61, 5, 938- 941.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Moutounet, M., Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 42-47.
- Saucier, C., Roux, D. & Glories, Y. Stabilité colloïdale polymers catéchiques. Influence des polysaccharides. In: *Oenologie 1995. 5e Symposium International d'Oenologie*. A. Lonvaud-Funel (Ed). Lavoisier Tec-Doc, Paris, **1995**, 395-400.
- Saucier, C., Glories, Y., Roux, D. Tannin-colloid interactions: new advances concerning the concept of good and bad tannins. *Rev. Œnol. Tech. Vitivinic. Œnol.*, **2000**, 94, 9-10,
- Saucier, C., Mirabel, M., Daviaud, F., Longieras, A., Glories, Y. Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 5732-5735.
- Scanes, K.T., Hohmann, S., Prior, B.A. Glycerol production by yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, 19, 17- 24.
- Scarbert, A., Lapiere, C. Ellagitanins et lignines du coeur de chêne. Structure et évolution au cours du vieillissement du bois. *Revue des Oenologues*, **1994**, 71, 9- 12.
- Schwartz, S.S., Zhu, W.X., Sreebny, L.M., Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis of human whole saliva. *Arch. Oral Biol.*, **1995**, 40, 10, 949- 958.
- Scudamore, S.P.D., Hooper, R.L., McLaran, E.D. Color and phenolic changes of Cabernet Sauvignon wine made by simultaneous yeast/bacterial fermentation and extended pomace contact. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1990**, 41, 1, 57-67.
- Serafini, M., Maiani, G., Ferro- Luzzi, A. Effect of ethanol on red wine tannin- protein (BSA) interactions. *J. Agric. Food. Chem.*, **1997**, 45, 3148- 3151.
- Shibata, S., Asakura, J., Isemura, T., Isemura, S., Saitoh, E., Sanada, K. Conformational study of the basic proline-rich polypeptides from human parotid saliva. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1984**, 23, 158- 165.
- Siebert, K.J., Troukhanova, N.V., Lynn, P.Y., Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, 80-85.
- Siebert, K.J., Effect of protein-polyphenol interactions on beverage haze stabilization and analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2, 353- 362.
- Siebert, K.J., Lynn, P.Y. Effect of protein-polyphenol ratio on the size of haze particle. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **2000**, 58, 3, 117- 123.
- Siebert, K.J., Lynn, P.Y. Effect of alcohol and pH on protein-polyphenol haze intensity and particle size. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **2003**, 61, 2, 88- 98.
- Siebert, K.J., Chassy A.W., An alternative mechanism for the astringent sensation of acids. *Food Quality Preference*, **2003**, 15, 13- 18.
- Silva, A., Lambri, M., de Faveri, D.M. Influenza dell'ossigeno in macerazione sulla struttura polifenolica ed aromatica di vini rossi di qualità. *Revue des Oenologues*, **2005**, 215, 22- 27.
- Sim, C.A., Morris, J.R. Effect of pH , sulfur dioxide, storage time and temperature on the color and stability of red Muscadine grape wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1984**, 35, 1, 35- 39.
- Simon, C., Barathieu, K., Laguerre, M., Schmitter, J.M., Fouquet, E., Painet, I., Dufourc, E. Three dimensional structure and dynamic of wine tannin- saliva protein complexes. A multitechnique approach. *Biochem.*, **2003**, 42, 10385- 10395.(a)
- Simon, C., Painet, I., Dufourc, E. Synthesis and circular dichroism study of the human salivary Proline- Rich Protein IB7. *J. Peptide Sci.*, **2003**, 9, 125- 131.(b)
- Singlenton, V.L., Draper, D.E. The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds to the wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1964**, 15, 34- 40.
- Soo-Khoo, K., Beeley, J.A. Isoelectric focusing of human parotid salivary proteins in hybrid carrier ampholyte-immobilized pH gradient polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **1990**, 11, 489- 494.
- Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossaud, F., Moutounet, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skin. *Phytochem.*, **1996**, 43, 2, 509- 512.
- Souquet, J.M. ; Labarbe, B., Le guerneve, C., Cheynier, V. ; Moutonnet, M. Phenolic composition of grape stems. *J. Agric. Food. Chem.*, **2000**, 48, 1076- 1080.

## Capítol I. Introducció

- Sousa, C., Mateus, N., Perez- Alonso, J., Santos- Buelga, C., de Freitas, V. Preliminary study of oaklins, a new class of brick red catechinpyrylium pigments resulting from the reaction between catechin and wood aldehydes. *J. Agric. Food. Chem.*, **2005**, 53, 9249- 9256.
- Sponholz, W.R. L'attività enzimatica dei lieviti e la stabilità del colore rosso dei vini. *Vignevini*, **1997**, 7-8, 34- 36.
- Steiner, J.C., Keller, P. J. An electrophoretic analysis of the protein components of human parotid saliva. *Archs. Oral Biol.*, **1968**, 13, 1213- 1221.
- Sudraud, P., Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges. *Ann. Technol. Agric.*, **1958**, 7, 203- 208.
- Sugiyama, K., Ogata, K., High performance liquid chromatographic determination of histatins in human saliva. *J. Chromatogr.*, **1993**, 619, 306-309.
- Sullivan, P., Fugelsang, K., Gump, B., Zoeklein, B. Effects of microoxygenation on red wine quality. ASEV 53rd Annual Meeting. *Am. J. Enol. Vitic.*, **2002**, 53, 3, 255a
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 10, 4267 - 4274.
- Swain, T. y Hillis, W.E., The phenolic constituents of Prunus domestica. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric*, **1959**, 10, 63.
- Thomas, C.J.C., Lawless, H.T., Astringents subqualities in acid. *Chem. Senses.*, **1995**, 20, 6, 593-600.
- Thornton, D.J., Khan, M., Mehrotra, R., Howard, M., Veerman, E., Packer, N.H., Sheehan, J. Salivary mucin MG1 is comprised almost entirely of different glycosylated forms of the MUC5B gene product. *Glycobiology*, **1998**, 9, 3, 293- 302.
- Timberlake, C.F. y Bridle, P. Interaction between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am J. Enol. Vitic.*, **1976**, 27, 97- 105.
- Torkangerpoll, K., Andersen, Ø. Colour stability of anthocyanins in aqueous solution at various pH. *Food Chem.*, **2005**, 89, 427- 440.
- Troxler, R.F., Offner, G.D., Xu, T., Vanderspeck, J.C., Oppenheim, F.G., Structural relationship between human salivary histatins. *J. Dent. Res.*, **1990**, 69, 2-6.
- Valentova, H., Skrovánková, S., Panovská, Z., Pokorný, J., Time-Intensity studies of astringency taste. *Food Chem.*, **2002**, 78, 29- 37.
- Van-Seunigen, I., Davril, M. A rapid acid- shiff staining procedure for the detection of glycoproteins using phastsystem. *Electrophoresis*, **1992**, 13, 97- 99.
- Vidal, S., Meudec, E., Cheynier, V., Skouroumounis, G., Hayasaka, Y. Mass spectrometric evidence for existence of oligomeric anthocyanins in grape skin. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 7144- 7151. (a)
- Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E., Taste and mouth-feel properties of different types of tannin like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 513, 57- 65. (b)
- Vidal, S. Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., Cheynier, V. Use an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth- feel perception. *Food Quality Preferences*, **2004**, 209- 217. (c)
- Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in wine like médium. *Food Chem.*, **2004**, 85, 519- 525. (d)
- Vivas de Gaulejac, N., Vivas, N., Absalon, C., Nonier, M.F. Identification du Procianidole A2 dans le raisin et le vin Vitis vinifera L. CV de Merlot et Cabernet sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne vin*, **2001**, 35, 1, 51- 56.
- Vivas, N. Le sechage naturel du bois de chêne destiné à la fabrication de barriques. *Compté rendu d'activité de recherche Université de Bordeaux II*. **1991**.
- Vivas, N., Lonvaud- Funel, A., Glories, Y. Observations sur l'augmentation de l'acidité volatile dans les vins rouges au cours de leur élevage en barriques. *J. Sci. Tech. Tonnellerie*, **1995**, 1, 81- 101.
- Vivas, N., Glories, Y. Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during ageing. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1996**, 471, 103- 107.
- Vivas, N.; Glories, Y.; Raymond, P. Quelques observations sur l'évolution des qualités organoleptiques des vins rouges au cours de leur élevage en barriques neuves. *Rev. Fr. Œnol.*, **1997**, 166, 31-34.
- Vivas, N. Influencia de la duración de utilización de barricas sobre sus aportaciones a los vinos. En la *Tecnología de la elaboración de vinos tintos e innovaciones en la estabilización de los vinos*. *Firavi 99*, **1999**, 6-24.
- Vivas, N. Apports récents à la connaissance du chêne de tonnellerie at à l'élevage des vins rouges en barriques. *Bull. O.I.V.*, **2000**, 827- 828.
- Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Nonier, M.F. Implications technologiques de la valeur du pH dans l'élevage et la conservation des vins rouges. *Revue des Oenologues*, **2004**, 110, 12- 16.
- Vrhocsek, U., Vanzo, A., Nemanic, J. Effect of red wine techniques on oligomeric and polymeric proanthocyanidins in wine, cv. Blaufränkisch. *Vitis*, **2002**, 41, 1, 47- 51.
- Warner, T.F., Azen, E.A., Proline-rich proteins are present in serous cells of submucosal glands in the respiratory tract. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **1984**, 130, 115-118.
- Water, E., Pellerin, P., Brillouet, J.M., A Saccharomyces manoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydr. Polym.*, **1984**, 23, 185- 191.
- Wilmarth, P.A., Riviere, M.A., Rustvold, D.L., Lauten, J.D., Madden, T.E., David, L. Two dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *J. Proteome Research*, **2004**, 3, 1017- 1023.

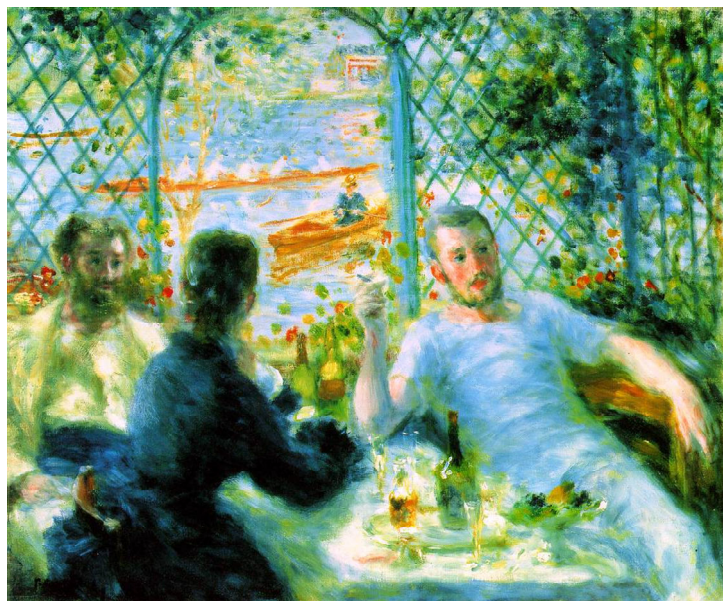
- Wu, L., Lu, Y., Electrophoretic method for the identification of haze active protein in grape seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 3130- 3135.
- [WWW.Rodanmza.com](http://WWW.Rodanmza.com)  
[WWW.Oenodev.com](http://WWW.Oenodev.com)
- Xie, D.Y y Dixon, R.A. Proanthocyanidin biosynthesis-still more questions than answers? *Phytochem.*, **2005**, doi: 10.1016/j.phytochem.2005.01.008
- Xu, L., Lal, K., Santarpia, R.P. III, Pollock, J.J., Salivary proteolysis of histidine-rich polypeptides and the antifungal activity of peptide degradation products. *Arch. Oral Biol.*, **1993**, 38, 277-283.
- Yan, Q., Bennick, A., Identification of histatins as tannin-binding proteins. *Biochem. J.*, **1995**, 311, 341- 347.
- Yanagida, A., Shoji, T., Shibusawa, Y. Separation of proanthocyanidins by degree of polymerisation by means of size-exclusion chromatography and related techniques. *J. Biochem. Biophys Methods*, **2003**, 56, 311-322.
- Yokotsuka, K., Singleton, V.L. 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*, **1987**, 46, 329-338.
- Yokotsuka, K., sato, M., Ueno, N., Singleton, V.L. Colour and sensory characteristics of Merlot red wines caused by prolonged pomace contact. *Journal of Wine Research*, **2000**, 11, 1, 7-18.
- Yuste, J., Rubio, J.A., Baeza, P., Lissarrague, J.R. Aclareo de racimos y regimen hídrico: Efectos en la producción, el desarrollo vegetativo y calidad del mosto de la variedad *Tempranillo* conducida en vaso. *Viticultura Enología Profesional*, **1997**, 51, 28- 35.
- Zamora, F, Luengo, G., Margalef, M., Magriña, M. Arola, L. Efecto del sangrado sobre el color del vino tinto (nota). *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.*, **1994**, 34, 663- 671.
- Zamora, F. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. AMV ed. Madrid, **2003**, 3-46(a), 89- 121(b), 181(c), 105-112(d)
- Zamora, F. El concepto de grano en tonelería; un criterio para clasificar el roble. *Enólogos*, **2003**, 24, 24-28 (e)
- Zamora, F. El color del vi. Conferencia. *La Química i el vi*. UB. Barcelona, 14-15 de diciembre, **2004**.
- Zamora, F. El anhídrido sulfuroso; algunas reflexiones sobre este aditivo. *Enólogos*, **2005**, 38, 28- 31.(a)
- Zamora, F. Los aromas que el roble aporta al vino; influencia del grado de tostado de las duelas. *Enólogos*, **2005**, 35.(b)
- Zanardelli, P., La gomme arabique en oenologie. 2° Partie. *Rev. CEnol.*, **2004**, 110, 28-31.
- Zimman, A., Joslin, W. S., Lyon, M.L., Meier, J., Waterhouse, A.L. Maceration variables affecting Phenolic composition in Commercial- scale Cabernet sauvignon winemaking trials. *Am. J. Enol. Vitic.*, **2002**, 53, 2, 93- 98.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

## CAPITULO II

---

# NUEVA METODOLOGÍA PARA EVALUAR LA ASTRINGENCIA EN VINO TINTO Y ESTUDIOS RELACIONADOS.



*Lunch at the Restaurant Fournaise. Renoir (1841- 1919)*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

## **1. NUEVA METODOLOGÍA PARA EVALUAR LA ASTRINGENCIA EN VINO TINTO.**

---

New Method for Evaluating Astringency in Red Wine

Artículo publicado en:

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*  
2004 Vol. 52 Núm. 4 Pag: 742-746

---

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007



## New Method for Evaluating Astringency in Red Wine

MARÍA C. LLAUDY, ROSER CANALS, JOAN-MIQUEL CANALS, NICOLAS ROZÉS,  
LLUÍS AROLA, AND FERNANDO ZAMORA\*

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, (CeRTA),  
Universitat Rovira i Virgili, C/Ramón y Cajal 70, 43005 Tarragona, Spain

Astringency is an important sensory attribute of red wine. It is usually estimated by tasting and is subject to a certain subjectivity. It can also be estimated by using the gelatin index. This procedure is not very reproducible because there are many gelatins on the market with a heterogeneous composition. Furthermore, the gelatin index determines procyanidin concentration by acid hydrolysis that gives only an approximate result. This paper proposes a new and reproducible method that determines astringency by using ovalbumin as the precipitation agent and tannic acid solutions as standards. Statistical analysis of the results indicates that this method is more reproducible (RSD = 5%) than the gelatin index (RSD = 12%) and correlates better with sensorial analysis.

**KEYWORDS:** Astringency; tannin; red wines

### INTRODUCTION

The color of red wine is due to the phenolic compounds fraction and, in particular, to anthocyanins. However, procyanidins, also known as condensed tannins, contribute to color stability by combining with anthocyanins (1). These combinations of anthocyanins and procyanidins seem to be responsible for the red color of aged wines (2). In fact, winemakers usually say that only tannic wines can age. Besides, tannins are also associated with such texture sensations as body and astringency (3).

Astringency is probably one of the most important sensory attributes of red wines, and it is caused by the capacity of some phenolic compounds to bind salivary proteins, producing drying and puckering sensations in the mouth (4). Naturally occurring procyanidins are mainly responsible for astringency (5, 6). However, aging wine in oak barrels and using enological tannins can provide a certain amount of gallotannins and ellagitannins, which can also contribute to wine astringency (7, 8).

The interactions between tannin and salivary proteins depend on the pH and the characteristics of the protein and the procyanidins (9, 10). Salivary proteins with a high proline and hydroxyproline proportion (PRP) seem to be the major target for the procyanidin reaction (11, 12). On the other hand, the size of the procyanidin molecule size seems to be related to the sensation of astringency. The greater the degree of polymerization, the greater is the sensation of astringency (13). Nevertheless, combination between anthocyanins and procyanidins might reduce the capacity of tannins to react with salivary proteins and, therefore, decrease astringency (14).

Nowadays, deeply colored and full-bodied wines are highly valued by the market, which is why winemakers try to make

these wines, which are necessarily very tannic. However, excessive phenolic compound extraction may sometimes take place during winemaking, making the wine more astringent and affecting its quality (15).

The astringency of red wine is usually estimated by tasting. This method, however, needs a group of expert wine tasters and is always subject to a certain subjectivity (16). Because astringency is a major factor in wine quality, winemakers are interested in an analytical and objective method to evaluate it.

In the literature there are many studies about protein–tannin interactions that use different strategies (17–24). Recently, a predictive model for astringency estimation was published that is based on phenolic compounds and color analysis (25). However, to our knowledge, the gelatin index is still the only analytical method for estimating astringency in red wine (26). Nevertheless, this procedure requires procyanidin concentration be determined before and after precipitation with an excess of gelatin. Because total procyanidin estimation in wines by means of acid hydrolysis (27) gives only an approximate result (28), this analytical method also does. Besides, gelatin is a heterogeneous mixture of proteins, and its composition may change among the different commercial products. This may also be an important source of variability and imprecision.

Evidently, the most suitable proteins for evaluating astringency are the salivary proline-rich proteins (PRP). However, it is very difficult to obtain enough PRP as their purification is highly complicated (29). A possible alternative is the use of ovalbumin as a precipitation agent. Ovalbumin is one of the most used proteins for fining red wine because of its ability to bind and precipitate tannins. Besides, ovalbumin is a single protein and not a heterogeneous mixture of proteins like gelatin.

This paper proposes a new and reproducible method using ovalbumin as a precipitation agent that makes it possible to determine astringency alternatively.

\* Author to whom correspondence should be addressed (fax 34 97 72 50347; e-mail fzm@astor.urv.es).

Astringency in Red Wine

J. Agric. Food Chem., Vol. 52, No. 4, 2004 743

MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** All of the products were of high purity. Gelatin (type B, Sigma) and hydrochloric acid (Panreac, Barcelona, Spain) were used for gelatin index estimation. Tannic acid and ovalbumin solutions were prepared in a synthetic solution similar to wine: 4 g/L of tartaric acid (Panreac), 95 g/L of ethanol (Panreac), adjusted to a pH of 3.5 with sodium hydroxide (Panreac). Solutions of tannic acid (ACS reagent, Sigma) at concentrations of 0, 0.2, 0.4, 0.6, and 0.8 g/L were used as standards. Ovalbumin solutions (grade V, Sigma) at concentrations of 0.0, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, and 4.0 g/L were used as the protein to precipitate astringent tannins.

**Wines.** Ten red wines from different origins were used to validate the method. These wines were selected in a previous sensorial session in order to cover the entire scale of astringencies. The concentration of phenolic compounds was determined by measuring the absorbance value at 280 nm (28).

**Tannin Assay.** Tannin concentration was measured according to the method of Ribéreau-Gayon and Stonestreet (27). Two tubes with 4 mL of previously diluted (1:50) wine, 2 mL of distilled water, and 6 mL of HCl (12 N) were prepared and hermetically sealed. One of them was heated to 100 °C in a water bath, and the other was maintained at room temperature. After 30 min, 1 mL of ethanol (95%) was added to both tubes. After stirring, absorbance at 550 nm was measured. The tannin concentration was obtained by multiplying 19.33 by the difference between absorbances.

**Gelatin Index.** The gelatin index of the different wines was measured using the methodology described by Glories (26). To two Erlenmeyer flasks with 50 mL of wine was added 5 mL of distilled water or 5 mL of gelatin solution (70 g/L). After 3 days, the samples were centrifuged at 11700g for 10 min (Sorval RC5C). The supernatants were assayed to determine the tannin concentration (27). The results were expressed as astringency intensity and as a percentage. Astringency intensity was calculated as the difference between the total wine tannin concentration and the concentration after gelatin precipitation. The percentage was calculated by referring this astringency intensity to the total tannin concentration.

**New Astringency Estimation Method.** All of the experiments were carried out at room temperature (20 ± 2 °C). For each tannic acid concentration or wine astringency analysis, 12 tubes were prepared that contained 1 mL of solutions with increasing concentrations of ovalbumin (0.0–4.0 g/L). To each tube was added 1 mL of corresponding tannic acid solution or wine. The tubes were stirred, and 10 min after, the samples were centrifuged at 11700g for 10 min (Sorval RC5C).

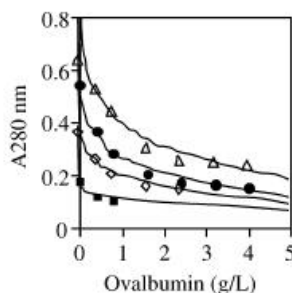
The supernatants were diluted 1/50 with distilled water. Absorbances were measured immediately at 280 nm (Ultraspec 5100 pro, Amersham Pharmacia Biotech) in a quartz bucket with an optical path of 10 mm.

**Sensory Analysis.** All of the wines were tasted by a panel of 10 expert enologists from the Rovira i Virgili University. Each expert evaluated the astringency of each wine on a scale from 1 to 100. Two previous training sessions of tasting were carried out to standardize criteria among the panelists. During these training sessions, panelists were required to agree by consensus on the score of three previously selected wines. Wine 1 was selected because it was very soft and was qualified with 30 points. Wine 2 was a medium-bodied wine with an agreeable sensation of astringency and was qualified with 50 points. Finally, wine 3 was a very astringent press wine and was qualified with 85 points.

**Statistics.** All of the data are expressed as the arithmetic average ± standard deviation from five replicates. Linear and logarithmic regressions as well as Fisher's correlation analysis were carried out using Statview (software for Macintosh). Relative standard deviation (RSD) was calculated as the quotient between the standard deviation and its corresponding mean value expressed as a percentage.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the graph of the absorbance at 280 nm versus the amount of ovalbumin added for the different tannic acid solutions. As expected, adding ovalbumin precipitated tannic acid and clearly decreased the supernatant absorbance at



$$A_{280} = a \times \log [\text{ovalbumin}] + b$$

[tannic acid]	Symbol	a	b	r <sup>2</sup>
0.2 g/L	■	0.0475	0.0875	0.9998
0.4 g/L	◇	0.1525	0.1508	0.9762
0.6 g/L	●	0.218	0.2017	0.9668
0.8 g/L	△	0.3081	0.3042	0.9664

Figure 1. Influence of ovalbumin additions on A<sub>280nm</sub> from different tannic acid solutions.

280 nm. This decrease in A<sub>280nm</sub> depends on the amount of ovalbumin added, and the behavior is clearly logarithmic. In fact, the curves fitted reasonably well to logarithmic equations. This behavior was probably due to the following reasons. When a small amount of ovalbumin was added to a tannic acid solution, a protein–tannic acid complex was formed that had the appearance of a cloudy precipitate. Initially the tannic acid concentration was higher than that of ovalbumin and so all of the protein precipitated together with a certain amount of tannic acid. This is why A<sub>280nm</sub> decreased so drastically initially. However, as more ovalbumin was added, the tannic acid concentration became increasingly lower until no tannic acid remained in the solution. At this point, A<sub>280nm</sub> began to increase because the excess of ovalbumin did not precipitate.

All of the tannic acid concentrations were found to behave in a similar way. Nevertheless, a relationship between tannic acid concentration and the initial slope of the curves was detected: the slope was greater when the tannic acid solution was higher. Figure 2 shows the relationship between the fitted logarithmic equation slope and the initial tannic acid concentration. The slopes of the logarithmic equations obtained fitted perfectly to the tannic acid concentration of the different solutions.

Tannic acid is very reactive with proteins and may therefore reproduce the behavior of the astringent phenolic compounds in wine. Our results indicate that there is a close relationship between tannic acid concentration and the corresponding slopes of logarithmic equations. For this reason, we have considered applying this methodology to estimate the astringency of red wines.

Table I compares the gelatin index, expressed as a percentage and as astringency intensity, with the proposed method for 10 different wines. Both analytical methodologies are compared with astringency sensorial analysis. The table also shows the absorbance of the 10 wines at 280 nm as an indicator of their phenolic concentration. These wines were chosen because of

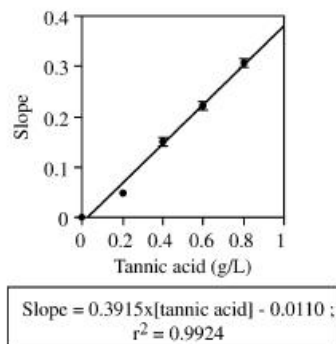


Figure 2. Relationship between logarithmic equation slope versus initial tannic acid concentration.

Table 1. Comparison of the Astringency of the Different Wines Estimated by Sensorial Analysis, the Gelatin Index, and the Proposed Method

wine	sensorial		gelatin index		proposed method
	astringency	A <sub>280nm</sub>	%	AI <sup>a</sup> (g/L)	TA <sup>b</sup> (g/L)
1	27.3 ± 10.1	37.3 ± 0.4	38.6 ± 9.4	0.41 ± 0.15	0.132 ± 0.016
2	38.8 ± 13.6	39.3 ± 0.2	54.3 ± 7.4	0.79 ± 0.14	0.150 ± 0.008
3	47.7 ± 16.7	46.2 ± 0.1	50.2 ± 5.4	0.66 ± 0.08	0.125 ± 0.011
4	48.5 ± 10.8	40.8 ± 0.3	56.3 ± 5.5	0.84 ± 0.09	0.112 ± 0.007
5	51.4 ± 9.7	54.9 ± 0.3	62.8 ± 3.6	1.02 ± 0.04	0.190 ± 0.015
6	53.2 ± 15.8	57.1 ± 0.6	33.3 ± 5.4	0.67 ± 0.12	0.291 ± 0.011
7	58.3 ± 13.2	65.1 ± 0.5	58.1 ± 4.1	1.74 ± 0.19	0.322 ± 0.011
8	64.6 ± 14.1	65.8 ± 0.3	65.7 ± 3.9	1.75 ± 0.18	0.371 ± 0.012
9	67.8 ± 13.8	58.1 ± 0.2	78.9 ± 2.7	2.12 ± 0.13	0.332 ± 0.002
10	78.8 ± 12.1	80.5 ± 0.4	69.4 ± 2.7	1.71 ± 0.05	0.566 ± 0.003

<sup>a</sup> Astringency intensity. <sup>b</sup> Tannic acid.

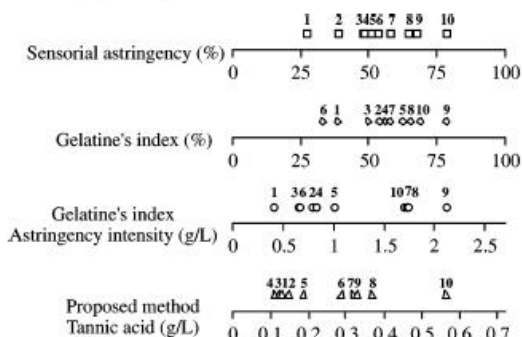


Figure 3. Wines in increasing order of astringency (relative comparison among the different methodologies).

their different phenolic compositions and sensorial astringency levels so that the real performances of both methods could be verified.

In general terms, the gelatin index and the proposed method seem to have the same tendency as sensorial astringency, which shows that it can be useful for analytical astringency estimation. However, if the wines were tested in order of increasing astringency, some important divergences between the different methodologies were detected (see Figure 3). The gelatin index gave a classification that depends on the unit of expression, which points out the necessity of comparing astringency estimation systems of expression to obtain the best optimized system closed to sensorial perception.

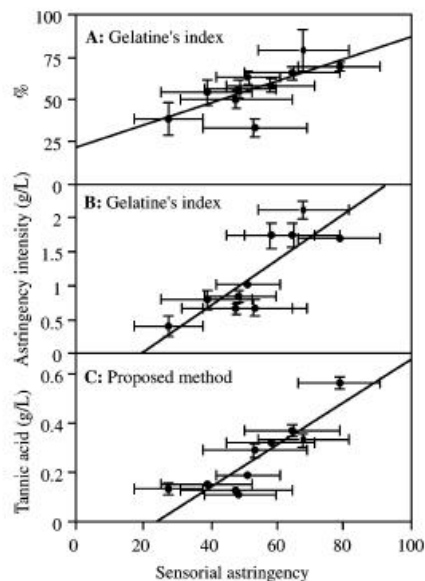


Figure 4. Comparison of sensorial astringency with the different analytical methods. Horizontal lines indicate the standard deviation for sensorial astringency estimation. Vertical lines indicate the standard deviation for the corresponding analytical method.

When the gelatin index was expressed as a percentage, considerable differences were found in sensorial estimation. In particular, the gelatin index considered wine 6 to be the least astringent, whereas sensorial analysis placed it in sixth position. On the other hand, sensorial analysis considered wine 2 to be the second least astringent, whereas the gelatin index put it in fourth position.

When the gelatin index was expressed as astringency intensity, the order of the wines seemed to be better than when it was expressed as a percentage. However, wines 6 and 10 were still a long way from their sensorial locations.

The proposed method seemed to be closer to the sensorial astringency estimation. Wines 5–10 were arranged in nearly the same order by the two methods. Only wines 8 and 9 changed their positions. However, the proposed method placed wine 10 relatively further away than sensorial analysis. On the other hand, the proposed method indicated that wines 1–4 had very similar astringencies, whereas sensorial analysis found certain differences.

Figure 4 compares sensorial astringency and the various analytical methods for the 10 wines. The graphs confirm the clear relationship between both analytical methodologies and sensorial analysis. However, some points should be made. Sensorial astringency estimation (horizontal lines) gave very high standard deviations. In general terms, the standard deviations (vertical lines) of all analytical astringency methods were lower than those of sensorial analysis. However, the standard deviations of the gelatin index were higher than those of the proposed method.

Sensorial astringency estimation has an average relative standard deviation of 25.8%. This value may be high because wine sensorial analysis is always subject to a certain subjectivity. Even well-trained wine tasters can confuse bitterness and astringency or have difficulty distinguishing between them (30). Furthermore, differences between the experts' salivary flow and

Astringency in Red Wine

J. Agric. Food Chem., Vol. 52, No. 4, 2004 745

**Table 2.** Linear Regression Coefficients, Fisher's Correlation Coefficients, and *p* Values between Sensorial Astringency and the Different Analytical Methods

	linear regression coeff	Fisher's correl coeff	<i>p</i> value
gelatin index (%) vs sens anal.	0.5014	0.708	0.0191
gelatin index (AI <sup>a</sup> ) vs sens anal.	0.7127	0.844	0.0011
proposed method (TA <sup>b</sup> ) vs sens anal.	0.7737	0.879	0.0003

<sup>a</sup> Astringency intensity. <sup>b</sup> Tannic acid.

composition, as well as between oral gustatory and tactile sensitivities, may produce certain divergences (31). It has been reported that the intensity and duration of an astringent sensation increases with repeated ingestion (32). This may be of particular importance in our case, inasmuch as experts had to taste 10 wines consecutively.

The gelatin index had an average relative standard deviation of 11.3% when it was expressed as a percentage and 12.9% when it was expressed as astringency intensity. These values were lower than those for sensorial analysis, which indicate that this method was more reproducible. Nevertheless, the major analytical problem of the gelatin index is that it requires procyanidin concentration to be analyzed before and after precipitation with an excess of gelatin. Procyanidins are usually analyzed according to the method described by Ribèreau-Gayon and Stonestreet (27). Although this method is highly reproducible, it gives only an approximate result because it does not take into account the effect of the various structures present in wine or their degrees of polymerization or the other components in wine that interfere with the assay (28).

Furthermore, the gelatin index obviously needs to use gelatin. As gelatin is produced by the hydrolysis of collagen from different animal species, there are many gelatins on the market with a heterogeneous composition (33, 34). It has been reported that the reactivity of procyanidins depends on the composition of the gelatin (34). In our case, all of the analyses were made with exactly the same gelatin from the same solution. It is logical to imagine that the variability among the compositions of commercial gelatins is also a source of variability and imprecision.

The proposed method presents an average relative standard deviation of 5.2%. This value is low and indicates the high reproducibility of the method, which is probably due to the fact that ovalbumin is a single protein and not a heterogeneous mixture of proteins, making the conditions of this assay more reproducible.

In general terms, the reproducibility of both of the analytical methods for estimating astringency seems to be higher than that of sensorial analysis. However, sensorial analysis must be used as the control reference for astringency estimation and any analytical method must be compared with it. Table 2 shows the linear regression coefficient, Fisher's correlation coefficient, and the statistical significance (*p* value) between sensorial analysis and the analytical methods.

In all cases, there is a statistically significant correlation between the sensorial and analytical methods. However, Fisher's correlation coefficient was high and the *p* value was low for the proposed method. The gelatin index gives better results when it is expressed in terms of astringency intensity.

Although the linear regression coefficients indicate that the linear behavior of the analytical methods is not close to that of sensorial analysis, the proposed method does show the highest value.

As stated in the Introduction, astringency perception is associated with the ability of tannins to bind salivary proteins in the buccal cavity (11, 12). However, current knowledge does not allow us to establish which proteins, tannins, and/or tannin combination are responsible for this phenomenon (35). Evidently, no method can substitute completely for sensorial analysis, but the proposed method is a reproducible index that correlates quite well with it.

CONCLUSIONS

All of the analytical astringency estimation methods studied in this paper present a statistically significant correlation with sensorial astringency. The proposed method, which uses ovalbumin as precipitation agent and tannic acid solutions as standards, has the lowest relative errors, the highest linear regression coefficient, the highest Fisher correlation coefficient, and the lowest *p* value. These results indicate that this method is more reproducible than the gelatin index and correlates better with sensorial analysis.

LITERATURE CITED

- (1) Mazza, G. Anthocyanins in grapes and grapes products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1995, 35, 341–371.
- (2) Bakowska, A.; Kucharska, A. Z.; Oszmianski, J. The effect of heating, UV irradiation and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chem.* 2003, 81, 349–355.
- (3) Lea, A.; Arnold, G. M. The phenolics of ciders bitter and astringency. *J. Sci. Food Agric.* 1978, 29, 478–483.
- (4) ATSM. Standard definitions of terms relating to sensory evaluation of materials and products. *Annual Book of ATSM*; American Society of Testing and Materials: Philadelphia, PA, 1989.
- (5) Hagerman, A. E.; Butler, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 4494–4497.
- (6) Zamora, M. C.; Guirao, M. Analysing the contribution of orally perceived attributes to the flavor of wine. *Food Qual. Pref.* 2002, 13, 275–283.
- (7) Zamora, F. *Elaboración y Crianza del Vino Tinto; Aspectos Científicos y Prácticos*; A. Madrid Vicente Ediciones: Madrid, Spain, 2003.
- (8) Fernández de Simon, B.; Hernández, T.; Cadahia, E.; Dueñas, M.; Estrella, I. Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *Eur. Food Res. Technol.* 2003, 216, 150–156.
- (9) McManus, J. P.; Davis, K. G.; Lilley, T. H.; Haslam, E. The association of protein with polyphenols. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1981, 309–311.
- (10) Minaguchi, K.; Bennick, A. Genetic human salivary proteins. *J. Dent. Res.* 1989, 68, 2–15.
- (11) Baxter, N.; Lilley, T. H.; Haslam, E.; Williamson, M. P. Multiple interactions between polyphenols and salivary proline-rich proteins repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry* 1997, 36, 5566–5577.
- (12) Prinz, J. F.; Lucas, P. W. Saliva tannin interactions. *J. Oral Rehabil.* 2000, 27, 991–994.
- (13) Vivas, N.; Glories, Y. Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 1996, 47, 103–107.
- (14) Vidal, S.; Cartalade, D.; Souquet, J. M.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2261–2266.
- (15) Bertuccioli, M.; Zini, S.; Siliami, A.; Picchi, M. Valutazione sensoriale dei risultati di tecniche di vinificazione. *Ind. Bevande* 2002, 350–356.

- (16) Valentová, H.; Skrovánková, S.; Panovská, Z.; Pokorný, J. Time-intensity studies of astringent taste. *Food Chem.* **2002**, *78*, 29–37.
- (17) Edelmam, A.; Lendl, B. Toward the optical tongue: Flow-through sensing of tannin-protein interactions based on FTIR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14741–14747.
- (18) Hagerman, A.; Butler, L. Determination of protein in tannin-protein precipitates. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 944–947.
- (19) Bacon, J. R.; Rhodes, M. J. C. Development of a competition assay for the evaluation of the binding of human parotid salivary proteins to dietary complex phenols and tannins using peroxidase-labeled tannin. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5083–5088.
- (20) Chapon, L. Nephelometry as a method for studying the relations between polyphenols and proteins. *J. Inst. Brew.* **1993**, *99*, 49–56.
- (21) Serafini, M.; Maiani, G.; Ferro-Luzzi, A. Effect of ethanol on red wines tannin-protein (BSA) interactions. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3148–3151.
- (22) Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Interaction of grape seed tannins with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 42–47.
- (23) De Freitas, V.; Mateus, N. Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *82*, 113–119.
- (24) Charlton, A. J.; Haslam, E.; Williamson, M. P. Multiple conformations of the proline-rich protein/epigallocatechin gallat complex determined by time-averaged nuclear overhauser effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9899–9905.
- (25) Cliff, M.; Brau, N.; King, M. C.; Mazza, G. Development of predictive models for astringency from anthocyanin, phenolic and color analyses of British Columbia red wines. *J. Int. Vigne Vin* **2002**, *36*, 21–30.
- (26) Glories, Y. La couleur des vins rouges, 2<sup>ème</sup> Partier. Mesure, origine et interpretation. *Connaiss. Vigne Vin* **1984**, *18*, 253–271.
- (27) Ribéreau-Gayon, P.; Stonestreet, E. Le dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chem. Anal.* **1966**, *48*, 188–192.
- (28) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdiou, D. *Handbook of Enology. Vol. 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*; Wiley: Chichester, U.K., 2000.
- (29) Oho, T.; Rahemtulla, F.; Mansson-Rahemtulla, B.; Hjerpe, A. Purification and characterization of a glycosylated proline-rich protein from human parotid saliva. *Int. J. Biochem.* **1992**, *24*, 1159–1169.
- (30) Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M. N. Interaction of (+) catechin, (–) epicatechin, procyanidin B<sub>2</sub> and procyanidin C, with pooled human saliva in vitro. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *81*, 261–268.
- (31) Guinard, J. X.; Zoumas-Morse, C.; Walchak, C. Relation between parotid saliva flow and composition and the perception of gustatory and trigeminal stimuli in foods. *Physiol. Behav.* **1998**, *63*, 109–118.
- (32) Lee, C. B.; Lawless, H. T. Time-course of astringent sensation. *Chem. Senses* **1991**, *16*, 225–238.
- (33) Lagune, L.; Glories, Y. Les gélamines œnologiques: matière première, fabrication. *Rev. Fr. Enol.* **1996**, *157*, 35–38.
- (34) Poinsaut, P.; Scotti, B. Clarification of wines with gelatin: science and tradition agree. *Enotecnico* **1998**, *34*, 89–96.
- (35) Maury, C.; Sarni-Manchado, P.; Lefebvre, S.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 140–145.

Received for review July 17, 2003. Revised manuscript received December 15, 2003. Accepted December 19, 2003. We thank CICYT (AGL 2001-0716) for financial support.

JF034795F

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

## **2. INFLUENCIA DE VARIACIONES ALGUNOS COMPONENTES DE LA MATRIZ SOBRE LA ASTRINGENCIA.**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007



## **2. INFLUENCIA DE VARIACIONES EN LA MATRIZ SOBRE LA ASTRINGENCIA**

### **Introducción**

Algunos componentes del vino tienen la particularidad de ser astringentes por sí mismos, lo cual afecta indirectamente la sensación de astringencia alterando el caudal y la composición salival durante la degustación. Los ácidos orgánicos e inorgánicos han demostrado tener esta particularidad (Hartwig y col., 1995).

La sensación de astringencia y/o amargor también se ve influenciada por otros componentes de la matriz del vino. Así se ha descrito que el aumento del etanol disminuye la sensación de astringencia causada por los polifenoles (Noble, 1995). Mientras, el aumento de la acidez (y acidez percibida) aumenta la intensidad (Kallithraka y col., 1997<sub>a</sub>) y duración de la astringencia.

El etanol, el glicerol, los polisacáridos, los monosacáridos y los azúcares no reductores son componentes que aumentan la viscosidad del vino tinto. La astringencia también se reduce por un aumento de la viscosidad, pero se plantea que no reduce la sensación de amargor. (Ishikawa y Noble, 1995).

La astringencia puede variar de forma muy sutil cuando cambian algunos de los componentes de la matriz del vino tinto. Los catadores han de ser entrenados rigurosamente a fin de reproducir y discriminar entre las diferentes intensidades de astringencia y en su clasificación de astringencia o amargor (Gawel y col., 2001).

En este anexo se presentan los resultados obtenidos al variar componentes propios de la matriz del vino tinto, específicamente el pH, la concentración de etanol, la presencia de glicerol, así como la goma arábica, por ser un polisacárido que comúnmente se añade al vino para prevenir la turbidez, actuando como coloide protector, y para suavizar vinos muy ásperos (Hidalgo, 2003). Este experimento se realizó con el objetivo de conocer la influencia de estos componentes en la determinación de astringencia usando la metodología puesta a punto por nuestro grupo de trabajo (Capítulo II apartado 1).

### **Materiales y Métodos**

Para el estudio de cada uno de los efectos se prepararon:

- Soluciones de ovoalbúmina (Grado V, Sigma, España) desde 0 hasta 8 g/L en solución sintética.
- Soluciones de ácido tánico (ACS reagent, Sigma, España) desde 0 hasta 1 g/L en solución sintética.
- Solución sintética\*: 4g/L de ácido tartárico (Panreac, España), 13,5% (95g/L) de etanol (Panreac, España) ajustado a pH 3,5 con hidróxido de sodio (Panreac, España).

\* En los efectos pH y etanol estas condiciones varían de acuerdo con el ensayo.

Se realizó la técnica de astringencia (Llaudy y col., 2004) para cada parámetro en cada concentración de ácido tánico (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 g/L) por triplicado, observando en cada caso los efectos de la variación de los diferentes parámetros. Se realizaron los mismos cálculos y gráficos que en la metodología descrita en el apartado 1 de este capítulo.

- Efecto del pH

Para estudiar este efecto se utilizaron soluciones sintéticas ajustadas a pH 2; 3; 3,5; 4 y 5. El ajuste se realizó con hidróxido de sodio.

Las soluciones de ácido tánico se prepararon utilizando las soluciones sintéticas de cada pH en particular.

- Efecto del Etanol

Para estudiar este efecto se utilizaron soluciones sintéticas al 10% de etanol (73 g/L); 13,5; 15% (110 g/L) y 20% (146 g/L).

Las soluciones de ácido tánico se prepararon utilizando las soluciones sintéticas de cada concentración de etanol en particular.

- Efecto del Glicerol

Para estudiar este efecto se adicionó a la solución sintética 0; 7,5; 15 y 30 g/L de glicerol (Sigma, España).

Las soluciones de ácido tánico se prepararon utilizando las soluciones sintéticas de cada concentración de glicerol en particular.

- Efecto de la Goma Arábica

Para estudiar este efecto se adicionó a la solución sintética 1L por cada 30 hL ( $3,3 \times 10^{-4}$  L/L) y 1L por cada 15 hL ( $6,6 \times 10^{-4}$  L/L) de Fitrostabil (goma arábica de *Acacia verek*, Martín Vielatte Oenologie, Francia). Las dosis utilizadas se establecieron de acuerdo con las recomendadas por el fabricante que van desde 1L por cada 30 hL hasta un máximo de 1L por cada 10 hL.

Las soluciones de ácido tánico se prepararon utilizando las soluciones sintéticas de cada concentración de goma arábica en particular.

## **Resultados y discusión**

Para cada parámetro y cada concentración de ácido tánico se realizaron curvas de absorbancia a 280 nm versus concentración de ovoalbúmina. La adición de ovoalbúmina al ácido tánico provoca precipitación de los complejos ácido tánico-proteínas, lo cual lleva a un claro descenso de la absorbancia en el sobrenadante. La disminución de la absorbancia depende de la ovoalbúmina añadida y muestra un comportamiento logarítmico.

Los resultados de cada uno de los parámetros estudiados están expresados en tablas donde aparecen las medias aritméticas y desviaciones standards de las pendientes logarítmicas para cada concentración de tanino. Estas pendientes llevadas a gráficos de pendientes logarítmica versus concentración de ácido tánico dan lugar a rectas cuyas ecuaciones lineales también se expresan en las tablas. Por último, las pendientes de estas rectas se utilizan para elaborar gráficos versus las diferentes condiciones ensayadas en cada parámetro, mostrando el comportamiento en cada caso.

Para la mejor visualización de los resultados, dentro del texto sólo aparecen las gráficas de comportamiento. En la página final de este apartado se encuentran las tablas correspondientes a cada parámetro estudiado.

- Variaciones en el pH

La astringencia producida por los compuestos fenólicos se incrementa en presencia de ácidos o con la disminución del pH (Kallithraka y col., 1997<sub>a,b</sub>). Los efectos de la disminución del pH en la percepción de astringencia podrían ser debido a un incremento de la afinidad de los compuestos fenólicos por las proteínas de la saliva (Fischer y col., 1994; Siebert y Chassy, 2003). También hay autores que consideran que algunos ácidos a bajas concentraciones producen, por sí mismos, mayor sensación de astringencia que de acidez (Rubico y MaDaniel, 1992; Hartwing y Mc Daniel, 1995).

En el caso de los ácidos orgánicos con grupos hidroxilos adyacentes, los puentes de hidrógeno son un posible mecanismo para explicar el incremento de la astringencia (Murray y col., 1994). Para otros ácidos, se plantea que la sensación de astringencia podría resultar de la pérdida de viscosidad que producen los ácidos por precipitación de proteínas salivares que se desnaturalizan frente a cambios de pH, aún en condiciones de pH cercanos al pH fisiológico de la mucosa bucal (Thomas y Lawless, 1995).

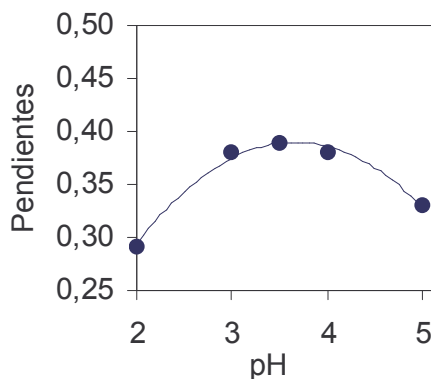


Figura 1. Comportamiento de las pendientes de las ecuaciones lineales obtenidas a partir de la reacción de ovoalbúmina en concentraciones crecientes con patrones de ácido tánico a diferentes pH.

En la Figura 1 observamos el comportamiento de las pendientes de las rectas obtenidas a partir de las curvas logarítmicas de los sobrenadantes de las reacciones de concentraciones crecientes de ovoalbúmina con patrones de ácido tánico, en soluciones sintéticas ajustadas a pH 2,0; 3,0; 3,5; 4,0 y 5,0.

Los resultados dibujan una parábola, donde observamos que la pendiente aumenta desde pH=2,0 hasta pH=3,0, posteriormente la pendiente permanece estable entre pH=3,0 y pH=4,0, para finalmente disminuir a pH=5,0.

Estos resultados fueron obtenidos mediante la utilización de ovalbúmina como proteína precipitante. Esta proteína presenta un punto isoeléctrico de 4,5, por lo que en nuestras condiciones experimentales, dicha proteína presentaría carga positiva decreciente entre pH=2,0 hasta pH=4,0, y una ligera carga negativa a pH=5,0. Posiblemente la disminución de la pendiente en este último punto de pH tenga que ver con el cambio de carga. Dado que las proteínas de la saliva presentan puntos isoeléctricos distintos, podemos albergar alguna duda sobre si podemos extrapolar nuestros resultados a las condiciones reales. No obstante, nuestros resultados se corresponden con los publicados por Siebert (2003) donde analiza la turbidez de la saliva con ácido tánico a pH desde 2,0 hasta 7,0. El punto máximo de turbidez en estos trabajos se alcanza a pH 4.4. Trabajos anteriores de Siebert (1996) establecen modelos predictivos de turbidez empleando gladiadina y ácido tánico, donde la turbidez se incrementa hasta valores entre 3,5 y 4,0 para luego descender. En otros estudios mediante análisis sensorial, las variaciones de pH desde 3 hasta 7 producen disminución de la astringencia (Lawless y col., 1996) y también disminución en la viscosidad (deMiglio y col., 2002).

Es importante destacar que si bien nuestra metodología permite detectar la influencia de las variaciones en el pH y su estrecha relación con la astringencia, estas variaciones son muy pequeñas. En este sentido, Kallitraka y col., 1997<sub>b</sub> mediante análisis sensorial y Hornes y col., 2002 en estudios de turbidez han descrito que los efectos de las variaciones del pH en soluciones modelos suelen ser más pronunciados que en el vino tinto. Por una parte, porque los cambios de pH tienen menos efectos sobre la astringencia a concentraciones altas de taninos. Por otra parte, por el hecho de que el vino tinto presenta, en general, niveles de astringencia suficientemente altos que hacen que, mediante degustación sea prácticamente imperceptible la detección de pequeñas variaciones de pH que puedan tener lugar en el vino, durante su evolución. Además, el vino presenta una alta capacidad tampón comparado con soluciones modelos (Guinard y col., 1986).

- Variaciones en la Concentración de Etanol

Las interacciones tanino-proteínas pueden verse inhibidas por la presencia de solventes no polares como lo es el caso del etanol en el vino tinto. El etanol tiene la capacidad de obstaculizar mediante interacciones hidrofóbicas la unión entre las proteínas y los polifenoles, reduciendo la precipitación de complejos tanino-proteína

(Gawel, 1998). También es conocido que el etanol incrementa la viscosidad y en consecuencia disminuye la sensación de astringencia (Smith y Noble, 1998).

En la Figura 2 se observa el comportamiento de las pendientes de las rectas obtenidas a partir de las curvas logarítmicas de los sobrenadantes de las reacciones de concentraciones crecientes de ovoalbúmina con los patrones de ácido tánico, en soluciones sintéticas que contenían un 10; 13,5; 15; 20 % de etanol. Dichas pendientes dibujan una recta decreciente, mostrando que el aumento de la concentración de etanol produce una pequeña disminución de la precipitación de complejos taninos-proteínas, lo que se traduciría en una ligera disminución de la astringencia.

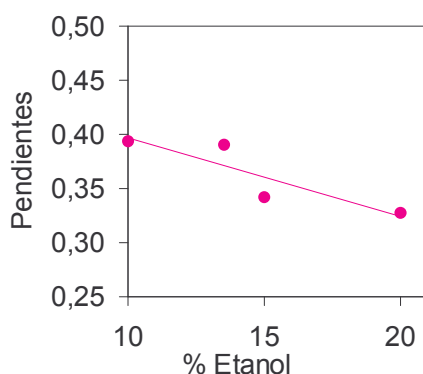


Figura 2. Comportamiento de las pendientes de las ecuaciones lineales obtenidas a partir de la reacción de ovoalbúmina en concentraciones crecientes con patrones de ácido tánico en soluciones con diferentes porcentajes de etanol.

Estos resultados coinciden con los de Serafín y col. (1997) realizados con vino tinto y BSA mediante ensayos de precipitación de proteínas. Así como, con los de Martín y Pangbord (1971) mediante análisis sensorial y los de precipitación de taninos condensados por parte de las PRPs realizados por Yokotsuka y colaboradores (1987).

- Variaciones en la Concentración de Glicerol

El glicerol junto al etanol contribuyen a la sensación de dulzor y viscosidad en los vinos. Este polialcohol se produce durante la fermentación alcohólica y su concentración en el vino varía según la cepa de levadura utilizada para la fermentación (Erasmus y col., 2004) y la temperatura a la cual ocurre dicho proceso (Ough y col., 1972). Trabajos de Gawel y colaboradores (2001) plantean que la eliminación por sangrado del 10- 20 % del mosto disminuye la concentración de glicerol en el vino, lo cual contribuye, junto al aumento de la concentración de polifenoles en el vino, al aumento de la astringencia.

La Figura 3 muestra el comportamiento de las pendientes de las rectas obtenidas a partir de las curvas logarítmicas de los sobrenadantes de las reacciones de

concentraciones crecientes de ovoalbúmina con los patrones de ácido tánico, en soluciones sintéticas sin glicerol, comparadas con soluciones a concentraciones 7,5; 15 y 30 g/L de glicerol.

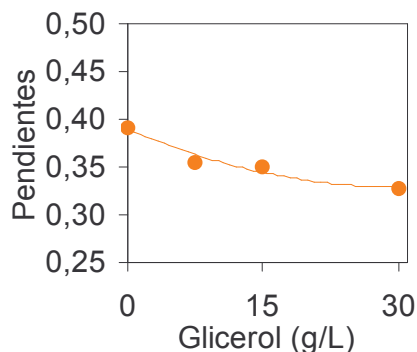


Figura 3. Comportamiento de las pendientes de las ecuaciones lineales obtenidas a partir de la reacción de ovoalbúmina en concentraciones crecientes con patrones de ácido tánico los cuales contenían diferentes concentraciones de glicerol.

Los resultados dibujan una línea de pendiente decreciente, mostrando que el aumento de la concentración de glicerol produce una ligera disminución de la precipitación de complejos formados por el ácido tánico y la ovoalbúmina.

Estos resultados indican una disminución de la astringencia lo cual concuerda con resultados obtenidos mediante análisis sensorial, donde se observan marcadas diferencias utilizando Test Triangular al añadir glicerol a vinos tintos de mesa (Filipello, 1955). Sin embargo, los resultados descritos por Noble y Bursick (1984) plantean que la presencia de glicerol en el vino contribuye primeramente al dulzor y que sólo cantidades elevadas (25,8 g/L) contribuirían a la viscosidad. Recientemente, Nurgel y Pickering (2005) observan en soluciones modelos, ligeros incrementos de la viscosidad y la densidad, percibidas por degustación, al aumentar las concentraciones de etanol (3, 7, 15% v/v) y de glicerol (5, 20 ,50 g/L).

- Adición de Goma Arábica

La goma arábica es un polisacárido que tradicionalmente se ha utilizado como tratamiento preventivo contra precipitaciones o formación de coloides en los vinos (Hidalgo, 2003). Además, produce una disminución clara de la astringencia y aumenta la untuosidad (Maury, 2001; Comuzzo, 2002).

Numerosos estudios han demostrado el efecto de los polisacáridos en las interacciones tanino-proteínas (Ozawa y col., 1987; Luck y col., 1994; Haslam, 1991). Los polisacáridos, actúan como inhibidores de la precipitación de proteínas, probablemente por la habilidad de formar complejos ternarios proteína/ polifenol/ polisacárido, lo cual aumenta la solubilidad en medio acuoso. O por la asociación

molecular del polisacárido al polifenol, compitiendo con la agregación de la proteína. También es probable, que los polisacáridos formen estructuras donde encapsulan al polifenol (Mc Manus y col., 1985, Ozawa y col., 1987).

En la Figura 4 observamos el comportamiento de las pendientes de las rectas obtenidas a partir de las curvas logarítmicas de los sobrenadantes de las reacciones de concentraciones crecientes de ovoalbúmina con patrones de ácido tánico, en soluciones sintéticas sin goma arábiga y añadiendo goma arábiga en cantidades equivalentes a 1L por cada 30 hL y 1L por cada 15 hL.

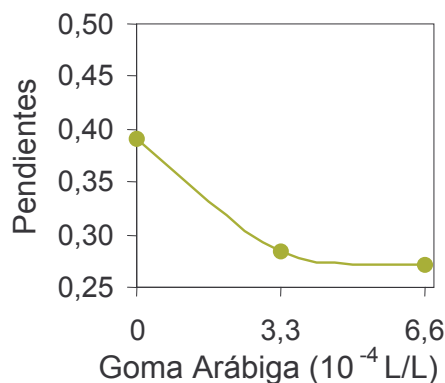


Figura 4. Comportamiento de las pendientes de las ecuaciones lineales obtenidas a partir de la reacción de ovoalbúmina en concentraciones crecientes con patrones de ácido tánico los cuales contenían diferentes cantidades de goma arábiga.

El comportamiento de estas pendientes describe una importante disminución de la astringencia al estar la goma arábiga presente en el medio que, prácticamente, no variará al doblar la cantidad de goma arábiga añadida. Este comportamiento se corresponde con la disminución de formación de complejos insolubles descritos en trabajos de de Freitas y colaboradores (2003) donde mediante técnicas de turbidimetría calculan el porcentaje de formación de agregados insolubles en el medio, utilizando proantocianidinas de semillas de uva y BSA junto a diferentes concentraciones de goma arábiga.

Estudios de adición de goma arábiga en vinos tintos (Crespy, 2003) describen una disminución de astringencia mediante la técnica del Índice de Geltina de Glories, sin que se observen diferencias importantes entre las dosis empleadas (10, 20, 30 g/hL). Estos vinos presentaron mejor puntuación en boca durante la degustación que sus respectivos controles.

Otros estudios de análisis sensorial en polisacáridos han demostrado la importancia de los polisacáridos en general en la viscosidad, la sensación de cuerpo y redondez en boca y la disminución de la astringencia (Vidal y col., 2004<sub>a,b</sub>).

## **Conclusiones**

1. La técnica aplicada para expresar la astringencia como g/L de ácido tánico de forma experimental es sensible a cambios en la matriz del vino, mostrando variaciones ante cambios del pH, el contenido de etanol en el medio, así como la presencia de glicerol y goma arábica, como ejemplo de polisacárido añadido al vino.
2. Los resultados indican que dentro de los intervalos habituales de pH, concentración de etanol y concentración de glicerol, las posibles variaciones de la astringencia serían moderadas.
3. La adición de goma arábica produce ya a la dosis más baja ensayada una importante disminución de la astringencia que en nuestras condiciones experimentales sería del orden del 25 %.
4. Los resultados, en todos los casos, muestran comportamientos similares a los descritos en trabajos previos realizados con otras técnicas de estudios de interacciones tanino-proteínas y/o degustación.



## TABLAS

Tabla 1. Pendientes Logarítmicas obtenidas al gráficar las absorbancias a 280 nm de los sobrenadantes de las reacciones de concentraciones crecientes de ovoalbúmina con cada concentración de ácido tánico a diferentes pH. Ecuaciones lineales obtenidas a partir de estas pendientes.

[Acido Tánico]	0,2 g/L	0,4 g/L	0,6 g/L	0,8 g/L	1 g/L	Ecuación Lineal
pH 2,0	0,029 ± 0,001	0,097 ± 0,001	0,148 ± 0,010	0,202 ± 0,000	0,268 ± 0,001	Y= 0,2922X - 0,0265 r <sup>2</sup> = 0,9974
pH 3,0	0,042 ± 0,004	0,141 ± 0,002	0,206 ± 0,010	0,289 ± 0,002	0,352 ± 0,006	Y= 0,3840X - 0,0244 r <sup>2</sup> = 0,9942
pH 3,5	0,043 ± 0,001	0,148 ± 0,001	0,211 ± 0,017	0,300 ± 0,003	0,357 ± 0,001	Y= 0,3900X - 0,0222 r <sup>2</sup> = 0,9977
pH 4,0	0,044 ± 0,000	0,142 ± 0,005	0,203 ± 0,001	0,253 ± 0,001	0,350 ± 0,002	Y= 0,3750X - 0,0185 r <sup>2</sup> = 0,9862
pH 5,0	0,037 ± 0,002	0,097 ± 0,004	0,153 ± 0,002	0,230 ± 0,001	0,300 ± 0,001	Y= 0,3303X - 0,0349 r <sup>2</sup> = 0,9962

Las pendientes están expresadas como media aritmética ± desviación standard.

Tabla 2. Pendientes logarítmicas obtenidas al gráficar las absorbancias a 280 nm de los sobrenadantes de las reacciones de concentraciones crecientes de ovoalbúmina con cada concentración de ácido tánico en soluciones con diferente porcentaje de etanol. Ecuaciones lineales obtenidas a partir de estas pendientes.

[Acido Tánico]	0,2 g/L	0,4 g/L	0,6 g/L	0,8 g/L	1 g/L	Ecuación Lineal
10% Etanol	0,046 ± 0,004	0,160 ± 0,002	0,214 ± 0,001	0,301 ± 0,005	0,370 ± 0,002	Y= 0,3940X - 0,0184 r <sup>2</sup> = 0,9889
15% Etanol	0,035 ± 0,006	0,089 ± 0,004	0,153 ± 0,011	0,247 ± 0,003	0,298 ± 0,001	Y= 0,3417X - 0,0405 r <sup>2</sup> = 0,9906
20% Etanol	0,044 ± 0,003	0,114 ± 0,004	0,165 ± 0,007	0,219 ± 0,004	0,318 ± 0,006	Y= 0,3275X - 0,0244 r <sup>2</sup> = 0,9847

Las pendientes están expresadas como media aritmética ± desviación standard.

*Capítulo II. Metodología de astringencia y estudios relacionados...*

Tabla 3. Pendientes logarítmicas obtenidas al gráficar las absorbancias a 280 nm de los sobrenadantes de las reacciones de concentraciones crecientes de ovoalbúmina con cada concentración de ácido tánico en soluciones con con diferentes concentraciones de glicerol. Ecuaciones lineales obtenidas a partir de estas pendientes.

[Acido Tánico]	0,2 g/L	0,4 g/L	0,6 g/L	0,8 g/L	1 g/L	Ecuación Lineal
0 g/L glicerol	0,043 ± 0,001	0,148 ± 0,001	0,211 ± 0,017	0,300 ± 0,003	0,357 ± 0,001	Y= 0,3900X - 0,0222 r <sup>2</sup> = 0,9904
7,5 g/L glicerol	0,036 ± 0,001	0,095 ± 0,002	0,170 ± 0,008	0,246 ± 0,001	0,315 ± 0,001	Y= 0,3550X - 0,0403 r <sup>2</sup> = 0,9983
15 g/L glicerol	0,034 ± 0,001	0,083 ± 0,003	0,166 ± 0,001	0,243 ± 0,001	0,308 ± 0,001	Y= 0,3540X - 0,0456 r <sup>2</sup> = 0,9945
30 g/L glicerol	0,044 ± 0,001	0,068 ± 0,001	0,178 ± 0,002	0,226 ± 0,002	0,279 ± 0,002	Y= 0,3280X - 0,0350 r <sup>2</sup> = 0,9655

Las pendientes están expresadas como media aritmética ± desviación standard.

Tabla 4. Pendientes logarítmicas obtenidas al gráficar las absorbancias a 280 nm de los sobrenadantes de las reacciones de concentraciones crecientes de ovoalbúmina con cada concentración de ácido tánico en soluciones con con diferentes cantidades de goma arábica. Ecuaciones lineales obtenidas a partir de estas pendientes.

[Acido Tánico]	0,2 g/L	0,4 g/L	0,6 g/L	0,8 g/L	1 g/L	Ecuación Lineal
0 L/L						Y= 0,3900X - 0,0222 r <sup>2</sup> = 0,9904
Goma Arábica 3,3 x 10 <sup>-4</sup> L/L	0,043 ± 0,001	0,148 ± 0,001	0,211 ± 0,017	0,300 ± 0,003	0,357 ± 0,001	Y= 0,2840X - 0,0056 r <sup>2</sup> = 0,9974
Goma Arábica 6,6 x 10 <sup>-4</sup> L/L	0,046 ± 0,001	0,115 ± 0,001	0,164 ± 0,005	0,223 ± 0,001	0,276 ± 0,001	Y= 0,2710X - 0,0166 r <sup>2</sup> = 0,9986
Goma Arábica	0,067 ± 0,004	0,130 ± 0,002	0,179 ± 0,001	0,234 ± 0,001	0,286 ± 0,003	

Las pendientes están expresadas como media aritmética ± desviación standard.

## Bibliografía

- Charlton, A., Baxter, N., Lokman, M., Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 1593- 1601.
- Comuzzo, P., Tat, L., Battistutta, F., Zironi, R. Dalla stabilizzazione sottrattiva alla conservativa. *Vignevini*. **2002**, 11, 64- 69.
- Crespy, A. Étude de l'addition á différentes doses de gomme arabique, de gomme arabique et de tannin, sur les caractéristiques phénoliques de plusieurs vins rouges. *Revue des Œnologues*, **2003**, 109, 37- 40.
- de Freitas, V., Carvalho, E., Mateus, N., Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chem.*, **2003**, 81, 503- 509.
- deMiglio, P. , Pickering, G.J., Reynolds, A.g. astrin gent subqualities elicited by red wine: the role of ethanol and pH. En *Proceeding of the International bacchus to the Future Conferences*. (ISBN 0-9682851-1-2) St Ctharines, Ontario, may 23-25, **2002**, 31-52.
- Erasmus, D., Cliff, M., Van Vuuren, H.J.J. Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol and the sensory attributes of icewines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2004**, 55,4, 371- 378.
- Fisher, U. Boulton, R.B., Noble, A.C. Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments relationships between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli. *Food Quality and Preferences*, **1994**, 5, 55- 64.
- Filipello, F. Small Panel Taste Testing of Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **1955**, 6, 4, 26- 32.
- Gawel, R. Red wine astringency: a review. *Australian Journal of grape and wine Research*. **1998**, 4, 74-95.
- Gawel, R., Iland, G.P., Leske, A. P., Dunn, C.G. Compositional and sensory differences in Syrah wines following juice run-off prior to fermentation. *J. Wine Research*, **2001**, 12, 5-18.
- Guinard, J.X., Pangborn, R.M., Lewis, M., Preliminary studies on acidity- astringency interactions in model solutions and wines. *J.Sci. Food Agric.*, **1986** 37, 811-817.
- Hartwig, P., McDaniel, M.R. Flavor characteristics of lactic, malic, citric and acetic acids at various pH levels. *J. Food Sci.*, **1995**, 60, 2, 384- 388.
- Haslam, E., Lilley, T.H., Warminski, E., Liao, H., Cai, Y., Martin, R., Polyphenol complexation. A study in molecular recognition. In: *Phenolic compounds in food and their effects on health*. I. Analysis, occurrence and chemistry. Ho C-T, Lee CY, Huang M-T, editors. Washington, DC: Am. Chem. Soc., **1991**, 8-49.
- Hidalgo, T. *Tratado de Enología*. Tomo II Cap. XXII Fenómenos coloidales y clarificación por encolado de los vinos. Ediciones Mundi Prensa. **2003**, 1075-1078.
- Horne, J., Hayes, J., Lawless, T., Turbidity as a measure of salivary protein reaction with astringent substances. *Chem. Senses*, **2002**, 27, 653-659.
- Ishikawa, T y Noble, A.C. Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Quality and Preference*, **1995**, 6, 27-33.
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford M.N. Red wine and model wine astringency as affected by malic and lactic acid. *J. Food Science.*, **1997**, 62, 2, 416- 420. (a)
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford M.N. Effect of pH on astringency in model solution and wines. *J. Agric. Food Chem.*, **1997** 45, 6, 2211-2216. (b)
- Lawless, H.T., Horne, J., Giasi, P., Astringency of organic acid is related to pH. *Chem. Senses*, **1996**, 4, 397-403.
- Llaudy, M.C.; Canals, R.; Canals, J.M.; Rozès, N.; Arola, L.; Zamora, F. New method for evaluating astringency in red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 742-746.
- Luck, G., Liao, H., Murray, N.J., Grimmer, H.R., Warminski, E.E., Williamson, M.P., Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochem.*, **1994**, 37, 357-371.
- Martin, S., Pangborn, R. M. Human parotid secretion in response to ethyl alcohol. *Journal of Dental Research* **1971**, 50, 485-490.
- Maury, Ch., Sarni- Manchado, P., Lefebvre, S., Cheyner, V. Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *Am.J. Enol. Vitic.*, **2001**, 52 2, 140-145.
- McManus, J.P., Davis, K.D., Beart, J.E., Gaffney, S.H., Lilley, T.H., Haslam, E., Polyphenol interactions. Part 1. Introduction: some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *J Chem Soc Perkin Trans II*, **1985**, 1429-1438.
- Murray NJ, Williamson MP, Lilley TH, Haslam E. Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by 1H-NMR spectroscopy. *Eur J Biochem.*, **1994**, ;219, 3, 923-35.
- Noble, A.C., Bursick, G.F. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1984**, 35, 2, 110- 112.
- Noble, A.C. Application of time- intensity procedures for the evaluation of taste and mouthfeel. *American Journal of Enology and Viticulture* **1995**, 46, 128- 133.
- Nurgel, C., Pickering, G. Contribution of glycerol, ethanol and sugar to the perception of viscosity and density elicited by model white wines. *Journal of Texture Studies*, **2005**, 36, 3, 303.
- Ough, C.S., Fong, D., Amerine, M.A. Glycerol in wine: Determination and some factors affecting. *American Journal of Enology and Viticulture* **1972**, 23, 1, 1-5.
- Ozawa T, Lilley TH, Haslam E. Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, **1987**, 26, 2937-2942.
- Rubico, S.M., McDaniel, M.R. Sensory evaluation of acid by free choice profiling. *Chemical Senses*, **1992**, 17, 173- 289.

*Capítulo II. Metodología de astringencia y estudios relacionados...*

---

- Serafini, M., Maiani, G., Ferro- Luzzi, A. Effect of ethanol on red wine tannin- protein (BSA) interactions. *J. Agric. Food. Chem.*, **1997**, 45, 3148- 3151.
- Siebert, K.J., Chassy A.W., An alternative mechanism for the astringent sensation of acids. *Food Quality Preference*, **2003**, 15, 13- 18.
- Siebert, K.J., Troukhanova, N.V., Lynn, P.Y., Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, 80–85.
- Smith, A.K., Noble, A.C. Effect of increased viscosity on the sourness and astringency of aluminium sulfate and citric acid. *Food Quality and Preferences*, **1998**, 9, 3, 139-144.
- Thomas, C.J.C., Lawless, H.T., Astringents subqualities in acid. *Chem. Senses.*, **1995**, 20, 6, 593-600.
- Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., Cheynier, V., Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preferences*, **2004**, 15, 209- 217.(a)
- Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E., The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chem.*, **2004**, 85, 519-525.(b)
- Yokotsuka, K., Singleton, V.L. 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*, **1987**, 46, 329-338.

### **3. COMPARACIÓN DE LA REACTIVIDAD DEL ÁCIDO TÁNICO CON LA OVOALBÚMINA Y LA SALIVA, COMO PROTEÍNAS MODELOS PARA EVALUAR LA ASTRINGENCIA.**

---

Comparison of the reactivity of tannic acid with  
ovalbumin and whole salivary proteins as a  
model for evaluating astringency

Artículo enviado para su publicación a:

*Food Quality and Preferences*  
*Manuscript ID: FQAP-D-06-00182*  
*22 de Septiembre del 2006*

---

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

## COMPARISON OF THE REACTIVITY OF TANNIC ACID WITH OVALBUMIN AND WHOLE SALIVARY PROTEINS AS A MODEL FOR EVALUATING WINE ASTRINGENCY.

María del Carmen Llaudy, Roser Canals, Mireia Esteruelas, Joan Miquel Canals, and  
Fernando Zamora\*

\* Author to whom correspondence should be addressed (e-mail: [fernando.zamora@urv.cat](mailto:fernando.zamora@urv.cat); fax: +34977558686;  
telephone: +34977558679)

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, (CeRTA), Universitat Rovira i  
Virgili. Campus de Sescelades, C/ Marcel·li Domingo, s/n. 43007-Tarragona, Spain.

### **Abstract**

This paper compares the reactivity of ovalbumin and whole salivary proteins to tannic acid in a model wine solution. Ovalbumin precipitates more tannic acid than whole salivary proteins at the same protein concentrations. However, there is a significant correlation between them which would indicate that both protein models behave in a similar way, even though they present different affinities towards tannic acid. The use of both protein models as a precipitating agent for determining the astringency of different red wines has provided similar results in most cases (83 %), which would confirm the validity of the use of ovalbumin for wine astringency estimation.

*Keywords: Astringency, Ovalbumin, Salivary proteins, Tannic acid, Wine.*

### **1. Introduction**

Astringency is described as a drying or puckering sensation of the epithelium of the mouth induced by substances such as tannins (ATSM, 1989). It is perceived as a tactile sensation and it is a diffuse stimulus, not confined to a particular region of the mouth or tongue (Green, 1993).

Astringency occurs when the lubricating effect of salivary proteins is lost by the precipitation of complexes formed through non-covalent interactions between salivary proteins and tannins (Haslam, 1974). The general consensus is that this phenomenon results from the cross-linking of separate salivary protein molecules by tannins, which act as a polydentated ligand on the protein surface, involving hydrophobic effects and hydrogen bonding (Luck, Liao, Murray, Grimmer, Warminski & Williamson, 1994; de Freitas & Mateus, 2001a). Moreover, remaining

tannins in the mouth may contribute to the astringent sensation when they interact with bitterness receptors, and because the formation of soluble tannin-protein complexes also affects the viscosity in the oral cavity (Kallithraka, Bakker & Clifford, 1997).

Several molecular models of astringency have recently been described based on interactions between proteins and phenolic compounds (Jöbstl, O'Connell, Fairclough & Williamson, 2004; Poncet-Legrand Edelman, Putuax, Cartalade, Sarni-Manchado & Vernhet., 2005). These models suggest that initially small soluble polydispersed particles are formed which later increase in size due to the incorporation of more tannin-protein complexes until they become insoluble and precipitate.

The oral cavity is filled with a thin layer of saliva that contains a large number of peptides and proteins. The quantity and composition of salivary proteins varies widely among individuals because they are conditioned by genetic polymorphism, gender, time of day or stress (Witmarth, Riviere, Rustvold, Lauten, Madden & David, 2004).

Moreover, the contributions of different secretion glands also significantly affect salivary protein composition (Walz, Stuhler, Wattenberg, Hawranke, Meyer, Schmalz, Bluggel & Ruhl, 2006). Without stimulation, saliva flow is present in a relative proportion of 1/4 from the parotid glands, 2/3 from the submandibular glands and 1/20 from the sublingual gland. However, this relative proportion increases up to 1/3 from the parotid gland upon stimulation (Gawel, 1998) as does the proportion of basic PRPs from the parotid gland. (Sas & Dawes, 1997).

SDS-PAGE analyses of whole saliva have been used to characterize the main protein groups: mucins, lactoferrin,  $\alpha$ -amylases, Proline Rich Proteins (PRP) and histatins (Steiner & Keller, 1968; Beeley, Sweeney, Lindsay, Buchana, Sarna & Khoo, 1991; Beeley, 1993; Kauffman, Hoffman, Bennick, & Keller, 1992). Recently, some new peptides and proteins corresponding to wide group of PRPs (Isemura, Asakura, Shibata, Isemura, Saitoh & Sanada, 1983; Messana Cabras, Inzitari, Lupi, Zuppi, Olmi, Fadda, Cordano, Giardina & Castagnola, 2004; Witmarth et al., 2004),  $\alpha$ -amylases (Hirtz, Chevalier Centeno, Rofidal, Egea, Rossignol, Sommerer & Deville de Périère, 2005), cystatins and lysozyme (Hardt, Thomas, Dixon, Newport, Agabian, Prakobphol, Witkowska & Fisher, 2005) have been identified by proteomic analysis. Most of these peptides and proteins are isoforms and /or fragments of proteins.

Some authors have studied tannin-protein interactions using extracts of proanthocyanidins or tannic acid (Hagwerman & Butler, 1978; Ratnavathi & Sashidhar, 1997; Naish, Clifford & Birch, 1998) and proteins such as Bovine Serum Albumine (BSA), Gelatine, Poly-L-Proline, Gliadin, Mucine and radiolabelled proteins (Glories, 1984; Hagwerman & Butler, 1980, 1989; Kawamoto, Nakatsubo & Murakami, 1995; Ratnavathi & Sashidhar, 1998, Naish, et al., 1998; Siebert & Lynn., 2003; Henson, Niemeyer, Ansong, Forkner, Makkar & Hagerman, 2004; Monteleone, Condelli, Dinnella & Beruccioli, 2006; Poncet-Legrand et al., 2005) as a protein model to simulate salivary proteins.

Other authors have studied interactions between wine tannins and salivary proteins using the SDS-PAGE (Lu & Bennick., 1998; Sarni- Manchado et al., 1999; Bacon & Rhodes, 2000; Gambuti, Rinaldi, Pessina & Moio, 2005), nephelometry (Carvalho,



Mateus & de Freitas, 2004; Mateus, Carvalho, Luis & de Freitas, 2004) or HPLC analysis (Kallithraka, Bakker & Clifford, 1997, 2000). It is generally accepted that PRPs (Bate-Smith, 1954; Baxter, Lilley, Haslam & Williamson 1997) and histatins (Yan & Bennick, 1995; Naurato, Wong, Lu, Wroblewski & Bennick, 1999) are the most reactive among the salivary proteins.

However, it is very difficult to correlate these results with the real sensation of a wine's astringency because the different proteins of the saliva do not react equally with the different tannins (Lu & Bennick, 1998; Sarni- Manchado, Cheynier, & Moutounet, 1999; Baxter, Lilley, Haslam, & Williamson, 1997; Monagas, Bartolomé & Gómez-Cordovés, 2005).

The astringency of red wine is usually estimated by tasting. However, astringency sensorial measurement requires a group of expert wine tasters and is always subject to a certain degree of subjectivity (Gawel, Iland & Francis, 2001; Valentova, Skrovankova, Panovska & Pokorny, 2002). The mouth-feel perception is a highly complex process depending on each individual wine component but also on the interaction between components and on the structures of the resulting molecular assemblies (Vidal, Courcoux, Francis, Kwiatkowski, Gawel, Williams, Waters & Cheynier, 2004). As astringency is a negative sensory attribute that plays a huge role in the quality of red wines, objective methods for wine astringency estimation have recently been developed. (Bate- Smith, 1973; Hagerman & Butler, 1980; Glories, 1984; Kawamoto et al., 1995; Ratnavathi & Sashidhar, 1998; Bacon & Rodhes, 1998; Horne, Hayes & Lawless, 2002; Edelman & Lendl, 2002; Condinelli, Dinnella, Cerone, Monteleone & Bertuccioli, 2005; Gambuti, et al., 2005; Monteleone, et al., 2006).

Our research group has recently developed a method for astringency estimation using ovalbumin as a protein model (Llaudy, Canals, Canals Rozès, Arola & Zamora, 2004). This method is based on the pursuit of the precipitation of phenolic compounds of the wine through the addition of increasing amounts of ovalbumin. The comparison of the behaviour of different wines with standard solutions of tannic acid allows us to express the wine astringency in terms of g of tannic acid per litre. This method has been showed to be very effective in later studies (Rodríguez, Lezáun, Canals, Llaudy, Canals & Zamora, 2005; Canals, Llaudy, Valls, Canals & Zamora, 2005; Llaudy, Canals, Gonzalez-Manzano, Canals, Santos-Buelga & Zamora, 2006).

However, as cited above, the reactivity of ovalbumin and salivary proteins versus tannins is not exactly equal. For that reason, some questions about the direct applicability of our method for wine astringency estimation may be raised. The aim of this work was to compare the astringency determination method using ovalbumin as model protein with that using whole saliva. The results were verified on twelve different wines.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents

All the solvents and acids used were from the HPLC grade and were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). The tannic acid (ACS reagent) and ovalbumin (Grade V) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

### 2.2. Solutions

Ovalbumin, salivary solutions and Tannic acid were made in a synthetic solution similar to wine: 4g/l of tartaric acid (Panreac, Spain), 95 g/l of Ethanol (Panreac, Spain), adjusted to a pH of 3.5 with sodium hydroxide (Panreac, Spain).

Tannic acid solutions at concentrations of 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 g/l were used as standards.

Ovalbumin solutions at concentrations of 0.0, 0.8, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4 g/l were used as the protein to precipitate astringent tannins.

### 2.3. Human saliva

Parafilm- stimulated whole saliva was collected in an ice-cooled vessel, two hours after normal breakfast time (Schwartz, Zhu & Sreebny., 1995). All preparation of saliva was performed at 4°C. After collection, saliva was centrifuged at 11,700 g for 10 minutes. The supernatant was referred to as whole saliva. EDTA was added to a final concentration of 5 mM and the sample was dialyzed overnight against 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer, pH 6.8 (Steiner & Keller, 1968; Levine & Keller, 1977). The protein content was then determined by a Bradford assay using the standard Bio-Rad Protein assay kit (Bradford, 1976). The whole saliva was lyophilized, stored at -20°C and re-suspended in synthetic solution in concentrations similar to those of the ovalbumin to conduct the assays. (0, 0.8, 1.6, 3.1, 4.7, 6.25 g/L)

### 2.4. Wines

Twelve commercial red wines from different origins were used for the comparison of ovalbumin to saliva as a precipitation agent.

### 2.5. Astringency

Astringency was estimated using ovalbumin as a precipitation agent and tannic acid solutions as standards in accordance with the previously described method (Llaudy et al., 2004). Following the same steps as the astringency methodology, the assays were conducted using concentrations of whole saliva in synthetic solution similar to those used with ovalbumin as a precipitation agent.

### 2.6. Sodium Duodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS- PAGE)

Each of the supernatants from the last stage of the astringency assays using ovalbumin or whole salivary proteins solutions plus tannic acid were analyzed by SDS-PAGE. The samples were lyophilized and were re-suspended in SDS buffer

(0.125 M Tris-HCl, 4% SDS v/v, 20% v/v of glycerol, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.02 % bromophenol blue, pH 6.8).

The SDS PAGE molecular weight Standards, Low Range from Bio-Rad (California, US) diluted 1:20 in SDS buffer.

Standards and samples were heated for 5 minutes at 100°C and were then analyzed by SDS PAGE (Steiner & Keller, 1968; Laemmli, 1970; Shwartz et al., 1995) using phastsystem equipment (Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden), PhastGel Homogeneous-20 (Amersham, Madrid, Spain) with separation Range 2- 150 kD and PhastGel Buffer Strips - SDS (0.112 M acetate, 0.112 M Tris, pH 6.4) (Amersham, Madrid, Spain). The separation was carried out according to File no. 111 of the Phastsystem Separation Technique as recommended by Amersham for SDS PAGE in homogeneous-20.

The proteins were stained with coomassie blue R-250 (Amersham, Spain). The gels were fixed using a mixture of ethanol, acetic acid and water (40:10:50) for 1 hour. After soaking in water for 5 minutes, the gels were stained with 0.1% coomassie blue in 25% methanol and 10% acetic acid. The coomassie blue destained were with 10% acetic acid (without ethanol or methanol). Molecular weight was estimated by comparison with the migration rates of standard proteins.

The densities and relative quantity calculations were performed with Quantity One Software Version 4.3.1 for PC (Bio- Rad, California, US). These relative quantities and the original protein concentration of the ovalbumin or whole salivary proteins were used to calculate the different proteins.

### *2.9. Statistics*

All data are expressed as the arithmetic average (standard deviation of three replicates). One- and two-factor ANOVA, Scheffe's test and correlation analysis were conducted with Statistica Statsoft (Lisboa, Portugal).

## **3. Results and Discussion**

Figure 1 contains the graphs depicting absorbance at 280 nm versus the amount of ovalbumin and whole salivary proteins added for the different tannic acid solutions. As expected, the addition of both protein models provokes tannic acid precipitation and consequently a clear decrease in supernatant absorbance at 280 nm. This decrease in A<sub>280nm</sub> depends on the amount of protein added, and the behaviour is clearly logarithmic for both protein models. In fact, all the curves fit reasonably well to logarithmic equations as indicated in Table 1.

Figure 2 shows the relationship between the fitted logarithmic equation slope for ovalbumin and whole salivary proteins and the initial tannic acid concentrations. The slopes of the logarithmic equations obtained fit perfectly to the tannic acid concentration for both protein models.

According to these data, ovalbumin and whole salivary proteins seem to react differently toward tannic acid solutions. Specifically, ovalbumin produced greater

decreases of A280nm than whole salivary proteins in the studied interval of concentrations, generating greater slopes in the logarithmic fitted curves.

This data indicates that ovalbumin precipitates more tannic acid than whole salivary proteins at the same protein concentrations. This behaviour can clearly be seen in Figure 2 by comparing the slopes corresponding to both protein models.

Ovalbumin has been described as having a globular conformation (Herald & Smith, 1992). On the contrary, PRP, a major component of salivary proteins, has a linear conformation (Asquish & Butler, 1985) and presents higher affinities for tannins than globular proteins (Hagerman & Butler, 1981). Evidently, our results do not correspond to these data. In this experiment we have used similar concentrations of whole saliva and ovalbumin according to Bradford's method. Therefore, when ovalbumin is added to tannic acid solutions, all the protein corresponds to this protein. However, when whole salivary proteins are added to tannic acid solutions, there are many proteins involved in the reaction that do not necessarily react with tannins in a similar way to PRPs.

Nevertheless, in spite of the differences observed between the behaviour of ovalbumin and whole salivary proteins (Figure 2), there is a significant correlation between them ( $r^2: 0.9812$ ;  $p < 0.0001$ ). This would indicate that both protein models behave in a similar way, although they present different affinities towards tannic acid.

Figures 3 and 4 show the results corresponding to the SDS-PAGE of the supernatants from the last point of the astringency assays using ovalbumin or whole salivary proteins solutions plus tannic acid, respectively. In the last stage of these analyses, both protein models are in clear excess compared to the tannic acid solutions. In those conditions, all the tannic acid is precipitated thus allowing us to determine the proteins remaining in the supernatant.

In Figure 3, a single band is detected in all the experimental lines corresponding to the molecular weight of Ovalbumin (45 kDa) (Li-Chan & Nakai, 1989).

In Figure 4, several bands are detected. The literature has described the following molecular weights, obtained using SDS-PAGE, for the different salivary proteins. Mucins from 100 to 200 kDa (Banderas- Tarabay, Zacarias D'oleire, Garduño-Estrada, Aceves Luna & González Begné, 2002); Lactoferrin about 80 kDa (Beeley et al., 1991, Beeley, Newman, Wilson & Shimmin, 1996 ; Schwartz et al., 1995); Basic Glycosilated PRP from 69 to 60 kDa (Beeley et al., 1991, 1996 ; Schwartz et al., 1995; Carpenter, Proctor, Pankhurst, Linden, Shori & Zhang, 1996),  $\alpha$ - Amylases from 62 to 59 kDa (Beeley et al., 1991, 1996; Hirtz et al., 2005), Basic PRPs (b1 and b2) among 43-37 kDa; Acidic PRP from 31- to 27kDa and Basic PRPs (IB1-IB4) from 20-14 kDa (Beeley et al., 1991, 1996; Schwartz et al., 1992). According to these data we can identify 5 bands corresponding to Mucine/Lactoferrin around the 97.4 kDa molecular weight marker, Basic Glycosilated PRP/ $\alpha$ -Amilase around the 66.2 kDa molecular weight marker, the Basic PRP (b1 and b2) slightly below the 45.0 kDa molecular weight marker, the Acid PRP around the 31.0 kDa molecular weight marker, and finally the Basic PRP (IB1-IB4) around the 14.4 kDa molecular weight marker.

Figures 3 and 4 show that the intensity of all the protein bands diminishes as the concentration of tannic acid increases. The quantification of the intensity of the bands corresponding to the ovalbumin and salivary proteins is shown in Table 2. This table also shows the correlation coefficients and p values corresponding to the statistic comparison between ovalbumin behaviour and salivary proteins.

Whole PRPs have been described as representing around the 70 % of salivary proteins (de Freitas & Mateus, 2001b). Our results indicate that the band corresponding to the ensemble of Basic Glycosilated PRP and  $\alpha$ -Amylase represent more than 50 % of the saliva proteins and that the remaining the salivary proteins are present in a lesser concentrations. Other authors have found similar results (Beeley et al., 1991; Gambuti et al., 2005, Walz et al., 2006).

In general terms, the concentration of all proteins diminished when the concentration of tannic acid increased. However, ovalbumin behaved differently from whole salivary proteins. Thus, ovalbumin concentration diminishes more quickly than total salivary protein concentration. This data confirms that ovalbumin presents a higher affinity for tannic acid than whole salivary proteins at the same protein concentrations, as suggested above. Despite this different behaviour, there is a significant correlation between ovalbumin and whole salivary proteins. These data would confirm again that both protein models react in a similar way, although they present different affinities towards tannic acid.

All proteins from saliva diminish in concentration when tannic acid is added to the medium, confirming that they are all reactive towards tannic acid (Lu & Bennick, 1998; Gambuti et al, 2005). Moreover, all the salivary proteins corresponding to the five detected bands present significant correlation coefficients versus ovalbumin.

Table 3 shows the statistic correlation coefficients corresponding to the astringency assay using both protein models and the corresponding protein values obtained by SDS-PAGE. In every case, the correlation coefficients are very significant. These data would indicate that the use of either protein model, ovalbumin or whole salivary proteins, for the determination of astringency would be equally valid in spite of their different affinities towards tannic acid.

Obviously, wines are much more complex than a tannic acid solution. Red wine contains a lot of phenolic compounds that can react with salivary proteins and produce the sensation of astringency (Vidal, Francis, Williams, Kwiatkowski, Gawel, Cheynier, & Waters, 2004). For that reason, a comparative determination of the astringency of twelve red wines was conducted using the ovalbumin method (Llaudy et al., 2004) and similar concentrations of whole salivary proteins as a precipitation agent.

Table 4 shows the astringency of these wines using both protein models and the statistical comparison between them. In general, the astringencies obtained using whole salivary proteins as a precipitation agent produced greater values than those obtained using ovalbumin. The differences between both methods oscillated between 1 and 32 % depending on the wine, and the arithmetic average of the twelve wines was 15 %. However, in 10 of the 12 wines, the results were so similar that there were

no significant differences, which would indicate that the results obtained by means of the use of ovalbumin do not differ excessively from those obtained using whole salivary proteins.

These results seem to indicate that ovalbumin is a good model to use as a precipitating agent in order to measure red wine astringency. These results would confirm the validity of the method we had previously proposed for the objective determination of astringency (Llaudy et al., 2004). Ovalbumin has the advantage of being easily available. On the contrary, whole salivary proteins are difficult to collect in large enough quantity, require long processing times and vary in composition depending on numerous factors (Guinard, Zoumas-Morse & Walchak, 1998; Gawel et al., 2001; Witmarth et al., 2004).

## 4. Conclusions

This study indicates that the use ovalbumin or whole salivary proteins as precipitating agents for the objective determination of wine astringency are equally valid in spite of their different affinities towards tannic acid. The use of both protein models for the determination of the astringency of different wines gave similar results in most cases (83 %), which would confirm the validity of our previously proposed method for the objective determination of astringency.

*Acknowledgements* We thank Centro de Investigación Científica y Tecnológica (AGL 2001-0716 and AGL 2004-02309) and the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya for financial support.

## 5. References

- Asano, K., Shinagawa, K., Hashimoto, N. (1982) Characterization of haze forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *Journal of the American Society Brewing Chemists*, 40, 147-154.
- Asquith, T.N y Butler, L.G. (1985) Use of dye labelled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *Journal of Chemical Ecology*, 11, 1535- 1544.
- ATSM. (1989) Standard Definitions of terms relating to sensory evaluation of materials and products. *Annual Book of Standards American Society of testing and materials*. Philadelphia. PA. 2
- Bacon, J.R., Rhodes, M.J. (1998) Development of a competition assay for the evaluation of the binding of human parotid salivary proteins to dietary complex phenols and tannins using a peroxidase labelled tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5083- 5088.
- Bacon, J.R., Rhodes, M.J. (2000) Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 838-843.
- Banderas-Tarabay, J.A., Zacarias D'oleire, I.G., Garduño-Estrada, R., Aceves Luna, E., González Begné, M. (2002) Electrophoresis analysis of whole saliva and prevalence of dental caries. A study in Mexican dental student. *Archives of Medical Research*, 33, 499- 505.
- Bate-Smith, E.C. (1954) Flavonoid compounds in foods. *Advances in Food Research*, 5, 261-300.
- Bate-Smith, E.C. (1973) Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochemistry*, 12, 907- 912.
- Baxter, N.J., Lilley, T.H., Haslam, E., Williamson, M.P. (1997) Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 36 (18), 5566-5577.
- Beeley, J. A., (1993) Fascinating families of proteins: electrophoresis of human saliva. *Biochemical Society Transactions*, 21, 133- 138.
- Beeley, J.A., Sweeney, D., Lindsay, J.C.B., Buchana, M.L., Sarna, L., Khoo, K. (1991) Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human parotid salivary proteins. *Electrophoresis*, 12, 1032- 1041.
- Beeley, J., Newman, F., Wilson, P., Shimmin, I (1996) Sodium Dodecyl Sulphate polyacrylamide gel electrophoresis of human salivary protein: Comparison of dansylation, Coomassie Blue R-250 and silver detection methods. *Electrophoresis*, 17, 505- 506.

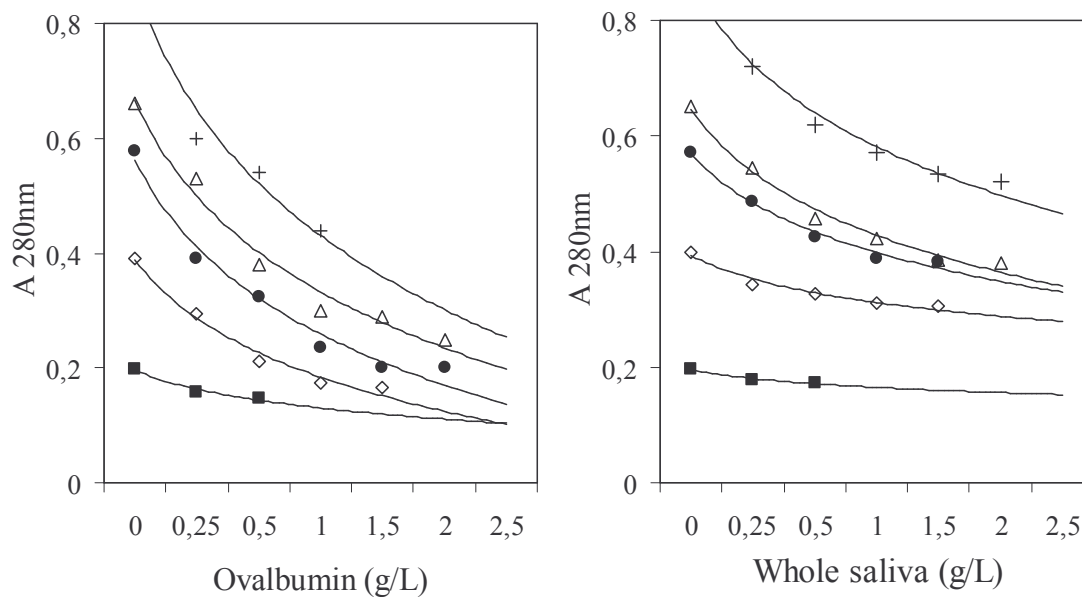
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 346-352.
- Canals, R., Llaudy, M.C., Valls, J., Canals, J.M., Zamora, F. (2005) Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seed of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4019- 4025.
- Carpenter G.H., Proctor G., Pankhurst C. L., Linden R. W., Shori D.K., Zhang X.S. (1996) Glycoproteins in human parotid saliva assessed by lectin probes after resolution by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 17, 91- 97.
- Carvalho, E., Mateus, N., de Freitas, V. (2004) Flow nephelometric analysis of protein- tannin interactions. *Analytical Chemical Acta*, 513, 97- 101.
- Cliff, M., Brau, N., King, M.C., Mazza, G. (2002) Development of predictive models for astringency from anthocyanin, phenolic and color analyses of british Columbia red wines. *Journal international des Sciences de la Vigne et du Vin*, 32, 21- 30.
- Condinelli, N., Dinnella, C., Cerone, A., Monteleone, E., Bertuccioli, M. (2005) Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Quality and Preferences*, doi:10.1016/j.foodqual.2005.04.009
- de Freitas, V., Mateus, N. (2001) Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 940-945. (a)
- de Freitas, V., Mateus, N. (2001) Nephelometric study of salivary protein- tannin aggregates. *Journal Sciences Food Agriculture.*, 82, 113- 119. (b)
- Edelman, A. y Lendl, B. (2002) Toward the optical tongue: flow through sensing of tannin – protein interactions based on FTIR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 14741- 14747.
- Gambutì, A., Rinaldi, A., Pessina, R., Moio, L. (2005) Evaluation of aglicano grape skin and seed polyphenols astringency by SDS-Page electrophoresis of salivary proteins after binding reaction. *Food Chemistry*, doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.038 (article in press)
- Gawel, R. (1998) Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4, 74-95.
- Gawel, R., Iland, E.G., Francis, I.L. (2001) Characterizing the astringency of red wine: a case study. *Food Quality and Preferences*, 12, 83-94.
- Glories, Y. (1984) La couleur des vins rouges. 2ème partie Mesure, origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne et du Vin.*, 18, 253-271.
- Green, B.G. (1993) Oral astringency: A tactile component of flavor. *Acta Psychologica*, 84, 119- 125.
- Guinard, J.X, Zoumas-Morse, C., Walchak, C. (1998) Relation between parotid saliva flow and composition and the perception of gustatory and trigeminal stimuli in foods. *Physiology & Behavior*, 63 (1), 109- 118.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G. (1978) Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 809-812.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G. (1980) Determination of protein in tannin-protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 944-947.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G. (1981) The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 4494-4497.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G. (1989) Choosing appropriated methods and standards for assaying tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 15 (6), 1795- 1810.
- Hart, M., Thomas, L.R., Dixon, S.E., Newport, G., Agabian, N., Prakobphol, A., Witkowska, E., Fisher, S.J. (2005) Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS PAGE, Ultrafiltration, HPLC and mass spectrometry. *Biochemistry*, 44, 2885- 2899.
- Haslam, E. (1974) Polyphenols- Protein interactions. *Biochemistry Journal*, 139, 285- 288.
- Henson, L. G., Niemeyer, L., Ansong, G., Forkner, R., Makkar, H.P.S., Hagerman, E.E. (2004) A modified method for determining protein binding capacity of plant polyphenolics using radiolabelled protein. *Phytochemical Analysis*, 15 (3), 159-163.
- Herald, T. & Smith, D. (1992) Heat-Induced Changes in the Secondary Structure of Hen Egg S- Ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1737-1740.
- Hirtz C., Chevalier F., Centeno D., Rofidal V., Egea J.C, I Rossignol M., Sommerer N., Deville de Périère, D. (2005) MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics*, 5 (17), 4597-4607.
- Horne, J., Hayes, J., Lawless, T. (2004) Turbidity as a measure of salivary protein reaction with astringent substances. *Chemical Senses*, 27, 653-659.

- Isemura, T., Asakura, J., Shibata, S., Isemura, S., Saitoh, E., Sanada, K. Conformational study of the salivary proline-rich polypeptides. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1983, 21, 281–287.
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, P.A., Williamson, M.P. (2004) Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules*, 5, 942- 949.
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford M.N. (1997) Evaluation of bitterness and astringency of (+) catechin and (-) epicatechin in red wine and in model solutions. *Journal of Sensory Studies*, 12, 25-37.
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M.N. (2000) Interaction of (+) catechin, (-) epicatechin, procyanidin B2 and procyanidin C1 with pooled human saliva in vitro. *Journal of the Sciences Food and Agriculture*, 81, 261- 268.
- Kauffman, D.L., Hoffman, T., Bennick, A., Keller, P.J. (1986) Basic proline-rich proteins from human parotid saliva: complete covalent structures of proteins IB-1 and IB-6. *Biochemistry*, 25, 2387–2392.
- Kawamoto, H., Nakatsubo, F., Murakami, K. (1995) Quantitative determination of tannin and protein precipitates by high performance liquid chromatography. *Phytochemistry*, 40 (5), 1503- 1505.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage. *Nature*, 227, 680- 685.
- Levine M, Keller PJ (1977) The isolation of some basic proline-rich proteins from human parotid saliva. *Archives of Oral Biology*, 22, 37–41.
- Li- Chan, E., Nakai, S. Biochemical basis for the properties of egg white. (1989) *Crit Rev. Poult Biol.*, 21- 57.
- Lu, Y., Bennick, A. (1998) Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology*, 43, 717–728.
- Luck, G., Liao, H., Murray, N.J., Grimmer, H.R., Warminski, E.E., Williamson, M.P. (1994) Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, 37, 357–371.
- Llaudy, M.C., Canals, R., Canals, J.M., Rozès, N., Arola, L. and Zamora, F. (2004) New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 742-746.
- Llaudy, M.C., Canals, R., Gonzalez-Manzano, S., Canals, J.M., Santos-Buelga, C., Zamora, F. (2006) Influence of Micro-Oxygenation Treatment before Oak Aging on Phenolic Compounds Composition, Astringency, and Color of Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4246-4252
- Mateus, N., Carvalho, E., Luis, C., de Freitas, V. (2004) Influence of tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analytical Chimical Acta*, 513, 135-140.
- Mateus, N., Oliveira, J., Pissarra, J., González- Paramás, A.M., Rivas- Gonzalo, J.C., Santos- Buelga, C., Silva, A.M.S., Rivas- Gonzalo, J.C., de Freitas, V. (2005) A new vinylpyranoanthocyanin pigment occurring in aged red wines. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.051
- Messana, I., Cabras, T., Inzitari, R., Lupi, A., Zuppi, C., Olmi, CH., Fadda, M.B., Cordano, M., Giardina, B., Castagnola, M. (2004) Characterization of the human salivary basic Proline Rich Protein complex by a proteomic Approach. *Journal of Proteome Research*, 3, 792- 800.
- Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. (2005) Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45 (2), 85- 118.
- Monteleone, E., Condelli, N., Dinnella, C., Beruccioli, M. (2006) Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preferences*, 17, 96- 107.
- Naish, M, Clifford, M., Birch, G.G. (1998) Effect of Gelatin (a Model for Salivary PRP) on the Sensory Astringency of 5-O-caffeoylquinic Acid and Tannic Acid. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855, 823- 827.
- Naurato, N., Wong, P., Lu, Y., Wroblewski, K., Bennick, A. (1999) Interaction of tannin with human salivary histatins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2229–2234.
- Poncet- Legrand, C., Edelman, A., Putuax, J.L., Cartalade, D., Sarni- Manchado, P., Vernhet, A. (2005) Poly(L-proline) interactions with flavanol-3-ols units: influence of molecular structure and polyphenol/ protein ratio. *Food Hydrocolloids*, doi:10.1016/j.foodhyd.2005.06.009 (article in press)
- Ratnavathi, C.V. Sashidhar, R.B. (1998) Microassay for quantification of protein precipitable polyphenols: use of bovine serum albumin-benzidine conjugate as protein probe. *Food Chemistry*, 61 (3), 373- 380.
- Rodríguez, M., Lezáun, J., Canals, R. Llaudy, M.C., Canals, J.M., Zamora, F. (2005) Influence of the presence of the lees during oak ageing on colour and phenolic compounds composition of red wine. *Food Science and Technology International*, 11(4), 289-296.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Moutounet, M. (1999) Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 42–47.
- Sas, R., dawes, C. (1997) The intra-oral distribution of unstimulated and chewing-gum-stimulated parotid saliva



- Schwartz, S.S., Zhu, W.X.,m Sreebny, L.M. (1995) Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis of human whole saliva. *Archives of Oral Biology*, 40 (10), 949- 958.
- Siebert, K.J., Lynn, P.Y. (2003) Effect of alcohol and pH on protein-polyphenol haze intensity and particle size. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 61(2), 88- 98.
- Steiner, J.C., Keller, P. J. (1968) An electrophoretic analysis of the protein components of human parotid saliva. *Archives of Oral Biology*, 13, 1213- 1221.
- Valentova, H., Skrovankova, S., Panovska, Z., Pokorný, J. (2002) Time-intensity studies of astringent taste. *Food Chemistry*, 78, 29-37.
- Vidal, S. Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., Cheynier, V. (2004) Use an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth- feel perception. *Food Quality and Preferences*, 209- 217.
- Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E. (2004) Taste and mouth-feel properties of different types of tannin like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytical Chimical Acta*, 513, 57- 65.
- Walz, A., Stuhler K., Wattenberg A., Hawranke E., Meyer, H.E., Schmalz, G., Bluggel, M., Ruhl, S. (2006) Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 6 (5), 1631-1639.
- Wilmarth, P.A., Riviere, M.A., Rustvold, D.L., Lauten, J.D., Madden, T.E., David, L. (2004) Two dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *Journal of Proteome Research*, 3, 1017- 1023.
- Yan, Q., Bennick, A. (1995) Identification of histatins as tannin-binding proteins. *Biochemical Journal*, 311, 341– 347.

Figure 1. Graphs showing absorbance at 280 nm ovalbumin/whole salivary proteins in different tannic acid solutions.



Tannic Acid Concentrations: 0.2 g/L (■) 0.4 g/L (◇) 0.6 g/L (●) 0.8 g/L (△) 1.0 g/L (+)

Figure 2. Linear Behaviour of logarithmic equation slopes versus tannic acid standard solution concentration.

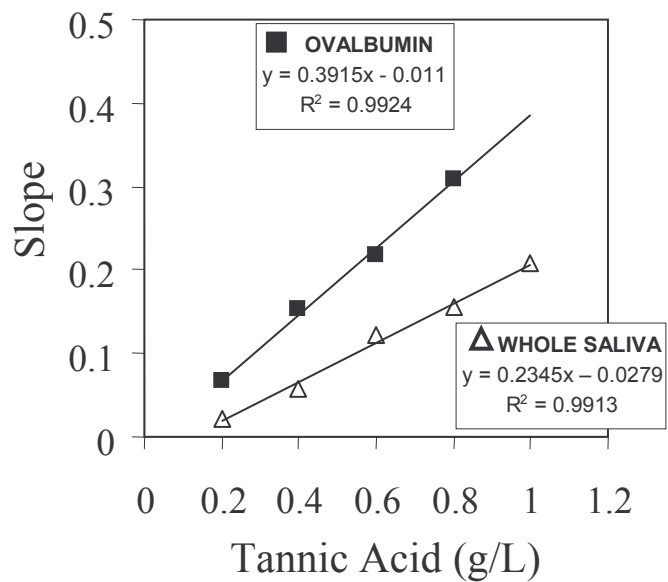


Figure 3. . SDS PAGE of supernatant after the reaction of ovalbumin with increasing tannic acid concentrations.

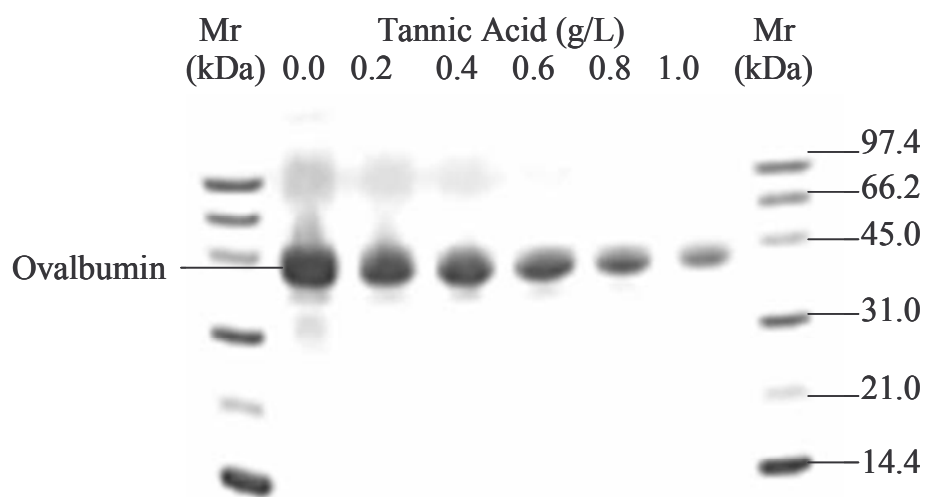


Figure 4. PAGE of supernatants after the reaction of whole saliva with increasing tannic acid concentration.

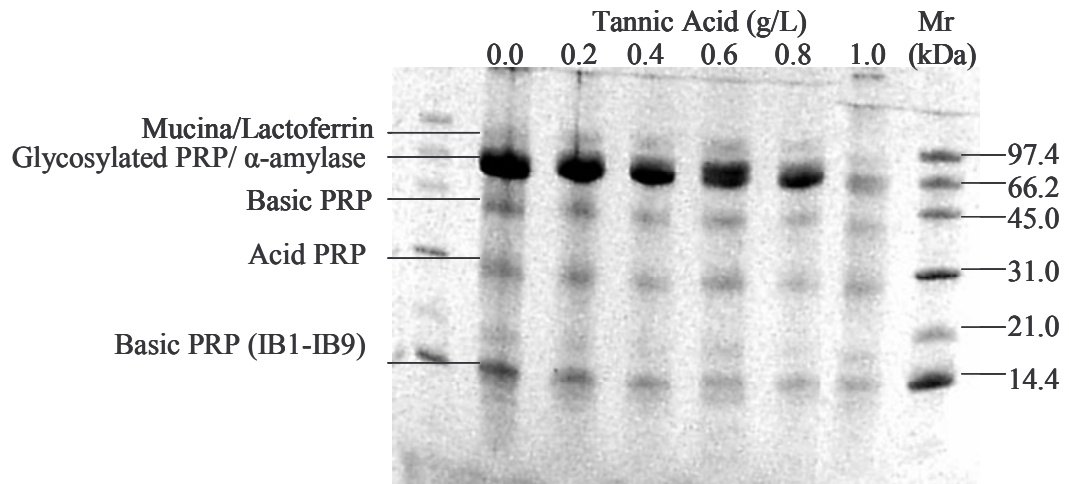


Table 1. Logarithmic equations of the curves from the graphs of absorbance at 280 nm versus ovalbumin and whole salivary proteins at different tannic acid solutions.

[Tannic Acid]	Symbol	$A_{280} = a \times \text{Log} [\text{ovalbumin}] + b$			$A_{280} = a \times \text{Log} [\text{whole saliva}] + b$		
		a	b	$r^2$	a	b	$r^2$
0.2 g/L	■	0.0475	0.0875	0.9998	0.0221	0.1956	0.9926
0.4 g/L	◇	0.1525	0.1508	0.9762	0.0587	0.3932	0.9747
0.6 g/L	●	0.2180	0.2017	0.9668	0.1234	0.5695	0.9871
0.8 g/L	△	0.3081	0.3042	0.9664	0.1579	0.6470	0.9871
1.0 g/L	+	0.3167	0.8691	0.9701	0.2063	0.8672	0.9884

Table 2. Proteins quantities by SDS PAGE and correlations among the salivary proteins and Ovalbumin.

	Tannic Acid							$r^2$	p
	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,0		
Mucin and Lactoferrin ( $\mu\text{g}$ )	1.94	1.79	0.87	1.00	0.48	0.21	0.85	0.010	
Glycosylated PRP and $\alpha$ amylase ( $\mu\text{g}$ )	13.30	11.77	9.01	7.08	6.23	2.49	0.91	0.004	
Basic PRP ( $\mu\text{g}$ )	2.96	2.41	1.59	1.19	0.84	0.55	0.94	0.001	
Acid PRP ( $\mu\text{g}$ )	3.48	1.94	1.39	1.59	0.92	0.80	0.92	0.003	
Basic PRP (IB 1- IB 9) ( $\mu\text{g}$ )	3.31	2.75	1.92	1.46	0.91	0.78	0.93	0.002	
TOTAL( $\mu\text{g}$ )	25.00	20.67	14.79	12.31	9.38	4.83	0.95	0.001	
Ovalbumin ( $\mu\text{g}$ )	25.00	15.13	13.37	9.53	5.88	2.31			

The coefficient of determination ( $r^2$ ) and p values shows the significance of the correlation ( $p < 0.05$ )

Table 3. Correlations among astringency levels assayed by whole saliva and ovalbumin by precipitation methodology and by SDS PAGE.

	PROTEINS by SDS PAGE						
	Mucins Lactoferrin	Glycosylated PRP $\alpha$ amylase	Basic PRP	Acid PRPs	Basic PRP (IB1- IB9)	Saliva Total	Ovalbumin
Astringency by Whole Saliva	$r^2=0.87$ p=0.006	$r^2=0.97$ p=0.000	$r^2=0.92$ p=0.002	$r^2=0.68$ p=0.042	$r^2=0.93$ p=0.002	$r^2=0.95$ p=0.001	$r^2=0.89$ p=0.005
Astringency by Ovalbumin	$r^2=0.93$ p=0.002	$r^2=0.97$ p=0.000	$r^2=0.96$ p=0.001	$r^2=0.79$ p=0.018	$r^2=0.97$ p=0.000	$r^2=0.98$ p=0.000	$r^2=0.94$ p=0.001

The coefficient of determination ( $r^2$ ) and p values shows the significance of the correlation ( $p<0.05$ )



Table 4. Comparative of astringency determination using ovalbumin and whole saliva as protein models in twelve wines.

WINES	Astringency (g/L Tannic Acid)	
	With Ovalbumin	With Whole Saliva
1	0.314 ± 0.049 a	0.345 ± 0.012 a
2	0.539 ± 0.041 a	0.699 ± 0.079 b
3	0.439 ± 0.051 a	0.460 ± 0.060 a
4	0.360 ± 0.031 a	0.405 ± 0.056 a
5	0.169 ± 0.030 a	0.213 ± 0.015 a
6	0.197 ± 0.046 a	0.234 ± 0.022 a
7	0.312 ± 0.051 a	0.460 ± 0.033 b
8	0.409 ± 0.031 a	0.490 ± 0.093 a
9	0.621 ± 0.049 a	0.626 ± 0.023 a
10	0.255 ± 0.031 a	0.290 ± 0.010 a
11	0.347 ± 0.041 a	0.400 ± 0.099 a
12	0.207 ± 0.009 a	0.255 ± 0.050 a

All data are expressed as the average of three replicates ± standard deviation (n=3). Statistical analysis: One factor ANOVA and Scheffe's test (both, p=0.05). Different letter indicates the existence of statistically differences. The letters (a,b) are used to compare the astringency levels.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

#### **4. INFLUENCIA DE VARIACIONES EN LA COMPOSICIÓN MONOMÉRICA Y GRADO DE POLIMERIZACIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS SOBRE LA ASTRINGENCIA**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

## **4. INFLUENCIA DE VARIACIONES EN LA COMPOSICIÓN MONOMÉRICA Y GRADO DE POLIMERIZACIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS SOBRE LA ASTRINGENCIA**

### **Introducción**

La sensación de astringencia que percibimos al degustar un vino tinto viene condicionada por la composición monomérica y el tamaño de las proantocianidinas presentes en del mismo (Sarni- Manchado y col., 1999).

Las proantocianidinas del vino provienen de diferentes partes de la uva. Las semillas contienen la (+) catequina, (-) epicatequina y la (-) epicatequina- 3- galato (Prieur y col., 1994; Kennedy y col., 2000). Por su parte, las pieles contienen mucha menor cantidad (-) epicatequina- 3- galato pero contienen (-) epigalocatequina (Souquet y col., 1996; González- Manzano y col., 2004). Los raspones contienen (+) catequina, (-) epicatequina, (-) epicatequina- 3- galato y (-) epigalocatequina (Souquet y col., 2000; Vivas y col., 2004). El vino también puede presentar taninos hidrolizables si ha envejecido en barrica de roble (Cheynier y col., 2000).

Durante el proceso de vinificación y crianza del vino tinto, tienen lugar reacciones de combinación y polimerización que a nivel sensorial producen variaciones en la astringencia, y también, contribuyen a la estabilidad del color (Haslam, 1980). Parte de estas reacciones están mediatizadas por el etanal que se produce durante la fermentación como parte del metabolismo de las levaduras (Romano y col., 1994) o al oxidarse el etanol en presencia de cationes de hierro o cobre en medio ácido (Wildenradt y Singleton, 1974). El etanal permite la unión colateral de moléculas de flavanol, mediante puentes etilo. A su vez estos complejos flavanol- etilo-flavanol, pueden romperse dejando libres moléculas flavanol-etilo que volverán a reaccionar ya sea con moléculas de antocianos u otras moléculas de flavanol (Fulcran y col., 1996; Escribano- Bailón y col., 2001). Estos mecanismos de ruptura y recombinación llevarán a la formación de polímeros que, en principio, se describen como responsables del incremento de la sensación de astringencia. Sin embargo, algunos autores sugieren que podrían tener lugar reacciones entre los polímeros de uniones colaterales que formen macromoléculas que, por impedimentos estéricos, no permitan la reacción de las proteínas con los grupos OH del polímero y, en este caso; disminuirá la astringencia (Galvin, 1993; Saucier y col., 1997; Vidal y col., 2002; Poncet-Legrand y col., 2003). A medida que los polímeros sean más grandes, existe también, la tendencia a la precipitación. Otro aspecto a tener en cuenta es la presencia de unidades galoiladas (dada por la esterificación del ácido gálico a una molécula de epicatequina) en la molécula de proantocianidina. La presencia de un mayor número de anillos aromáticos en la molécula de proantocianidina incrementa los sitios de unión con las proteínas, lo cual contribuirá al aumento de la astringencia (Cheynier y col., 1997). Por tanto, la astringencia irá incrementándose con el grado de polimerización y la cantidad de unidades galoiladas presentes en las proantocianidinas. (Vivas, y col., 1996; Herderich & Smith, 2005).

Muchos estudios de interacciones tanino-proteínas utilizan proteínas modelos como gelatina, BSA o poli L-prolina. En todos ellos la proteína modelo actúa como agente precipitante, de modo similar a las proteínas de la saliva. Pero, no todas las

proteínas de la saliva presentan igual afinidad por las proantocianidinas, siendo las Proteínas Ricas en Prolinas –PRP– (Bate-Smith, 1954; Haslam, 1981) y las Histatinas (Yan y Bennick, 1995) las más reactivas. Por otra parte estas proteínas presentan afinidad diferentes en función de la composición específica de cada proantocianidina.

El objetivo de este experimento fue estudiar la influencia en la composición de las proantocianidinas y del grado de polimerización sobre la astringencia empleando la metodología puesta a punto por nuestro grupo de trabajo (Llaudy y col., 2004). Al mismo tiempo, se han comparado los resultados utilizando la ovoalbúmina como proteína modelo con saliva total obtenida mediante estimulación.

Para ello utilizamos extractos de (-)-epicatequina –E–, (+)-catequina –C–, (-)-galato de epicatequina–ECG– y (-)-epigallocatequina –EGC–; a los cuales se les añadió etanal diariamente para obtener diferentes grados de polimerización. El incremento del grado de polimerización se siguió mediante el Índice DMACH.

Los sobrenadantes de las reacciones de saliva entera con las diferentes proantocianidinas se analizaron mediante electroforesis en geles SDS poliacrilamida, con el objeto de visualizar las proteínas por separado y establecer correlación entre el comportamiento de cada proteína de la saliva en particular y el resultado de la determinación de astringencia utilizando la ovoalbúmina como proteína precipitante.

## **Materiales y Métodos**

Reactivos y Soluciones:

- Soluciones de ovoalbúmina (Grado V, Sigma, España) desde 0 hasta 8 g/L en solución sintética.
- Solución sintética: 4g/L de ácido tartárico ( Panreac, España), 13,5% (95g/L) de etanol (Panreac, España) ajustado a pH 3,5 con hidróxido de sodio (Panreac, España).
- Solución 750 mM de etanal diluido en agua destilada.

Para Procesar la saliva:

- Solución EDTA (Sigma) 0,5 M en agua destilada.
- Tampón fosfato: A 1000 ml de solución 50 mM de  $K_2HPO_4$  se le añade la solución 50 mM de  $KH_2PO_4$  hasta llegar al pH 6,8.

Para determinar concentración de proteína:

- Patrones de ovoalbumina y BSA en agua destilada desde 0,025-1mg/ml.

Para técnica de electroforesis:

- Solución solubilizadora: Tampón Tris-HCl 0,125 mM , 2%  $\beta$ -mercaptoetanol, 4 % SDS, 20% v/v glicerol, 0,02% de azul de bromofenol. pH 6,8.
- PhastGel Homogeneous-20 (rango de separación de 2- 150 kD, cod. 17-0624-01 Amersham, España)
- PhastGel Buffer Strips - SDS (0.112 M acetate, 0.112 M Tris, pH 6.4) (cod. 17-0516-01, Amersham, España)
- Marcadores de proteínas de bajo peso molecular para SDS-PAGE. (número de catálogo 161-0304, Biorad, california, USA)
- Solución fijadora de tinción : Etanol absoluto ( Panreac), ácido acético (Panreac), agua: 40:10:50 (v:v)
- Solución de Azul de Coomassie: 0,2 g de Azul Coomassie (Coomassie™ Blue R-250, Amersham, España) diluir en solución metanol, agua, ácido acético: 40:60:10 (v:v)
- Solución de desteñido: Acido acético al 10%

- Soluciones de proantocianidinas y Polimerización

1,5 mL de soluciones 10 mM de (-)-epicatequina –E–, (+)-catequina –C–, (-)-galato de epicatequina–ECG– y (-)-epigallocatequina –EGC– (Extrasynthese, Francia) fueron distribuidas por triplicado en viales ambar (Agilent, 5181-3376), cerrándolos herméticamente (tapón cápsula: Agilent 5181- 1211) y manteniéndolos a temperatura de 20°C. Las muestras fueron analizadas diariamente comenzando por el día 0 (antes de adicionar el etanal). A las muestras se les adicionó cada día 10 $\mu$ L de la solución 750mM de etanal\*\*. Las muestras sustraídas para analizar se enrasaban al volumen final de experimentación con solución sintética.

\*\* Las dosis de etanal se calcularon a partir de ensayos preliminares buscando que la polimerización se pudiese medir diariamente (0,36 mg/L diarios de etanal añadido). Para ello nos basamos en la cinética de reacción de la catequina descrita en los trabajos de Saucier y col. (1995, 1997).

- Colección de saliva

La saliva se recogió en un vaso de precipitado refrigerado en un baño de hielo. El saliveo se estimulaba masticando parafilm durante 2 minutos (Schwartz y col., 1995). Diariamente, las muestras recogidas se congelaban a –20°C.

El conjunto de las muestras de saliva congeladas se descongelaba y se procesaba cuando llegábamos a tener volúmenes de 100 mL. El proceso se realizaba siempre a 4°C (Steiner y Keller, 1968; Levine y Kaller, 1977):

- Se homogenizaba
- Se centrifugaba a 11700 g durante 10 minutos
- Se añadía EDTA (Sigma) hasta una concentración de 0,5 mM
- Se dializaba contra tampón fosfato.
- Para determinar la concentración de proteínas total de la saliva, se empleó la el Kit Bio-Rad Protein assay (Bradford, 1976). En este caso utilizamos la recta patrón de ovoalbúmina por las características de nuestro trabajo. Se

realizaron los Ensayos Standards (0,125-1,5 mg/mL) según el manual de Bio-Rad (tech note 1069).

- Las muestras eran liofilizadas y mantenidas a -20°C hasta el día de experimentación.
- Índice DMACH

La estimación de la polimerización de proantocianidinas se realizó diariamente, mediante la metodología del DMACH descrita y modificada por Nagel y Glories, (1991).

- Astringencia

La técnica de astringencia se realizó por triplicado según la metodología descrita en el apartado 1 de este capítulo, (Llaudy y col., 2004). Del mismo modo se realizó la metodología utilizando concentraciones equivalentes de saliva entera como proteína precipitante.

- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Doudecil Sulfato de Sodio (*SDS- PAGE*)
  - Se liofilizaron 20 µL del sobrenadante del último punto del ensayo de astringencia utilizando saliva como agente precipitante correspondientes a los días 0, 2 y 4 de experimentación.
  - Las muestras y la mezcla de los marcadores de masa molecular se disolvieron en 20 µL solución solubilizadora utilizando un vortex Reax 2000 (Heildolph). Muestras y marcadores se mantuvieron 5 minutos en baño de María a 100°C.
  - Después de colocar los geles y tampones en el equipo Phastsystem, se aplicaron las muestras y marcadores a los peines y se puso en marcha el programa para Phastsystem (Pharmacia LKB Biotechnology, Suecia) recomendado por la casa Amersham en el protocolo de técnicas de separación (SDS PAGE in Homogeneous media, Phastsystem Separation Technique File no. 111) donde:

Pasos de Separación	Voltaje	Intensidad	Potencia	Temperatura	Tiempo
Sep 3.1 El tampón llegará hasta el frente	250V	10 mA	3.0W	15°C	1 Vh
Sep 3.2 Para la aplicación de la muestra se reduce la corriente	250V	1 mA	3.0W	15°C	1 Vh
Sep 3.3 Las muestras corren a través del gel.	250V	10 mA	3.0W	15°C	99 Vh

La tinción con Azul de Coomasie:

1. Fijación: Se sumergieron los geles con solución fijadora durante 1 hora en agitación suave.
2. Tinción: Se sumergieron los geles en 5 volúmenes de colorante al menos 1 hora con agitación suave.



3. Destinción: Se sumergieron los geles en solución de desteñido y agitación, cambiando repetidas veces la solución.

\*Los mejores resultados se obtuvieron cuando se dejan las placas, después de varios lavados, en solución de desteñido durante 12 horas.

4. Se fotografía el gel y la foto se analiza utilizando el programa Quantity One Software Version 4.3.1 para PC de laboratorios Bio-Rad, donde es posible calcular la densidad. A partir de la densidad y las concentraciones de proteínas aplicadas se obtienen las cantidades de cada proteína en el gel.

- Estadística

Los datos están expresados como media y desviación standard de tres repeticiones. Las correlaciones fueron calculadas mediante el programa Statistica Statsoft (Lisboa, Portugal).

## Resultados y discusión

Las proantocianidinas de la uva y el vino presentan gran diversidad de estructura y reactividad. Además de las diferencias estructurales que encontramos en las proantocianidinas procedentes de las diferentes partes de la uva, durante el proceso de fermentación y crianza del vino se desarrollan reacciones de polimerización que permiten la formación de cadenas de flavanoles que pueden llegar a ser de gran tamaño e incluso precipitar (Peleg y col., 1999; Vidal y col., 2003).

Tabla 1. Evolución de la polimerización expresada como Índice DMACH.

Días	(-) Epicatequina	(+) Catequina	(-) Epicatequina Galato	(-) Epigalocatequina
0	190,00 ± 0,00 a, $\alpha$	185,75 ± 0,00 b, $\alpha$	126,75 ± 0,00 c, $\alpha$	173,25 ± 0,00 d, $\alpha$
1	201,63 ± 4,02 a, $\beta$	160,88 ± 0,18 b, $\beta$	114,25 ± 2,47 c, $\beta$	158,25 ± 1,77 d, $\beta$
2	164,75 ± 5,66 a, $\gamma$	136,25 ± 1,83 b, $\gamma$	92,63 ± 1,59 c, $\gamma$	129,13 ± 1,72 d, $\gamma$
3	144,38 ± 1,94 a, $\delta$	105,13 ± 0,18 b, $\delta$	71,25 ± 0,00 c, $\delta$	96,88 ± 1,94 d, $\delta$
4	87,50 ± 0,71 a, $\epsilon$	88,25 ± 1,77 a, $\epsilon$	53,75 ± 2,47 c, $\epsilon$	86,63 ± 0,53 a, $\epsilon$

Todos los resultados están expresados como media ± desviación standard (n=3). Análisis estadístico: ANOVA un solo factor y Scheffe's test (ambos, p = 0.05). Las diferencias significativas se indican con letras diferentes. Las letras (a,b,c,d) se usaron para comparar proantocianidinas. Las letras ( $\alpha,\beta,\gamma,\delta,\epsilon$ ) se usaron para comparar la polimerización entre días.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos mediante el Índice DMACH, donde se estima el aumento del grado de polimerización de las proantocianidinas. Dado que el reactivo DMACH reacciona con los extremos de los flavanoles o de los polímeros de flavanoles, este índice irá decreciendo a medida que aumenta la polimerización. Después del cuarto día de experimentación comenzaron a aparecer tonalidades amarillas y precipitado en las soluciones de ECG. Por tanto, al cuarto día se finalizó el experimento.

Como se puede comprobar, en todos los casos el índice DMACH disminuye a medida que pasan los días y se va incorporando más etanal a la mezcla de reacción. El análisis estadístico de los resultados confirma que en todos los casos hay un incremento significativo del grado de polimerización a lo largo del tiempo. El incremento de los valores diarios de polimerización se correlaciona significativamente ( $p < 0,05$ ) con el incremento de la astringencia en cada una de las proantocianidinas estudiadas.

La Tabla 2 muestra los resultados de astringencia obtenidos utilizando la ovoalbúmina como proteína precipitante, expresados como g/L de ácido tánico. En todos los casos se observa un claro incremento de la astringencia a medida que transcurren los días. Dado que de forma simultánea el índice DMACH de todas las muestras disminuye, se puede afirmar que la astringencia se incrementa al aumentar el grado de polimerización de las proantocianidinas. Esta afirmación puede corroborarse mediante análisis estadístico ya que existe un alto grado de correlación ( $p < 0,05$ ) entre el aumento de la astringencia y la disminución del índice DMACH. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores utilizando otras metodologías (Kallithraka y col., 1997, 2000; Vidal y col., 2003).

Al comparar la evolución de la astringencia de las muestras correspondientes a los diferentes monómeros, se observan comportamientos distintos. En el caso de los dos monómeros más abundantes en la uva y el vino, la catequina y la epicatequina, se observan que los polímeros de esta última presentan niveles de astringencia ligeramente superiores. Por su parte, los polímeros de ECG son claramente más astringentes, mientras que los de EGC parecen serlo algo menos.

Tabla 2. Astringencia expresada como g/L de ácido tánico empleando la ovoalbúmina como agente precipitante.

Días	(-) Epicatequina	(+) Catequina	(-) Epicatequina galato	(-) Epigalocatequina
0	0,069 ± 0,008 <i>a</i>	0,059 ± 0,004 <i>a</i>	0,066 ± 0,003 <i>a</i>	0,055 ± 0,006 <i>a</i>
1	0,088 ± 0,015 <i>a</i>	0,067 ± 0,013 <i>a</i>	0,084 ± 0,001 <i>b</i>	0,092 ± 0,005 <i>b</i>
2	0,118 ± 0,003 <i>b</i>	0,087 ± 0,010 <i>a</i>	0,146 ± 0,002 <i>c</i>	0,124 ± 0,010 <i>c</i>
3	0,294 ± 0,006 <i>c</i>	0,250 ± 0,003 <i>b</i>	0,355 ± 0,029 <i>d</i>	0,152 ± 0,005 <i>d</i>
4	0,316 ± 0,013 <i>d</i>	0,297 ± 0,009 <i>c</i>	0,444 ± 0,046 <i>e</i>	0,218 ± 0,003 <i>e</i>

Todos los datos están expresados como la media aritmética ± la desviación Standard de tres repeticiones. Análisis estadístico de ANOVA un solo factor y Scheffe (ambos para  $p = 0,005$ ). Las letras cursivas (*a, b, c, d, e*) se han utilizado para comparar la evolución de la polimerización en el tiempo.

La bibliografía describe que a igual concentración de proantocianidina la astringencia aumenta con el incremento del grado de polimerización hasta que los polímeros precipitan (Sarni-Manchado y col., 1999; Brossaud y col., 2001; Vidal y col., 2003). Las interacciones entre las proteínas y los polifenoles son mucho más fuertes a medida que el polifenol sea mayor y de estructura más compleja (Baxter y col., 1997).

La explicación a la diferencia de comportamiento de la evolución de la astringencia de los diferentes monómeros de proantocianidinas viene condicionada por la afinidad

de estos y sus respectivos polímeros con las proteínas, dependiendo del número de sitios para interactuar presentes en la molécula y de su estructura. La presencia de anillos aromáticos y grupos hidroxilos en una molécula de proantocianidina permite establecer uniones con la proteína, que dan lugar a la formación de complejos y a la precipitación. La formación de estos complejos aumenta con el grado de polimerización y el número de unidades galoiladas (Monagas y col., 2005).

En el caso de la E y la C que están ortohidroxiladas en los C-3 y C-4 del anillo B, a pesar de tener la misma masa molecular, existe una diferencia en la conformación (las soluciones de E presentan el anillo B en posición ecuatorial y las soluciones de C en posición axial) que posibilita que la E posea más afinidad con las proteínas que la C a igual concentración. Probablemente, debido a los impedimentos estéricos en la molécula de C se reduce la capacidad de unión por puentes hidrógenos comparado con la E (Kallithraka y col., 1997). Los resultados de astringencia que observamos en la E y C, así como en los polímeros obtenidos a partir de las mismas, están de acuerdo con este razonamiento y se corresponden con los obtenidos en estudios anteriores en soluciones sintéticas, agua y adición de flavanoles en vinos (Thorngate y Noble, 1995; Kallitraka y col., 1997, 2000).

La EGC es una molécula de epicatequina con el C-3 esterificado por ácido gálico (Su y Singleton, 1969). La presencia de unidades galoiladas incrementa los sitios de unión con las proteínas y por tanto la astringencia (Ricardo da Silva y col., 1991; Cheynier y col., 1997, Vidal y col., 2003). Nuestros resultados corroboran este efecto. Se plantea que los anillos pirrolidínicos de la prolina de las PRPs, que poseen estructura plana y rígida, son potenciales sitios de unión con los anillos aromáticos del polifenol, mediante interacciones de tipo hidrofóbico (Jöbstl y col., 2004).

La EGC presenta un tercer grupo hidroxilo en el C-5 (Whalley, 1962). Este tercer grupo hidroxilo permite que las uniones a las proteínas de la saliva sean algo más fuertes que en el caso de los monómeros de E y C (Kallitraka y col., 2000). En resultados obtenidos por Vidal y colaboradores (2003), mediante análisis sensorial, se aprecian variaciones en el descriptor “rugosidad en boca” ante la EGC. Nuestros resultados no indican que los polímeros de EGC presenten una mayor astringencia que los de E y/o C, sino que por el contrario parecen mostrar una menor afinidad hacia las proteínas.

Teniendo en cuenta las diferencias estructurales que encontramos en las proantocianidinas y su diferente afinidad por las proteínas, realizamos el ensayo de la astringencia utilizando saliva entera como agente precipitante. Previamente, se realizó una recta patrón de concentraciones crecientes de ácido tánico y concentraciones crecientes de saliva entera, partiendo de concentraciones similares a las de ovoalbúmina utilizadas en la metodología de determinación de astringencia. Los resultados referentes a la recta patrón se encuentran el apartado I de este capítulo.

La Tabla 3 muestra los valores de astringencia expresados como g/L de ácido tánico, utilizando saliva entera como proteína precipitante. El comportamiento de la astringencia es similar a los resultados obtenidos utilizando ovoalbúmina y acorde

con los resultados descritos en la bibliografía para cada proantocianidina, como se ha comentado en párrafos anteriores.

Tabla 3. Astringencia expresada como g/L de ácido tánico empleando la saliva como agente precipitante.

Días	(-) Epicatequina	(+) Catequina	(-) Epicatequina galato	(-) Epigallocatequina
0	0,213 ± 0,030 <i>a</i>	0,156 ± 0,022 <i>a</i>	0,538 ± 0,008 <i>a</i>	0,207 ± 0,010 <i>a</i>
1	0,266 ± 0,029 <i>a</i>	0,167 ± 0,010 <i>a</i>	0,567 ± 0,003 <i>b</i>	0,320 ± 0,007 <i>b</i>
2	0,320 ± 0,017 <i>a</i>	0,242 ± 0,000 <i>b</i>	0,657 ± 0,001 <i>c</i>	0,356 ± 0,002 <i>c</i>
3	0,492 ± 0,013 <i>b</i>	0,390 ± 0,018 <i>c</i>	0,897 ± 0,007 <i>d</i>	0,412 ± 0,001 <i>d</i>
4	0,582 ± 0,010 <i>c</i>	0,507 ± 0,005 <i>d</i>	1,101 ± 0,013 <i>e</i>	0,438 ± 0,017 <i>e</i>

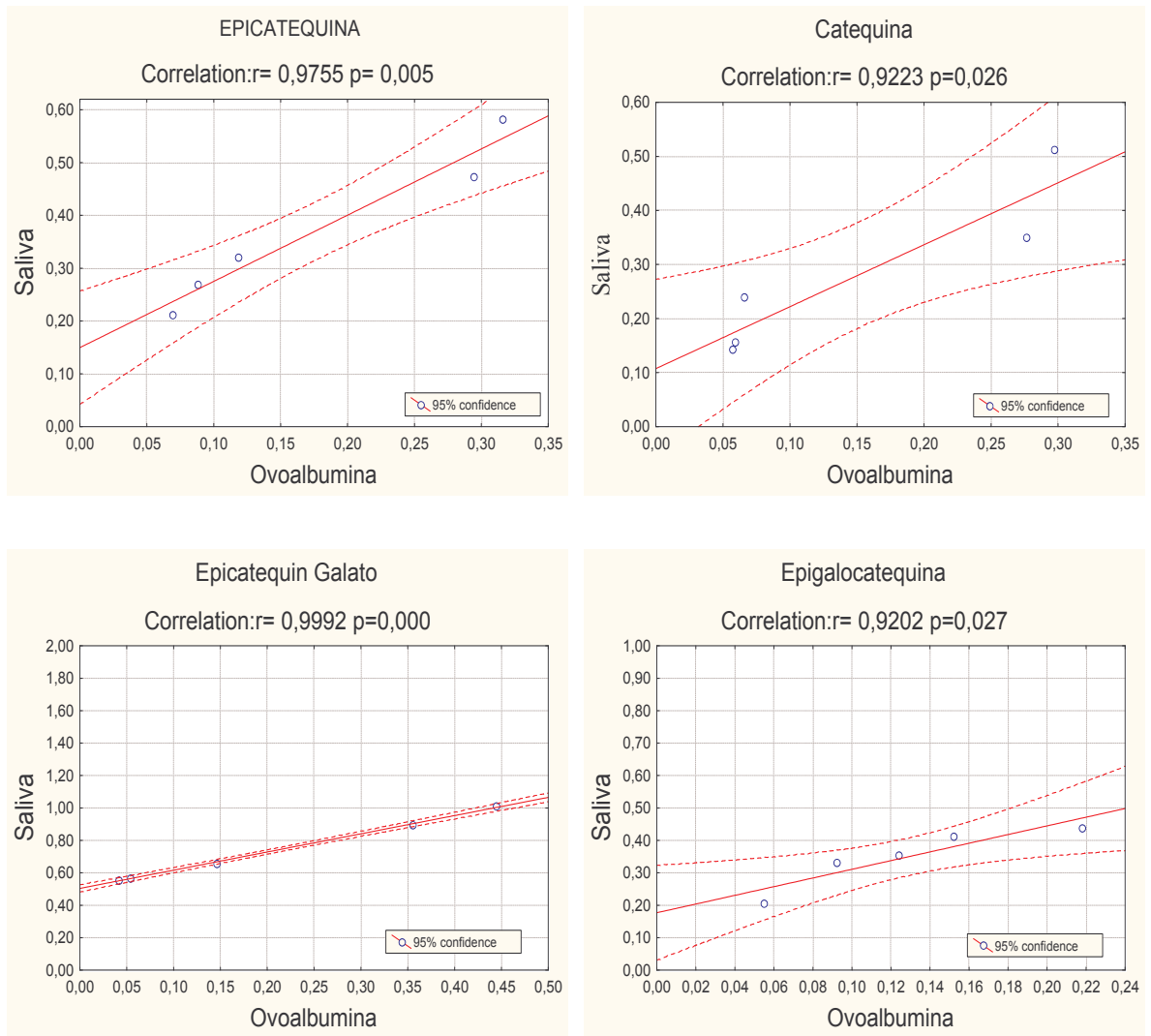
Todos los datos están expresados como la media aritmética ± la desviación Standard de tres repeticiones. Análisis estadístico de ANOVA un solo factor y Scheffe (ambos para p=0,005). Las letras cursivas (*a,b,c,d,e*) se han utilizado para comparar la evolución de la polimerización en el tiempo.

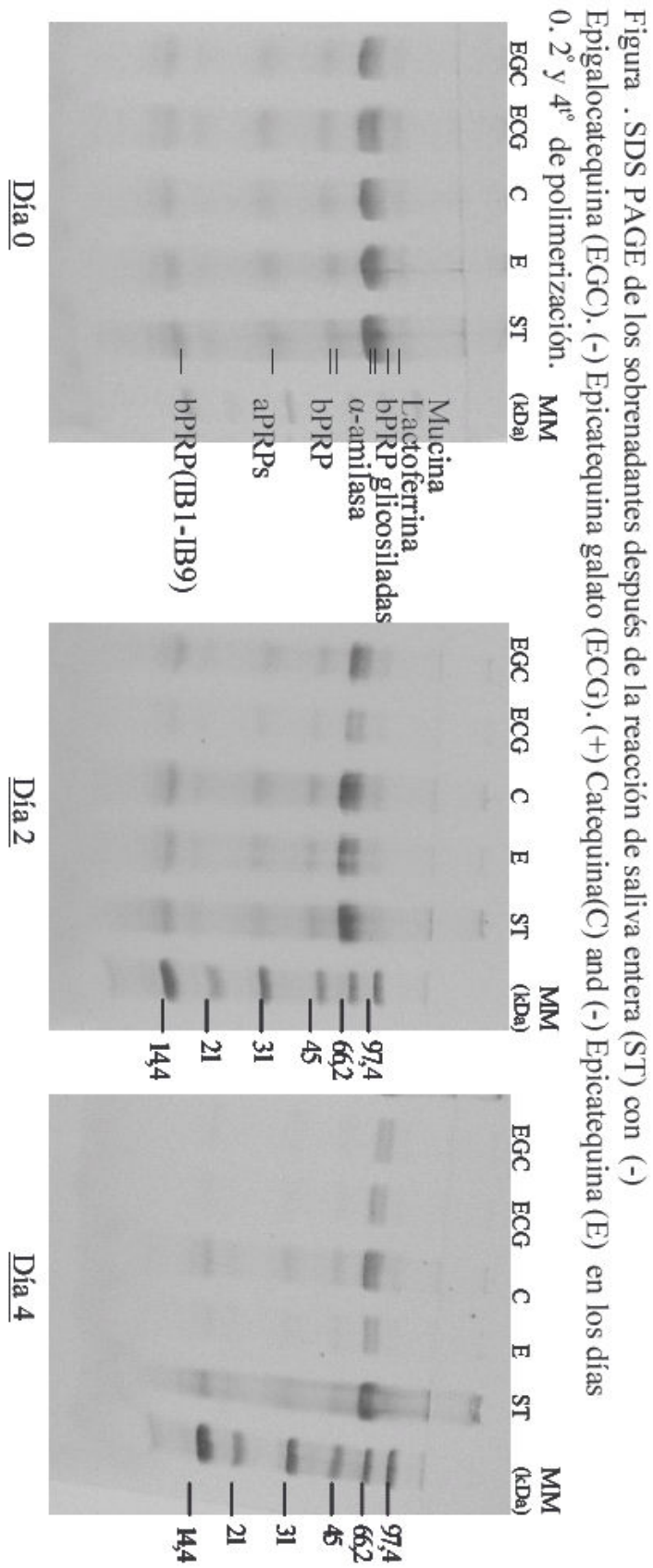
Los mayores valores de astringencia se aprecian en las soluciones de ECG, mostrándose un incremento de la astringencia más lento en las soluciones de E y C. En todos los casos se correlaciona significativamente ( $p < 0,05$ ) el incremento de la astringencia con el incremento de la polimerización. Sin embargo, estos resultados expresan valores de astringencia mayores a los obtenidos cuando utilizamos la ovoalbúmina como agente precipitante.

La Figura 1 muestra las correlaciones entre los valores de astringencia obtenidos utilizando la ovoalbúmina y la saliva entera. Los coeficientes de correlación de las cuatro proantocianidinas nos indican que existe una relación lineal en las variaciones de la astringencia calculada a partir de la ovoalbúmina, con la calculada a partir de la saliva entera. En todos los casos este comportamiento muestra correlaciones significativas ( $p < 0,05$ ).

Entre las posibles explicaciones de que, a partir de la precipitación usando ovoalbúmina, se obtengan valores inferiores de astringencia que usando saliva, pueden estar la ya mencionada diferencia estructural de las proantocianidinas usadas en el experimento, que conlleva a diferentes afinidades en las uniones proantocianidina-proteínas. Por otra parte, la conformación globular de la ovoalbúmina difiere mucho de la conformación abierta de las proteínas ricas en prolina (PRPs) presentes en la saliva, las cuales tienen muy alta afinidad por las proantocianidinas (Hagerman y Butler, 1981; Asquish y Butler, 1985). En este sentido trabajos de Freitas y colaboradores (2001) plantean que los compuestos fenólicos de muy bajo peso molecular son poco efectivos interaccionando con proteínas globulares, asegurando que los polifenoles han de presentar “tamaño suficiente y adecuado” para ser capaces de unirse simultáneamente a diferentes sitios de la misma proteína, actuando como ligandos polidentados. Por último, hemos de tener en cuenta que la concentración equivalente de ovoalbúmina/ saliva entera, significa que hay una concentración de mezcla de proteínas salivales equivalente a la concentración de ovoalbúmina y no todas las proteínas salivales interaccionan por igual con las proantocianidinas.

Figura 1. Gráfico y resultados de correlación entre los niveles de astringencia encontrados usando saliva y ovoalbumina como agentes precipitantes. (Correlación significativa  $p < 0,05$ )





Entre las proteínas, de la saliva la familia de las PRPs son las más efectivas al reaccionar con las proantocianidinas y de ellas, las PRP básicas son las más reactivas. Las  $\alpha$ -amilasas también tienen la capacidad de precipitar proantocianidinas y son menos efectivas pero más selectivas que las PRPs. También las histatinas son proteínas con capacidad de precipitar proantocianidinas pero, cuando la saliva es recolectada mediante estimulación, como es el caso de este experimento, prevalecen las PRPs sintetizadas en las glándulas parótidas (Lu y Bennick, 1998).

Los resultados del último punto de la determinación de astringencia obtenidos utilizando saliva entera se procesaron usando SDS-PAGE, lo cual nos permite observar en la Figura 2 el comportamiento de las diferentes proteínas de la saliva frente a los diferentes grados de polimerización y composición monomérica de las proantocianidinas estudiadas. La tabla 4 muestra las cantidades de proteínas en cada caso.

Tabla 4. Cantidades de proteínas encontradas en los geles de SDS PAGE de los sobrenadantes después de la reacción de saliva entera (ST) con (-) Epigallocatequina (EGC), (-) Epicatequina galato (ECG), (+) Catequina(C) and (-) Epicatequina (E) en los días 0, 2<sup>o</sup> y 4<sup>o</sup> de polimerización.

Epicatequina	Saliva (ST)	Día 0	Día 2	Día 4
mucina/lactoferrina ( $\mu$ g) *	1,94	1,95	1,31	0
$\alpha$ -amilasas y gPRPb ( $\mu$ g)	13,3	13,01	7,95	3,31
bPRP ( $\mu$ g) <sup>▫</sup>	2,96	2,81	1,58	0
aPRP ( $\mu$ g) *	3,48	3,06	2,22	0
bPRP IB1-IB9 ( $\mu$ g) *	3,31	2,68	1,74	0
Total ( $\mu$ g) <sup>▫</sup>	25	23,51	14,8	3,31
Catequina	Saliva	Día 0	Día 2	Día 4
mucina/lactoferrina ( $\mu$ g) <sup>†</sup>	1,94	1,8	1,7	0,56
$\alpha$ -amilasas y gPRPb ( $\mu$ g) <sup>▫</sup>	13,3	13,12	8,33	3,25
bPRP ( $\mu$ g)	2,96	2,92	1,88	0,45
aPRP ( $\mu$ g) *	3,48	3,22	2,22	0,55
bPRP IB1-IB9 ( $\mu$ g)	3,31	3,01	1,94	0,52
Total ( $\mu$ g)	25	24,07	16,07	5,33
Epicatequin Galato	Saliva	Día 0	Día 2	Día 4
mucina/lactoferrina ( $\mu$ g)	1,94	1,77	0,43	0
$\alpha$ -amilasas y gPRPb ( $\mu$ g)	13,3	11,81	7,22	1,77
bPRP ( $\mu$ g) * <sup>†</sup>	2,96	2,9	2,09	0
aPRP ( $\mu$ g)	3,48	2,57	1,64	0
bPRP IB1-IB9 ( $\mu$ g) * <sup>†</sup> <sup>▫</sup>	3,31	2,97	1,67	0
Total ( $\mu$ g)	25	22,02	13,05	1,77
Epigallocatequina	Saliva	Día 0	Día 2	Día 4
mucina/lactoferrina ( $\mu$ g)	1,94	1,82	1,23	0
$\alpha$ -amilasas y gPRPb ( $\mu$ g) <sup>†</sup> <sup>▫</sup>	13,3	12,83	7,32	3
bPRP ( $\mu$ g) <sup>†</sup> <sup>▫</sup>	2,96	2,89	1,66	0
aPRP ( $\mu$ g)	3,48	2,97	2,00	0
bPRP IB1-IB9 ( $\mu$ g) <sup>†</sup> <sup>▫</sup>	3,31	2,86	1,54	0
Total ( $\mu$ g) <sup>†</sup> <sup>▫</sup>	25	23,38	13,75	3

Los símbolos indican correlación significativa para ( $p < 0,05$ ) entre las proteínas de la saliva por SDS-Page y los parámetros de (\*) Astringencia usando saliva como agente precipitante, (†) Astringencia usando ovoalbúmina como agente precipitante y (▫) Índice DMACH).

En el día 0 de experimentación se visualizan todos los grupos de proteínas de la saliva con muy pocas diferencias entre la saliva sola y los sobrenadantes de las reacciones de la saliva con las diferentes proantocianidinas. En el día 2 de

experimentación se observa que el sobrenadante de la reacción de saliva con ECG es el que presenta menos cantidad de proteína disminuyendo todas las proteínas en general, especialmente las PRPs básicas tanto de bajo como de alto peso molecular. Los sobrenadantes de las reacciones de saliva con E, C, y EGC no presentan grandes diferencias entre ellas. En el día 4 de experimentación no se visualizan la mucina/lactoferrina, y apenas las PRPs básicas y ácidas en ninguno de los sobrenadantes y sólo se aprecian las bandas que pertenecen a las  $\alpha$ -amilasas y PRPs glicosiladas excepto en el caso de los sobrenadantes de saliva con C, que se visualizan bandas de muy baja densidad en el gel.

Estos resultados de SDS-PAGE se corresponden con los descritos recientemente por Gambutti y colaboradores (2006) en sobrenadantes de reacciones de saliva con extractos de taninos de semillas y pieles de uva de la variedad *Aglianico*. Las bandas de los sobrenadantes de reacción de saliva con taninos de semilla son apenas visibles, diferenciándose las correspondientes a las  $\alpha$ -amilasas y PRPs glicosiladas. Recordemos que las proantocianidinas de las semillas están compuestas por E, C, y ECG y polímeros de los mismos. Mientras que las proantocianidinas de las pieles tienen muy poca cantidad ECG y poseen EGC junto a E y C, lo cual se corresponde con una mayor densidad en las bandas visualizadas en el gel, especialmente las  $\alpha$ -amilasas y PRPs glicosiladas.

Otros resultados experimentales, mediante nefelometría, muestran que la cantidad de PRPs necesaria para precipitar proantocianidinas es menor que las cantidades requeridas de  $\alpha$ -amilasa ó BSA. Del mismo modo, es posible detectar turbidez utilizando PRPs ante la presencia de monómeros de proantocianidinas, mientras la  $\alpha$ -amilasa y la BSA requieren de dímeros y trímeros de proantocianidinas, en este caso se describen niveles de turbidez menores ante la BSA que la  $\alpha$ -amilasa; ante proantocianidinas de igual estructura y concentración (de Freitas y col., 2001).

Lu y Bennick en 1998 utilizaron electroforesis en gel para estudiar las uniones taninos condensados-proteínas, concluyendo que estas uniones son mucho mayores para las PRPs básicas (IB1-IB9) que para la gelatina, PRPs glicosiladas y PRP ácidas en orden decreciente.

En este sentido Sarni-Manchado y colaboradores (1999), usando SDS-PAGE, destacan que el total de proteínas de la saliva decrece al mismo tiempo que aumenta la concentración de proantocianidinas en el medio. Sin embargo, muy poca concentración de proantocianidina es necesaria para precipitar PRPs básicas de bajo peso molecular (IB1-IB9); mientras las  $\alpha$ -amilasa y las PRPs glicosiladas (desde 57kDa hasta 67kDa) se unen a las proantocianidinas y precipitan de modo gradual. Las interacciones de las proteínas de la saliva con las proantocianidinas están en función del tamaño, conformación y cargas de las moléculas de proteínas. Así, la gran afinidad de las PRPs básicas por los taninos está dada por su conformación abierta que permite las interacciones hidrofóbicas y los puentes hidrógenos, mientras las PRPs glicosiladas tienen mayor tamaño y azúcares que dificulta la unión a las proantocianidinas, formándose complejos solubles que precipitan sólo si existe gran concentración de proantocianidinas. Por su parte, las PRPs ácidas se describen con tendencia a reaccionar en menor proporción con las proantocianidinas (Bacon y Rhodes, 2000). No obstante, Yan y Bennick (1995) demostraron que existe relación



entre las PRPs ácidas y el ácido tánico, pues al incubarse ácido tánico con  $\alpha$ -amilasas, la presencia de PRPs ácidas inhibía la pérdida de la actividad  $\alpha$ -amilasa.

Mateus y colaboradores (2004), en estudios de adición de proantocianidinas a vinos de Oporto, concluyen que las  $\alpha$ -amilasas son proteínas muy selectivas y útiles para distinguir la reactividad de los polifenoles. Estas proteínas manifiestan un incremento de la turbidez al reaccionar con los taninos, que se corresponde con los niveles de proantocianidina añadida.

En general, los resultados de este experimento concuerdan con los descritos por otros investigadores. Los datos obtenidos mediante la técnica de determinación de astringencia puesta a punto por nuestro grupo de trabajo siguen la misma tendencia que los resultados obtenidos con saliva total y mediante electroforesis.

## Conclusiones

1. La adición de etanal a las soluciones de los diferentes monómeros de flavanol origina la disminución del índice DMACH, lo que indicaría un aumento paulatino de su grado de polimerización.
2. La aplicación de la metodología de determinación de astringencia a lo largo del proceso de polimerización, inducida mediante la adición de etanal a los diferentes monómeros, permite confirmar que la astringencia aumenta a medida que crece el grado de polimerización y ante la presencia de Galato de Epicatequina.
3. La utilización de las proteínas de la saliva como agente precipitante da lugar a valores de astringencia superiores a los obtenidos con ovoalbúmina. No obstante, existe una estrecha correlación entre los valores obtenidos con saliva total con respecto a los obtenidos con ovoalbúmina. Este último dato confirmaría la validez del método para la determinación de astringencia utilizando ovoalbúmina.
4. Del conjunto de proteínas presentes en los extractos de saliva, las más reactivas frente a los polímeros de proantocianidinas son las PRP básicas de bajo peso molecular (14-22 kDa), seguidas de las PRP básicas de alto peso molecular (37-43 kDa). Después se sitúan las proteínas pertenecientes a la banda de las  $\alpha$ -amilasas y PRP básicas glicosiladas, seguidas de la mucina/lactoferrina. En el caso de los polímeros de epicatequina galato las PRP ácidas muestran una mayor reactividad.

## Bibliografía

- Asquith, T.N y Butler, L.G. Use of dye labelled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *J. Chem. Ecol.*, **1985**, 11, 1535- 1544.
- Bacon, J.R., Rhodes, M.J., Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 838-843.
- Bate-Smith, E.C., Flavonoid compounds in foods. *Adv Food Res.*, **1954**, 5, 261-300.
- Baxter, N.J., Lilley, T.H., Haslam, E., Williamson, M.P., Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry* **1997**, 36, 5566-5577.
- Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
- Brossaud, F., Cheynier, V., Noble A.C. 2001. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2001**, 7, 33-39.
- Cheynier, V., Moutounet, M., Sarni- Manchado, P. Los compuestos fenólicos. En *Enología: fundamentos Científicos tecnológicos*. Coordinador Flanzys, C. AMV Ediciones. Mundiprensa, **2000**, 114- 136.
- de Freitas, V., Mateus, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 940-945.
- Escribano- Bailón, T., Alvarez-Gracia, M., Rivas- Gonzalo, J.C., Heredia, F.J., Santos-Buelga, C. Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde mediated condensation between malvidin 3-O-glucoside and (+) catechin. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 1213- 1217.
- Fulcrand, H., Doco, T., Es Safi, N , Chynier, V. Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography\_ion spray mass spectrophotometry. *Journal of Chromatography*, **1996**, 752, 85-91.
- Galvin, C. Etude de certaines reactions de degradation des anthocyanes et leur condensation avec les flavanols, consequences sur la couleur des vins. *Tesis Doctoral*, Université de Bordeaux II, **1993**.
- Gambuti, A., Rinaldi, A., Pessina, R., Moio, L. Evaluation of aglicano grape skin and seed polyphenols astringency by SDS-PAGE electrophoresis of salivary proteins after binding reaction. *Food Chem.*, **2005**, doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.038 (article in press)
- González- Manzano, S., Rivas- Gonzalo, J., Santos- Buelga, C. Extraction of flavan-3-ol from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 513, 283- 289.
- Gonzalez-Manzano, S.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 513, 283-289.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 4494-4497.
- Haslam, E. Oligomeric procyanidins and the ageing red wines. *Phytochem.*, **1980**, 16, 1625- 1670.
- Haslam, E. The association of proteins with polyphenols. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1981**, 309- 311.
- Herderich, M.J.; Smith, P.A. Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Australian J. Grape and Wine Res.*, **2005**, 11, 205-214.
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, P.A., Williamson, M.P., Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 942- 949.
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford M.N., Evaluation of bitterness and astringency of (+) catechin and (-) epicatechin in red wine and in model solutions. *J. Sensory Studies*, **1997**, 12, 25- 37.
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M.N., Interaction of (+) catechin, (-) epicatechin, procyanidin B2 and procyanidin C1 with pooled human saliva in vitro. *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, 81, 261- 268.
- Kennedy, J.A., Troup, G.L., Pilbrow, J.R., Hutton, D.R., Hewitt, D., Hunter, C.R., Ristic, R., Iland, P.G., Jones, G.P. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2000**, 6, 244-254.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage. *Nature*, **1970**, 227, 680- 685.
- Levine M, Keller PJ The isolation of some basic proline-rich proteins from human parotid saliva. *Arch Oral Biol.*, **1977**, 22, 37-41.
- Llaudy, M.C.; Canals, R.; Canals, J.M.; Rozès, N.; Arola, Ll.; Zamora, F. New method for evaluating astringency in red wine. *J. Agri. Food Chem.*, **2004**, 52, 742-746.
- Lu, Y., Bennick, A., Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Arch.Oral Biol.*, **1998**, 43, 717-728.
- Mateus, N., Carvalho, E., Luis, C., de Freitas, V. Influence of the tannin structures on the disruption of carbohydrates on protein\_tannin aggregates. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 513, 135- 140.
- Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Rev. Food Sci. And Nutr.*, **2005**, 45, 2, 85- 118.
- Nagel, C.W., Glories, Y. Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, 42, 4, 364- 366.
- Peleg, H., Gacon, K., Schilich, P., Noble, A.C., Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food. Agric.*, **1999**, 79, 1123- 1128.

- Poncet- Legrand, C., cartalade, D., Putuau, J.L., Cheynier, V., Vernhet, A. Flavanol- 3- ol aggregation in model ethanol solution: Incidence of polyphenols structure, concentration, ethanol content and ionic strength. *Langmuir*, **2003**, 19, 10563- 10572.
- Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochem.*, **1994**, 36, 781-784.
- Ricardo-da-Silva, M., Cheynier, V., Souquet, J.M., Moutounet, M., Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *J. Sci. Food Agric.*, **1991**, 57, 111- 125.
- Romano, P., Suzzi, G., Turbante, L., Polsinelli, M. Actaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *FEMS Microbiology Letters*, **1994**, 118, 213- 218.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Moutounet, M., Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 42-47.
- Saucier, C., Bourgeois, G., Vitry, C., Roux, D., Glories, Y. Characterization of (+) catechin-acetaldehyde polymers: a model for colloidal state of wine polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 1045- 1049.
- Saucier, C., Bourgeois, G., Vitry, C., Roux, D., Glories, Y. Etude par spectrométrie de masse de la fragmentation d'oligomères [catechine-ethanal]<sub>n</sub>. *12<sup>e</sup> Journées Françaises de spectrométrie de masse*. Bordeaux, Sept., 12-14, **1995**, 107
- Schwartz, S.S., Zhu, W.X., Sreebney, L.M. Sodium Dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis of human whole saliva. *Arch. Oral Biol.*, **1995**, 40, 10, 949- 958.
- Souquet, J.M., Cheynier, V., Moutounet, M. Les proanthocyanidins du raisin. *Bulletin de l'O.I.V.*, **2000**, 73, 601- 609.
- Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossaud, F., Moutounet, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skin. *Phytochem.*, **1996**, 43, 2, 509- 512.
- Steiner, J.C., Keller, P. J. An electrophoretic analysis of the protein components of human parotid saliva. *Archs. Oral Biol.*, **1968**, 13, 1213- 1221.
- Su, C.T., Singlenton, V. L. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochem.*, **1969**, 8, 1553- 1558.
- Thorngate, J.H., Noble, A.C. Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R(-)-epicatechin and 3S(+)-catechin. *J. Sci. Food Agric.*, **1995**, 67,44, 531-535
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E. J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.*, **2003**, 83, 6, 564-573.
- Vidal, S., Cartaladane, D., Souquet, J.M., Fulcrand, H., Cheynier, V. Changes in proanthocyanidin chain length in wine-like model solutions. *J. Sci. Food Agric.*, **2002**, 50, 2261- 2266.
- Vivas, N, Glories, Y. Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1996**, 47, 103-107.
- Vivas, N., Nonier, M.F., Vivas de Gaulejac, N., Absalon, C., Bertrand, A., Mirabel, M. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grape (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Shinopsis balansae*) by matrix assisted laser desorption/ ionisation time of flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 513, 147- 156.
- Whalley, W.B. En: The chemistry of flavanol compounds. *Geissman T.A.* ed. Pergamon Press, Oxford, **1962**.
- Wildenrad, H.L. y Singlenton, V.L. The production of aldehydes as a result of oxidation of phenolic compounds and its relation to wine ageing. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1974**, 25, 2, 119- 126.
- [www.Biorad.com](http://www.Biorad.com)
- [www.amershambiosciences.com](http://www.amershambiosciences.com)
- Yan, Q., Bennick, A., Identification of histatins as tannin-binding proteins. *Biochem. J.*, **1995**, 311, 341- 347.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

## CAPITULO III

---

# INFLUENCIA DE LA MADUREZ Y LA MACERACIÓN EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA Y LA ASTRINGENCIA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL RACIMO DE UVA.

---

Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in a wine simulated maceration.

Aceptado para su publicación a:

*European Food Research and Technology*  
Manuscript ID: *EFRT-06-0548*  
2 de noviembre del 2006.

---



*The virgin of the grape. Mignar (1612- 1695)*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

## Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in a wine simulated macerations.

Llaudy, M.C., Canals, R., Canals, J.M., Zamora, F\*.

Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, (CeRTA), Universidad Rovira i Virgili. Campus de Sescelades, C/ Marcel·li Domingo, s/n. 43007-Tarragona, Spain.

\*To whom correspondence should be sent  
Tel: 00 34 977 55 86 79  
Fax: 00 34 977 55 86 86  
e-mail: fernando.zamora@urv.cat

### ABSTRACT

This paper studies the influence of ripening stage and maceration time (1-23 days) on the contribution of each cluster grape components to phenolic composition and astringency in wine simulated macerations. In general terms, proanthocyanidin extraction from skins, stems and especially from seeds increased with maceration time. The ripening stage also had a major influence on tannin extraction and astringency. The tannin contribution from skins and stems increased with ripening but the contribution from the seeds decreased. The contribution to astringency from all cluster components was clearly higher when the grapes were unripened. The mean degree of polymerization of the tannins from skin and seed components was unaffected by ripening and maceration length.

**KEYWORDS:** Wine, Astringency, Proanthocyanidin, Maceration, Ripening

### INTRODUCTION

The composition of phenolic compounds in red wine is one of the main determinants of its quality. Some sensory attributes such as color, body and astringency are directly associated with the composition of anthocyanins and proanthocyanidins [1, 2, 3, 4].

Anthocyanins are only present in grape skins whereas proanthocyanidins, also known as condensed tannins, are present in skins, seeds and stems [5, 6, 7, 8, 9]. The nature of proanthocyanidins depends strongly on their origin. Seed proanthocyanidins are made up of (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-3-gallate [10, 11], whereas skin proanthocyanidins also contain (-)-epigallocatechin and a much lower proportion of (-)-epicatechin-3-gallate [12, 13]. Stem proanthocyanidins are made up

of the four monomers: (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin [14, 15].

It has been reported that seed proanthocyanidins present a lower mean degree of polymerization (mDP) than skin proanthocyanidins [14, 16]. According to Souquet et al., 2000 [14] the mDP of stem proanthocyanidins is similar that of seed proanthocyanidins. Other authors, however, have found that it is higher [15] and some have found that it is even higher than that of skin proanthocyanidins [17].

Molecular size, and especially the monomeric composition of the proanthocyanidins, greatly influence on the sensation of astringency: the greater the degree of polymerisation and the greater the percentage of galloylation, the greater the sensation of astringency [18, 19, 20].

It is generally considered that ripeness strongly influences the phenolic composition of red wines [21, 22]. It has been reported, for example, that not-well-ripen grapes have a lower extractability of anthocyanins and proanthocyanidins from skins and a higher extractability of proanthocyanidins from seeds [23, 24]. For this reason, it is generally considered that not-well-ripen grapes may produce more astringent wines because their seeds can release a higher amount of proanthocyanidins, which are very galloylated [25]. It has been also reported that stems can release highly astringent, herbaceous and bitter proanthocyanidins [26, 27]. For this reason grapes are usually destemmed in red winemaking. In addition to those described above, the arguments for removing the stems are that their presence reduces the alcohol content and color, and take up valuable space in the vat.

However, in the production of some wines from certain regions, such as Côte du Rhône or Bordeaux, partial or whole stems are already retained [28, 29]. The main reason for this is undoubtedly tradition. Some winemakers argue, however, that the presence of stems may occasionally have some positive effects [17, 30, 31]. Retaining stems produces wines with a higher concentration of proanthocyanidins which help to stabilize the color and improve the body of the wine. Evidently, stems directly release a non-negligible amount of proanthocyanidins [32, 33] and favor extraction from skins and seeds because they make the cap less compact [30].

Numerous studies have investigated the changes in proanthocyanidin and anthocyanin composition during berry development in relation to agroecological factors such as climate, cultivars, irrigation and soil conditions, [21, 34, 35, 36, 37]. Other studies have focused on the extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from the point of view of maceration time [38, 39, 40, 41] and others, on the changes of proanthocyanidins during maturation [11, 25, 33, 42, 43, 44 45]. However, the influence of ripening stage on the extractability of these compounds has hardly ever been described. To our knowledge, only our previous study [24] has done so.

The aim of this paper is to study how the maceration time affects color, phenolic compounds composition and astringency at several grape ripening stages and analyze the contribution of the various components of the grape cluster: skins, seeds and stems.



## MATERIALS AND METHODS

### Materials and Samples

Epicatechin, ovoalbumin and p-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACH) were purchased from Sigma. The other chemicals were of high purity (Panreac)

#### *Grapes*

This study was carried out with the *V. Vinifera* cv Cabernet sauvignon, from Gratallops, D.O. Priorato, during August and September 2005. Roughly two thousand grapes were randomly collected on August 1, August 29, and September 19, corresponding to 1, 5 and 8 weeks after veraison respectively. To obtain random samples, and avoid picking grapes from the same vine at the different sampling times, every third vine in the vineyard was marked. The first sample was collected only from the marked vines. The second sample was collected from the vine immediately next to the marked vine. The third sample was collected from the remaining vines. Grapes were also randomly selected within the vine to ensure a homogeneous distribution between grapes that had been exposed more or less to sunshine. Three grapes were collected from each bunch and randomly sampled: one was taken from the top, one from the bottom, and one from the middle of the cluster. Special care was taken to obtain an even distribution among berries from inside and outside the bunch. The weight of 100 berries, the sugar content, the titratable acidity, and the pH were determined in triplicate using the analytical methods recommended by the OIV [46].

Simultaneously, at each ripening stage, 60 clusters were picked to determine the cluster and stem weights and the number of grapes per cluster. The clusters from the first ripening stage were randomly chosen from the marked vines. The clusters from the second ripening stage were randomly collected from the vines immediately next to the marked vines. Finally, the clusters from the third ripening stage were randomly collected from the remaining vines.

#### *Maceration Conditions*

Twenty-four groups of 100 randomly selected berries were used for each ripening stage. Skins and seeds were manually separated from the pulp and placed separately in flasks. To reproduce identical maceration conditions to those of skins and seeds, the proportional weight of stems corresponding to 100 grapes, were also placed in flasks containing 100 ml of different synthetic solutions.

All synthetic solutions contained 4 g.L<sup>-1</sup> of tartaric acid and were adjusted with sodium hydroxide to pH 3.5. In function of the selected maceration time, the following alcoholic concentrations were used: day 1 (0 %), day 2 (2 %), day 3 (4 %), day 4 (8 %), days 8 to 23 (13 %) to reproduce the evolution of alcoholic fermentation. In all cases, potassium metabisulfite (80 mg.L<sup>-1</sup>) was added to protect phenolic compounds against oxidation and to reproduce real winemaking conditions. Sodium fluoride (1g.L<sup>-1</sup>) was also added to inhibit the development of

microorganisms. All flasks were hermetically closed, protected from oxidation with carbon dioxide and kept at 28 °C in darkness throughout the experiment. Maceration samples were extracted, centrifuged and used for analytical determinations.

## **Methods**

### *Anthocyanin analysis*

Total anthocyanins were determined using the method described by Niketic-Alksic and Hrazdina [47].

### *Total phenolic compounds (IPT)*

The contents of phenolic compounds were determined by measuring the absorbance at 280 nm.

### *Proanthocyanidins*

Total PA ( $\text{g.L}^{-1}$ ) were estimated according to Ribéreau-Gayon and Stonestreet, 1966 [48].

### *Mean Degree of polymerization of proanthocyanidins (mDP)*

Epicatechin solutions ( $0.0$  to  $5.0 \text{ g.L}^{-1}$ ) were prepared using a synthetic solution with 12.5% ethanol content. All samples and epicatechin standard solutions were used for DMACH index estimation measured according to Nagel and Glories, 1991[49]. The p-Dimethylaminoacinaldehyde react with the extremes/ends of the flavanol polymers giving adducts that show maximum absorption at 640 nm. The DMACH index obtained for the epicatechin concentration equivalent to the proanthocyanidin of a sample divided by its real DMACH index can then provide an idea of the mean degree of polymerization of proanthocyanidins [50].

### *Astringency*

Astringency was estimated using ovoalbumin as a precipitation agent and tannic acid solutions as standards in accordance with the previously described method [51].

### *Statistics*

All the data are expressed as the arithmetic average (standard deviation of three replicates). One- and two-factor ANOVA and Scheffe's test were carried out with SPSS software.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Table 1 shows the physical and chemical parameters of grapes throughout the ripening process. The weight of 100 berries, clusters and stems, the sugar content, titratable acidity and pH showed the usual behaviour during ripening and confirmed that the degrees of ripeness of the samples selected were significantly different.

Figure 1 shows the influence of maceration time on anthocyanin concentration at different ripening stages. At all stages, the anthocyanin concentration increased during the first 3-4 days of maceration and then stabilized. These data are in agreement with those of other studies [38, 41] and confirm the already described influence of ripening on anthocyanin extractability [21, 24, 52]: the higher the degree of maturation, the greater the anthocyanin extraction.

Figure 2 shows how the maceration time of skins, seeds and stems influenced proanthocyanidin concentration at different ripening stages. Generally, the concentration of proanthocyanidins from skins, seeds and stems increased with maceration time in all experimental conditions. However, from skins and stems it remained stable after 4-5 days of maceration whereas from seeds it continued to increase beyond this time, especially with the least mature seeds. These data agree with those of González-Manzano et al., 2004 [13] for the behaviour of the seeds and skins. To our knowledge, there are no data in the bibliography on the synthetic solution of stem proanthocyanidins. Spranger et al., 2004 [53] found the highest levels of proanthocyanidins at day 7 of maceration in stem-contact winemaking, which agrees with our results in a synthetic medium.

These results also indicate that ripening has a great strong influence on proanthocyanidin extraction in all cluster components. Skins and stems generally release larger amounts of proanthocyanidins when the grapes are more mature, whereas seeds behave contrary.

Figure 3 shows how the maceration time of skins, seeds and stems influenced the mDP of the extracted proanthocyanidins at different ripening stages. Our results indicate that seed extracted proanthocyanidins had an mDP of around 3, skin extracted proanthocyanidins had an mDP of between 4 and 6, and stem extracted proanthocyanidins had an mDP of between 4 and 9. Our mDP for seeds and skins were rather lower than those reported in the literature [14, 16]. Moreover, there is certain controversy regarding the mDP of stem proanthocyanidins. Souquet et al., 2000 [14] found that the mDP of stem proanthocyanidins are similar to those of seed proanthocyanidins. Other authors reported that they are higher than those of seed proanthocyanidins [15] and even higher than those of skin proanthocyanidins [17], which is in agreement with our results.

The above studies were conducted using organic solvents to extract all the proanthocyanidins presents in these cluster components, whereas our study was conducted by simulating winemaking conditions. Organic solvents can be useful for studying how the phenolic compound composition of all cluster components change throughout the ripening process. However, they are not directly applicable for studying how these components are extracted during winemaking because they can overestimate the results [13]. Moreover, applying aggressive methods can extract proanthocyanidins with a higher degree of polymerisation than are really found in wine [24].

Some studies have reported that the proanthocyanidin mDP from skins [11], seeds [25, 54] and stems increases [33, 44] throughout the ripening process. Our results do not indicate a clear trend in this sense for skins and seeds, and the mDP of stem

proanthocyanidins decreased slightly. This is probably because our experimental extraction conditions were less strong than those of the above authors. If the mDP really does increase during grape maturation, the solubility of the great polymers must decrease in simulated wine conditions.

On the other hand, the time of maceration did not affect the proanthocyanidin mDP of all cluster components.

Figure 4 shows how the maceration time influenced astringency at different ripening stages for all the cluster components. Generally, astringency from skins, seeds and stems increased with maceration time in all experimental conditions. As happened with proanthocyanidin extraction, astringency from skins and stems increased during the first 4-5 days and then remained stable, whereas astringency from seeds continued to increase beyond this time, especially with the least mature seeds.

Ripening generally had a great influence on astringency from all cluster components: the greater the degree of maturation, the lower the astringency. This behaviour is more marked in the case of seeds. In the case of seeds there is a parallelism between the release of proanthocyanidins and final astringency: The higher the proanthocyanidin concentration, the higher the astringency. In the case of skins and stems, however, there is a no direct relation: proanthocyanidin release increases with maturation, but astringency decreases simultaneously.

A possible explanation for this phenomenon in the case of seeds and stems may be the changes in proanthocyanidin mDP observed during ripening. As the mDP from seeds did not change along maturation, astringency only depended on the amount of proanthocyanidin extracted. These data are in agreement with Kennedy et al., 2000 [42], who also found that the mDP of the extracted seed proanthocyanidins did not change along maturation. On the other hand, the mDP of stems decreased during ripening, which made the extraction medium less astringent and even contain a greater proanthocyanidin concentration.

However, the release of skin proanthocyanidins increases and astringency decreases along maturation. In this case, the mDP cannot explain this pattern because there are no clear changes in this parameter during ripening. A possible explanation may be that skins also contain polysaccharides and anthocyanins that can considerably modulate the final astringency of the medium [19, 55, 56, 57].

Figure 5 shows how skins and seeds would contribute to proanthocyanidin concentration and astringency in a hypothetical wine in function of the maturation of the grape and the maceration length. We have not included stems because grapes are usually destemmed and because they would complicate this figure. This graph clearly synthesizes all the results in this study.

Generally, total proanthocyanidin concentration and astringency decrease when grapes are riper but increase with maceration time. The increase in proanthocyanidin concentration that takes place along the maceration is mainly due to both cluster components. However, skin extraction starts quickly and soon becomes stable while seed extraction starts later, when ethanol is present in the medium, and extends along the maceration. This behaviour is also influenced by the degree of ripening. Green

grapes generally release seed tannins more quickly and skin tannins more slowly than mature grapes.

We can conclude that a short maceration produces wines with a moderate concentration of tannins, which will mainly be from skins. On the other hand, a long maceration produces wines with a high concentration of tannins, a large percentage of which comes from the seeds. As the degree of maturation affects the astringency of tannins from skins, and especially from seeds, it must be taken into account when choosing maceration length.

When grapes are well ripened, therefore, the length of the maceration depends on the style of wine we wish to produce: a short maceration for fruity wines to be consumed quickly, and a long maceration for full-bodied and tannic wines to be aged in oak barrels. However, when grapes are not well ripened, a long maceration is not suitable because, due to an excess of seed tannin extraction, it can produce wines that are too astringent. Also, the presence of stems increases wine astringency especially when the grapes are not well ripened.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Centro de Investigación Científica y Tecnológica (AGL 2001-0716 and AGL 2004-02309) and the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya for financial support. We also thank René Barbier (Clos Mogador) for providing the grapes for the experiments.

### REFERENCES

1. Arnold, R., Noble, A.C. (1978) Bitterness and astringency of grape seed phenolics in a model solution. *American Journal of Enology and Viticulture*, 29: 150- 152.
2. Noble, A.C. (1990) Bitterness and astringency in wine: Development in food science 25. in Rouseff, R. L. New York: Elsevier, (ed) *Bitterness in Foods and Beverages*, pp: 145- 158.
3. Gawel, R. (1998) Red wine astringency: A review. *Australian Journal Grape Wine Research*: 74- 98.
4. Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E. J. (2003) The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, 83, 6: 564-573.
5. Lea, A., Bridle, P., Timberlake, C., Singletong, V.L. (1979) The procyanidins of white grape and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38: 277- 281.
6. Czochanska, Z., Foo, L., Porter, L. (1979) Compositional changes in lower molecular weight flavan during grape maturation. *Phytochemistry*, 18: 1819- 1822.
7. Glories, Y. (1984) La couleur des vins rouges. 1ère partie: Les equilibres des anthocyanes et des tannins. *Connaiss. Vigne Vin*, 18: 195-217.
8. Bourzeix, M., Weyland, D., Héredia, N., Desfeux, C. (1986) Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bulletin O.I.V.*: 669-670, 1179- 1254.
9. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdiou, D. (2000). *The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments*. In U.K. Wiley Chichester (ed), *Handbook of Enology*. Vol. 2 pp: 232-234.
10. Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. (1994) Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36: 781-784.
11. Kennedy, J.A., Mathewwa, M.A., Waterhouse, A. L. (2002) Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoides. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 4: 268- 274.

12. Souquet, J.-M.; Cheynier, V.; Brossaud, F. (1996) Moutounet, M. Polymeric Proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43: 509-512.
13. Gonzalez-Manzano, S.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. (2004) Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytical Chemical Acta*, 513: 283-289.
14. Souquet, J.M.; Cheynier, V.; Moutonet, M. (2000) Les proanthocyanidins du raisin. *Bulletin de l'O.I.V.*, 73: 601-609.
15. Vivas, N., Nonier, M.F., Vivas de Gaulejac, N., Absalon, C., Bertrand, A., Mirabel, M. (2004) Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grape (*Vitis vinifera*) and heatwood of Quebracho (*Shinopsis balansae*) by matrix assisted laser desorption/ ionisation time of flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry. *Analytical Chemical Acta*, 513: 147- 156.
16. Moutonet, M.; Fulcrand, H.; Sarni-Manchado, P.; Souquet, J.M.; Atanalsova, V.; Labarbe, B.; Maury, C.; Vidal, S.; Cheynier, V. (2002) Wine Tanins and their role in astringency perception. 13ème Symposium International d'Oenologie. Montpellier: 737-747.
17. Sun, B., Spranger, M.I. (2005) Changes in phenolic composition of Tinta Miúda red wines after 2 years of ageing in bottle : Effect of winemaking Technologies. *European Food Research and Technology*, 221 : 305-312.
18. Vivas, N, Glories, Y. (1996) Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47: 103-107.
19. Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., Waters, E. (2004) Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytical Chemical Acta.*, 513: 57-65.
20. 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.
21. Ryan, J.M., Revilla, E. (2003) Anthocyanin composition of Cabernet sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 3372- 3378.
22. Ó-Marques, J., Reguinga, R., Laureano, O., Ricardo-da-Silva, J.M. (2005) Changes in grape seed, skins and pulp condensed tannins during berry ripening: effect of fruit pruning. *Ciência Técnica Vitivinícola*, 20, 1: 35- 52.
23. Peyrot des Gachons, C., Kennedy, J.A. (2003) Direct method determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 5877- 5881.
24. Canals, R., Llaudy, M.C., Valls, J., Canals, J.M., Zamora, F. (2005) Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seed of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 4019- 4025.
25. Romeyer, F.M., Macheix, J.J., Sapis, J.C. (1986) Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seed. *Phytochemistry*, 25, 1: 219- 221.
26. Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. (1995) Principles Practices of winemaking. New York: Chapman and Hall, pp: 88.
27. Hashizume, K., Samuta, T. (1997) Green odorant of grape cluster stem and their ability to cause wine stemmy flavor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 1333- 1337.
28. Blouin, (2000) La vinificación bordelesa de las uvas tintas. In AMV Madrid (ed) *Enología: Fundamentos Científicos Tecnológicos*. Cord. Flanzys, pp: 465-467.
29. Delteil, D. (2000) El despalillado de las uvas. In AMV Madrid (ed) *Enología: Fundamentos Científicos Tecnológicos*. Cord. Flanzys, pp: 436- 437.
30. Peynaud, E. (1984) *Connaissance et travail du vin*. Paris: Dunod, Bordas (ed), pp: 133- 135.
31. Peynaud, E. (1988) *Le vin et les jours*. Paris: Dunod, Bordas (ed), pp: 228- 232.

32. Ricardo da Silva, J.M., Rigaud, J., Cheyrier, V., Cheminat, A., Moutountet, M. (1991) Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, 30, 4: 1259- 1264.
33. Jordao, A., Ricardo da Silva, J., Laureano, O. (2001) Evolution of catechins and oligomeric proacyanidins during grape maturation of Castelao Frances and Touriga Francesa. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 3: 230- 234.
34. Jackson, D.I., Lombard, P.B. (1993) Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality. A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44: 409- 430.
35. Esteban, M.A., Villanueva, M.J., Lissarrague, J.R. (2001) Effect of irrigation on changes in the anthocyanins composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grape berries during ripening. *Journal of Science and Food Agriculture*, 81: 409- 420.
36. Vivas de Gaulejac, N., Nonier, M.F., Guerra, C., Vivas, N. (2001) Anthocyanins in grape skins during maturation of *Vitis vinifera* L cv Cabernet sauvignon and Merlot noir from different Bourdeaux terroirs. *Journal International de la Vigne et du Vin*, 35, 3: 149- 156.
37. Pérez-Magariño, S. and González San-José, M.L. (2004) Evolution of flavanols, anthocyanins and their derivatives during the aging red wine elaborated from grape harvested at different stage of ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 1181- 1189.
38. Gómez- Plaza, E., Gil- Muñoz, R., López- Roca, J.M., Martínez- Cutillas, A., Fernández- Fernández, J.I. (2001) Phenolic compounds and colour stability of red wines: Effect of skin maceration time. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 3: 266-270.
39. Zimman, A., Joslin, W. S., Lyon, M.L., Meier, J., Waterhouse, A.L.(2002) Maceration variables affecting Phenolic composition in Commercial- scale Cabernet sauvignon winemaking trials. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 2: 93- 98.
40. Gómez- Míguez, M , Heredia, F. J. (2004) Effect of the maceration technique on the relationships between anthocyanins composition and objective color of Syrah wines. *Journal of Agriculture and Food. Chemistry*, 52: 5117- 5123.
41. Kelebek, H., Canbas, A., Selli, S., Saucier, C., Jourdes, M., Glories, Y. (2005) Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wine made from *Vitis vinifera* cvs Bogazkere and Öküzgözü. *Journal of Food Engineer*, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.08.032
42. Kennedy, J.A., Mattheus, M.A., Waterhouse, A.L. (2000) Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55: 77-85.
43. Kennedy, J.A., Troup, G.L., Pilbrow, J.R., Hutton, D.R., Hewitt, D., Hunter, C.R., Ristic, R., Iland, P.G., Jones, G.P. (2000) Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6: 244-254.
44. Jordao, A., Ricardo da Silva, J., Laureano, O. (2001) Evolution of proanthocyanidins in bunch stems during berry development (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 40:17- 22.
45. Harbertson, J. F., Kennedy, J.A., Adams, D.O. (2002) Tannin in skins and seeds of cabernet sauvignon, Syrah and Pinot noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 1: 54- 59.
46. O.I.V. (1990) [Le recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts](#). Paris: O.I.V (ed).
47. Niketic-Aleksic, G.K.; Hrazdrina, G. (1972) Quantitative analysis of the anthocyanin content in grape juices and wine. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 5, 5: 163-165.
48. Ribéreau-Gayon, P. ; Stonestreet, E. (1966) Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimical Analytical*, 48: 188-196.
49. Nagel, C.W., Glories, Y. (1991) Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42: 364- 366.
50. Rodríguez, M., Lezáun, J., Canals, R. Llaudy, M.C., Canals, J.M., Zamora, F. (2005) Influence of the presence of the lees during oak ageing on colour and phenolic compounds composition of red wine. *Food Science and Technology International*, 11, 4: 289-296.

51. Llaudy, M.C.; Canals, R.; Canals, J.M.; Rozès, N.; Arola, L.L.; Zamora, F. (2004) New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 742-746.
52. Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B. (1999) Anthocyanins, phenolic and color of Cabernet franc, Merlot and Pinot noir from British Columbia. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 4009- 4017.
53. Spranger, M.I., Climaco, M.C., Sun, B., Eiriz, N. (2004) Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Analytica Chimica Acta*, 513: 151-161.
54. Geny L.; Saucier, C.; Bracco, S.; Daviaud, F.; Glories, Y. (2003) Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 8051-8054.
55. Fuster, A. ( 2001) Les polysaccharides, leur contribution à la qualité du vin. *Revue Française d'Oenologie*, 187: 14- 17.
56. Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., Cheynier, V. (2004b) Use of an experimental design approach for evaluation key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality Preferences*, 15: 219- 217.
57. Mateus, N., Carvalho, E., Luis, C., de Freitas, V. (2004) Influence of the tannin structures on the disruption of carbohydrates on protein\_tannin aggregates. *Analytical Chemical Acta*, 513: 135- 140.

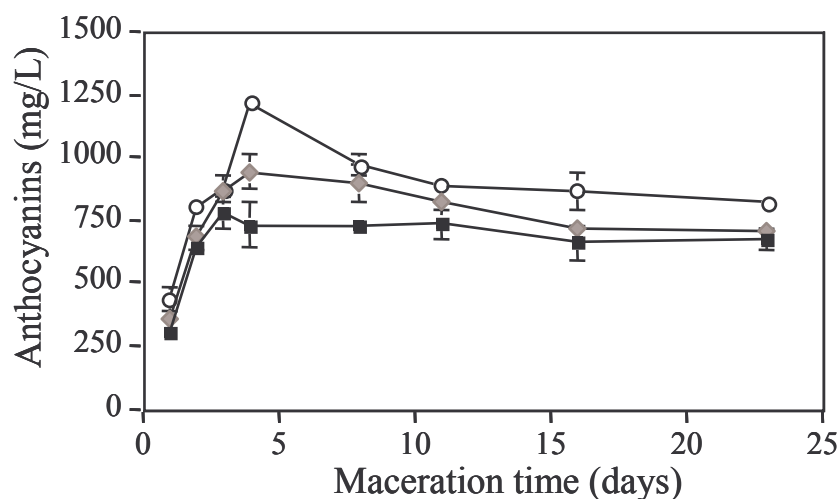


Table 1. Evolution of Grape Parameters throughout Ripening.

	Stage of Ripening ( Weeks after veraison)		
	1	5	8
Weight of 100 berries (g)	80.77 ± 5.01 A	101.60 ± 11.40 B	109.42 ± 10.73 B
Weight of clusters (g)	128.70 ± 6.39 A	168.42 ± 19.18 B	179.20 ± 2.81 B
Weight of stems (g)	8.13 ± 2.01 A	10.36 ± 4.42 A	9.10 ± 1.81 A
Berries on cluster	151.6 ± 23.9 A	141.5 ± 10.8A	146.8 ± 15.0 A
Sugar Content (g.L <sup>-1</sup> )	156.6 ± 1.8 A	239.7 ± 1.9 B	268.6 ± 8.6 C
Sugar Content (Brix)	15.6 ± 0.2 A	23.9 ± 0.2 B	26.7 ± 0.9 C
Potential alcohol value (%)	9.2 ± 0.1 A	14.1 ± 0.1 B	15.8 ± 0.5 C
Titrate acidity (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	6.52 ± 0.40 A	5.75 ± 0.23 B	4.88 ± 0.60 C
pH	2.85 ± 0.09 A	3.15 ± 0.01 B	3.26 ± 0.16 B

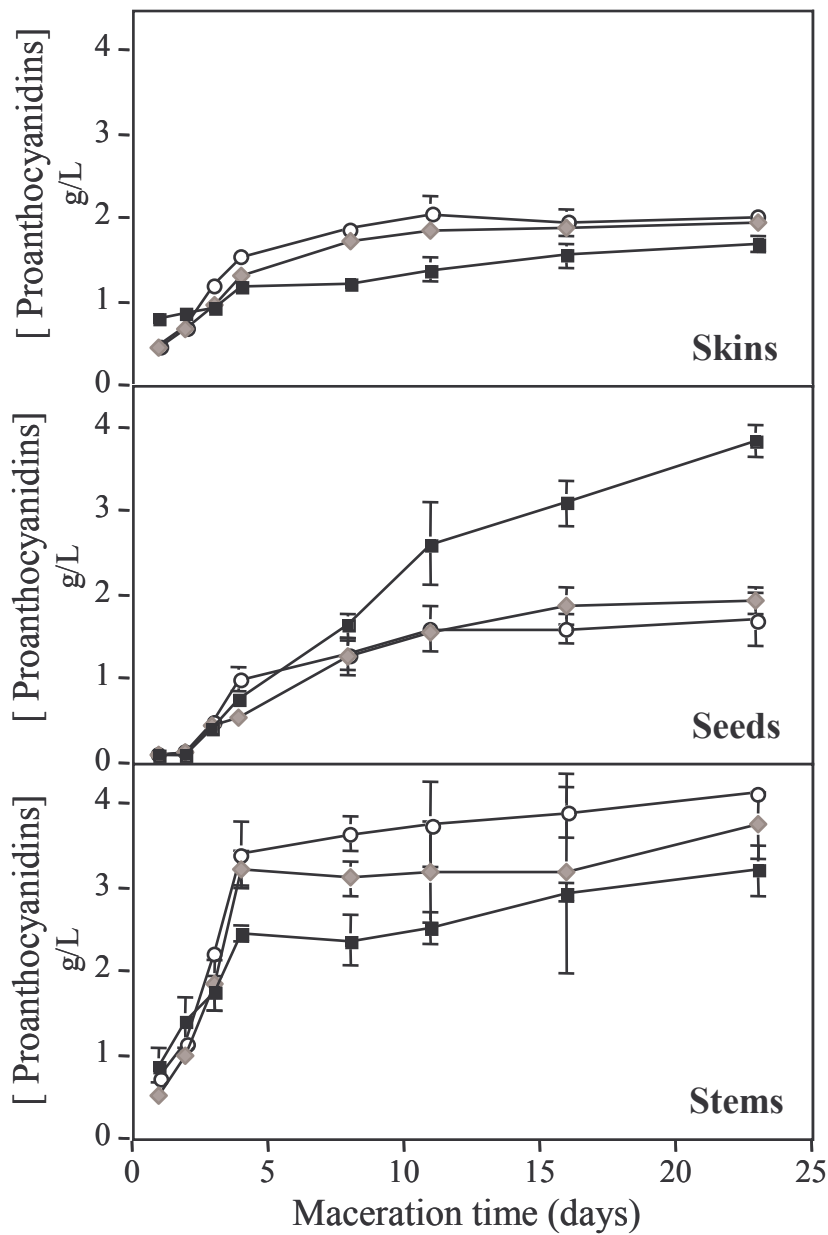
<sup>a</sup> Titrate acidities are expressed as tartaric acid. All data are expressed as the average values of three replicates ± standard deviation. Statistical analysis: one factor ANOVA and Scheffé's test (both.  $p=0.05$ ). Different letters indicate statistical differences.

Figure. 1. Influence of maceration time on anthocyanin concentration at different ripening stages.



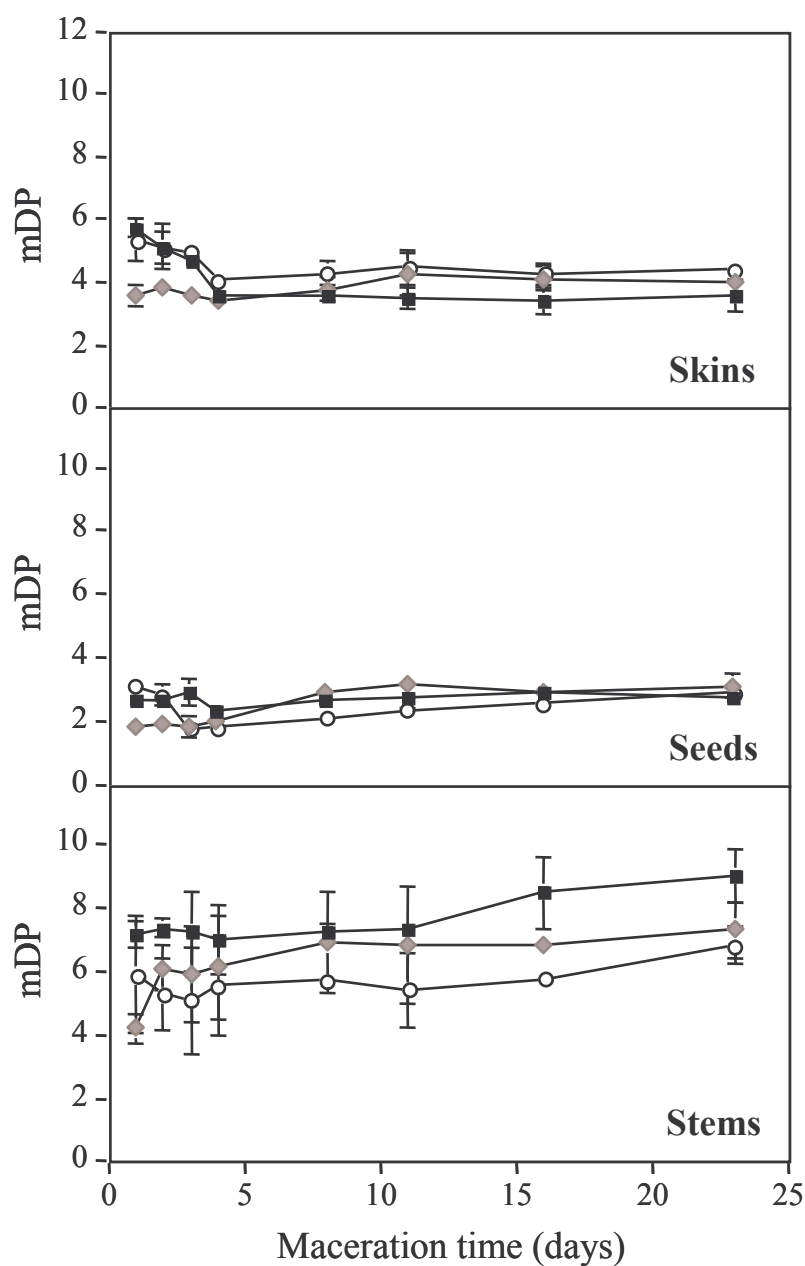
All data are expressed as the average values of three replicates ± standard deviation. 1 weeks (—■—), 5 weeks (—◆—) and 8 weeks (—○—) after veraison.

Figure. 2. Influence of maceration time on Proanthocyanidin concentration at different ripening stages.



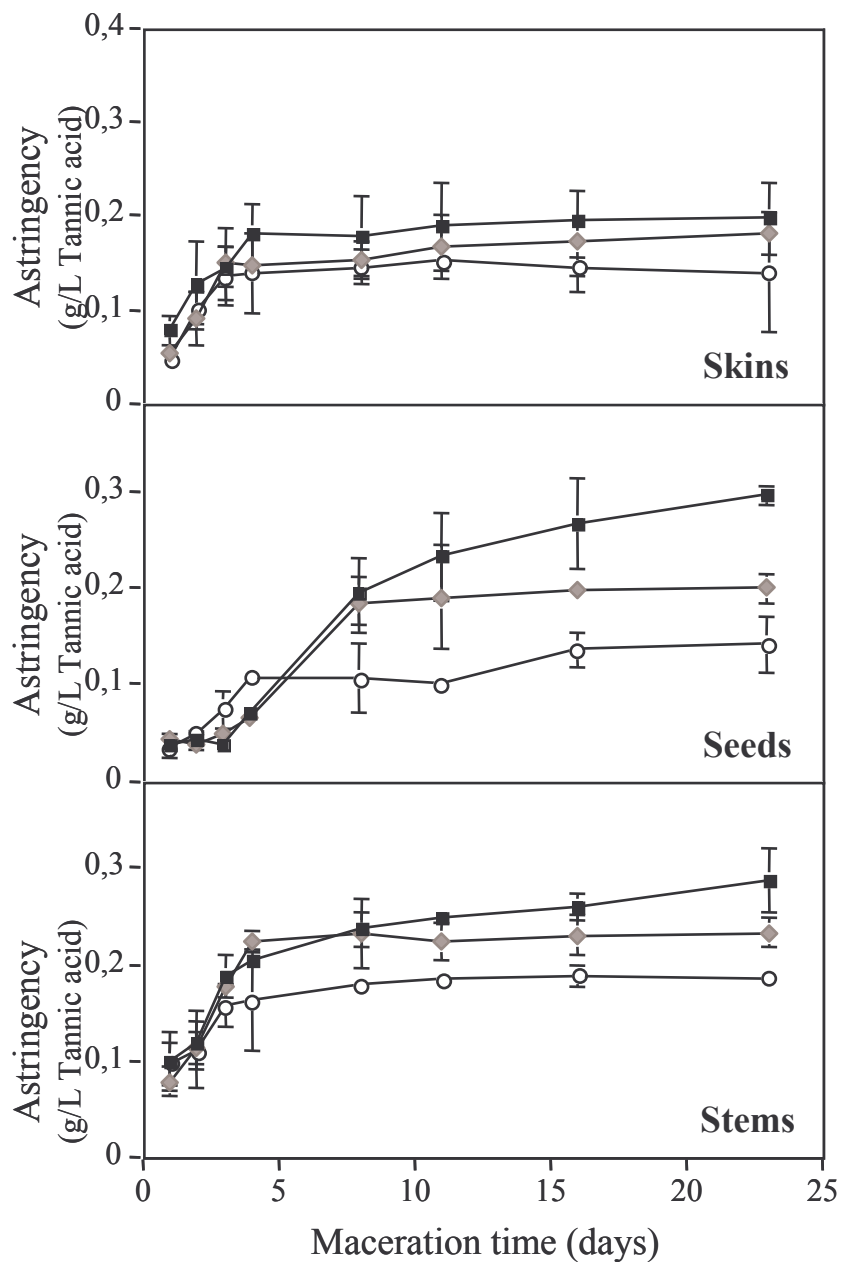
All data are expressed as the average values of three replicates  $\pm$  standard deviation. 1 weeks (■), 5 weeks (◆) and 8 weeks (○) after veraison.

Figure. 3. Influence of maceration time on the mDP of proanthocyanidins at different ripening stages.



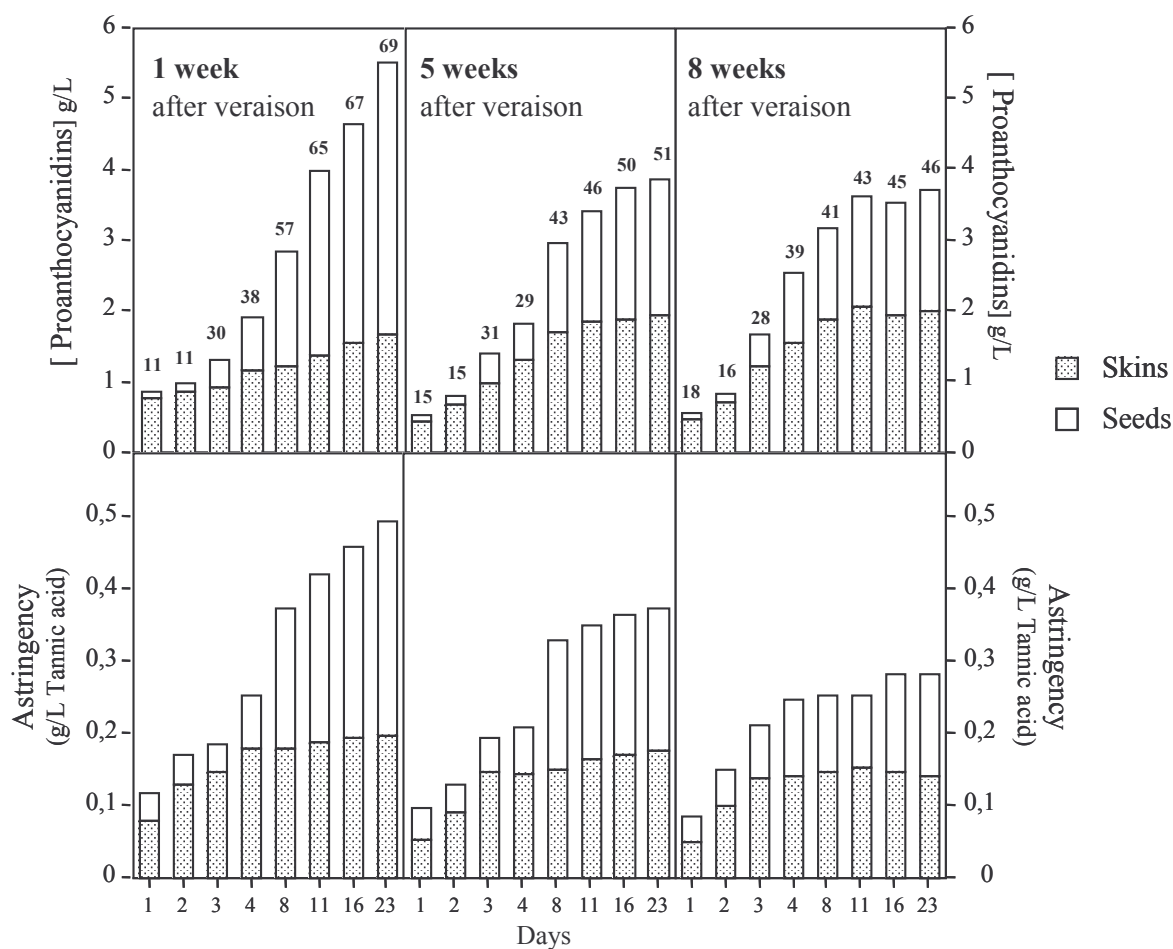
All data are expressed as the average values of three replicates  $\pm$  standard deviation. 1 weeks ( $\blacksquare$ ), 5 weeks ( $\blacklozenge$ ) and 8 weeks ( $\circ$ ) after veraison.

Figure. 4. Influence of maceration time on astringency at different ripening stages.



All data are expressed as the average values of three replicates  $\pm$  standard deviation. 1 weeks (—■—), 5 weeks (—◆—) and 8 weeks (—○—) after veraison.

Figure 5: Relation between the astringency levels with proanthocyanidin concentrations from skins and seeds at different ripening stages and maceration lengths



All data are expressed as the average values of three replicates  $\pm$  standard deviation. Numbers on the graphics indicate the percentage of proanthocyanidins from seeds in an hypothetical red wine.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

## CAPITULO IV

---

# INFLUENCIA DEL USO DE LA MICROOXIGENACIÓN ANTES DE LA CRIANZA EN BARRICA DE ROBLE SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA Y LA ASTRINGENCIA.

---

Influence of Micro-Oxygenation Treatment  
before Oak Aging on Phenolic Compounds  
Composition, Astringency, and Color of Red  
Wine.

Artículo Publicado en:

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*  
2006 Vol.54 Núm.12 Pag: 4246- 4252

---



*Bar en el folies-Bergère, Manet (1832-1883)*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007



## Influence of Micro-Oxygenation Treatment before Oak Aging on Phenolic Compounds Composition, Astringency, and Color of Red Wine

MARÍA DEL CARMEN LLAUDY,<sup>†</sup> ROSER CANALS,<sup>†</sup> SUSANA GONZÁLEZ-MANZANO,<sup>‡</sup>  
JOAN MIQUEL CANALS,<sup>†</sup> CELESTINO SANTOS-BUELGA,<sup>‡</sup> AND  
FERNANDO ZAMORA\*<sup>†</sup>

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona (CeRTA),  
Universitat Rovira i Virgili, Campus de Sescelades, C/ Marcel·li Domingo s/n,  
43007-Tarragona, Spain, and Laboratorio de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia,  
Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno s/n, 37007-Salamanca, Spain

Micro-oxygenation is usually applied to red wines as a cheaper alternative to oak aging. It has been suggested, however, that micro-oxygenation can also be used to complement oak aging in order to improve the quality of very astringent and herbaceous red wines. In this paper we study how applying the micro-oxygenation technique before oak aging affects the composition and quality of astringent red wines. When this technique is applied prior to oak aging, the wines have a slightly less intense red color and significantly higher levels of combined and free anthocyanins and ethyl-bridged anthocyanin–flavanol pigments. On the other hand, no differences in other newly formed pigments are found. Applying micro-oxygenation before oak aging does not affect the total proanthocyanidin concentration, but it produces wines with a slightly (though significantly) higher mean degree of proanthocyanidin polymerization and a drastically lower astringency. These wines also present a clearer impact of wood aromas.

**KEYWORDS:** Wine; phenolic compounds; micro-oxygenation; oak aging

### INTRODUCTION

High-quality red wines are traditionally stored for a long time in oak barrels to improve their sensorial attributes. Clearly, wood provides many substances that enhance the intensity and complexity of wine flavor (1). However, oak aging also leads to color stabilization, lower astringency, and the disappearance of excess vegetative notes. These latter transformations seem to be associated with small quantities of oxygen that penetrate the porosity of the wood, the interstices between staves, and the bunghole (2).

The dissolved oxygen leads to the formation of ethanal from ethanol. The ethanal can in turn react with flavanols to induce the formation of a very reactive carbocation that quickly reacts either with another flavanol molecule or with an anthocyanin, producing ethyl-bridged flavanol–flavanol and flavanol–anthocyanin oligomers (3). More recently, it has been reported that ethanal also participates in the formation of new pigments such as vitisin B and other pyranoanthocyanins (4, 5).

According to these data, oak aging should increase both the proanthocyanidin degree of polymerization and anthocyanin–flavanol combinations. Some authors have suggested that these

processes are responsible for the color stabilization and lower astringency observed during oak aging (3–6). However, it has recently been shown that the compounds formed by ethyl bridges are unstable (7).

Oak aging is an expensive and laborious process that cannot be used for all wines. Micro-oxygenation has therefore been proposed for reproducing, and even accelerating, the transformations of color and phenolic compounds that take place during oak aging (8).

The technique involves providing a controlled flow of oxygen to the wine. The amount of oxygen must be sufficient to produce a high enough ethanal concentration for inducing the polymerization and combination reactions (9, 10). Too great an oxygen flow may be unsuitable, however, as this can lead to the oxidation of aromas, the precipitation of high-molecular-weight polymers, and browning.

The use of micro-oxygenation to stabilize the color and decrease the astringency and herbaceous characters of wine has proved highly successful (11), and the technique is now used in wineries around the world as a cheaper alternative to oak aging. Nevertheless, the micro-oxygenation provides neither the flavors nor ellagic tannins that it gives the contact with the oak wood.

Some winemakers also recommend using micro-oxygenation as a complementary technique to oak aging. Some astringent

\* To whom correspondence should be addressed. Phone: +34977558679.  
Fax: +34977558686. E-mail: fernando.zamora@urv.cat.  
<sup>†</sup> Universitat Rovira i Virgili.  
<sup>‡</sup> Universidad de Salamanca.

and herbaceous wines can retain these negative characteristics even after a long period of oak aging (12). In such cases, applying micro-oxygenation before oak aging could help to reduce these negative sensory attributes (13).

Some publications in the literature have studied the influence of micro-oxygenation on wine color, composition, and sensory attributes (10–14). To our knowledge, however, none of these have studied the application of this technique before oak aging for the treatment of very astringent wines.

In this paper, therefore, we study how applying a micro-oxygenation treatment prior to oak aging affects the phenolic composition, astringency, and color of a very astringent red wine.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** HPLC-grade methanol, acetonitrile, and formic acid were purchased from Merck (Mollet del Vallès, Spain). Epicatechin, ovalbumin, tannic acid, and 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACH) were purchased from Sigma (Madrid, Spain). The other chemicals were of high purity and purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

**Wines.** This study was carried out with a very astringent red wine from the *Vitis vinifera* cv Cabernet sauvignon from the 2003 crop. The wine (1500 L) was obtained from the experimental cellar of the Faculty of Enology of the Rovira i Virgili University in Constantí (Tarragona, Spain). Grapes were harvested when they were not completely ripened. Winemaking was carried out trying to extract a high proanthocyanidin concentration in order to obtain a very astringent wine. The length of the maceration was 21 days. Two "rack and return" by day were carried out during the first 4 days of fermentation. After that, a daily pump over was done until the end of maceration. Press wine was added to the mixture to enhance astringency and herbaceous characters.

The analytical characteristics of the wine at the start of the experiment were as follows: ethanol content, 12.8%; titratable acidity, 5.2 g of tartaric acid/L; volatile acidity, 0.52 g of acetic acid/L; pH, 3.74; residual sugars, 1.96 g/L; sugar free extract, 24.6 g/L; free SO<sub>2</sub>, 23 mg/L; total SO<sub>2</sub>, 60 mg/L.

**Oak Barrels.** Six new American oak barrels each with a capacity of 225 L were used. The cooperage (Torné, Vilafranca del Penedès, Spain) guaranteed the maximum homogeneity between casks.

**Micro-Oxygenation Equipment.** The multiple diffuser micro-oxygenator (VISIO 2/6-Oenodev, France) was connected to three stainless steel tanks of 275 L. These tanks were 2.2 m in height, had a diameter of 0.4 m, and were equipped with a ceramic diffuser placed at 10 cm above the bottom of the tank. These dimensions were necessary so that the oxygen bubbles produced during micro-oxygenation would have a sufficient height of displacement to guarantee their complete dissolution.

**Experimental Conditions.** All wines were kept at a temperature of 16 ± 2 °C. Around 675 L of the wine was distributed in three oak barrels and stored for 8 months (control wine). The wines were then racked individually to three 200 L stainless steel tanks and stored for 3 months to make the total time of conservation in both experimental conditions equal. These experimental conditions (i.e., first, oak aging and afterward, stainless steel conservation) were chosen as control conditions in order to better reproduce the typical procedure of oak aging in commercial cellars.

Simultaneously, 825 L of the same wine was stored in the three micro-oxygenation tanks (275 L in each tank). These wines (MO wine) were kept for 3 months with an oxygen flow of 3 mg/L per month. The wines were then racked individually to three barrels without any previous step and stored there for 8 months.

Free sulfur dioxide was analyzed every 15 days by the OIV method (15) and corrected to be kept at 25–30 mg/L (0.29–0.35 mg/L of molecular sulfur dioxide). After the experiment, sulfur dioxide was added to maintain free sulfur dioxide concentration at 25 mg/L. The wines were immediately bottled in 750 mL bottles and closed with 38 mm × 21.5 mm synthetic stoppers (Supreme Corq, Supreme Corq, LL; WA). Just before the chemical analyses, the wines were centrifuged (10 000g; 10 min).

**Color Parameters.** The components yellow (A420 nm), red (A520 nm), and blue (A620 nm) and the color intensity (CI) were estimated using the method described by Glories (16). The CIELAB parameters, lightness (L\*), chroma (C\*), and hue (H\*) were determined according to Ayala et al. (17).

**Anthocyanin Analysis.** Total anthocyanins were determined using the method described by Niketic-Alksic and Hrazdina (18). Free and combined anthocyanins were calculated using the PVPP index (16). The anthocyanin fraction contributing to wine color was calculated using the ionization index (19). The percentage of color due to copigmentation was calculated according to Boulton (20).

**HPLC Analyses of Anthocyanins and Derived Pigments.** Analyses were performed in a Hewlett-Packard 1100 series liquid chromatograph. Separation was achieved on a 5 µm AQUA C18 150 mm × 4.6 mm column (Phenomenex, Torrance, CA) thermostated at 35 °C. No precolumn was used for the HPLC analysis of the pigment profiles. Even if the chromatogram baselines improve with the use of a precolumn, some retention of complex pigments may occur. The solvents used were (A) 0.1% trifluoroacetic acid in water and (B) HPLC-grade acetonitrile. The following gradient was established: isocratic 10% B for 5 min, 10–15% B for 15 min, isocratic 15% B for 5 min, 15–18% B for 5 min, and 18–35% B over 20 min. A flow rate of 0.5 mL/min was used. Double on-line detection was carried out in a diode array spectrophotometer (DAS), using 520 nm as the preferred wavelength, in a mass spectrometer (MS) connected to the HPLC system via the DAS cell outlet. The mass spectrometer was a Finnigan LCQ (San Jose, CA) equipped with an ESI source and an ion trap mass analyzer, which were controlled by the LCQ navigator software. Nitrogen was used as both auxiliary and sheath gas at flow rates of 6 and 1.2 L/min, respectively. The capillary voltage was 4 V, and the capillary temperature was 195 °C. Spectra were recorded in positive ion mode between *m/z* 150 and 1500. The MS detector was programmed to perform a series of three consecutive scans: a full scan, a zoom scan of the most abundant ion in the first scan, and an MS–MS scan of the most abundant ion, using a normalized collision energy of 45%. The compounds were identified from their elution characteristics, UV–vis spectra, molecular ion, and MS<sup>2</sup> fragmentation patterns by comparison with previous data (21). Pigment quantification was obtained from the areas of their chromatographic peaks recorded at 520 nm and comparison with calibration curves obtained with an external standard of malvidin 3-glucoside (Extrasynthese, Lyon, France).

**Other Phenolic Compounds.** The contents of phenolic compounds were determined by measuring the absorbance at 280 nm (19). Total proanthocyanidins were estimated according to Ribéreau-Gayon and Stonestreet (22). Dimethylaminocinnamaldehyde index (DMACH index) was measured according to Nagel and Glories (23).

**Mean Degree of Polymerization (mDP) and Percent of Monomers.** The proanthocyanidin mDP and the percentage of monomers were measured according to Souquet et al. (24). A volume of 4 mL of wine was evaporated on Genevac apparatus and then resolubilized in 4 mL of water with 2% acetic acid. A volume of 2 mL of wine was eluted on SPE cartridges waters tc18 (500 mg) which were previously preconditioned with 5 mL of water following with 10 mL of methanol and then with 10 mL of the first solvent, water–2% acetic acid. After rinsing the cartridge with 5 mL of water the components of interest were eluted with 8 mL of methanol. This fraction was evaporated. A volume of 100 µL of 0.1 N HCl in methanol containing 50 g/L of phloroglucinol and 10 g/L of ascorbic acid reacted with this fraction at 50 °C for 20 min and then was combined with 100 µL of aqueous sodium acetate (200 mM).

The proanthocyanidin composition of the wine was determined by phloroglucinolysis after isolating and calibrating each of the reaction products.

Phloroglucinol adducts were analyzed by HPLC. The column was a C18 (Atlantis dc 18 water 4.6 mm × 250 mm; Waters Corporation, Milford, MA) that exhibited enhanced retention of polar compounds. The method used a binary gradient with mobile phases containing 2% formic acid in water (phase A), 1% v/v aqueous acetic acid (Phase A), and 2% formic acid in acetonitrile/water (80/20) (phase B). Eluting peaks were monitored at 280 nm. The elution conditions were 1.0 mL/min; 0% B for 5 min, a linear gradient from 0 to 20% B in 55 min.

The column was then washed with 90% B for 10 min and reequilibrated with 0% B for 5 min before the next injection.

The LC-MS analyses in positive mode were performed on the same column to identify the components of the reaction.

The mDP was calculated by adding up all the units (lower and upper units) and dividing by the sum of the terminal units in mol. The percentage of each monomer in the polymer was calculated by dividing each monomer by the all monomers and expressing this as a percentage (24–26).

**Astringency.** Astringency was estimated using ovalbumin as a precipitation agent and tannic acid solutions as standards in accordance with the previously described method (27).

**Sensory Analysis.** All the wines were tasted by a group of 10 expert enologists from the Rovira i Virgili University 6 weeks after bottling. A previous sensory season has been developed to homogenize the criteria. Two sensory trials were conducted. The first of these was a triangular test between the control and the micro-oxygenated wine in which the tasters were only asked to recognize the different glass. The second was a descriptive trial in which each expert evaluated each wine for 10 sensorial attributes: five olfactory (fruit, green pepper, toasting, spices, and coffee) and five gustatory (body, mouth feel, persistence, bitterness, and astringency), on a scale from 1 to 10. The values indicate the intensity of the sensation for each attribute.

**Statistics.** For color and chemical analysis, all the data are expressed as the arithmetic average  $\pm$  the standard deviation from three replicates for each experimental condition. For the descriptive sensorial analysis, all the data are expressed as the arithmetic average from the 10 expert tasters. In this case, the standard deviation is not included in order to avoid excessively complicating the graphs. Statistical comparisons between values were established with Student's *t*-test using Statview (SAS Institute Inc., Cary, NC, version 4.01). In the triangle test, statistically significant differences between wines were determined by considering a *p* value of less than 0.05 (28).

## RESULTS AND DISCUSSION

As we explained above, this work was performed to compare the application of a micro-oxygenation treatment before oak aging with a process that uses oak aging only. The treatment for the experimental group was clear (3 months in stainless steel with micro-oxygenation prior to 8 months of oak aging). However, the treatment for the control group was not so obvious. If the control wine had spent only 8 months of oak aging, it would be not comparable with the micro-oxygenated wine because the time of evolution was not the same. Therefore, we decided to maintain the wine for 3 months in stainless steel tanks to equalize the time of storage. The scientific logic would suggest storing the control wine for 3 months in stainless steel tanks before oak aging to reproduce exactly the conditions of the micro-oxygenated wine. However, these conditions are typically not used in wineries. Nowadays, the wine cellars put the wine in casks as early as possible, even before malolactic fermentation. The reason for proceeding this way is that winemakers consider this practice to be good to enhance wine quality, and it also allows the producer to obtain a stabilized and aromatized wine before (19, 29). For this reason, we decide to first perform oak aging and afterward store the wine in stainless steel tanks, to better reproduce the typical conditions of commercial cellars.

Table 1 shows the color parameters of the wine at the beginning of the experiment and after the application of both experimental conditions. In general, the changes in color during aging were as expected. Both the MO and control wines presented a lower color intensity (CI) and a higher hue (H\*) and luminosity (L\*) than their initial values. However, the chroma (C\*) was almost not modified.

When we compared the color parameters of the wine that was micro-oxygenated before oak aging (MO wine) with those

Table 1. Color Parameters<sup>a</sup>

	initial wine	control wine	MO wine
A420	0.460	0.488 $\pm$ 0.023 b	0.465 $\pm$ 0.010 a
A520	0.925	0.847 $\pm$ 0.040 b	0.791 $\pm$ 0.023 a
A620	0.232	0.218 $\pm$ 0.011 b	0.177 $\pm$ 0.006 a
CI	16.17	15.53 $\pm$ 0.74 b	14.33 $\pm$ 0.38 a
C*	54.30	53.05 $\pm$ 0.09 a	54.62 $\pm$ 0.60 b
L*	37.00	38.90 $\pm$ 1.90 a	42.73 $\pm$ 0.93 b
H*	7.95	14.53 $\pm$ 0.17 a	16.33 $\pm$ 0.21 b

<sup>a</sup> All data are expressed as the average of three replicates  $\pm$  standard deviations (*n* = 3). CI, color intensity; C\*, chroma; L\*, luminosity; H\*, hue. Statistical analysis: one-factor ANOVA and Scheffé's test (both *p* = 0.05). Different letters indicate statistical differences.

Table 2. Spectrophotometric Analysis of Anthocyanins and Related Parameters<sup>a</sup>

	initial wine	control wine	MO wine
free anthocyanins (mg/L)	269	130 $\pm$ 16 a	178 $\pm$ 16 b
combined anthocyanins (mg/L)	145	194 $\pm$ 2 a	210 $\pm$ 10 b
total anthocyanins (mg/L)	414	322 $\pm$ 13 a	389 $\pm$ 9 b
ionization index (%)	35.3	51.7 $\pm$ 2.3 a	48.9 $\pm$ 4.5 a
copigmentation index (%)	14.8	11.6 $\pm$ 1.8 a	10.6 $\pm$ 2.2 a

<sup>a</sup> All data are expressed as the average of three replicates  $\pm$  standard deviations (*n* = 3). Statistical analysis: one-factor ANOVA and Scheffé's test (both *p* = 0.05). Different letters indicate statistical differences.

of the wine that was only oak aged (control wine) we found some statistically significant differences. The values of CI and the three color components (A420-yellow, A520-red, and A620-blue) were significantly lower in the MO wine. On the other hand, chroma (C\*), hue (H\*), and especially luminosity (L\*) significantly increased when micro-oxygenation was applied before oak aging. Micro-oxygenation before oak aging therefore seems to produce wines with a slightly less intense color and slightly more evolved to yellowish nuances. Although no information is published about the effect of micro-oxygenating wines before oak aging, these results agree in general terms with the observed effect of oxygen on the evolution of wine color (30, 31).

Table 2 shows the results from the spectrophotometric analysis of anthocyanins and other related parameters. Total and free anthocyanins decreased during the aging period, whereas the combined anthocyanins increased.

Simultaneously, the contribution of anthocyanins to wine color (ionization index) increased and the percentage of the color due to the copigmentation process decreased. Both changes were probably due to the augmentation of the combination of anthocyanins with proanthocyanidins. These results agree with those published by other authors (19, 20, 32).

Some statistically significant differences were found between MO and control wines regarding anthocyanins. As expected, the concentration of combined anthocyanins in MO wines was significantly higher than in control wines. This indicates that color is more stable in the MO wines than in control wines (6). Unexpectedly, however, the MO wine also had a higher free anthocyanin concentration than the control wine. These results were confirmed by the HPLC analysis of anthocyanins (Table 3).

The total anthocyanin concentrations determined by HPLC (33) were much lower than those obtained by spectrophotometry (19). This could be logical as spectrophotometric analysis is

*Capítulo IV. Influencia del uso de la microoxigenación antes de la crianza...*

## Micro-Oxygenation Treatment of Red Wine

J. Agric. Food Chem., Vol. 54, No. 12, 2006 4249

Table 3. HPLC Analysis of Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Pigments<sup>a</sup>

	control wine	MO wine
anthocyanidin-3-monoglycosides (mg/L)	28.68 ± 4.04 a	60.38 ± 7.71 b
acetylated anthocyanins (mg/L)	5.70 ± 0.44 a	11.00 ± 1.61 b
<i>p</i> -coumaroyl anthocyanins (mg/L)	4.17 ± 0.26 a	6.00 ± 0.57 b
total anthocyanins (mg/L)	37.34 ± 4.73 a	77.38 ± 9.73 b
vitisin A (mg/L)	6.74 ± 0.08 a	6.71 ± 0.17 a
vitisin B (mg/L)	2.06 ± 0.07 a	1.90 ± 0.10 a
vinylcatechin-malvidine (mg/L)	4.14 ± 0.13 a	4.29 ± 0.04 a
vinylphenol-malvidine (mg/L)	1.57 ± 0.03 a	1.59 ± 0.04 a
catechin-ethyl-malvidine (mg/L)	4.29 ± 0.07 a	4.54 ± 0.10 b

<sup>a</sup> All data are expressed as the average of three replicates ± standard deviations ( $n = 3$ ). Statistical analysis: one-factor ANOVA and Scheffe's test (both  $p = 0.05$ ). Different letters indicate statistical differences.

known to overestimate the total anthocyanin concentration because in its measurement it includes the contribution from other pigments (34), whereas only free anthocyanins are detected by the HPLC method (33). With the PVPP index we can indirectly quantify both free anthocyanins and, by subtraction, the combined ones (16). In any case, the free anthocyanin values obtained by this method were still higher than those obtained by HPLC, probably because the different way used to express the results in each case, which makes them not directly comparable.

Despite the different values obtained by HPLC and spectrophotometric methods, the anthocyanin concentrations showed the same trend. The MO wine had significantly higher levels of anthocyanidin-3-glycosides and acetylated and *p*-coumaroyl anthocyanins than the control wine.

These results are surprising. Micro-oxygenation favors the combination of anthocyanins and flavanols via the formation of ethyl bridges (30, 35). A higher combined anthocyanin concentration in MO wines could be therefore completely logical, but simultaneously, a lower free anthocyanin concentration should be expected. A possible explanation for the higher free anthocyanin concentration in MO wine may be the instability of anthocyanin-ethyl-flavanol compounds, which may undergo cleavage of the ethyl bridge and allow free anthocyanins and structural rearrangements (7). Theoretically, in the first 3 months of aging, the formation of these compounds in the MO wine must be higher than in the control wines because of the micro-oxygenation process and the subsequent availability of acetaldehyde (35–37). In further stages, a degradation of the ethyl-linked oligomers would take place to again releasing free anthocyanins.

Table 3 also shows the concentration of the anthocyanin-derived pigments. No important differences were found between the composition of the control wine and the MO wine. The levels of pyranoanthocyanins such as vitisin A, vitisin B, and vinylcatechin- and vinylphenol-anthocyanin adducts were almost identical. We should point out that, as pyruvic acid and vinylphenol (precursors of vitisin A and vinylphenol-anthocyanins) are products of the metabolism of microorganisms (38), we should expect that vitisin A and vinylphenol-anthocyanin adducts to be present at similar levels in both wines. Microorganisms also produce ethanal, but this compound may also derive from the oxidation of ethanol. We should therefore expect that the MO wine have higher levels of ethyl-linked products and, possibly, vitisin B. The origin of vinylcatechin-anthocyanin adducts is more debatable. It has been suggested that vinylcatechin can derive either from the reaction between

Table 4. Total Phenolic Compounds, Proanthocyanidins, and Related Parameters<sup>a</sup>

	initial wine	control wine	MO wine
A280 nm	78.0	75.6 ± 1.5 a	76.7 ± 0.3 a
proanthocyanidins (g/L)	4.50	4.12 ± 0.05 a	4.08 ± 0.01 a
DMACH index	46.7	31.3 ± 1.5 a	32.8 ± 1.4 a
astringency (g/L)	0.707	0.596 ± 0.024 b	0.383 ± 0.025 a
mDP		4.53 ± 0.11 a	4.77 ± 0.01 b
(+)-catechin (%)		15.94 ± 0.24 a	15.92 ± 0.05 a
(-)-epicatechin (%)		60.19 ± 0.23 a	60.42 ± 0.27 a
(-)-epigallocatechin (%)		21.17 ± 0.15 a	21.03 ± 0.33 a
(-)-epicatechin gallate (%)		2.71 ± 0.13 a	2.65 ± 0.02 a

<sup>a</sup> All data are expressed as the average of three replicates ± standard deviations ( $n = 3$ ). DMACH, dimethylaminocinnamaldehyde; mDP, mean degree of polymerization. Statistical analysis: one-factor ANOVA and Scheffe's test (both  $p = 0.05$ ). Different letters indicate statistical differences.

catechin and acetaldehyde or from the degradation of catechin-ethyl-anthocyanin adducts (39) and that vinylcatechin later reacts with the anthocyanin to yield the derived pigment. Higher levels of this type of pigments would therefore be expected in MO wines. However, no important differences were found in the concentrations of vitisin B or vinylcatechin-anthocyanin adducts in these wines. We should bear in mind that both wines were maintained in new oak barrels for 8 months and that oak aging also implies a certain micro-oxygenation. Also, most of these anthocyanin-derived pigments are probably produced during the fermentation process (38). This may be why no major differences were found between the anthocyanin-derived pigments in the MO wine and the control wine.

It has been reported that catechin-ethyl-anthocyanin adducts are produced during red wine micro-oxygenation (40). Our results agree with this, though the differences between the wines are very slight and just a minor but significant increase of 6% was detected in the levels of catechin-ethyl-malvidin in the MO wine with respect to that of the control wine (see Table 3). This small difference could be due to instability of the ethyl-bridged compounds and their tendency to increase in size in the presence of available ethanal (7, 9, 41).

Table 4 shows the results for total phenolic compounds, proanthocyanidins, and other related measurements. Generally, proanthocyanidin concentration decreases throughout aging in both wines. This decrease may be explained by the precipitation of some of the polymers formed during the aging period (19). This increase in the degree of polymerization during wine aging is supported by the decrease in the DMACH index. The DMACH reacts with the catechin moieties in the proanthocyanidin ends, so its reactivity diminishes as the degree of polymerization increases. As we expected (42), the increase in the degree of polymerization and proanthocyanidin precipitation throughout aging was accompanied by a decrease in astringency, measured by chemical analysis. On the other hand, despite the decrease in proanthocyanidin concentration, the differences in total phenolic compounds (A280 nm) were only slight. This is probably because of the precipitation of the proanthocyanidins is compensated by the dissolution of other phenolic compounds from the wood of the casks (1, 6, 43).

No statistically significant differences were found between the proanthocyanidin concentrations, A280 nm, or DMACH indexes of the control wine and the MO wine. However, the MO wine was 35% less astringent than control wine. This supports the suitability of using micro-oxygenation to treat very astringent wines before oak aging.

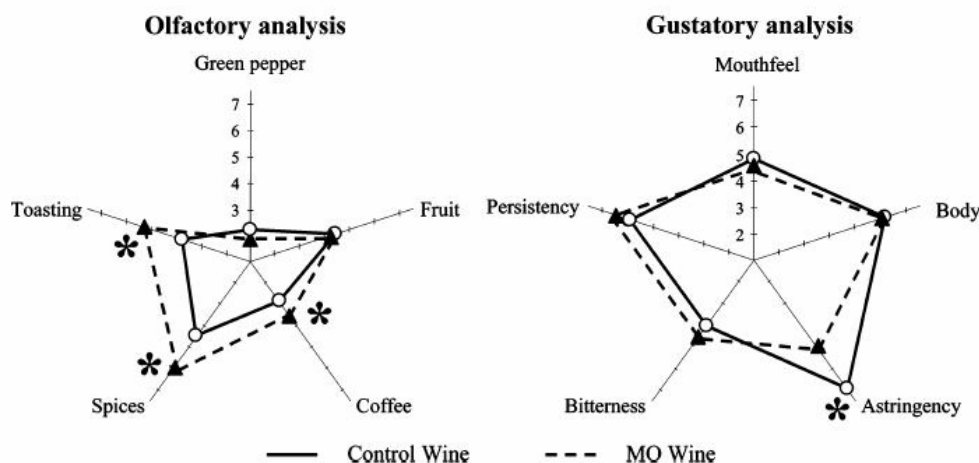


Figure 1. Sensory analysis of control and micro-oxygenation wines. All data are the arithmetical average corresponding to the results of 10 tasters. The \* indicates the existence of statistically significant differences.

Table 4 also shows the mDP of the proanthocyanidins and their monomeric composition. Though the differences are small (5%), the mDP of MO wine is significantly higher than that of the control wine which confirms that, as expected, micro-oxygenation favors the polymerization of proanthocyanidins (10, 12, 35, 37). The increase in the mDP was not detected in the DMACH index. As shown above, this index is only an indirect measurement of the polymerization degree and so is less precise than using acid cleavage in the presence of phloroglucinol (43–46). On the other hand, no significant differences were found between the monomeric compositions of the proanthocyanidins of these wines.

Some authors have reported that the size of the proanthocyanidin molecule is related to astringency: the greater the mDP, the greater the astringency (47, 48). In our case, the MO wines present a slightly, but significantly, higher mDP, but they are much less astringent. The reason for this apparent contradiction may be related to the fact that many other factors influence wine astringency. Some authors have suggested that the combination of proanthocyanidins and anthocyanins may be responsible for the decrease in astringency during oak aging (49, 50). Our results indicate that MO wines have a significantly higher concentration of catechin–ethyl-malvidin and combined anthocyanins than control wine. Although these differences are small, they may partially explain the lower astringency of the MO wines.

On the other hand, the sensory comparison of the two wines by the triangular test indicates that 7 out of 10 tasters differentiated between the two wines. According to the statistical tables (28), these results are statistically significant ( $p < 0.05$ ) and confirm that micro-oxygenation before oak aging produces a different wine.

Figure 1 shows the results of the descriptive sensory analysis of the two wines. The MO wine had significantly higher levels of toasting, spices, and coffee aromas and a significant lower astringency than the control wine. No differences were found in the other sensorial attributes. The higher intensity of some of the olfactory attributes could be due to the fact that MO wine was more recently extracted from wood than control wine or because micro-oxygenation before oak aging accentuates these aromatic notes. Similarly, the observed sensory astringency had the same tendency as the astringency determined by chemical

analysis, which confirms micro-oxygenation before oak aging may help to diminish this disagreeable sensation.

We can conclude that applying micro-oxygenation before oak aging presents the disadvantage of producing wines with a slightly less intense red color and somewhat more evolved toward yellowish nuances. However, this technique has the advantages that the wines obtained have a higher anthocyanin concentration, a clearer impact of oak aromas, and especially, a much lower astringency. Applying micro-oxygenation before oak aging is therefore mainly advised for very astringent wines such as press wines or wines obtained from not well-ripened grapes.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Hilario Tavares for analytical support and Guillem Roig (AZ3) for technical support.

#### LITERATURE CITED

- (1) Puech, J. L.; Feulliat, F.; Mosedale, J. R. The tannin of oak heartwood, structure, properties and their influence on wine flavor. *Am. J. Enol. Vitic.* 1999, 50, 4, 469–478.
- (2) Vivas, N.; Glories, Y.; Raymond, P. Quelques observations sur l'évolution des qualités organoleptiques des vins rouges au cours de leur élevage en barriques neuves. *Rev. Fr. Oenol.* 1997, 166, 31–34.
- (3) Silva, A.; Lambri, M.; de Faveri, D. M. Influenza dell'ossigeno in macerazione sulla struttura polifenolica ed aromatica di vini rossi di qualità. *Ind. Bevande* 2002, Settembre, 332–341.
- (4) Fulcrand, H.; Benabdeljalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry* 1998, 47, 1401–1407.
- (5) Mateus, N.; Silva, A. M.; Rivas-Gonzalo, J.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V. Identification of anthocyanin–flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2110–2116.
- (6) Vivas, N.; Glories, Y. Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 1996, 47, 103–107.
- (7) Escribano-Bailón, T.; Alvarez-García, M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Heredia, F. J.; Santos-Buelga, C. Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde mediated condensation between malvidine 3-*o*-glucoside and (+)-catechin. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1213–1217.

- (8) Parish, M.; Wollan, D.; Paul, R. Micro-oxygenation—a review. Annual Technical issue. *The Australian Grapegrower & Winemaker*, 2000, pp 47–50.
- (9) Es-Safi, N. E.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, Y. Studies on the acetaldehyde induced condensation of epicatechin and malvidin 3-O-Glucoside in a model solution system. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 2096–2102.
- (10) Nikfardjam, M. P.; Dykes, S. Micro-oxygenation research at Lincoln University. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 2002, pp 66–68.
- (11) Nikfardjam, M. P.; Dykes, S. Micro-oxygenation research at Lincoln University. Part 2 Sensory changes in Pinor Noir. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 2002, pp 88–90.
- (12) Nikfardjam, M. P.; Dykes, S. Micro-oxygenation research at Lincoln University. Part 3 Polyphenolic analysis of Cabernet Sauvignon wine under the application of micro-oxygenation. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 2003, pp 41–44.
- (13) Bertuccioli, M.; Zini, S.; Siliani, A.; Picchi, M. Valutazione sensoriale dei risultati di tecniche di vinificazione. *Ind. Bevande* 2002, Settembre, 350–356.
- (14) Morata, A.; Calderón, F.; Gonzalez, M. C.; Colomo, B.; Suarez, A. Crianza sobre lías, chip, microoxigenación, utilización conjunta en el envejecimiento de vinos tintos. Ventajas del uso de levaduras seleccionada. *Enólogos* 2005, 34, 52–56.
- (15) O.I.V. *Le Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Mouts*; Paris, France, 1990.
- (16) Glories, Y. La couleur des vins rouges. 2EnDash
- (17) Ayala, F.; Echávarri, J. F.; Negueruela, A. I. A new simplified method for measuring the color of wines I. Red and rose wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 1997, 48, 357–363.
- (18) Niketic-Aleksic, G. K.; Hrazdrina, G. Quantitative analysis of the anthocyanin content in grape juices and wine. *Lebensm.—Wissen. Technol.* 1972, 5 (5), 163–165.
- (19) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Mayjean, A.; Dubourdieu, D. *Tratado de Enología*; Química del vino, estabilización y tratamientos; Capítulo 6 Compuestos fenólicos; Capítulo 13 Crianza de los vinos tintos en cuba y en tonel; Los fenómenos de envejecimiento; Ediciones Mundiprensa: Argentina, 2003; pp 191–228, 497–505.
- (20) Boulton, R. B. The pigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine, a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* 2001, 52, 67–87.
- (21) Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. Separation of pyranoanthocyanins from red wine by column chromatography. *Anal. Chim. Acta* 2004, 513, 305–318.
- (22) Ribéreau-Gayon, J.; Stonestreet, E. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.* 1966, 48, 188–196.
- (23) Nagel, C. W.; Glories, Y. Use of a modified dimethylamino-cinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *Am. J. Enol. Vitic.* 1991, 42 (4), 364–366.
- (24) Souquet, J.-M.; Mazauric, J.-P.; Meudec, E.; Preys, S.; Morel-Salmi, C.; Cheynier, V. Comparaison on different methods of depolymerization to the characterization and quantification of proanthocyanidins in grape seed, grape skin and wine. Proceedings of the XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland, 2004; pp 693–694.
- (25) Kennedy, J.; Jones, G. P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1740–1746.
- (26) Rigaud, J.; Perez-Ilzarb, X. Micro method for the identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1991, 540, 401–405.
- (27) Llaudy, M. C.; Canals, R.; Canals, J. M.; Rozès, N.; Arola, L.; Zamora, F. New method for evaluating astringency in red wine. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 742–746.
- (28) Jackson, R. S. *Wine Tasting. A Professional Hand Book*; Academic Press: 2002; pp 177–178.
- (29) Zamora, F. *Elaboración y crianza del vino Tinto; Aspectos científicos y prácticos*; AMV Ediciones/Mundiprensa: Madrid, Spain, 2003.
- (30) Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine making. *Anal. Chim. Acta* 2002, 458, 15–27.
- (31) Pérez-Magariño, S.; González-San José, M. L. Efecto de la aplicación de la microoxigenación durante la fermentación de vinos tintos. *Tecnol. Vino* 2003, Noviembre–Diciembre, 107–112.
- (32) Pérez-Magariño, S.; González-San José, M. L. Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grape harvested at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 1181–1189.
- (33) Santos-Buelga, C.; Williamson, G. *Methods in Polyphenol Analysis*; The Royal Society of Chemistry: U.K., 2003; Chapter 15, pp 338–358.
- (34) Rivas-Gonzalo, J. C.; Gutierrez, Y.; Hebrero, E.; Santos Buelga, C. Comparison of methods for the determination of anthocyanins in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 1992, 43 (2), 210–214.
- (35) Atanasova, V. Réactions des composés phénoliques dans les vins rouges induites par la technique de micro-oxigénation. Caractérisation de nouveaux produits de condensation des anthocyanes avec l'acétaldéhyde. Deuxième Partie, Étude de l'influence de la technique de micro-oxigénation sur la composition phénolique du vin. Thèse Doctorat Science des Aliments, Ensa Montpellier, 2003, pp 83–118.
- (36) Moutounet, M.; Mazauric, J.-P.; Ducoumau, P.; Lemaire, T. Wine microoxygenation. Principles and technological applications. *Ind. Bevande* 2001, 30 (173), 253–258.
- (37) Sullivan, P.; Fugelsang, K.; Gump, B.; Zoeklein, B. Effects of microoxygenation on red wine quality. ASEV 53rd Annual Meeting. *Am. J. Enol. Vitic.* 2002, 53 (3), 255A.
- (38) Morata, A.; Gomez Cordobes, M. C.; Colomo, B.; Suarez, J. A. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *saccharomyces cerevisiae*, relationship with vitisina A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7402–7409.
- (39) Mateus, N.; Carvalho, E.; Carvalho, A. R. F.; Melo, A.; Gonzalez-Paramás, A. M.; Santos-Buelga, C.; Silva, A. M. S.; de Freitas, V. Isolation and structural characterization of new acylated anthocyanin-vinyl-flavanol pigments occurring in aging red wines. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 277–282.
- (40) Boulet, J. C.; Moutounet, M. La microoxigenación de los vinos. *Enología, Fundamentos Científicos y Técnicos*; Flanz; AMV Ediciones/Ed. Mundi- Prensa: Spain, 2003; pp 114–121.
- (41) Rivas-Gonzalo, J. C.; Bravo-Haro, S.; Santos-Buelga, C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin-3-glucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 144–149.
- (42) Vidal, S.; Cartadale, D.; Souquet, J. M.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solution. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2261–2266.
- (43) Moutounet, M.; Rabier, P.; Sami, F.; Scalbert, A. Les tannins du bois de chêne. Les conditions de leur présence dans les vins. *Vigne et Vin Publications Internationales-Martillac*, 1992, 33, pp 75–79.
- (44) Vivas, N.; Glories, Y.; Lagune, L.; Saucier, C.; Augustin, M. Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au p-diméthylaminocinnamal-déhyde. *J. Sci. Vigne Vin* 1994, 28, 319–336.
- (45) Peyrot des Gachons, C.; Kennedy, J. A. Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction in red wine. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5877–5881.
- (46) De Beer, D.; Harbertson, J. F.; Kilmartin, P. A.; Roginsky, V.; Barsukova, T.; Adams, D. O.; Waterhouse, A. L. Phenolics, a comparison of diverse analytical methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 2004, 55, 389–400.

4252 *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 54, No. 12, 2006

del Carmen Llaudy et al.

- (47) Peleg, H.; Bacón, K.; Schlich, P.; Noble, A. C. Bitterness and astringency of flavanol-3-ol monomer, dimer, trimers. *J. Sci. Food. Agric.* **1999**, *79*, 1123–1128.
- (48) Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Chevrier, V.; Waters, E. J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in wine like medium. *J. Sci. Food. Agric.* **2003**, *83*, 564–573.
- (49) Remy, S.; Fulcrand, H.; Labarbe, B.; Chevrier, V.; Moutounet, M. First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin–tannin reactions. *J. Sci. Food. Agric.* **2000**, *80*, 745–751.
- (50) Brossaud, F.; Chevrier, V.; Noble, A. C. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2001**, *7*, 33–39.

---

Received for review November 15, 2005. Revised manuscript received April 5, 2006. Accepted April 10, 2006. We thank CiCYT (AGL 2001-0716 and AGL 2004-02309) and Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu, for financial support.

JF052842T

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007



## CAPITULO V

---

## CONCLUSIONES



*Los Borrachos, Velázquez (1599- 1660)*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

## CONCLUSIONES:

A continuación se presentan las conclusiones derivadas de todo el trabajo experimental que se ha reflejado en esta tesis doctoral.

### NUEVA METODOLOGÍA PARA EVALUAR LA ASTRINGENCIA EN VINO TINTO Y ASPECTOS RELACIONADOS

1. Se ha desarrollado un nuevo método que permite la determinación objetiva de la astringencia de los vinos tintos. Este método, que utiliza ovoalbúmina como agente precipitante de los taninos, y ácido tánico como patrón, es más preciso, rápido, reproducible y se correlaciona mejor que el índice de gelatina con los resultados obtenidos mediante degustación.
2. La aplicación de esta metodología permite visualizar el efecto de algunos componentes no fenólicos de la matriz del vino sobre la astringencia. El pH, la concentración de etanol y de glicerol ejercen un efecto sobre la astringencia. No obstante, los resultados indican que, dentro de los intervalos habituales de dichos parámetros, las posibles variaciones de la astringencia serían moderadas. Por el contrario, la adición de goma arábiga al vino produce una importante disminución de esta propiedad.
3. La ovoalbúmina precipita más ácido tánico que el conjunto de proteínas salivares a la misma concentración proteica. No obstante, ambos modelos de proteína presentan una alta correlación estadística, lo que indicaría un comportamiento similar frente al ácido tánico a pesar de presentar diferentes afinidades hacia él.
4. La aplicación de ovoalbúmina y del conjunto de proteínas salivares como agentes precipitantes dio resultados estadísticamente similares en más del 80 % de los vinos estudiados. Debido a las dificultades metodológicas que entraña la utilización de proteínas de la saliva, la utilización de ovoalbúmina como agente precipitante puede ser una buena solución para la determinación objetiva de la astringencia en vinos.
5. La aplicación de la metodología de determinación de astringencia a lo largo del proceso de polimerización, inducida mediante la adición de etanal a los diferentes monómeros, permite confirmar que la astringencia aumenta a medida que crece el grado de polimerización y ante la presencia de Galato de Epicatequina.
6. La utilización de proteínas salivares como agente precipitante para determinar la astringencia de los polímeros inducidos mediante adición de etanal, da lugar a valores sensiblemente superiores a los obtenidos mediante la utilización de ovoalbúmina. Estos resultados difieren de los obtenidos en vinos tintos, donde apenas había diferencias. Sin embargo, la existencia de una estrecha correlación entre los valores obtenidos con ambos modelos de proteínas, tanto en vino como en los polímeros inducidos, confirmaría un comportamiento

## Capítulo V. Conclusiones

similar de ambos modelos de proteínas a pesar de que puedan presentar afinidades diferentes hacia los diversos compuestos fenólicos.

7. Del conjunto de proteínas presentes en los extractos de saliva, las más reactivas frente a las proantocianidinas inducida por adición de etanal fueron las PRP básicas de bajo peso molecular (14-22 kDa), seguidas de las PRP básicas de alto peso molecular (37-43 Kda). Después se sitúan las proteínas pertenecientes a la banda de las  $\alpha$ -amilasas y PRP básicas glicosiladas, seguidas de la mucina/ lactoferrina. En el caso de los polímeros de epicatequina galato, las PRP ácidas muestran una mayor reactividad.

### INFLUENCIA DE LA MADUREZ Y LA MACERACIÓN EN LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA ASTRINGENCIA DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL RACIMO DE UVA.

8. La madurez de la uva y la duración de la maceración ejercen una gran influencia sobre la extracción de taninos de los diferentes componentes del racimo de uva y su correspondiente astringencia.
9. A medida que la uva madura, disminuye el aporte de tanino de la semilla y de forma paralela también decrece su astringencia. Por el contrario, en las pieles y el raspón, el aporte de tanino aumenta al madurar la uva, si bien la astringencia decrece.
10. Los taninos de las pieles y de los raspones se liberan rápidamente, estabilizándose hacia el día 5 de la maceración. Por el contrario, los taninos de las semillas se solubilizan más lentamente y tardan más en estabilizarse, especialmente cuando la uva está verde.
11. La presencia de raspón aumenta notablemente la astringencia del vino especialmente cuando las uvas no están bien maduras, por lo que es aconsejable su eliminación previa a la maceración.
12. De acuerdo con estos resultados, una maceración corta produciría vinos con una concentración moderada de taninos los cuales procederían principalmente de las pieles. Contrariamente, una maceración larga produciría vinos con una alta concentración de taninos los cuales en un alto porcentaje procederían de las semillas.
13. Dado que el grado de maduración afecta a la astringencia de los taninos de pieles y especialmente de semillas, debería ser considerado para determinar el tiempo de maceración. Cuando las uvas estén bien maduras el tiempo de la maceración debería seleccionarse en función del estilo del vino que deseemos producir: una maceración corta para vinos afrutados y de rápido consumo, y una maceración larga para vinos tánicos destinados a la crianza. Sin embargo, cuando las uvas no han madurado bien, una maceración larga no es conveniente ya que conduciría a un exceso de la extracción del tanino de semilla, lo que produciría vinos demasiado astringentes.

## INFLUENCIA DEL USO DE LA MICROOXIGENACIÓN ANTES DE LA CRIANZA EN BARRICA DE ROBLE.

14. La aplicación de la microoxigenación al vino antes de la crianza en barricas de roble origina vinos con una ligera disminución de la intensidad colorante y un aumento de la Croma ( $C^*$ ), la Claridad ( $L^*$ ) y la tonalidad ( $H^*$ ). Por lo tanto, los vinos así obtenidos serían percibidos por los consumidores con un color levemente menos intenso y ligeramente más evolucionado.
15. El vino obtenido mediante microoxigenación antes de la crianza en barricas de roble presenta una concentración de antocianos superior a la del vino criado únicamente en barrica. Esta diferencia se observa tanto en antocianos libres como en combinados, y tanto en los análisis espectrofotométricos como cromatográficos. El vino microoxigenado presentó niveles significativamente mayores tanto de los monoglucósidos de los antocianos como de sus derivados acetilados y cumarilados.
16. No se observaron diferencias significativas en la concentración de piranoantocianos (vitisina A y B), ni en la de vinilcatequina-malvidina, ni en la de vinilfenol-malvidina. Por el contrario, el vino microoxigenado presentó una concentración ligera pero significativamente superior de catequina-etil-malvidina.
17. El DPM del vino obtenido mediante microoxigenación previa a la crianza en roble fue ligera pero significativamente superior al del vino únicamente criado en barricas. No se observaron diferencias significativas en el índice de polifenoles totales ( $A_{280}$  nm), la concentración de proantocianidinas, el índice DMACH, ni en la composición monomérica de las procianidinas.
18. En ambos grupos experimentales se observó una clara disminución de la astringencia respecto al vino de partida. Esta disminución fue significativamente mayor en el vino microoxigenado antes de la crianza (46 %) que en el vino únicamente criado en barricas (16 %). Esta disminución de la astringencia fue corroborada mediante análisis sensorial.
19. La percepción de los aromas de crianza fue más nítida en el vino al que se le aplicó la microoxigenación antes de la crianza.
20. De acuerdo con estos resultados la aplicación de la microoxigenación al vino antes de la crianza en barricas de roble sería aconsejable en vinos muy astringentes tales como vinos de prensa o los vinos obtenidos de uvas no muy maduras.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007

# ANEXO I

---

## MATERIALES Y MÉTODOS



*Anónimo.*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007



## ANEXO I. MATERIALES Y MÉTODOS

**Intensidad Colorante (IC):** La Intensidad Colorante se calcula según la metodología descrita por Glories (1984). Se miden las absorbancias del vino a las longitudes de onda 420 nm, 520 nm y 620 nm, usando cubeta de cuarzo de 1 mm de camino óptico.

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

**CIELAB:** Se mide la absorbancia del vino a las longitudes de onda 450, 520, 570, 630 nm en cubeta de cuarzo de 1mm camino óptico.

Las coordenadas C\* (croma), L\* (Luminosidad), H\* (hue: tono) se calculan utilizando el programa MSCV (Universidad de la Rioja) para Windows 95/98 y NT.

**Índice de polifenoles totales (IPT):** Según metodología descrita por Ribéreau-Gayon. (2000).

El vino se diluye 1 en 100 en agua destilada y se lee la absorbancia a 280 nm utilizando cubeta de cuarzo con camino óptico de 10 mm.

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

**Antocianos totales (AT):** Según metodología descrita por Ribéreau-Gayon y Stonestreet. (1966).

Soluciones:

- Mezcla: A 1 mL de vino se le añaden 1 mL de etanol (absoluto, Panreac) y 20 mL de HCl al 0,7 % (Panreac).
- Solución de metabisulfito sódico (anhidro 97%, Acros) al 15%.

Procedimiento:

Tubo 1	Tubo 2
• 5 mL de la mezcla	• 5 mL de la mezcla
• 2 mL de agua destilada	• 2 mL sol. de Na <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>

Ambos tubos se agitan y después de 10 minutos se mide la absorbancia a 520 nm usando cubeta camino óptico de 10 mm. La concentración de antocianos totales se calculó siguiendo la siguiente expresión:

$$AT = (A1 - A2) \times 875$$

875: El coeficiente de extinción molar de la malvidina 3-glucosido, para expresar el resultado directamente en mg/L.

⇒ En los vinos de crianza y microoxigenación se realizó la técnica utilizada por Niketic-Aleksic y Hrazdrina (1972) donde el vino se diluye en ácido clorhídrico 1 N. Después de 4 horas en la oscuridad se mide la absorbancia a 520 nm en cubeta de cuarzo

de 10 mm de camino óptico. Los antocianos totales se expresaron como la concentración de la malvidina 3-glucosido (mg/L).

**pH:** Se mide el pH de los vinos directamente en un equipo de lecturas de pH (Crison micropH 2002)

**Índice de polivinil-polipirrolidona (PVPP):** Según metodología descrita por Glories en 1984, con la variante de utilizar un equipo de extracción en fase sólida bajo vacío para facilitar el trabajo de presionar la jeringa y estandarizarlo al mismo tiempo.

Soluciones:

- 70 mL de etanol (absoluto, Panreac), 30 mL de agua destilada y 1 mL de HCL concentrado ( Panreac)
- Suspensión de PVPP (polivinil-polipirrolidona, Sigma) añadiendo agua destilada hasta conseguir una mezcla.

Procedimiento:

En una jeringuilla de 10 ml se coloca una torunda de algodón en la punta y se añade una suspensión de PVPP. Después se presiona hasta que quede una columna compacta de alrededor de 1 mL. Posteriormente, se coloca la jeringa en un equipo para extraer en fase sólida bajo presión (Supelco Visiprep), se añade 1 mL de vino y se pone en funcionamiento la bomba de vacío hasta que el vino es absorbido por la columna de PVPP, del mismo modo se vierten 10 mL de agua destilada para liberar todos los compuestos no fenólicos del vino.

Finalmente, se adiciona el volumen suficiente de la solución 1 hasta coleccionar un volumen de 20 mL de solución. La solución 1 libera los antocianos libres.

A estos 20 mL se adicionan 2 mL de HCl para igualar el pH al pH que utilizamos en la determinación de antocianos totales y se aplica el mismo procedimiento que para la determinación de los antocianos libres (A1), teniendo en cuenta las diluciones.

El índice de PVPP, nos indica el porcentaje de antocianos que está combinado con taninos, calculándose mediante la siguiente expresión:

$$\text{Índice de PVPP} = 100 \times (\text{AT} - \text{A1}) / \text{AT}$$

Desde esta expresión se calculan los antocianos combinados:

$$\text{Antocianos combinados} = \text{AT} \times (\text{Índice de PVPP}/100)$$

**Copigmentación:** Utilizando la metodología propuesta por Boulton (1996). Los vinos son tratados con acetaldehído, para eliminar el efecto decolorante del  $\text{HSO}_3^-$ . Las muestras se diluyen 1 en 20 en solución sintética al pH del vino para romper la copigmentación.

Soluciones:

- Solución al 10% de acetaldehído (Panreac, España) en agua a 4°C mantener bien cerrada y en frío.

*Anexo I. Materiales y Métodos*

- Solución Sintética: 12,5 % Etanol absoluto (Panreac, España), 4 g/L ácido tartárico (Panreac, España), pH igualado al de cada vino en particular.

Procedimiento:

- En un tubo de ensayo se vierten 2 mL de vino añadiendo 20  $\mu$ L de solución de acetaldehído al 10%.
- Se tapa y se deja reaccionar durante 45 minutos.

A1	A2
<ul style="list-style-type: none"><li>• Absorbancia a 520 nm (cubeta de 1 mm de camino óptico).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dilución 1: 20 con solución sintética.</li><li>• Absorbancia a 520 nm (cubeta de 10 mm de camino óptico).</li></ul>

$$\% \text{ del color debido a la copigmentación} = [(A1 - (2 \times A2)) / A1] \times 100$$

**Índice DMACH:** El reactivo DMACH (p-dimetilaminocinnamaldehído) reacciona con el extremo del polímero de flavanol dando lugar a un aducto que tiene su máxima absorción a 640 nm. Esta técnica se realiza según la metodología descrita y modificada por Nagel y Glories. (1991).

Soluciones:

- Se diluyen 10 mg de reactivo DMACH (p-dimetilaminoacinnamaldehído, Sigma) en 10 mL de HCl al 37 % (Panreac) enrasando a 100 mL con metanol (Panreac).
- \*El reactivo se puede utilizar durante dos días de experimentación y se mantiene a 4°C, tapado cuidadosamente para evitar su deterioro y/o evaporación.

Procedimiento:

- Los vinos se diluyen 1 en 25 con metanol .

Tubo 1	Tubo 2
<ul style="list-style-type: none"><li>• 1 mL de vino (1:25)</li><li>• 5 mL de reactivo</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1 mL de vino (1:25)</li><li>• 5 mL de metanol</li></ul>

Se esperaron 10 minutos para leer la absorbancia a 640 nm, usando cubeta de cuarzo con paso óptico de 1 mm.

La expresión utilizada para calcular el índice DMACH fue:

$$\text{DMACH} = (A1 - A2) \times 10 \times 25$$

**Taninos Totales:** Según la metodología descrita por Ribéreau-Gayon y Stonestreet (1966), se basa en que las procianidinas del vino al ser calentadas en medio suficientemente ácido, se transforman en cianidina (reacción de Bate- Smith).

Procedimiento:

- El vino se diluye 1 en 50 en agua destilada.

Tubo 1	Tubo 2
<ul style="list-style-type: none"><li>• 2 mL de vino diluido</li><li>• 1 mL de agua destilada</li><li>• 6 mL de HCl12N (Panreac)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 2 mL de vino diluido</li><li>• 1 mL de agua destilada</li><li>• 6 mL de HCl 12 N</li></ul>

Ambos tubos han de protegerse de la luz y cerrarse herméticamente.

El tubo 1 se coloca a baño de María y el tubo 2 se deja a temperatura ambiente.

Después de exactamente 30 minutos de ebullición del tubo 1, ambos tubos se enfrían rápidamente en hielo.

Se les añade 1 mL de etanol absoluto (Panreac) y se agitan brevemente para medir inmediatamente la absorbancia a 550 nm en cubetas de 10 mm de camino óptico.

$$\text{Taninos Totales (g/L)} = (A_{550T1} - A_{550T2}) \times 19,33$$

19,33: El coeficiente de extinción molar de la cianidina, obtenida por hidrólisis ácida de los taninos condensados, para expresar el resultado directamente en g/L.

**Índice de etanol:** Según Manual de Enología escrito por Glories (1984).

- A 1 mL de vino se le añaden 9 mL de etanol (absoluto, Panreac) se homogeniza y se deja en reposo 24 horas a 4°C.
- Se centrifuga a 11700 g durante 10 minutos para eliminar el precipitado.
- Se lee la absorbancia a 280 nm, usando cubeta de cuarzo de 10 mm de camino óptico a.
  - o A2: El sobrenadante diluido 1 en 10 en agua destilada
  - o A1: El vino original diluido también 1 en 100 en agua destilada.

El índice de etanol se calcula siguiendo la siguiente expresión:

$$\text{Índice de etanol} = 100 \times (A1 - A2) / A1$$

El índice de etanol nos permite calcular el porcentaje de taninos combinado con polisacáridos en los vinos:

$$\text{Taninos combinados con polisacáridos} = \text{taninos} \times (\text{Índice de etanol}/100)$$

**Índice de Ionización:** Indica el porcentaje de antocianos que contribuyen al color. (Glories, 1984).

Soluciones:

- Solución de metabisulfito sódico (anhidro 97%, Acros) al 15% en agua destilada.
- Solución de ácido clorhídrico (Panreac) 0,1 N en agua destilada.

Procedimiento:

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
• 10 mL de vino	• 10 mL de vino	• 1 mL de vino	• 1 mL de vino
• 2 mL agua destilada	• 2 mL solución Na <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	• 7 ml solución HCl	• 7 ml solución HCl
		• 2 mL agua destilada	• 2 mL solución Na <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>

Se tapan, se mezclan y se dejan reaccionar durante 10 minutos.

Se mide la absorbancia a 520 nm:

- De los tubos 1 y 2, en cubeta cuarzo de 1 mm de camino óptico

$$\Delta\alpha = [(A1 - A2) \times 12] / 10$$

- De los tubos 3 y 4, en cubeta cuarzo de 10 mm de camino óptico

$$\Delta\gamma = [(A3 - A4) \times 100] / 95$$

$$\text{El Índice de Ionización} = 100 \times (\Delta\alpha / \Delta\gamma)$$

Para vinos jóvenes serán valores entre 10- 30%, se incrementa con la crianza siendo para vinos muy envejecidos entre 80- 90%.

**Índice de Gelatina:** Esta técnica permite conocer el porcentaje de taninos capaces de reaccionar con las proteínas del vino y por tanto da una idea de la astringencia. (Glories, 1984).

Soluciones:

- Solución de gelatina 35 g/L. (Sigma)

Procedimiento:

Vaso 1 (T1)	Vaso 2 (T2)
• 25 mL de vino	• 25 mL de vino
• 5 mL de agua destilada	• 5 mL de solución de gelatina

Ambos vasos de precipitado se mantiene a 4° C durante 72 horas.

Posteriormente, se centrifugan a 11700 g durante 10 minutos. Y se determinan los Taninos Totales de los sobrenadantes.

$$\text{Índice de gelatina} = [(T1 - T2) / T1] \times 100$$

**Método de determinación de astringencia:** Esta metodología permite determinar la astringencia usando la ovoalbúmina como proteína precipitante y patrones a ácido tánico que permiten hacer una recta patrón. La astringencia se expresará como g/L de ácido tánico. (Ver Capítulo III. Apartado I)

Soluciones:

- Solución sintética: 13% etanol absoluto (Panreac), 4 g/L ácido tartárico (Panreac), pH 3,5.
  - Patrones de ácido tánico (0; 0,2; 0,4, 0,6; 0,8; 1 g/L) en solución sintética
  - Soluciones de ovoalbúmina (0-8 g/L) en solución sintética.
- \*Se prepararán cantidades de tubos de acuerdo a la capacidad de la centrifuga.

Procedimiento:

Para cada muestra o cada patrón se preparan los tubos de la A al H con 1ml de las soluciones crecientes de ovoalbúmina como se detalla:

<u>Tubos</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>H</u>
[ovoalbúmina g/L]	0	0,5	0,75	1	1,5	2	3	4

A cada tubo (desde la A hasta la H) se le adiciona 1 ml la muestra de vino o patrón motivo de ensayo.

- Se dejan reaccionar durante 10 minutos.
- Se centrifugan a 11700 g y 4°C.
- El sobrenadante se diluye 1 en 50 en agua destilada utilizando matraces aforados.
- Se mide la absorbancia a 280 nm en cubeta de cuarzo de 10 mm de camino óptico.
- Los valores de absorbancia del sobrenadante decrecerán a medida que aumenta la concentración de ovoalbúmina, pues precipitará mayor cantidad de tanino astringente. Cuando exista un exceso de ovoalbúmina los valores de absorbancia aumentarán. Con los valores decrecientes de absorbancia se elabora un gráfico donde el eje X serán las concentraciones de ovoalbúmina en g/L y el eje Y la absorbancia a 280 nm. Este gráfico deberá ajustarse a una curva de tipo logarítmica. ( $Y = -a \log(X) + b$ )

---

<u>Patrones</u>	<u>Muestra</u>
Las pendientes de cada curva logarítmica se grafican vs. la concentración de los patrones de ácido tánico, dando como resultado una recta de ecuación: $Y = a X + b$	La pendiente de la curva logarítmica se sustituye en la ecuación de la recta patrón (valor Y) dando como resultado los g/L de ácido tánico (valor X) que representan la astringencia del vino.

---

**Determinación de anhídrido sulfuroso libre y combinado (Método Paul o Rankine):** Se basa en que el dióxido de azufre de un vino o mosto se libera, después de acidular, por arrastre con una corriente de aire y se oxida a ácido sulfúrico haciéndolo borbotear a través de una solución diluida y neutra de peróxido de hidrógeno. El ácido sulfúrico formado se determina con una solución de hidróxido de sodio (OIV, 1990).

La liberación en frío (20°C) asegura la extracción del dióxido de azufre libre y en caliente (100°C) la del dióxido de azufre combinado.

Material y reactivos:

- Compresor de aire, capaz de suministrar un flujo de  $\approx 1$  L/min.
- Dosificador del ácido fosfórico de 10 mL.
- Manta calefactora.
- Matraz de fondo redondo de 100 mL.
- Refrigerante.
- Borboteador con un aforo de 10 mL y tubo de conducción de los gases terminado en una placa de vidrio fritado para garantizar la formación de un gran número de pequeñas burbujas, facilitando el contacto de las fases gaseosa y líquida.
- Ácido orto-Fosfórico 85% PA-ACS-ISO
- Peróxido de Hidrógeno 0,9% p/v (3 vol) VINIKIT,
- Indicador Mixto I (Indicador de Tashiro) VINIKIT
- Hidróxido de Sodio 0,01 mol/L (0,01N) VINIKIT

Procedimiento:

- Para el SO<sub>2</sub> libre: Se colocan en el borboteador 10 mL de la solución de peróxido de hidrógeno, 3 gotas del indicador y se neutraliza con la solución de hidróxido de sodio 0,01 M hasta color verde oliva. En el matraz de 100 mL de fondo redondo se introducen 30 mL de vino, se conecta con el sistema de arrastre y desde el dosificador de ácido fosfórico se introducen 10 mL. Se hace borbotear el aire mediante el compresor durante 20 min. El ácido sulfúrico formado por oxidación del dióxido de azufre se valora con la solución de hidróxido de sodio 0,01 M hasta color verde oliva. V= volumen gastado.

- Para el SO<sub>2</sub> combinado: Se vuelve a conectar el borboteador y el matraz que contiene el vino se lleva a ebullición usando la manta calefactora y se mantiene ésta mientras se hace pasar la corriente de aire durante 20 minutos más. El ácido sulfúrico formado se valora con la solución de hidróxido de sodio 0,01 M hasta color verde oliva. V'= volumen gastado.

- Calculos:

$$\text{SO}_2 \text{ libre, mg/L} = (V \times 0,01 \times 32 \times 1.000) / 30 = 10,7 \times V$$

$$\text{SO}_2 \text{ combinado, mg/L} = (V' \times 0,01 \times 32 \times 1.000) / 30 = 10,7 \times V'$$

$$\text{SO}_2 \text{ total, mg/L} = [(V + V') \times 0,01 \times 32 \times 1.000] / 30 = 10,7 \times (V + V')$$

V = mL hidróxido de sodio 0,01M consumido en la valoración del SO<sub>2</sub> libre

V' = mL hidróxido de sodio 0,01M consumido en la valoración del SO<sub>2</sub> combinado

**Microoxigenación:** Se utilizaron tanques de acero inoxidable de 230 L de capacidad con altura de 2,2 m y diámetro de 0,4 m. Las dosis de oxígeno aplicadas durante la microoxigenación se aplicaron utilizando un microoxigenador modelo: VISIO 2/6, difusores de cerámica recubiertos de acero inoxidable de 4,2 cm de diámetro y conexiones de polietileno (Oenodev, Francia). Tanto las dosis como las degustaciones periódicas del vino microoxigenado se realizaron bajo la supervisión y con la ayuda de AZ3 (Grupo Oenodev).

**Preparación de barricas nuevas:** Las barricas utilizadas fueron de 225 L de capacidad, roble americano, tostado medio de la tonelería Torné (Vilafranca del Penedès). Se prepararon usando el protocolo facilitado por AZ3.

- Lavado con agua para eliminar el polvo.
  - Rellenar con agua sulfitada 4g/L y mantener 24 horas
  - Vaciar, lavar con agua y dejar escurrir.
  - Quemar un disco de 10 g de azufre.
- 
- La corrección del sulfuroso tanto en microoxigenación como en barrica se realizó manteniendo niveles de 25-30 mg/L de dióxido de azufre libre utilizando comprimidos efervescentes de metabisulfito potásico (Effersol 2, Esseco- Italia)
  - El embotellado se realizó en botellas de 750 mL, luego de rectificar el sulfuroso libre. Tapadas con tapones sintético de 38 x 21.5 mm (Supreme Corq, Supreme Corq, LL; Washington, USA).
  - La degustación final se realizó 6 semanas después del embotellado.

**Degustación:** Los vinos fueron degustados por un panel de 10 enólogos que se reúnen frecuentemente para realizar degustaciones de los vinos con que trabajamos en la Facultad de Enología de la URV.

Previamente se realizó una degustación para establecer los criterios de degustación.

Se realizaron dos tipos de degustaciones en función de los experimentos, como se puede observar en las fichas de degustación. Degustaciones de tipo triangular para diferenciar un vino entre otros dos iguales, según el manual de degustación profesional de Jackson (2002) y análisis sensorial descriptivo utilizando análisis visual, olfativo y gustativo.

**FICHA 1: Tast Triangular**

Encercleu la vostra resposta

**Test**

Quina mostra és diferent

1	2	3
---	---	---

Quina mostra prefereixes

1	2	3
---	---	---



**FICHA 2: Tast** Encerleu la vostra resposta

VINOS		1	2	3	4	5
Color 1:Violaci, 10:teula	Intensitat					
	Evolució					
Olfacte  1: reduït, 10: oxidat	Fruita/flor					
	Redox					
	Pebrot verd					
	Cafè					
	Especiat bóta					
	Fumat bóta					
Boca	Untuositat (greix)					
	Tanicitat (estructura)					
	Astringència					
	Amargor (fi boca)					
	Persistència					
Observacions:						

Las valoraciones se realizaron del 1 al 10, donde el 10 representaba la máxima intensidad de cada descriptor.

**Los niveles de madurez en el experimento de extracciones (Capítulo III) fueron determinados siguiendo:**

- Peso medio de 5 racimos de uva.
- Peso medio de los 5 raspones correspondientes.
- Peso medio de 20 granos de uva.
- Grado alcohólico probable, utilizando un refractómetro (RCT 0,21 %, vol AP Casals).
- Acidez total, se determinó por valoración con NaOH 0,1 N (Sigma) utilizando como colorante la Fenolftaleina al 1 % (Sigma)
- pH: Del mosto directo en equipo Crison micropH 2002.

**Colección y preparación de Saliva:**

Soluciones:

- Solución EDTA (Sigma) 0,5 M en agua destilada, se ha de añadir hidróxido de sodio hasta que se disuelva.
- Tampón fosfato: 1000 ml de solución 50 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> se añadió una solución 50 mM de KHPO<sub>2</sub> hasta llegar al pH 6,8.
- Patrones de ovoalbúmina y BSA en agua destilada desde 0,025-1 mg/ ml.

La saliva se recogió en un vaso de precipitado refrigerado en un baño de hielo. El saliveo se estimulaba masticando parafilm durante 2 minutos (Schwartz y col., 1995). Diariamente, las muestras recogidas se congelaban a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El conjunto muestras de saliva congeladas se descongelaba y se procesaba cuando llegábamos a tener volúmenes de 100 mL. El proceso se realizaba siempre a  $4^{\circ}\text{C}$  (Steiner y Keller, 1968; Levine y Kaller, 1977):

- Se homogenizaba
- Se centrifugaba a 11700 g durante 10 minutos
- Se añadía EDTA (Sigma) hasta una concentración de 0,5 mM
- Se dializaba contra tampón fosfato.
- Para conocer la concentración de proteínas total de la saliva, se utiliza la técnica BRADFORD y usando el Kit Bio-Rad Protein assay (Bradford, 1976). En este caso utilizamos la recta patrón de ovoalbúmina por las características de nuestro trabajo. Se realizaron los Ensayos Standards (0,125-1,5 mg/mL) según el manual de Bio-Rad (tech note 1069).
- Las muestras eran liofilizadas y mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el día de experimentación.

**Separación de proteínas mediante SDS- Page:** Descrita por Laemmli (1970). Se trata de aplicar la electroforesis a geles de poli(acrilamida) utilizando agentes que desnaturalizan las muestras en presencia de calor.

Los agentes desnaturalizantes son  $\beta$ -mercaptoetanol, que destruye los puentes bisulfuro y el Duodecil sulfato de Sodio (SDS) que desnaturaliza y recubre a las proteínas, separándose como cadenas polipeptídicas aisladas.

Materiales y reactivos:

- Solución solubilizadora: Tampón Tris-HCl 0,125 mM , 2%  $\beta$ -mercaptoetanol, 4 % SDS, 20% v/v glicerol, 0,02% de azul de bromofenol. pH 6,8.
- PhastGel Homogeneous-20 (rango de separación de 2- 150 kD, cod. 17-0624-01 Amersham, España)
- PhastGel Buffer Strips - SDS (0.112 M acetate, 0.112 M Tris, pH 6.4) (cod. 17-0516-01, Amersham, España)
- Marcadores de proteínas de bajo peso molecular para SDS-Page. (número de catálogo 161-0304, Biorad, California, USA).

Preparación de muestra y patrones:

Preparación de muestra y marcadores de masa molecular:

1. Se liofilizaron 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante del último punto del ensayo de astringencia utilizando saliva como agente precipitante o ovoalbúmina.
2. Las muestras y la mezcla los marcadores de masa molecular se disolvieron en 20  $\mu\text{L}$  solución solubilizadora utilizando un vortex Reax 2000 (Heildolph). Muestras y marcadores se mantuvieron 5 minutos en baño de María a  $100^{\circ}\text{C}$ .

3. Después de colocar los geles y tampones en el equipo Phastssystem, se aplicaron muestras y marcadores a los peines y se puso en marcha el programa para Phastssystem (Farmacia LKB Biotechnology, Suecia) recomendado por Amersham en el protocolo de técnicas de separación (SDS PAGE in Homogeneous media, Phastssystem Separation Technique File no. 111) donde:

Pasos de Separación	Voltaje	Intensidad	Potencia	temperatura	Tiempo en voltios-hora
Sep 3.1 El tampón llegará hasta el frente	250V	10 mA	3.0W	15°C	1 Vh
Sep 3.2 Para la aplicación de la muestra se reduce la corriente	250V	1 mA	3.0W	15°C	1 Vh
Sep 3.3 Las muestras corren a través del gel.	250V	10 mA	3.0W	15°C	99 Vh

#### La tinción con azul de Coomassie:

##### Soluciones:

- Solución fijadora: Etanol absoluto ( Panreac), ácido acético (Panreac), agua: 40:10:50 (v:v)
- Solución de Azul de Coomassie: 0,2 g de Azul Coomassie (Coomassie™ Blue R-350, Amersham, España) en metanol, agua ,de ácido acético glacial. 40:60:10 (v:v)
- Solución de desteñido: Acido acético al 10% (omitiendo el metanol para visualizar correctamente las PRPs).

##### Pasos a seguir:

1. Fijación: Sumergir el gel con solución fijadora durante 1 hora en agitación suave.
2. Tinción: Sumergir el gel en 5 volúmenes de colorante al menos 1 h con agitación suave (el máximo se consigue en 20 minutos aproximadamente).
3. Destinción: Sumergir el gel en solución de desteñido y agitación, cambiando repetidas veces la solución.\*
4. Fotografiar.
5. Pasar a programa Quantity One Software Version 4.3.1 para PC. Donde podemos determinar las cantidades relativas y densidad de cada proteína. Con estos datos se calcula la cantidad de proteína, a partir de la concentración inicial aplicada al gel.

\*Los mejores resultados se obtuvieron cuando se dejan las placas, después de varios lavados, en solución de desteñido durante 12 horas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- Boulton, R. A method for the assessment of copigmentation in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, *47*, 346.
- Glories, Y. La couleur des vins rouges. 2ème partie Mesure, origine et interpretation. *Conn. Vigne Vin* **1984**, *18*, 253-271.
- Jackson, R.S. *Wine Tasting. A professional Hand Book*. Academic Press. A division of Harcourt Inc., USA, **2002**; 177-178.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage. *Nature*, **1970**, *227*, 680- 685.
- Levine M, Keller PJ The isolation of some basic proline-rich proteins from human parotid saliva. *Arch Oral Biol.*, **1977**, *22*, 37-41.
- Nagel, C.W., Glories, Y. Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 4, 364- 366.
- Niketic-Aleksic, G.K., Hrazdrina, G. Quantitative analysis of the anthocyanin content in grape juices and wine. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **1972**, *5*, 5, 163-165.
- Ribéreau-Gayon, J. and Stonestreet, E. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.* **1966**, *48*, 188-196.
- Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of Enology*. Vol. 2. The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments; Wiley: Chichester, U.K., **2000**, 129-185.
- O.I.V. Le recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Mouts, Paris, France, 1990.
- Schwartz, S.S., Zhu, W.X., Sreebney, L.M. Sodium Dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis of human whole saliva. *Arch. Oral Biol.*, **1995**, *40*, 10, 949- 958.
- Steiner, J.C., Keller, P. J. An electrophoretic analysis of the protein components of human parotid saliva. *Archs. Oral Biol.*, **1968**, *13*, 1213- 1221.
- [www.Biorad.com](http://www.Biorad.com)
- [www.amershambiosciences.com](http://www.amershambiosciences.com)
- [www.oenodev.com](http://www.oenodev.com)
- [www.unirioja.es/dptos/dq/grupos/color/servicios.shtml](http://www.unirioja.es/dptos/dq/grupos/color/servicios.shtml).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ASTRINGENCIA DEL VINO TINTO.  
María del Carmen Llaudy Fernández  
ISBN: 978-84-690-7596-8 / DL: T.1384-2007