



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Técnicas Enológicas de Frío y Enzimáticas
Aplicadas a la Extractabilidad de Syrah,
Cabernet Sauvignon y Monastrell

Dña. Ana Adoración Moreno Pérez
2013



Universidad de Murcia

Departamento de Tecnología de Alimentos



Instituto Murciano de Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario

Departamento de Viticultura

TÉCNICAS ENOLÓGICAS DE FRÍO Y ENZIMÁTICAS APLICADAS A LA EXTRACTABILIDAD DE SYRAH, CABERNET SAUVIGNON Y MONASTRELL

Ana Adoración Moreno Pérez

Murcia 2013



Universidad de Murcia

Departamento de Tecnología de Alimentos



Instituto Murciano de Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario

Departamento de Viticultura

TÉCNICAS ENOLÓGICAS DE FRÍO Y ENZIMÁTICAS APLICADAS A LA EXTRACTABILIDAD DE SYRAH, CABERNET SAUVIGNON Y MONASTRELL

**Memoria de Tesis presentada por Ana Adoración Moreno Pérez
para optar al grado de Doctor**

Dirigida por D^a Rocío Gil Muñoz

Murcia 2013



Región de Murcia

Consejería de Agricultura y Agua



Instituto Murciano de Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario

Departamento de Viticultura

D^a ROCIO GIL MUÑOZ, investigadora del Departamento de Viticultura del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “TÉCNICAS ENOLÓGICAS DE FRÍO Y ENZIMÁTICAS APLICADAS A LA EXTRACTABILIDAD DE SYRAH, CABERNET SAUVIGNON Y MONASTRELL”, realizada por Dña. Ana Adoración Moreno Pérez bajo mi tutela, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia

En Murcia, a 25 de Mayo de 2013

Fdo. Rocío Gil Muñoz

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
ESTACIÓN ENOLÓGICA

Avda. Asunción nº 24 – 30520 Jumilla (Murcia)

Tel y Fax: 968 75 75 80



D^a ENCARNA GÓMEZ PLAZA, Catedrática de Universidad del Área de Tecnología de Alimentos del Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología AUTORIZA

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “TÉCNICAS ENOLÓGICAS DE FRÍO Y ENZIMÁTICAS APLICADAS A LA EXTRACTABILIDAD DE SYRAH, CABERNET SAUVIGNON Y MONASTRELL”, realizada por Dña. Ana Adoración Moreno Pérez bajo mi tutela, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia

En Murcia, a 25 de Mayo de 2013

Fdo. Encarna Gómez Plaza

La realización de esta Tesis Doctoral ha tenido lugar dentro del marco del Plan de Ciencia y Tecnología 2007-2010 de la Región de Murcia por el que la firmante ha sido beneficiaria de una beca IMIDA para el “Seguimiento y determinación de parámetros de calidad en uvas y vinos”.

El trabajo de investigación ha sido financiado en parte por el Proyecto de Investigación “Diseño de nuevas estrategias para la optimización de la extractabilidad de compuestos fenólicos en la vinificación de uvas de Monastrell” con número de referencia AGL2006-11019-C02-02, subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

“La ciencia es la progresiva aproximación del hombre al mundo real”

Max Planck

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero mostrar mi más sentido agradecimiento a mi directora, la doctora Rocío Gil Muñoz, investigadora del Departamento de Viticultura del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, por su coordinación, orientación y dedicación para la realización de esta Tesis Doctoral y, especialmente, por el apoyo y confianza que siempre he encontrado en ella.

De igual forma, quiero mostrar también mi agradecimiento a mi tutora en el Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, la doctora Encarna Gómez Plaza, Catedrática de Universidad del Área de Tecnología de Alimentos, por su orientación y colaboración en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Quiero agradecer también a Don Adrian Martínez Cutillas, director del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, el apoyo ofrecido durante el tiempo que he desarrollado el trabajo de investigación en este centro.

Quisiera hacer una mención especial a todo el personal de la Estación Enológica de Jumilla. A los que están allí y a los que estuvieron, muchas gracias porque siempre se mostraron dispuestos a echarme una mano en los momentos en los que tenía mucho trabajo, que no fueron pocos. A Charo Vila, Gertrudis, Seve, M^a Ángeles, Paca, Elisa, Juan, Juan Carlos, Pepe, Pascual, David y José Vicente. Por supuesto, a todos aquellos cuyo trabajo formó parte de este proyecto, sin ellos no hubiera sido posible realizar este amplio trabajo de investigación: Charo Fernández, Chema, Silvia, Ana, Vicente y Cayetano. En esta mención al personal del IMIDA tengo que hacer un agradecimiento con mayúsculas a José Ignacio. Todos los que hemos trabajado con él sabemos que es el *alma mater* de la Enológica, su conocimiento, su experiencia y su carácter hacen posible el buen funcionamiento de la Bodega Experimental. Su colaboración ha sido esencial para llevar a cabo la parte experimental de este trabajo. Y además de agradecer la colaboración profesional de todo el personal

del IMIDA, también quiero agradecer su amistad. En ellos no solo encontré unos buenos compañeros, sino que para mí han sido y son unos grandes amigos.

También debo dar las gracias a los investigadores y becarios del Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología por su colaboración con el Departamento de Viticultura del IMIDA para llevar a cabo este proyecto de investigación.

Este reto profesional y personal jamás hubiera sido posible sin mi familia. Mis padres, tal y como hicieron mis abuelos, han dado lo mejor de su vida para que mis hermanos y yo pudiésemos alcanzar nuestros sueños. Tanto mis padres, Miguel y Dolores, como mis hermanos, Natalia y Miguel, han confiado siempre en mí y me han apoyado en cualquier decisión que he tomado en mi vida. Y ha sido precisamente esa confianza en mí lo que me ha dado la fuerza para mirar siempre hacia delante. Y en ese mirar hacia delante no puedo olvidarme de mis sobrinos, Samuel y Blanca, que me brindan los momentos más dulces y los abrazos más tiernos, deseo poder ser un buen ejemplo para ellos mostrándoles que la felicidad se encuentra en estos pequeños gestos. También quiero agradecer a mi cuñado, Paco, su amistad y su confianza. Muchas gracias a todos.

Pero si hay alguien a quien debo agradecer especialmente este y todos los momentos es, sin duda alguna, a Carlos. El me animó para comenzar este proyecto, me ha ayudado, ha sufrido conmigo y se ha alegrado conmigo. El es mi compañero, mi amigo, mi familia, mi presente y mi futuro. Gracias por estar a mi lado.

A mis padres y a Carlos

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	1
1.1. ANTECEDENTES	3
1.2. OBJETIVOS	7
CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN	9
2.1 ESTRUCTURA, COMPOSICIÓN Y EXTRACTABILIDAD DE LA BAYA	11
2.2 UTILIZACIÓN DE ENZIMAS EN LA ELABORACIÓN DE VINOS TINTOS	14
2.2.1 ACCIÓN DE LOS ENZIMAS	14
2.2.2 PREPARADOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES	18
2.3 UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS DE FRÍO EN LA ELABORACIÓN DE VINOS TINTOS	21
2.3.1 MACERACIÓN PREFERMENTATIVA EN FRÍO	22
2.3.2 CONGELACIÓN DE LA UVA O SUPRAEXTRACCIÓN	25
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	29
3.1.1 CAMPAÑA 2007	29
3.1.2 CAMPAÑA 2008	31
3.1.3 CAMPAÑA 2009	32
3.2 UVA	33
3.2.1 MATERIAL VEGETAL	33
3.2.2 OBTENCIÓN DEL MOSTO	34
3.2.3 MADUREZ TECNOLÓGICA DE LA UVA	35
3.2.3.1 Grado Brix	35
3.2.3.2 pH	35
3.2.3.3 Acidez total	35
3.2.3.4 Ácido L-málico	35
3.2.3.5 Ácido tartárico	35
3.2.4 MADUREZ POLIFENÓLICA DE LA UVA	36
3.2.5 DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS	37
3.2.5.1 Antocianos totales	37
3.2.5.2 Índice de polifenoles totales (IPT)	37

3.2.6 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	38
3.2.6.1 Antocianos y flavonoles en el hollejo	38
3.2.6.2 Taninos en el hollejo y las semillas	40
3.3 VINO	43
3.3.1 VINIFICACIONES	43
3.3.1.1 Vinificación tradicional o testigo	44
3.3.1.2 Maceración prefermentativa en frío	44
3.3.1.3 Congelación de la uva	45
3.3.1.4 Congelación del mosto con nieve carbónica	45
3.3.1.5 Adición de un preparado enzimático comercial	45
3.3.1.6 Adición de un enzima natural (β -galactosidasa)	46
3.3.2 DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS	46
3.3.2.1 Intensidad y tono	46
3.3.2.2 Parámetros CIELab	47
3.3.2.3 Índice de polifenoles totales (IPT)	47
3.3.2.4 Parámetros de copigmentación	47
3.3.3 DETERMINACIONES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	48
3.3.3.1 Antocianos y flavonoles	48
3.3.3.2 Taninos en el vino	49
3.3.4 DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN AROMÁTICA DEL VINO	50
3.3.5 ANÁLISIS SENSORIAL	52
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
CAPÍTULO 4. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS Y FENÓLICAS DE LOS VINOS	55
4.1 INTRODUCCIÓN	57
4.1.1 EL COLOR DEL VINO	57
4.1.2 COMPUESTOS FENÓLICOS RESPONSABLES DEL COLOR	58
4.1.2.1 Antocianos	59
4.1.2.2 Taninos	61
4.1.3 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN	64
4.1.4 EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL VINO	67
4.1.4.1 Fenómeno de copigmentación	67
4.1.4.2 Polimerización de taninos	70
4.1.4.3 Reacciones enzimáticas	73
4.1.4.4 Reacciones de condensación	74

4.1.4.5 Reacciones de cicloadición. Formación de piranoantocianos	76
4.1.4.1 Influencia de las características del vino sobre la evolución de los compuestos fenólicos	77
4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
4.2.1 CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DE LA UVA EN EL MOMENTO DE LA VENDIMIA	81
4.2.2 CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS Y FENÓLICAS DE LOS VINOS	97
4.2.2.1 Cabernet Sauvignon	97
4.2.2.2 Syrah	122
4.2.2.3 Monastrell	142
4.2.3 ANÁLISIS MULTIFACTORIAL	158
CAPÍTULO 5. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS AROMÁTICAS DE LOS VINOS	163
5.1 INTRODUCCIÓN	165
5.1.1 AROMA PRIMARIO	166
5.1.2 AROMA SECUNDARIO	168
5.1.3 AROMA Terciario	173
5.1.4 PERCEPCIÓN DE NOTAS AROMÁTICAS	174
5.1.5 INFLUENCIA DE LAS TÉCNICAS ENOLÓGICAS SOBRE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA	177
5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	181
5.2.1 CABERNET SAUVIGNON	181
5.2.2 SYRAH	191
5.2.3 MONASTRELL	199
CAPÍTULO 6. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LOS VINOS	207
6.1 INTRODUCCIÓN	209
6.1.1 FASES DE LA CATA	210
6.1.2 TIPOS DE PRUEBAS SENSORIALES	211
6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	213
6.2.1 CABERNET SAUVIGNON	213
6.2.2 SYRAH	219
6.2.3 MONASTRELL	224

CAPÍTULO 7. INFLUENCIA DE LA ZONIFICACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE VINOS DE MONASTRELL	229
7.1 INTRODUCCIÓN	231
7.1.1 FACTORES EDAFOCLIMÁTICOS	231
7.1.1.1 Temperatura	231
7.1.1.2 Pluviosidad	232
7.1.1.3 Insolación	233
7.1.1.4 Suelo	233
7.1.2 CONCEPTO DE ZONIFICACIÓN	234
7.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	237
7.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA UVA EN EL MOMENTO DE LA VENDIMIA	237
7.2.2 CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DE LOS VINOS AL FINAL DE LA FERMENTACIÓN ALCOHOLICA	247
7.2.3 INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS DE FRÍO Y ENZIMÁTICOS SOBRE LOS VINOS DE LAS DISTINTAS ZONAS	250
7.2.3.1 Cañada del Judío	250
7.2.3.2 Albatana	255
7.2.3.3 Montealegre	259
7.2.3.4 Chaparral	266
7.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIABLE	272
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	275
CAPÍTULO 9. ANEXOS	281
CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA	301

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1.1 ANTECEDENTES

El vino es un producto gastronómico cuyo origen no se ha podido establecer con exactitud. La historia del vino es tan antigua como la historia de la humanidad. Los paleontólogos han encontrado restos fosilizados de pepitas y polen de la vid silvestre, correspondiente a la Era Terciaria, extendidos por todo el hemisferio norte. Aunque a causa de las glaciaciones de la Era Cuaternaria la vid únicamente sobrevivió en zonas cálidas del área del Mediterráneo y de Oriente Próximo, donde fue experimentando mutaciones genéticas y adaptaciones al medio ambiente hasta evolucionar a la actual *Vitis Vinífera*. Los yacimientos arqueológicos han puesto de manifiesto que el hombre del Neolítico ya recolectaba uva para su consumo, almacenándola en oquedades de las rocas de donde fluía el mosto espontáneamente por acción del peso de la uva acumulada. Se pueden encontrar referencias al vino en escritos como las tablas de arcilla de Babilonia o los papiros de Egipto. Fueron los mercaderes fenicios, griegos y, posteriormente, los romanos los que expandieron la viticultura a través del desarrollo marítimo del Mediterráneo.

En la actualidad el vino no sólo forma parte de la dieta mediterránea, sino que es una de las bebidas alcohólicas de mayor producción y consumo del mundo. Está recogido como uno de los alimentos opcionales dentro de la pirámide de la alimentación que propone la Guía de la Alimentación Saludable de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC, 2004), ya que muchos estudios científicos avalan que su consumo moderado puede tener efectos beneficiosos sobre la salud.

La vitivinicultura de la Unión Europea lidera el mercado mundial del vino. Sus viñedos representan un 45% de la superficie vitícola mundial, su producción de vino supone un 65% del total de la producción mundial y acapara un 60% del consumo mundial.

España posee la mayor superficie de viñedos para vinificación del mundo y es el tercer productor, por detrás de Francia e Italia. Según datos de la Federación Española del Vino (FEV), en los últimos años se ha producido un

descenso progresivo en el consumo per cápita de vino en España, debido fundamentalmente a una disminución del consumo de vinos de mesa. Aunque, por otro lado, se ha observado un aumento en el consumo de vinos de calidad. Las cifras del Ministerio de Agricultura muestran que, desde hace unos años, el volumen de vino exportado supera al volumen de vino consumido en el país.

El sector vitivinícola español está experimentando importantes cambios para poder adaptarse a las nuevas tendencias del mercado. Así, para solventar los problemas de excedentes en la producción de vinos de mesa, se están desarrollando líneas de producción encaminadas a la obtención de vinos de mayor calidad, conforme a las exigencias del mercado nacional e internacional. Un mercado en el que, además, emergen países productores como Sudáfrica, Australia o Nueva Zelanda.

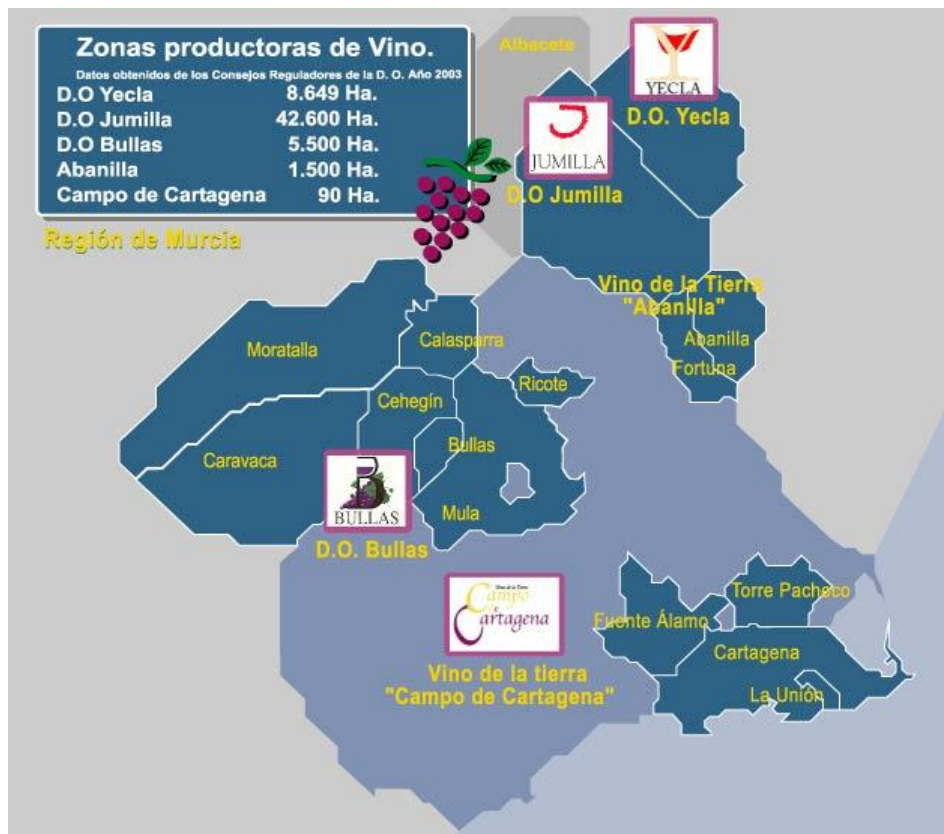
Todos estos datos ponen de manifiesto la necesidad de investigar, innovar y desarrollar prácticas vitivinícolas destinadas a mejorar la calidad de los vinos españoles.

En la Región de Murcia existen tres Denominaciones de Origen (Jumilla, Yecla y Bullas) y dos áreas de vinos de la tierra (Abanilla y Campo de Cartagena) (**Figura 1.1**) en las que se destinan unas 58.000 Ha al cultivo de vid para vinificación. La variedad predominante es Monastrell, cuyo cultivar representa un 85% de la superficie vitícola total. Aunque existen otras variedades tintas autorizadas por el Reglamento CE nº3255/94 de la Comisión, de 19 de Diciembre de 1994, para la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, aprobado por la Orden de 24 de abril de 2002 (BORM de 9 de mayo de 2002) y por los Consejos Reguladores de cada Denominación de Origen, entre las que se encuentran principalmente Syrah, Cabernet Sauvignon, Tempranillo o Merlot.

Las condiciones climáticas de las zonas de clima cálido provocan una maduración de la uva más acusada y más rápida que en otras zonas menos cálidas, lo que, en principio, puede plantear ciertos problemas para la vinificación. Pero este es un hándicap que está siendo solucionado

seleccionando los terrenos más adecuados para cada variedad mediante los estudios de *zonificación* que se centran en conocer cómo afectan los factores edafoclimáticos a la maduración de la uva y a su posterior vinificación.

Figura 1.1 Mapa de zonas productoras de vino en la Región de Murcia.



Monastrell es una variedad muy bien adaptada a las condiciones edafoclimáticas del sureste español, con un alto potencial polifenólico en su piel, aunque presenta cierta dificultad para su extracción. Sin embargo, variedades como Syrah o Cabernet Sauvignon no presentan esta dificultad, y sus compuestos fenólicos son extraídos con más facilidad durante el proceso de vinificación.

La calidad de los vinos tintos viene caracterizada, entre otros parámetros, por el color del vino y su estabilidad en el tiempo, que dependerá de la presencia de compuestos fenólicos como los antocianos o los taninos. En la uva, los antocianos se encuentran en las vacuolas de las células del hollejo, y los taninos se localizan en el hollejo, en la pulpa y en la semilla. La concentración de antocianos y taninos en la uva depende de la variedad, del estado de madurez, de las condiciones edafoclimáticas y de las prácticas vitícolas.

Durante el proceso de maceración del vino estos compuestos son extraídos de las uvas, incorporándose en el mosto. Generalmente la extracción de compuestos fenólicos y aromáticos se produce de una manera incompleta, de modo que el vino solo contiene entre un 20 y un 50% respectivamente de la cantidad total presente en la uva. Puesto que estos compuestos son los principales responsables de las características organolépticas del vino, el principal objetivo de las distintas técnicas empleadas en la vinificación consiste en extraerlos de una forma efectiva y óptima. Para ello es necesario que el hollejo de la uva se degrade con facilidad, puesto que es el que actúa como barrera frente a la difusión de los componentes fenólicos y aromáticos. Las técnicas enológicas destinadas a mejorar la extracción están centradas en facilitar la ruptura de las paredes celulares.

Muchos autores han propuesto la adición de enzimas exógenos durante la maceración, cuya actividad ayuda a degradar las paredes celulares. En otros estudios se han utilizado técnicas de maceración en frío e incluso de congelación de las uvas para romper la pared celular y facilitar la extracción de los compuestos. Aunque la variabilidad de los resultados obtenidos muestra que la efectividad de estas técnicas parece estar condicionada por factores como la variedad, la añada, las actividades enzimáticas empleadas o el método de enfriamiento utilizado para la maceración en frío.

1.2 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de investigación es aplicar distintas técnicas enológicas (adición de enzimas de maceración y aplicación de técnicas de frío) para mejorar la extractabilidad de compuestos fenólicos y aromáticos, y estudiar su influencia sobre la calidad de vinos tintos jóvenes. Para ello se plantean los siguientes objetivos parciales:

- ❖ Utilizar diferentes técnicas de frío (maceración prefermentativa en frío, congelación del mosto con nieve carbónica y congelación de las uvas) y de adición de enzimas macerativos (preparado enzimático comercial y enzima natural), comparándolas con una elaboración tradicional en variedades de Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah.
- ❖ Determinar la influencia de estas técnicas sobre parámetros cromáticos, fenólicos, aromáticos y sensoriales de los vinos obtenidos, en diferentes momentos de su elaboración (final de fermentación alcohólica, momento del embotellado y 6 meses después del embotellado) estudiando los resultados obtenidos durante su evolución.
- ❖ Comprobar el efecto de las distintas técnicas de frío y utilización de enzimas macerativos en la vinificación de uvas Monastrell procedentes de cuatro zonas vitícolas de la Región de Murcia pertenecientes a dos Denominaciones de Origen (Jumilla y Bullas).

2. INTRODUCCIÓN

Las tecnologías utilizadas durante la vinificación de vinos tintos suelen tener como principal objetivo la extracción efectiva de compuestos fenólicos responsables del color y de la estructura de los vinos, así como la extracción de compuestos responsables del aroma. La calidad de la materia prima es determinante para la calidad del vino obtenido, de modo que el estado de madurez de la uva determina el contenido potencial de estos compuestos. Sin embargo, que la uva posea un alto contenido en compuestos fenólicos y aromáticos es condición necesaria pero no suficiente para que la extracción sea efectiva. Se ha constatado que de uvas altamente coloreadas no siempre se obtienen vinos muy coloreados (Romero-Cascales, 2006). La mayor parte de los compuestos fenólicos y aromáticos se localizan en el hollejo de la uva y su extracción va a depender de la degradación que sufran las paredes celulares durante la maceración. La estructura y rigidez de las células del hollejo y las técnicas empleadas para facilitar la degradación serán factores decisivos para maximizar el paso de estos compuestos al vino.

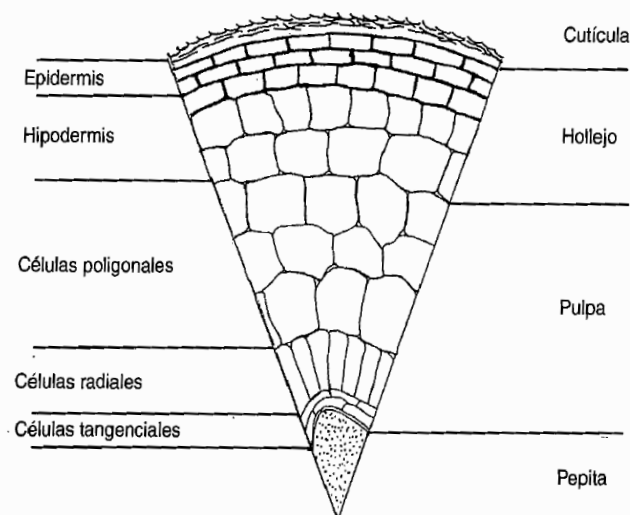
2.1 ESTRUCTURA, COMPOSICIÓN Y EXTRACTABILIDAD DE LA BAYA

El racimo de uva está formado por dos partes bien diferenciadas: el raspón o parte leñosa y las bayas o granos que están unidas al racimo mediante el pedicelo, a través del cual se nutren. Las bayas están formadas por una película exterior denominada hollejo o piel, una masa interna de la que se extrae el mosto, conocida como pulpa y un número variable de semillas o pepitas situadas en el centro.

La mayoría de los compuestos fenólicos y los compuestos aromáticos y sus precursores se localizan en el hollejo (Pogorzelski et al., 2007). Los compuestos fenólicos y los compuestos responsables del aroma se encuentran mayoritariamente en las células de la hipodermis, contenidos en disolución en el interior de las vacuolas celulares, junto con azúcares, ácidos y sales. Algunos compuestos fenólicos como los taninos se pueden encontrar también en la membrana vacuolar, ligados a proteínas, e incluso en la membrana celular unidos a polisacáridos de la pared.

La estructura del hollejo está formada por tres zonas o capas. La zona más externa es la cutícula, tiene un espesor de 1,5 a 4 micras y está compuesta por pequeñas células de forma aplastada, con paredes celulares muy gruesas y situadas en posición tangencial. Tras la cutícula se encuentra la epidermis, esta segunda zona está formada por dos capas de células alargadas y colocadas también en posición tangencial. La última zona se denomina hipodermis y puede contener de 6 a 8 capas de células situadas de menor a mayor tamaño hacia el interior del grano. Entre la pulpa y la hipodermis no existe un límite de transición perfectamente definido (**Figura 2.1**) (Lasanta-Melero, 2009).

Figura 2.1 Estructura de la baya.



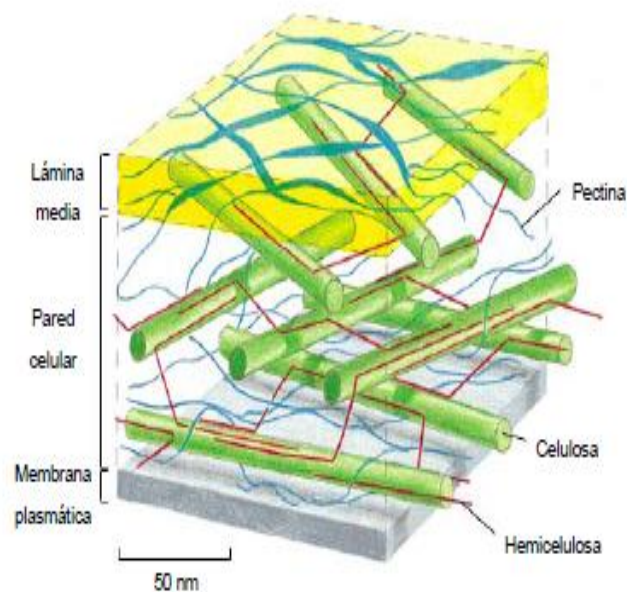
Las paredes celulares están formadas por polisacáridos complejos (pectinas, celulosa y hemicelulosa) y son las encargadas de proteger a la célula, dándole consistencia y rigidez. Se puede distinguir varias partes en su estructura (**Figura 2.2**):

- **Lámina media:** es la capa más externa y se comparte entre células adyacentes. Esta capa es rica en pectinas, que son polímeros de ácido

galacturónico altamente metilados. La ramnosa, arabinosa, galactanos y arabinogalactanos también pueden formar parte de estos polímeros.

- **Pared primaria:** está compuesta principalmente por fibras de celulosa, en una matriz de pectinas, hemicelulosa y proteínas. También se pueden encontrar otros compuestos como lignina, cutina, suberina, ceras, compuestos fenólicos y compuestos inorgánicos (Lau et al., 1985).
- **Pared secundaria:** está formada por acumulación de celulosa, xilano y lignina a partir de la pared primaria. Esta pared no siempre se forma, por lo que algunas células pueden carecer de ella.

Figura 2.2 Estructura de la pared celular



En la pared celular, las fibras de celulosa se encuentran unidas a las proteínas a través de xiloglucanos (hemicelulosa) y las pectinas se unen a los arabinogalactanos por residuos de serina. Durante la maduración del fruto se produce una degradación de los polisacáridos de la lámina media y de la pared

primaria. La pared se debilita y disminuye la adhesión entre las células (Ishimaru y Kobayashi, 2002).

En la vinificación, la extracción de los compuestos fenólicos y de los constituyentes aromáticos se produce durante la maceración y para ello es necesaria la ruptura de las paredes celulares, lo que requiere una previa degradación de la lámina media, rica en pectinas.

El término “extractabilidad” se utiliza como medida de la facilidad con la que estos compuestos pueden ser extraídos. La extracción dependerá de su concentración en la uva, del grado de maduración de ésta, de la composición de las paredes celulares y de las técnicas enológicas empleadas durante la maceración. Técnicas como los remontados y bazuqueos, la optimización de los tiempos de maceración, la adición de enzimas exógenos, las maceraciones en frío, la selección de levaduras, el *delestage* o el *flash-détente* son utilizadas para facilitar la extracción de dichos compuestos (Sachi et al., 2005).

2.2 UTILIZACIÓN DE ENZIMAS EN LA ELABORACIÓN DE VINOS TINTOS

Durante la maceración, los polifenoles y aromas varietales presentes en la uva son extraídos por la acción de actividades enzimáticas, la acción del SO₂, acciones mecánicas de remontados y bazuqueos y, una vez iniciada la fermentación alcohólica, por la acción del alcohol. Pero entre todos estos factores, son las actividades enzimáticas las máximas responsables de la degradación de las paredes celulares.

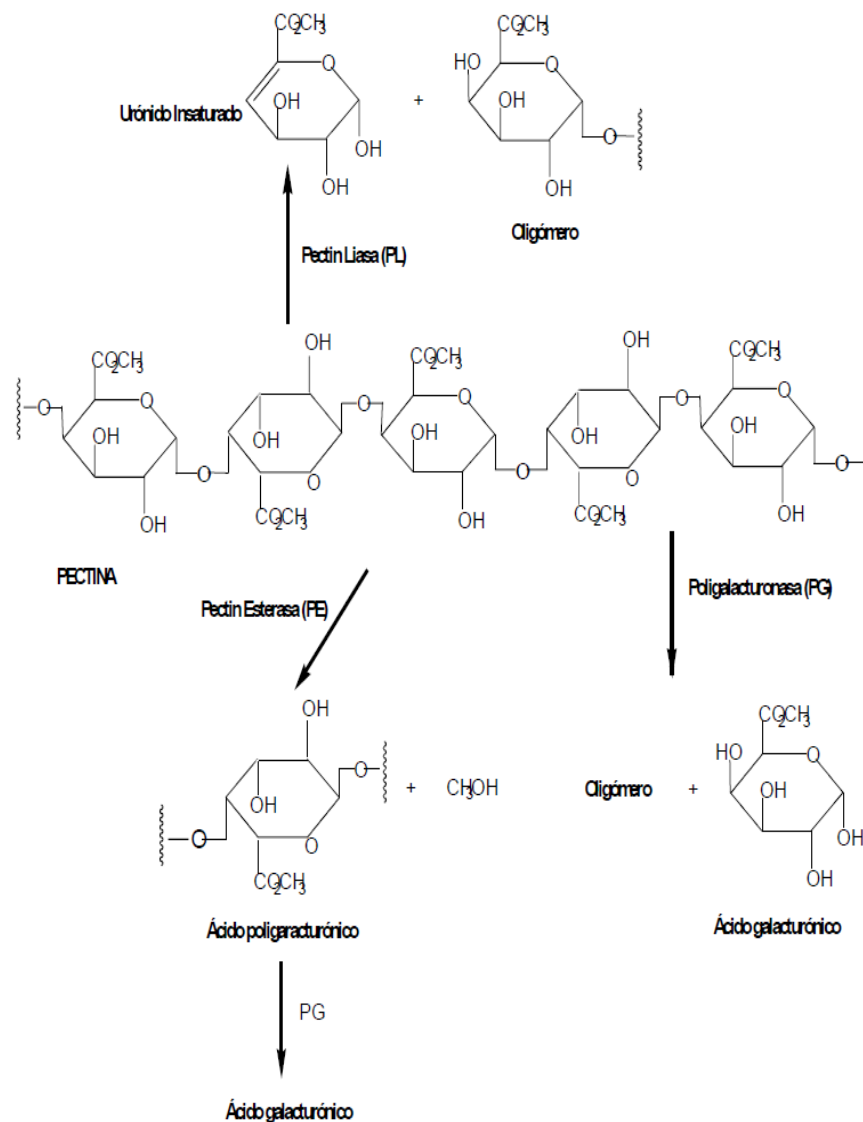
2.2.1 ACCIÓN DE LOS ENZIMAS

Los enzimas son proteínas naturales capaces de catalizar reacciones bioquímicas específicas, incrementando la velocidad de la reacción. Normalmente tienen una acción específica sobre un solo sustrato, con una temperatura y un pH óptimos de actuación, y su acción puede ser inhibida o potenciada por la presencia de otros compuestos.

Puesto que las distintas capas de la pared celular están formadas por moléculas diferentes y complejas, su degradación requerirá la acción de diferentes actividades enzimáticas. Así, en función del sustrato sobre el que son capaces de actuar, existen distintos enzimas con capacidad para degradar las paredes celulares:

- **Pectinasas**: son enzimas con actividad pectolítica, capaces de degradar la pectina. Hay cuatro tipos de enzimas pécticos, que pueden diferenciarse según su acción sobre los diferentes sustratos (**Figura 2.3**).

Figura 2.3 Acción de las pectinasas.



La pectinesterasa (PE) rompe los enlaces del grupo metilo de pectinas altamente metoxiladas. La poligalacturonosa (PG) rompe los enlaces entre unidades de ácido galacturónico no esterificado, la endo-PG actúa al azar a lo largo de la cadena y la exo-PG rompe los enlaces no reducidos del final de la cadena. La pectín liasa (PL) actúa al azar en la cadena para despolimerizar a los poligalacturanos rompiendo los enlaces entre moléculas metiladas. La pectato liasa (PAL) rompe uniones glicosídicas entre moléculas de ácido galacturónico no metiladas en pectinas poco metoxiladas (Amrani-Joutei et al., 2003).

- **Hemicelulasas:** la hemicelulosa es un polisacárido formado por macromoléculas asociadas no covalentemente a la celulosa. El principal componente de la hemicelulosa es el xiloglucano, aunque también se pueden encontrar arabinoxilanos, glucomananos y galactomananos. Los arabinanos tienen un esqueleto de arabinofuranosil unidos por enlaces α -1,5 y con ramificaciones adicionales de arabinosil cada tres unidades a lo largo de la cadena. Los galactanos tienen esqueletos de galactopiranosil unidos en β -1,4 o β -1,3. Estas cadenas se pueden sustituir por grupos arabinofuranosil o arabinanos para formar arabinogalactanos (Bautista-Ortín, 2005). Las hemicelulasas son los enzimas con capacidad para degradar los enlaces de las cadenas de hemicelulosa y, dependiendo del sustrato sobre el que actúan, se pueden distinguir entre arabinasas, xilanasas, galactanasas y glucanasas. Existen tres formas de enzimas arabinasa, la arabinasa A que degrada los oligómeros de arabinanos a monómeros, la arabinasa B que degrada el arabinano para dar una cadena lineal, y la endo-arabinasa que hidroliza al azar la cadena lineal, formando oligómeros sobre los que luego actúa la arabinasa A. La galactanasa y la endogalactanasa actúan al azar rompiendo, respectivamente, uniones β -1,4 y β -1,6 de la cadena de galactano. (Pellerín y Brollouet, 1994). La endo-glucanasa rompe los enlaces β -1,3-D-glucosilo y β -1,4-D-glucosilo de los xiloglucanos (Romero-Cascales, 2008).

- **Celulasas:** la celulosa es una cadena lineal de moléculas de glucosa unidas por enlaces tipo β -1,4 que pueden formar puentes de hidrógeno dando lugar a microfibras cristalinas. La celulosa con alto grado de cristalización es difícilmente degradable, pero la celulosa con bajo grado de cristalización si puede ser degradada por la acción de actividades enzimáticas. Las celulasas son los enzimas con capacidad para degradar a la celulosa. Son un complejo enzimático formado por endo-glucanasa, exo-glucanasa y celobiasa. La endo-glucanasa escinde las cadenas de celulosa amorfa, hidrolizando al azar los enlaces de glucosa β -1,4. La exo-glucanasa libera celobiosa y glucosa a partir del extremo terminal de las cadenas de glucosa, rompiendo los enlaces β -1,4 no reducidos del final de la cadena. La celobiasa degrada la celobiosa a glucosa, compitiendo con la actividad de la endo y exo-glucanasa (Crouzet et al., 2000).
- **Galactosidasas:** estos enzimas catalizan la ruptura de las cadenas de galactosa. La α -galactosidasa tiene acción exo-, actuando sobre los enlaces α -1,4 de las cadenas laterales de los ramnogalacturonanos tipo-II, los galactoglucomananos y los galactomananos. Su intervención en el reblandecimiento de la baya no está bien definida. Se ha demostrado su presencia en la pared celular y un aumento de su actividad durante la maduración de uvas tintas (Ortega-Regules, 2006), aunque otros autores encontraron un descenso de su concentración a partir del envero (Barnavon et al., 2000). La β -galactosidasa actúa sobre los enlaces β -1,4 de las cadenas laterales de los ramnogalacturonanos tipo-I y tipo-II y de los xiloglucanos (Fry, 1995; Crouzet et al., 2000). También se ha encontrado un aumento de su actividad durante la maduración y algunos autores han citado que es el enzima que actúa en las primeras etapas del ablandamiento del fruto siendo su papel en el reblandecimiento más importante que el de la pectinesterasa (PE) o la poligalacturonasa (PG) (Mohd Ali et al., 1995; Lazan et al., 1995).
- **Proteasas:** la pared celular puede contener alrededor de un 10% de proteínas que, mayoritariamente, tienen funciones estructurales. Las

proteasas son los enzimas responsables de la degradación de las proteínas presentes en la pared. La actividad de enzimas como la lisina, la autolisina o la extensina peroxidasa es capaz de liberar péptidos de las paredes celulares (Matsuda et al., 1985; Dey et al., 1997).

2.2.2 PREPARADOS ENZIMÁTICOS COMERCIALES

Los enzimas se encuentran de forma natural en la uva, pero normalmente se encuentran en cantidades más bajas que las necesarias para degradar de manera efectiva las paredes celulares y extraer eficientemente los compuestos fenólicos y aromáticos. La adición al mosto de enzimas exógenos, también conocidos como enzimas de maceración, se comenzó a aplicar a comienzos de la década de los 70, sobre todo para conseguir un mayor rendimiento del mosto en el estrujado de la uva y para facilitar la clarificación (Capdeboscq et al., 1994). Actualmente el uso de enzimas exógenos se ha diversificado, empleándose para fines más concretos como la extracción de compuestos fenólicos responsables del color y de constituyentes aromáticos.

Los preparados enzimáticos utilizados son material extracelular obtenido en fermentaciones controladas producidas por cepas de microorganismos. Las cepas utilizadas son generalmente *Aspergillus Niger* y el resultado de la fermentación es un preparado que contiene diferentes actividades enzimáticas. La mayor o menor concentración de enzimas en el preparado y las actividades que estos presenten dependerán de la cepa utilizada, de las condiciones de fermentación y del tipo de sustrato fermentado. La distinta naturaleza de los enzimas presentes en las preparaciones y su nivel de actividad condicionan la eficacia de estos productos. Las actividades varían mucho dependiendo del fabricante, que suele utilizar unidades propias para expresar la concentración. Los preparados comerciales contienen principalmente actividades enzimáticas pectolíticas (poligalacturonasa PG, pectín-esterasa PE y pectín-liasa PL) y actividades enzimáticas secundarias (celulasas, hemicelulasas, proteasas o glicosidasas) que refuerzan la acción de las pectinasas para conseguir una mayor ruptura de las células.

Otros factores importantes de los que depende su efectividad son el pH y la temperatura del mosto en el momento de su aplicación. Generalmente, valores bajos de pH y temperatura inhiben la acción de las actividades enzimáticas. La presencia de alcohol conforme avanza la fermentación alcohólica también produce una pérdida en la eficacia de las actividades enzimáticas (Romero-Cascales, 2008).

Los avances en las técnicas de ingeniería genética, ingeniería de proteínas e ingeniería de procesos han permitido producir enzimas más puros y optimizar las propiedades de los enzimas antes de su producción. Actualmente es posible encontrar en el mercado preparados enzimáticos con actividades seleccionadas en función del fin que se persiga con su aplicación (Lasanta-Melero, 2009).

Un alto nivel de actividad pectin-liasa provoca una rápida disminución de la viscosidad del mosto y puede ser recomendable para obtener desfangados rápidos. Si a esta actividad se le une una alta actividad poligalacturonasa resulta un preparado muy eficaz en la clarificación de mostos y vinos (Palacios et al., 2003). Cuando lo que se persigue es la extracción efectiva de la materia colorante, se suelen utilizar preparados enzimáticos con actividades principales poligalacturonasa, pectin-esterasa y pectin-liasa y actividad secundaria glucanasa (Clare et al., 2002), aunque se ha observado que la acción de la enzima β -galactosidasa juega también un papel importante en la ruptura de las paredes celulares durante la maduración y, sin embargo, no suele estar presente en los preparados enzimáticos comerciales (Gil-Muñoz et al., 2007). Los preparados con actividad enzimática glucosidasa son utilizados para facilitar la liberación de los precursores aromáticos, ya que este enzima favorece la hidrólisis de los enlaces glucosídicos que presentan los constituyentes aromáticos cuando se encuentran ligados a otros compuestos. Aunque también se ha observado que la actividad glucosidasa produce una decoloración en vinos tintos, ya que provoca la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de los antocianos (Pogorzelski et al., 2007; Romero-Cascales 2008; Lasanta-Melero, 2009). La actividad del enzima cinamil-esterasa provoca una disminución en el contenido de los ésteres de los ácidos hidroxicinámicos,

ya que cataliza su hidrólisis, liberándose los ácidos correspondientes, que por acción de la levadura de contaminación *Brettanomyces dekkera* pueden originar etil-fenoles con aromas fenólicos indeseados (Chatonnet et al., 1995), sin embargo estos etil-fenoles también pueden formar polímeros condensados con algunos antocianos, contribuyendo a la estabilización del color del vino (Fulcrand et al., 2006).

Se han obtenido muchas contradicciones en los estudios realizados sobre la aplicación de enzimas de maceración. Así, en muchos trabajos se ha mostrado que la aplicación de enzimas promueve la extracción de color y de aromas varietales, mejorando la calidad del vino tinto (Sacchi et al., 2005), pero también existen numerosos estudios en los que los resultados obtenidos no han sido los deseados. Soto-Vazquez et al. (2010) observaron que la adición de un preparado enzimático con actividades pectinasas, en la elaboración de vinos Mencía, favorecía la extracción de antocianos y la estabilización de color mediante copigmentación. Bautista-Ortín (2005) estudió la aplicación de enzimas en la vinificación de uvas Monastrell durante dos campañas consecutivas. En la primera campaña encontró que el uso de enzimas mejoraba las características de los vinos, mientras que en la segunda campaña, con la uva perfectamente madura, no se encontraron diferencias entre los vinos tratados con adición de enzimas y el vino control. Romero-Cascales (2008) también estudió el efecto de diferentes preparados enzimáticos en la vinificación de uva Monastrell y observó que la aplicación de preparados con distintos niveles de actividad enzimática no originó grandes diferencias en las características cromáticas de los vinos obtenidos y que el efecto de las actividades enzimáticas era mayor cuando las uvas de partida tenían un grado de madurez óptimo, pero no cuando se encontraban poco o muy maduras. También observó que el uso de enzimas macerativos era una buena herramienta para acortar los tiempos de maceración. Di Profio et al., (2011) estudiaron la adición de un preparado enzimático en la vinificación de uvas Merlot, Cabernet Franc y Cabernet Sauvignon durante tres campañas consecutivas y observaron que la adición de enzimas daba lugar a vinos con mayor intensidad de color en dos de las campañas estudiadas. La eficacia de los enzimas parecía depender de la variedad y de la añada, de modo que los

enzimas provocaron un aumento en la extracción de antocianos totales solo cuando la uva de partida contenía altas concentraciones de antocianos. En estudios realizados en vinos de Pinot Noir (Gerbaux et al., 2002), la adición de enzimas de maceración aumentó la extracción de compuestos fenólicos, pero al evaluar el perfil aromático se encontró un notable aumento en el contenido de fenoles volátiles no deseados. Si los enzimas utilizados eran purificados, eliminando la actividad enzimática cinamil-esterasa que estos presentaban, no se producía este aumento de la concentración de fenoles volátiles en el vino. Lasanta-Melero (2009) observó que la adición de un preparado enzimático con actividad principal β -glicosidasa durante la vinificación de vinos Tempranillo, Syrah y Merlot producía un aumento del contenido aromático, especialmente de alcoholes, derivados fenólicos, terpenos y norisoprenoides, pero provocaba un ligero descenso en el contenido de antocianos. Piñeiro et al. (2006) también estudiaron el efecto de la adición de enzimas con actividad β -glicosidasa en vinos comerciales monovarietales de 13 variedades diferentes pero encontró que la adición de enzimas influía muy poco en los niveles de compuestos aromáticos tipo éster.

Estos resultados ponen de manifiesto el hecho de que, en la actualidad, el empleo de enzimas de vinificación constituya un punto de investigación de gran interés, especialmente la relación entre actividades enzimáticas presentes en las preparaciones empleadas y las características de los vinos obtenidos.

2.3 UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS DE FRÍO EN LA ELABORACIÓN DE VINOS TINTOS

Puesto que las membranas de las paredes celulares de las pieles forman una barrera frente a la difusión de los compuestos fenólicos y de los constituyentes aromáticos, todas las técnicas enológicas que ayuden a degradar las paredes celulares estarán encaminadas a mejorar la extracción de estos compuestos.

2.3.1 MACERACIÓN PREFERMENTATIVA EN FRÍO

El origen de la maceración prefermentativa como técnica dirigida a mejorar la extracción de la materia colorante y aromática procede de la Borgoña (Delteil, 2004) donde, debido a las bajas temperaturas de la región, la uva recolectada solía llegar muy fría a la bodega y, como consecuencia de ello, el comienzo de la fermentación alcohólica se retardaba unos cuantos días durante la maceración. Los bodegueros observaron que los vinos que se obtenían cuando se producía este fenómeno eran vinos de buena calidad y empezaron a buscar sistemas que les permitiesen prolongar aún más el tiempo de maceración sin que comenzase la fermentación. Con este fin comenzaron a añadir altas dosis de dióxido de azufre, inhibiendo la acción de las levaduras e induciendo, por tanto, las maceraciones prefermentativas. Así se originaron las maceraciones sulfíticas, pero esta técnica no es recomendable ya que la elevada adición de dióxido de azufre está legalmente limitada debido a sus efectos nocivos sobre la salud.

Para alargar la fase prefermentativa sin adicionar elevadas dosis de SO₂ se comenzaron a utilizar métodos de enfriamiento durante la maceración. Esta técnica, denominada *cold soak* puede considerarse originaria de California, ya que fue allí donde la maceración prefermentativa en frío se convirtió en un sistema habitual de vinificación.

En la actualidad la maceración prefermentativa en frío es una técnica ampliamente utilizada en la elaboración de vinos blancos y también comienza a ser frecuente en la elaboración de vinos tintos. Como técnica de vinificación en tinto está admitida por la O.I.V mediante la resolución OENO 12/2005, donde se define como el *“procedimiento que consiste en macerar en frío las uvas rojas despalilladas y/o estrujadas o eventualmente enteras mantenidas en contacto con el mosto a una temperatura y durante un tiempo adaptados al objetivo buscado antes del inicio de la fermentación alcohólica”* y cuyos objetivos son *“favorecer la extracción de los constituyentes del hollejo por medio de procedimientos difusionales y enzimáticos con el fin de aumentar la*

complejidad aromática y gustativa de los vinos y mejorar las características del color".

Se trata pues de una técnica caracterizada por un período de contacto de 7 a 10 días entre el mosto y los hollejos, a baja temperatura (entre 4°C y 10°C) con el fin de difundir de forma selectiva ciertos compuestos hidrosolubles de la uva (pigmentos, aromas, polisacáridos, polifenoles,...) en ausencia de alcohol (Llaudy et al., 2005).

El frío necesario para enfriar la pasta de vendimia puede ser obtenido de varias maneras. Es conveniente que la uva llegue a la bodega a baja temperatura, y para ello se recomienda la vendimia nocturna o, en su defecto, su almacenaje en cámaras frigoríficas para disminuir su temperatura antes del estrujado. De esta forma el coste necesario para enfriar la pasta es menor, puesto que la uva ya se encuentra a baja temperatura. Una técnica para enfriar la pasta puede ser utilizar intercambiadores de calor justo después del prensado, pero se requiere un equipo de frío muy potente y costoso. Otra posibilidad es el enfriamiento en los propios depósitos utilizando camisas de refrigeración, aunque con esta técnica se corre el riesgo de que la pasta se enfríe solo en las proximidades de las paredes y comience la fermentación en las zonas más internas, especialmente si los depósitos son muy grandes. También se pueden mantener los depósitos dentro de cámaras frigoríficas a la temperatura deseada durante el tiempo que dure la maceración prefermentativa, pero esto también requiere unas instalaciones costosas si los depósitos son muy grandes. La técnica más utilizada es la adición directa de nieve carbónica (CO₂ en estado sólido) sobre la pasta de maceración. Con la adición de nieve carbónica el mosto se enfría muy rápidamente produciendo un shock térmico, congelando las pieles de la uva, provocando la rotura de las células y favoreciendo la futura solubilización de sus componentes (Celotti y Michelet, 2004). Presenta además otras ventajas adicionales, ya que el rápido enfriamiento inhibe la acción de las polifenoles oxidasas, responsables de las oxidaciones enzimáticas de los antocianos durante las primeras etapas de elaboración del vino (Zamora, 2004). Por otro lado, la sublimación de la nieve carbónica provoca una saturación de dióxido de carbono en estado gaseoso,

desplazando al oxígeno presente en el medio, protegiendo, por tanto, a los compuestos aromáticos y a los antocianos frente a posibles oxidaciones. Este desplazamiento también inhibe el desarrollo de las levaduras oxidativas y de las bacterias acéticas, pero la saturación del medio con dióxido de carbono provoca además un desplazamiento del dióxido de azufre, lo que puede resultar contraproducente ya que cuando aumente la temperatura del depósito, en ausencia de SO₂, existe un alto riesgo de que la fermentación alcohólica se lleve a cabo por levaduras autóctonas. Para evitar esta situación es recomendable inocular con levaduras seleccionadas cuando la temperatura del depósito comience a aumentar (Delteil, 2004).

En los estudios realizados sobre la aplicación de técnicas de maceración prefermentativa en frío se han encontrado resultados muy diversos. Couasnon (1999) encontró resultados espectaculares en la extracción de compuestos fenólicos para vinos de Merlot, pero otros autores han observado que los resultados de esta técnica parecen estar condicionados por el método de enfriamiento (Heredia et al., 2010), por el grado de madurez de la uva empleada (Llaudy et al., 2005) o por la temperatura alcanzada durante el enfriamiento (Parenti et al., 2004).

Sachi et al. (2005) señalaron que la adición de nieve carbónica provocaba un aumento significativo de antocianos en vinos Merlot si iba acompañada de una sulfitación. Reynols et al. (2001) observaron que la maceración en frío aumentaba la extracción de antocianos en Syrah cuando era combinada con bajas temperaturas de fermentación (15 y 20 °C), pero no cuando se combinaba con temperaturas de fermentación más altas (30 °C). Heatherbell et al. (1997) estudiaron el efecto de la maceración prefermentativa en frío en vinos de Pinot Noir, observando un aumento significativo de la fracción fenólica, pero también encontraron que se producía una disminución del carácter varietal de los vinos. Sin embargo, otros resultados obtenidos del análisis de vinos tintos elaborados con la variedad Tempranillo mediante técnicas prefermentativas en frío, mostraron que la maceración en frío, con o sin nieve carbónica, facilitaba la manifestación de caracteres aromáticos propios de la variedad, además de aumentar el contenido de otros compuestos aromáticos

como los acetatos o los ésteres etílicos (Morro-Urda, 2009). Álvarez et al. (2006) encontraron un aumento significativo en los niveles de ésteres etílicos y acetatos en vinos de Monastrell obtenidos mediante maceración prefermentativa en frío, pero en este caso el resultado era aún mejor cuando el enfriamiento se había producido por adición de nieve carbónica.

2.3.2 CONGELACIÓN DE LA UVA O SUPRAEXTRACCIÓN

La congelación de la uva, también conocida como supraextracción, es una técnica que consiste en congelar y descongelar la uva antes de someterla al proceso de vinificación (Defranoux et al., 1989). Es una variante de la técnica utilizada para la elaboración de los “*icewine*” o “*vinos de hielo*” que consiste en prensar la vendimia parcialmente congelada de forma natural (crioextracción selectiva o crioselección) (Roldán-Gómez, 2008).

Estas técnicas son tradicionalmente utilizadas en la elaboración de vinos blancos cuando se persigue mejorar la extracción de aromas varietales y aumentar la concentración de azúcares o el porcentaje de alcohol (Chauvét et al., 1986), aunque la supraextracción también ha comenzado a utilizarse para mejorar la calidad de vinos tintos, ya que la congelación y descongelación de los hollejos y de las capas subepidérmicas provoca modificaciones de la ultraestructura de los tejidos produciendo un efecto comparable al de la maceración pelicular en frío (Riberéau-Gayón et al., 2003).

El proceso de congelación provoca una serie de cambios irreversibles en los tejidos, que se manifiestan tras la descongelación. Estos cambios son la consecuencia de diferentes procesos: daños por enfriamiento, daños por concentración de soluto, daños por la formación de cristales de hielo y daños por la variación de volumen (Mallet, 1994; Ordoñez, 1998; Rodríguez, 2002). El aumento del volumen de la baya puede provocar desgarros. La formación de hielo provoca un aumento de la presión interna, facilitando la separación de las paredes celulopectídicas. Las modificaciones en la concentración de soluto influirán en los fenómenos de osmosis, provocando la desecación del protoplasma y la separación de las membranas celulares de las paredes. La

formación de cristales puntiagudos también facilitará la degradación del interior de las células.

Todos estos procesos hacen que la congelación produzca importantes modificaciones en la estructura de los tejidos, facilitando la extracción de componentes intra y extracelulares.

Según Riberéau-Gayón (2003) la supraextracción favorece fundamentalmente la liberación de aromas y sus precursores, pero limita la extracción de compuestos fenólicos. Sin embargo, Simonato et al. (2005) señalaron que los daños producidos en el hollejo por la baja temperatura producen un aumento de la extracción de fenoles totales, catequinas y proantocianidinas, aunque el alcance de la extracción depende de la temperatura de prensado y de la variedad.

Se pueden utilizar cámaras frigoríficas para congelar las uvas, aunque algunos autores también han señalado la adición de nieve carbónica o de nitrógeno líquido sobre la uva como método de congelación (Parenti et al., 2004). El uso de nieve carbónica confiere la ventaja adicional de que no sólo congela la uva, sino que también la protege del oxígeno. En ensayos realizados en Cabernet Sauvignon y Cabernet Franc (Couasnon, 1999) se observó que la congelación de las uvas con nieve carbónica provocaba un aumento en la concentración de antocianos y de la concentración de taninos. El incremento de taninos pudo ser debido a que la congelación completa de la uva favoreció la ruptura de las células de las semillas en las que están contenidos. Para evitar el aumento de taninos procedentes de las semillas es recomendable que la congelación no afecte a las pepitas.

Como ya se ha comentado, esta técnica ha sido ampliamente estudiada en la elaboración de vinos blancos. Su aplicación en la elaboración de vinos tintos es más novedosa y su estudio puede resultar de gran interés como método para mejorar la extracción de compuestos fenólicos y aromáticos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio experimental se basó en la aplicación de técnicas enológicas de vinificación a baja temperatura y en la adición de enzimas de maceración para estudiar su efecto sobre la extracción de compuestos fenólicos y volátiles, así como la evolución de los parámetros cromáticos y las características organolépticas.

El ensayo se realizó en tres variedades diferentes (Monastrell, Syrah y Cabernet Sauvignon) durante dos campañas (2007 y 2009). En la segunda campaña (2008) solo se estudió la variedad Monastrell procedente de cuatro zonas con diferentes condiciones edafoclimáticas.

3.1.1 CAMPAÑA 2007

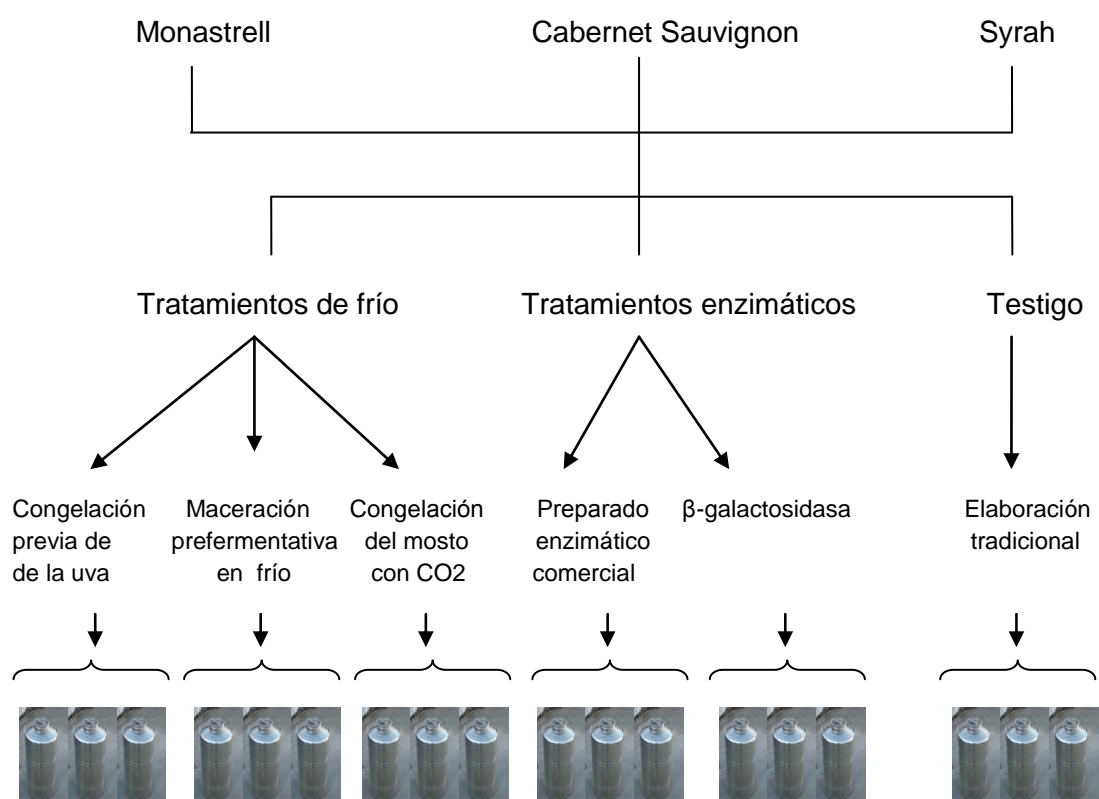
Las variedades de uva tinta estudiadas fueron Monastrell, como variedad predominante de las Denominaciones de Origen de la Región de Murcia y Cabernet Sauvignon y Syrah como variedades que se están introduciendo bien en la región. Toda la uva utilizada procedía de fincas comerciales de la bodega Casa de la Ermita (D.O. Jumilla), situadas en el paraje El Carche, término municipal de Jumilla, y donde el sistema de conducción era en espaldera y el riego por goteo.

Se comparó el efecto de tres técnicas diferentes de maceración a baja temperatura (maceración prefermentativa en frío, congelación previa de la uva y congelación del mosto con nieve carbónica), así como el efecto de la adición de dos enzimas macerativos (**Figura 3.1**), siendo uno de ellos un preparado enzimático comercial (Enozym Vintage, Agrovin) obtenido a partir del hongo filamentoso *Aspergillus Niger*, con actividades enzimáticas pectolíticas (pectinliasa 2,8 UI/g, poligalacturonasa 546,6 UI/g y pectinesterasa 7,3 UI/g) y actividad secundaria celulasa (β -glucanasa 179,6 UI/g). Para el segundo tratamiento enzimático se utilizó un enzima natural (β -galactosidasa, 8,0 unidades/mg sólido, Sigma-Aldrich) obtenido a partir de *Aspergillus Oryzae*.

Las técnicas enológicas empleadas se compararon con una vinificación tradicional o testigo. Todas las vinificaciones se realizaron por triplicado. La uva se analizó en el momento de la entrada en bodega, determinando los parámetros generales de madurez tecnológica y polifenólica. Se determinó también la composición de antocianos, flavonoles y proantocianidinas.

Para el seguimiento de los parámetros fenólicos, cromáticos y aromáticos de los vinos, se diseñó un protocolo de análisis en diferentes momentos de la vinificación: al finalizar la fermentación alcohólica, en el momento del embotellado y 6 meses después del embotellado. Se realizaron análisis sensoriales de los vinos en el momento del embotellado y 6 meses después del embotellado.

Figura 3.1. Diseño de las vinificaciones campaña 2007.

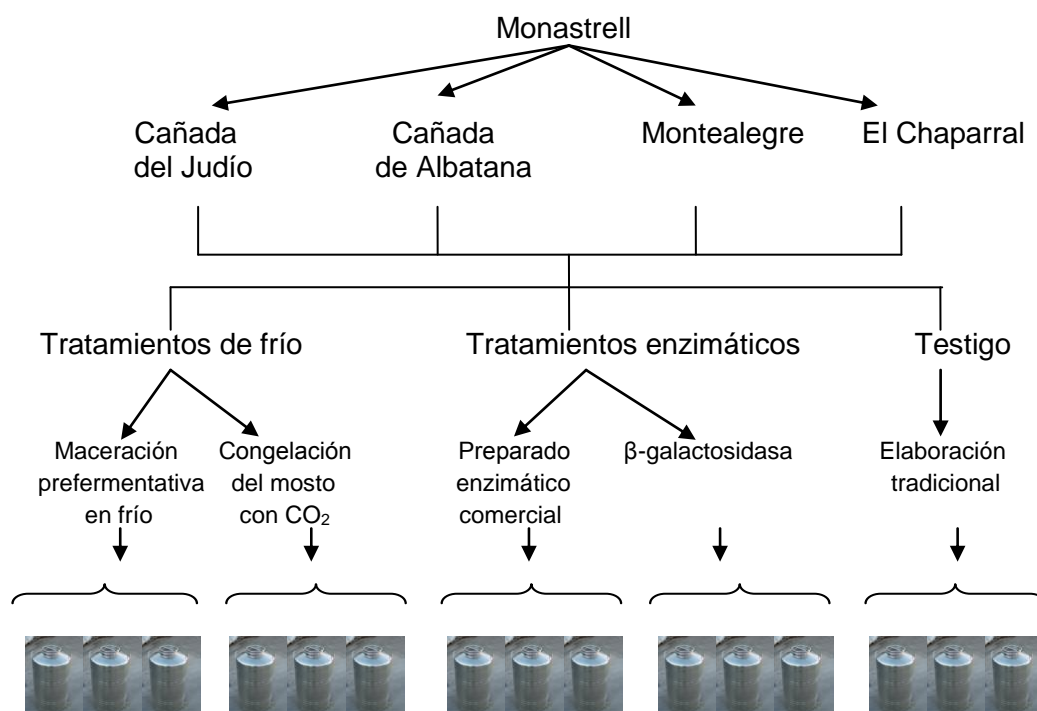


3.1.2 CAMPAÑA 2008

Durante la campaña 2008 se estudió la variedad Monastrell procedente de cuatro zonas con diferentes características edafoclimáticas. La uva Monastrell perteneciente a la D.O. Jumilla procedía de la Cañada del Judío (situada en el término municipal de Jumilla), de la Cañada de Albatana y de Montealegre del Castillo (estos dos municipios pertenecientes a la provincia de Albacete). Todas eran parcelas privadas, con cepas de más de 20 años de antigüedad, de secano y con sistema de conducción en vaso. La uva Monastrell procedente de la cuarta zona seleccionada, perteneciente a la D.O Bullas, procedía de la finca experimental que la Consejería de Agricultura, Agua y Medioambiente de la Región de Murcia tiene situada en El Chaparral (término municipal de Cehegín), donde el sistema de conducción era en vaso y el riego por goteo.

Se estudió el efecto de técnicas de maceración a baja temperatura y de adición de enzimas macerativos (**Figura 3.2**), comparándolas con una vinificación tradicional.

Figura 3.2. Diseño de las vinificaciones campaña 2008.

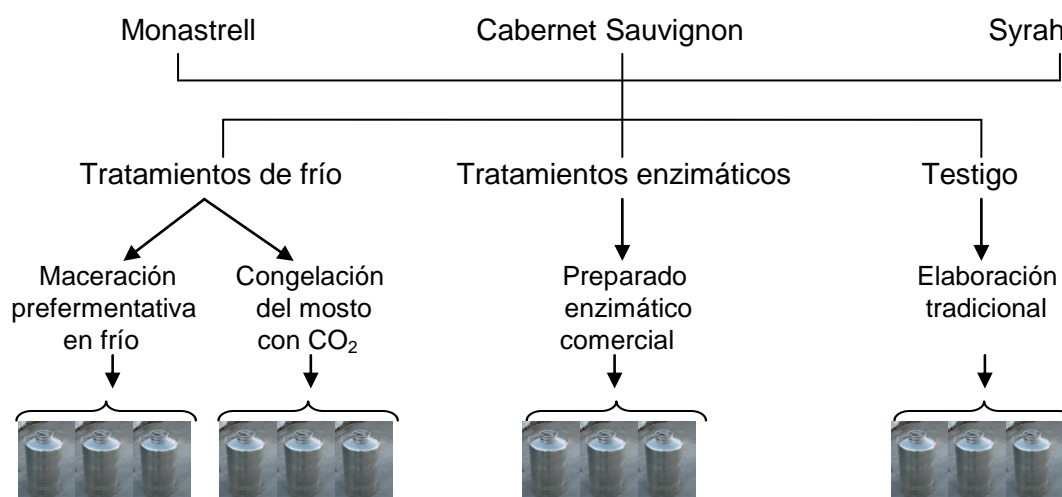


Se realizó un análisis de la uva en el momento de la entrada en bodega. Al final de la fermentación alcohólica se analizaron los parámetros fenólicos y cromáticos.

3.1.3 CAMPAÑA 2009

En esta campaña se empleó de nuevo uva de las variedades Monastrell, Syrah y Cabernet Sauvignon, procedente de la finca que la bodega comercial Casa Castillo (D.O. Jumilla) tiene ubicada en la ladera de la Sierra del Molar, término municipal de Jumilla. Todas ellas en secano, con un sistema de conducción en vaso en las parcelas de Monastrell y Cabernet Sauvignon y en espaldera en la parcela de Syrah. El análisis de los distintos parámetros en la uva y en los vinos fue igual que el establecido en la campaña 2007. Los análisis sensoriales se realizaron al finalizar la fermentación alcohólica y 6 meses después del embotellado. La **Figura 3.3** muestra las técnicas enológicas empleadas en esta campaña.

Figura 3.3. Diseño de las vinificaciones campaña 2009.



3.2 UVA

3.2.1 MATERIAL VEGETAL

En todas las vinificaciones, la uva utilizada fue uva tinta (*Vitis Vinífera L.*) La uva se recolectó a mano y fue transportada en cajas de 20 kg hasta la Bodega Experimental del IMIDA, en la Estación Enológica de Jumilla.

La **Tablas 3.1 y 3.2** muestran los datos edafoclimáticos de las zonas vitícolas de las que procedía la uva en cada una de las campañas. Los valores meteorológicos corresponden a los períodos de maduración y se obtuvieron utilizando el Sistema de Información Agraria de Murcia (SIAM) y el Servicio Integral de Asesoramiento al Regante (SIAR) de Castilla-La Mancha. Se aplicó el método de los polígonos de Thiessen (Thiessen, 1911) para determinar la estación meteorológica correspondiente a cada una de las zonas estudiadas.

Tabla 3.1. Datos edafoclimáticos desde el envero hasta la vendimia, campañas 2007 y 2009.

Campaña	Zona	Altitud (msnm)	Datos climáticos	Estación meteorológica	HS	Tm (°C)	Pm (mm)	HRm (%)
2007	El Carche	700,00	Julio	JU52	346	26.31	1.9	51.25
			Agosto		337	25.74	20.9	60.18
			Septiembre		286	21.61	17.7	67.27
			Octubre		231	16.44	85.7	72.77
2009	Sierra del Molar	750,00	Julio	JU12	366	26.89	0.1	48.75
			Agosto		223	25.17	35.9	57.01
			Septiembre		197	20.44	27.5	70.61

Abreviaturas: HS: horas de sol; Tm: temperatura media; Pm: precipitación media; HRm: humedad relativa media.

Tabla 3.2. Datos edafoclimáticos desde el envero hasta la vendimia, campaña 2008.

Zona	Altitud (msnm)	Datos climáticos	Estación meteorológica	HS	Tm (°C)	Pm (mm)	HRm (%)
Cañada del Judío	449,09	Julio	JU12	367	25.22	0.6	54.49
		Agosto		354	25.45	0.0	54.65
Albatana	692,95	Julio	AB06	409	24.22	10.4	48.77
		Agosto		386	24.35	1.4	48.75
		Septiembre		316	19.39	41.4	59.84
Montealegre	777,43	Julio	JU42	362	23.83	17.4	54.75
		Agosto		350	23.82	0.0	52.61
		Septiembre		289	18.90	36.1	65.25
		Octubre		248	14.43	44.2	75.95
Chaparral	485,00	Julio	CR32	360	24.72	1.2	55.19
		Agosto		355	24.71	0.0	56.14
		Septiembre		275	20.13	77.9	65.10

Abreviaturas: HS: horas de sol; Tm: temperatura media; Pm: precipitación media; HRm: humedad relativa media.

3.2.2 OBTENCIÓN DEL MOSTO

En el momento de la entrada de la uva a la bodega se tomó una muestra representativa de aproximadamente 300 g. En el laboratorio se cortaron los granos por el pedúnculo y se trituraron, usando un Robot Coupe modelo Gt 550 (Francia) durante dos minutos, seleccionando una velocidad baja para evitar la ruptura de las pepitas. El triturado se centrifugó a 4400 rpm durante 15 minutos (Centrífuga Eppendorf 5810R). En el mosto obtenido se determinaron grado Brix, acidez total, pH, ácido málico y tartárico.

3.2.3 MADUREZ TECNOLÓGICA DE LA UVA

3.2.3.1 Grado Brix

Se utilizó un refractómetro digital Atago modelo PR-101 (Atago, USA) con sensor de temperatura para la medida del grado Brix, realizando un ajuste previo del cero con agua destilada.

3.2.3.2 pH

La medida se realizó con un valorador automático Metrohm modelo 686 (Metrohm, Suiza), según el método oficial CEE, Reglamento N° 2676/90.

3.2.3.3 Acidez total

La acidez total se obtuvo por medida potenciométrica con un valorador automático Metrohm modelo 686 (Metrohm, Suiza), según el método oficial CEE, Reglamento N°2676/90. Los resultados se expresaron en g/L de ácido tartárico en el mosto.

3.2.3.4 Ácido L-málico

Se midió con un secuenciador automático Hycel, modelo Lisa 200 (Hycel Diagnostics, EEUU), utilizando un test enzimático y siguiendo el método oficial CEE Reglamento N° 2676/90. Los resultados se expresaron en g/L de ácido málico en el mosto.

3.2.3.5 Acido tartárico

Se determinó, con un secuenciador automático Hycel, modelo Lisa 200 (Hycel Diagnostics, EEUU) siguiendo el método colorimétrico Rebelein modificado. Los resultados se expresaron en g/L de ácido tartárico en el mosto.

3.2.4 MADUREZ POLIFENÓLICA DE LA UVA

Para el cálculo de la madurez fenólica se utilizó el método de Saint-Cricq et al. (1998), en el que se determina la capacidad de extracción de los antocianos de la membrana celular de los hollejos, expresada como índice de extractabilidad de antocianos (EA%) o índice de madurez celular (IMC%). El método consiste en realizar una extracción reproduciendo las condiciones de maceración de un vino (pH 3.6) y, por otro lado, una extracción en condiciones extremas (pH 1). La diferencia entre ambos resultados sirve para medir el grado de fragilidad de la membrana celular o madurez fenólica de la uva y, por consiguiente, la capacidad de extracción de estos compuestos.

El procedimiento experimental consiste en pesar dos fracciones de 25 g de la uva triturada, en vasos de precipitado de 250 mL. A uno de ellos se le adiciona una disolución a pH 1 (HCl 0,1 N) y al otro 25 mL de una disolución a pH 3.6 (10 g de ácido tartárico, 9 mL de NaOH 32% y H₂O hasta un volumen final de 2 L). Se deja macerar a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se centrifuga a 4400 rpm durante 15 minutos y el líquido sobrenadante se utiliza en la determinación de:

- **Antocianos extraíbles:** concentración de antocianos a pH 3,6 que representa el potencial de antocianos fácilmente extraíbles de la uva durante el proceso de vinificación.
- **Antocianos totales:** concentración de antocianos a pH 1 que representa el potencial total de antocianos en la uva.
- **IPT extraíbles a pH 3,6:** representa la cantidad de compuestos fenólicos de la uva que pueden ser fácilmente extraídos durante el proceso de vinificación.

El índice de madurez celular (IMC %) o índice de extractabilidad de antocianos (EA%) se calculó a partir de estos parámetros, mediante:

$$\text{IMC (\%)} = [(A_{\text{pH}1} - A_{\text{pH}3,6}) / A_{\text{pH}1}] * 100$$

El índice de madurez de las pepitas (IMP %) se calculó mediante:

$$\text{IMP (\%)} = [(IPT_{\text{pH}3,6} - A_{\text{pH}3,6} \times 40 / 1000) / IPT_{\text{pH}3,6}] \times 100$$

3.2.5 DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

3.2.5.1 Antocianos totales

Se obtuvieron por lectura de la absorbancia a 520 nm en cubetas de 1 cm de espesor, transcurridos 30 minutos desde la adición de 0,5 mL de mosto a 25 mL de HCl 0,1 N (Cayla et al., 2002). Se empleó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1600 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

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

3.2.5.2 Índice de polifenoles totales (IPT)

Se obtuvo por lectura de la absorbancia a 280 nm con cubetas de 1 cm de paso óptico, del mosto diluido 100 veces con agua destilada. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1600 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).

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

3.2.6 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

3.2.6.1 Antocianos y flavonoles en el hollejo

En el momento de la entrada de la uva a la bodega, se seleccionó una muestra representativa de 20 bayas y se congelaron a -20°C para su posterior análisis. Las uvas congeladas se pelaron con ayuda de un bisturí colocando los hollejos sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de humedad. Los hollejos fueron triturados en un molinillo (Vibratory Ball Mill Pulverisette 0, Cryo-box, FRITSCH, Alemania) con ayuda de nitrógeno líquido. Se pesaron 2 g del triturado y se realizó una extracción con 40 mL de metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac) durante 2 horas, con agitación de vaivén (Labotron, INFORS, Suiza) a 150 rpm y 25°C . El extracto metanólico obtenido se pasó por un filtro de nylon de $0,45\ \mu\text{m}$ (Albet LabScience, Dassel) y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La separación de los compuestos se realizó en un cromatógrafo líquido Waters 2960 (Waters, PA, USA), equipado con un detector diodo-array Waters 996. Se utilizó una columna C-18 de fase reversa de $25 \times 0,4\ \text{cm}$, LiChrospher® 100 RP –C18 (Merk, Darmstadt, Alemania) de $5\ \mu\text{m}$ de tamaño de partícula. El análisis se llevó a cabo a una temperatura de 25°C y el volumen de muestra inyectada fue de $20\ \mu\text{L}$. La separación se realizó en gradiente, utilizando como fases móviles una mezcla de ácido fórmico (4,5%) y acetonitrilo, con un flujo de $1\ \text{mL}/\text{min}$ (**Tabla 3.3**).

La identificación de los diferentes compuestos se llevó a cabo comparando sus espectros con los indicados en la bibliografía (Hebrero et al., 1998; Revilla et al., 1999, Castillo-Muñoz et al., 2009). La identificación se confirmó mediante HPLC-masas, en un cromatógrafo líquido acoplado a un detector de masas LC-MSD-trap VL-01036 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), equipado con un sistema de ionización por electrospray (ESI).

Los antocianos se cuantificaron a 520 nm utilizando como patrón externo el cloruro de malvidina-3-glucósido (Extrasynthèse, Genay, Francia) (Bautista-Ortín et al. 2005). Los resultados se expresaron en mg de malvidina por kg de uva, para cada uno de los antocianos monoglucósidos y de sus correspondientes derivados acilados. En el caso de los flavonoles se cuantificaron a 360 nm utilizando como patrones externos kampferol, miricetina y quercetina dihidrato (Sigma-Aldrich, MO, USA) (**Tabla 3.4**). Los resultados se expresaron en mg por kg de uva para cada uno de los flavonoles.

Tabla 3.3. Gradiente para la determinación de antocianos y flavonoles en uva por HPLC.

Tiempo (min)	% A	% B
0	90	10
10	90	10
30	88	12
40	88	12
85	79	21
95	79	21
100	0	100
105	0	100
110	90	10
115	90	10

A: ácido fórmico al 4.5%; B: acetonitrilo

Tabla 3.4. Cuantificación de antocianos y flavonoles.

Compuesto	Ecuación de la recta	R ²
Miricetina	$y = 3,60 \cdot 10^5 X - 1,21 \cdot 10^5$	0,997
Kampferol	$y = 4,02 \cdot 10^4 X - 1,42 \cdot 10^3$	0,999
Quercetina	$y = 6,61 \cdot 10^5 X - 6,12 \cdot 10^5$	0,999
Malvidina	$y = 27,12 \cdot 10^6 X - 0,5199$	0,997

3.2.6.2 Taninos en el hollejo y las semillas

Se utilizó el método descrito por Kennedy y Jones (2001) basado en la reacción de floroglucinólisis para la ruptura de las cadenas de los taninos poliméricos. El procedimiento experimental, descrito por Hernández-Jiménez et al. (2009), fue el siguiente: se seleccionaron 10 granos de uva, las semillas y pieles de las uvas se separaron de la pulpa con un bisturí y fueron congeladas a -20°C para su posterior análisis. La extracción de los taninos se realizó con 10 mL de acetona/agua 2:1 en un agitador de vaivén (Labotron, INFORS, Suiza) a 200 rpm durante 24 horas. El extracto se concentró a vacío a 35°C usando un concentrador Centrivap (Labconco, USA) y se redisolvió posteriormente en 2 mL de metanol.

Una alícuota de 100 µL de este extracto metanólico se hizo reaccionar con 100 µL de reactivo de floroglucinol (solución con HCL 0.2N en metanol, 100 g/L de floroglucinol y 20 g/L de ácido ascórbico), siguiendo el procedimiento descrito por Kennedy y Taylor (2003). La reacción se llevó a cabo en un baño de agua (Selecta, Unitronic OR) a 50°C durante 20 minutos, añadiendo 200 µL de acetato sódico 200 mM para detener la reacción. Finalmente se centrifugó la muestra a 13000 rpm durante 5 min.

Los aductos de la floroglucinólisis se separaron para su cuantificación mediante un cromatógrafo líquido Waters 2960 (Waters, PA, USA), equipado

con un detector diodo-array Waters 996. Se utilizó una columna en fase reversa Atlantis dC18 (Waters, PA, USA) 4.6 mm x 250 mm de 5.0 μm de tamaño de partícula, dotada de una precolumna Atlantis dC18 (Waters, PA, USA), 2.1 mm x 10 mm, 5 μm de tamaño de partícula. Para la separación se utilizó un gradiente binario (**Tabla 3.5**) de ácido fórmico al 2% (A) y acetonitrilo/agua/ácido fórmico (80:18:2) con un flujo de 1 mL/min. Los picos eluidos se monitorizaron a 280 nm. La identificación de los diferentes compuestos se realizó a 280 nm. Los flavan-3-oles monómeros (-)-epicatequina, (+)-catequina y (-)-epicatequina-3-O-galato se identificaron por comparación de sus espectros UV-Vis con los de los patrones puros (Sigma-Aldrich, MO, USA). El resto de compuestos se identificó por comparación de sus espectros con los indicados en la bibliografía (Kennedy et al 2001).

Tabla 3.5. Gradiente para la determinación de taninos en uva por HPLC.

Tiempo (min)	% A	% B
0	90	10
10	90	10
30	88	12
40	88	12
85	79	21
95	79	21
100	0	100
105	0	100
110	90	10
115	90	10

A: ácido fórmico 2%; B: acetonitrilo/agua/ácido fórmico (80:18:2)

Para determinar los monómeros presentes de forma natural, el extracto metanólico se analizó sin realizar la reacción de floroglucinólisis. Los productos

de ruptura se estimaron usando sus factores de respuesta relativos a la catequina, que se usó como patrón de cuantificación (Sigma-Aldrich, MO, USA), expresados en mmol/L (**Tabla 3.6**).

Tabla 3.6. Factores de respuesta de los monómeros respecto a la catequina.

Monómero	RMR($\epsilon_{\text{monómero}}/\epsilon_{\text{catequina}}$)	Coficiente monómero(Coef.Cateq./RMR)
Catequina	1	$4,51 \cdot 10^{-7}$ mM
Epicatequina	1	$4,51 \cdot 10^{-7}$ mM
Epicatequina-3-O-galato	3.41	$1,32 \cdot 10^{-7}$ mM
Epigalocatequina	0.29	$1,55 \cdot 10^{-7}$ mM
Catequina-floroglucinol	0.98	$4,60 \cdot 10^{-7}$ mM
Epicatequina-floroglucinol	0.98	$4,60 \cdot 10^{-7}$ mM
Epicatequina-3-O-galatofloroglucinol	3.64	$1,24 \cdot 10^{-7}$ mM
Epigalocatequina-floroglucinol	0.29	$1,55 \cdot 10^{-7}$ mM

Abreviaturas: ϵ : coeficiente de absortividad molar; RMR: respuesta molar relativa respecto a la catequina; Coef.Cateq. : coeficiente de la catequina.

Para calcular el grado medio de polimerización (GMP), la suma de las subunidades (monómeros y aductos de la floroglucinólisis) se dividió por la suma de todos los monómeros (en moles). El porcentaje de cada monómero se calculó respecto a la suma en moles de todos los monómeros.

El porcentaje de galoilación (%G) se obtuvo sumando el porcentaje de epicatequina-3-O-galato (monómero terminal) más el porcentaje del aducto

epicatequina-3-O-galato-floroglucinol (monómero de extensión). Para expresar la masa de cada monómero, la conversión de mol a gramos se hizo sin tener en cuenta la fracción correspondiente al floroglucinol en los aductos de la floroglucinólisis. La cuantificación final de cada monómero se expresó en $\mu\text{g/g}$ hollejo o $\mu\text{g/g}$ semilla y en mg/kg uva.

$$\text{GMP} = [\Sigma(\text{moles monómeros} + \text{moles aductos}) / \Sigma(\text{moles monómeros})]$$

$$\% \text{ monómero} = [\text{moles monómero} / \Sigma(\text{moles monómeros totales})] \times 100$$

$$\% \text{ G} = \% \text{Epicatequina-3-O-galato-floroglucinol} + \% \text{Epicatequina-3-O-galato}$$

3.3 VINO

3.3.1 VINIFICACIONES

En todas las campañas y para los distintos tratamientos a estudiar se realizaron por triplicado microvinificaciones de 100 kg de uva. El objetivo del ensayo durante las diferentes campañas fue comparar la aplicación de técnicas macerativas a baja temperatura y la adición de enzimas de maceración, estudiando su efecto sobre la extracción de compuestos fenólicos y volátiles, así como la evolución de los diferentes parámetros cromáticos y las características organolépticas, en la vinificación de las variedades Monastrell, Syrah y Cabernet Sauvignon.

La uva se vendimió de forma manual en cajas de 20 Kg, y se transportó a la Bodega Experimental de la Estación Enológica de Jumilla, donde se introdujo en cámaras frigoríficas para disminuir su temperatura a 10°C. Las técnicas de vinificación utilizadas fueron:

3.3.1.1 Vinificación tradicional o testigo

La uva fue despalillada, estrujada y sulfatada (8 g SO₂/100 kg uva), e introducida en 3 tanques de 100 L (90 kg /tanque). La pasta de cada una de las distintas elaboraciones se encubó durante 24 horas. Se procedió a una corrección de acidez con ácido tartárico hasta 5,5 g/L y a la adición del pie de cuba (10 g levadura seca/100 kg uva) (Laffort, DSM, Servian, Francia). La temperatura de fermentación se controló entre 23 y 28°C, realizándose medidas de temperatura y densidad del mosto dos veces al día hasta que el °Baumé llegó a cero. Se llevaron a cabo dos removidos diarios para favorecer la maceración que tuvo una duración de 10 días, prensándose al finalizar de este período en una prensa de membrana a 1.5 bares de presión y hasta un rendimiento del 65%. Finalizada la fermentación alcohólica se controló la temperatura para que ésta no bajase de los 18°C. Además se realizaron de 1 a 3 trasiegos, en función de la formación de SH₂ en los depósitos, manteniendo siempre el espacio de cabeza con CO₂ para evitar posibles oxidaciones en el vino. Concluida la fermentación maloláctica, los vinos se trasegaron y se adicionó SO₂ (50 mg/L), a continuación se procedió a la estabilización del vino a -3°C. Tras este proceso, los vinos fueron embotellados y conservados en el sótano de la Bodega Experimental a una temperatura constante de 15°C.

3.3.1.2 Maceración prefermentativa en frío

La uva fue despalillada, estrujada y sulfatada (8 g SO₂/100 kg uva), e introducida en 3 tanques de 100 L (90 kg /tanque). Los depósitos se introdujeron en cámaras frigoríficas donde estuvieron 7 días a 10 °C. Tras los 7 días de maceración en frío, los depósitos se sacaron de las cámaras, y se continuó la elaboración siguiendo los mismos pasos que en el caso de la elaboración tradicional.

3.3.1.3 Congelación previa de la uva

A la entrada en bodega de las uvas (en cajas de 20 kg), éstas se introdujeron en cámaras frigoríficas donde se disminuyó su temperatura primero hasta 5 °C, luego se mantuvieron a -4 °C durante 12 horas, y por último a -10 °C hasta la completa congelación del hollejo pero no de la pulpa (aproximadamente 5 horas). Después, estando los hollejos aún congelados, la uva fue despalillada, estrujada y sulfatada (8 g SO₂/100 kg uva) y se maceró durante 10 días siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de la vinificación tradicional.

3.3.1.4 Congelación del mosto con nieve carbónica

Las uvas fueron despalilladas, estrujadas y sulfatadas (8 g SO₂/100 kg uva). Se introdujeron en los 3 depósitos de maceración junto con el CO₂ sólido, hasta que la temperatura del mosto descendió a 0°C (aproximadamente 30 kg CO₂/depósito) (Isotherme, Linde, España). Cuando el mosto estuvo descongelado y alcanzó 5°C (1 o 2 días) se realizó la corrección de acidez a 5,5 g/L con ácido tartárico y la adición del pie de cuba. A partir de este momento se prosiguió con el mismo procedimiento utilizado en la vinificación tradicional.

3.3.1.5 Adición de un preparado enzimático comercial

Las uvas fueron despalilladas, estrujadas, y sulfatadas (8 g SO₂/100 kg uva). En este momento se añadió al estrujado el preparado enzimático comercial (5 g/100 kg uva) (Enozym Vintage, Agrovin, España). Se introdujo en 3 tanques de 100 L (90 kg /tanque). Se realizó una corrección de acidez con ácido tartárico hasta 5,5 g/L y se siguió el mismo protocolo que el establecido para la vinificación testigo.

3.3.1.6 Adición de un enzima natural (β -galactosidasa)

Las uvas fueron despalilladas, estrujadas y sulfatadas (8 g SO₂/100 kg uva). Se añadió al estrujado un enzima natural con actividad β -galactosidasa (1 g/100 kg uva) (β -galactosidasa, Sigma-Aldrich, MO, USA). Se introdujo en 3 tanques de 100 L (90 kg /tanque) y se realizó corrección de la acidez con ácido tartárico hasta 5,5 g/L, a partir de este momento, al igual que en el otro tratamiento enzimático, se siguió el mismo protocolo que el establecido para la vinificación testigo.

3.3.2 DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

En el mosto-vino, previamente centrifugado y exento de CO₂, se analizaron los siguientes parámetros: intensidad y tono, parámetros CIELab, antocianos totales, compuestos fenólicos totales y parámetros de copigmentación. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu 1600-UV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) y los resultados se refirieron a celdas de 1 cm de paso óptico.

3.3.2.1 Intensidad y tono

El valor de la intensidad de color se determinó mediante la suma de las absorbancias a 620 (componente azul), 520 (componente roja) y 420 nm (componente amarilla) del mosto-vino sin diluir, utilizando cubetas de 0.1 cm de paso óptico (Glories, 1984).

Mediante el cociente entre las absorbancias a 420 nm y a 520 nm se calculó el valor del tono (Sudraub, 1958).

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

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

3.3.2.2 Parámetros CIELab

Se obtuvieron a partir de las medidas de absorbancia realizadas en el rango de longitudes de onda comprendidas entre 380 y 780 nm, con cubetas de 1 mm de espesor y referidas a un observador de 10° y un iluminante D65. Para ello el espectrofotómetro estaba conectado a un ordenador con un programa específico de color que realizó el cálculo directo de los parámetros CIELab: L*, a*, b*, C* y H*.

3.3.2.3 Índice de polifenoles totales (IPT)

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

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

3.3.2.4 Parámetros de copigmentación

El cálculo de los parámetros de copigmentación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Levensgood y Boulton (2004). El vino previamente es ajustado a pH 3.6. Para la obtención de estos parámetros es necesaria la determinación de varias medidas espectrofotométricas:

A_{acet}: Se adicionaron 20 µL de acetaldehído al 10% a 2 mL de la muestra a analizar, agitándose inmediatamente. Después de 45 minutos se leyó la absorbancia a 520 nm en celdas de 1 mm de paso óptico. La medida se expresó referida a cubetas de 1 cm de espesor.

A₂₀: En un tubo de 10 mL se mezclaron 200 µL de la muestra a analizar y 3.8 mL de vino sintético (24 mL de etanol absoluto, 176 mL de agua destilada y 0.5 g de bitartrato potásico ajustando el pH a 3.6). Se agitó y a los 10 minutos se leyó la absorbancia a 520 nm en cubetas de 1 cm de paso óptico.

A_{SO2}: 160 µL de SO₂ al 5% se añadieron a 2 mL de la muestra a analizar. Se agitó y tras 1 minuto se leyó la absorbancia a 520 nm en cubetas de 0.2 cm de paso óptico.

Con los resultados de estas medidas se obtuvieron los siguientes parámetros:

$$\text{FCA (Fracción de color debida a antocianos copigmentados)} = (A_{\text{acet}} - A_{20}) / A_{\text{acet}}$$

$$\text{FFA (Fracción de color debida a antocianos libres)} = (A_{20} - A_{\text{SO2}}) / A_{\text{acet}}$$

$$\text{FPP (Fracción de color del vino a pigmentos poliméricos)} = A_{\text{SO2}} / A_{\text{acet}}$$

3.3.3 DETERMINACIONES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

3.3.3.1 Antocianos y flavonoles

Se realizó por inyección directa de la muestra (vino o mosto), previamente filtrada (filtro de nylon de 0,45 µm, Albet LabScience, Dassel), en un cromatógrafo líquido Waters 2690 (Waters, PA, USA), equipado con un detector diodo-array Waters 996. La columna utilizada fue una Licrochart RP-C18 (Merk, Darmstadt, Alemania), 25 x 0,4 cm de 5 µm de tamaño de partícula. El volumen de la muestra inyectada fue de 20 µL y el análisis fue llevado a temperatura ambiente. Los disolventes utilizados fueron ácido fórmico al 4.5% y acetonitrilo, con un flujo de 0.80 mL/min. Las condiciones de gradiente se muestran en la **Tabla 3.7**.

La identificación y cuantificación de los compuestos fueron las descritas en la determinación de antocianos y flavonoles en el hollejo de la uva (**3.2.6.1**).

Tabla 3.7. Gradiente para la determinación de antocianos en vino por HPLC.

Tiempo (min)	% A	% B
0.0	95.0	5.0
10.0	90.0	10.0
30.0	85.5	14.5
34.0	85.0	14.5
45.0	84.8	15.2
60.0	82.0	18.2
100.0	75.0	25.0
115.0	60.0	40.0
120.0	50.0	50.0
125.0	0.0	100.0
135.0	0.0	100.0
140.0	95.0	5.0
145.0	95.0	5.0

A: ácido fórmico (4.5%); B: acetonitrilo.

3.3.3.2 Taninos en el vino

Al igual que en la uva, se utilizó el método descrito por Kennedy y Jones (2001) basado en la reacción de floroglucinólisis para la ruptura de las cadenas de los taninos poliméricos. Para preparar las muestras de vino, se utilizó el método propuesto por Pastor del Río y Kennedy (2006), con algunas modificaciones. El procedimiento experimental fue el siguiente: se evaporaron 5 mL de vino en un concentrador Centrivap (Labconco, USA). El extracto seco se redisolvió en 3 mL de agua y se pasó por un cartucho SEP-PAK C18 (Vac 6 cc 1g) (Waters, Mildford, USA) previamente activado con 10 mL de metanol

seguidos de 10 mL de agua. Posteriormente este se lavó con 20 mL de agua, y después se eluyeron los compuestos de interés con 10 mL metanol. Este metanol de nuevo se evaporó en el concentrador y por último el residuo seco se redisolvió en 1 mL de metanol. A partir de este momento, la extracción, separación, identificación y cuantificación de los diferentes compuestos en el extracto metanólico se llevó a cabo como en el análisis de taninos descrito para la uva (3.2.6.2).

3.3.4 DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN AROMÁTICA DEL VINO

Se realizó un análisis de los compuestos volátiles siguiendo el método analítico propuesto por Ortega et al. (2001). Este método consiste en una extracción líquido-líquido con diclorometano de los compuestos volátiles del vino, adicionando patrones internos para la posterior cuantificación por cromatografía de gases usando un detector FID.

Los patrones internos utilizados (Sigma-Aldrich, MO, USA) fueron ácido heptanoico y una disolución conteniendo una mezcla de 2-butanol, 4-metil-2-pentanol, 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona y 2-octanol. Utilizando disoluciones estándares de cada uno de los compuestos analizados, se seleccionó el patrón interno con el que presentaban mejor factor de respuesta. En la **Tabla 3.8** se muestran los constituyentes aromáticos analizados así como el patrón interno seleccionado para su cuantificación.

El procedimiento experimental en la muestras de vino a analizar fue el siguiente: se depositaron 3 mL de vino en un tubo cónico de vidrio al que se le adicionaron 9.5 mL de una disolución acuosa saturada con sulfato amónico, 15 µL de cada una de las disoluciones que contenían los patrones internos y 0.4 mL de diclorometano. El tubo se llevó a un agitador de vaivén (Labotron, INFORS, Suiza) a 400 rpm durante 60 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron (centrífuga Eppendorf 5810R) a 5000 rpm a 0°C durante 10 minutos para separar las fases orgánica y acuosa.

La fase orgánica se recogió con una jeringuilla y se traspasó a un vial. La muestra se analizó en un cromatógrafo de gases dotado de un detector FID (CP-3800 Varian), con una columna 60 m x 0.25 mm ID DF= 0,25 μ m (Varian). El gas portador fue hidrógeno (3 mL/min) y se realizó una inyección de 2 μ L en modo split (30 mL/min). Las condiciones del horno se especifican en la **Tabla 3.9.**

Tabla 3.8. Patrones de cuantificación de los compuestos volátiles analizados.

Familia Volátil	Compuesto	Patrón interno
Alcoholes superiores	Propanol	2-Butanol
	Isobutanol	2-Butanol
	Alcoholes amílicos	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona
	2-Feniletanol	2-Octanol
Acetatos	Acetato de isoamilo	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona
	Acetato de hexilo	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona
	2-Feniletacetato	2-Octanol
Ésteres etílicos	Propionato de etilo	2-Butanol
	Etil-3-hidroxibutirato	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona
	Isobutirato de etilo	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona
	Hexanoato de etilo	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona
	Octanoato de etilo	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona
Ácidos	Ácido Hexanoico	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona
	Ácido Octanoico	Ácido Heptanoico
	Ácido Decanoico	Ácido Heptanoico
Compuestos C6	1-Hexanol	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona
	Cis-3-hexenol	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona

Tabla 3.9. Condiciones del horno para la determinación de compuestos volátiles por cromatografía de gases.

Temperatura (°C)	Rampa (°C / min)	Retención (min)	Tiempo (min)
40	-	5.0	5
220	3.0	0.0	65
240	20.0	10.0	76

3.3.5 ANÁLISIS SENSORIAL

Se llevaron a cabo dos tipos de pruebas sensoriales, una triangular y otra descriptiva de perfil.

La prueba triangular se aplicó para determinar si existían diferencias en las características sensoriales entre los vinos tratados y el vino testigo. Se trató de una prueba de diferenciación en la que se presentaron al catador tres muestras codificadas, dos de las cuales eran iguales y la tercera diferente, de modo que se le pidió que indicase cuál era la muestra diferente y la preferida. Para determinar los resultados se utilizó la técnica del “juicio forzado” en la que se suman únicamente las respuestas correctas y se comprueba mediante tablas estadísticas si la diferencia es significativa. La ficha de cata utilizada se muestra en la **Figura 3.4**. En la prueba descriptiva, los atributos a valorar fueron previamente descritos y se les pidió a los catadores que cuantificasen las características del vino a describir. Estas características se dividieron en tres grandes grupos que hacían referencia al color, aroma y gusto (**Figura 3.5**).

Las catas se realizaron en la Estación Enológica de Jumilla, y el panel de cata estaba formado por catadores experimentados.

Figura 3.4. Ficha de cata triangular.

FECHA: _____ **Nombre y Apellidos:**.....

CATA N°: _____

SERIE: _____

Ante usted hay tres muestras: **103** **112** **125**

Dos de ellas son iguales entre sí. Dígase qué muestra es diferente, cuál prefiere y las diferencias percibidas. Es obligatorio elegir una muestra preferida, aunque no se encuentren diferencias.

Muestras iguales:

Muestra diferente:

Muestra Preferida:

Razón de preferencia.....

.....

ATRIBUTOS	Diferencia percibida entre las muestras				
	NULA	DÉBIL	MEDIA	FUERTE	MUY FUERTE
FASE VISUAL					
FASE OLFATIVA					
FASE GUSTATIVA					

Figura 3.5. Ficha de cata descriptiva.

	Puntuar de 1 a 10. A mayor sensación, mayor puntuación									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
FASE VISUAL										
FASE OLFATIVA										
INTENSIDAD OLFATIVA										
CALIDAD OLFATIVA										
FASE GUSTATIVA										
INTENSIDAD GUSTATIVA										
CALIDAD GUSTATIVA										
ARMONÍA										

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) para estudiar si existían diferencias significativas entre los valores medios. Un análisis multifactorial de la varianza (MANOVA) se realizó para estudiar si existían diferencias estadísticamente significativas entre varios factores en base a un conjunto de variables dependientes. La separación de medias se realizó utilizando un test DUNCAN ($P < 0,05$). También se utilizó un ANÁLISIS DISCRIMINANTE para determinar si se podían discriminar grupos en función de unas variables originales y, posteriormente, analizar qué variables contribuían a discriminar entre los grupos formados. El paquete estadístico utilizado fue Statgraphics Plus 5.1.

4. INFLUENCIA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS Y FENÓLICAS DE LOS VINOS

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 EL COLOR DEL VINO

El color es uno de los factores determinantes de la calidad de un producto alimentario. Es el primer atributo que se percibe en un vino. Su aspecto, tonalidad e intensidad aportan información sobre sus posibles defectos o virtudes, puesto que son indicadores de las características gustativas y aromáticas y del estado de conservación del mismo.

Físicamente, la materia tiene color porque es capaz de absorber radiación lumínica y reflejarla a una longitud de onda determinada. Las características que definen el color de un objeto son el tono, la intensidad y el brillo. El tono está relacionado con la longitud de onda de la luz reflejada, la intensidad depende de la concentración de sustancias colorantes y el brillo es proporcional a la cantidad de luz que es reflejada en comparación con la luz incidente (Anzaldúa-Morales, 1994). Para cuantificar estas características en el vino, se utilizan unos parámetros estándar como son: la **intensidad de color (IC)**, que se obtiene sumando las absorbancias correspondientes a los colores amarillo, rojo y azul (420, 520 y 620 nm respectivamente) y que nos dará una idea de la cantidad de color que tiene el vino; el **tono (T)**, que indica la importancia relativa del amarillo sobre el rojo y **las componentes amarilla, roja y azul** que expresan la proporción relativa de estos colores respecto al color total del vino.

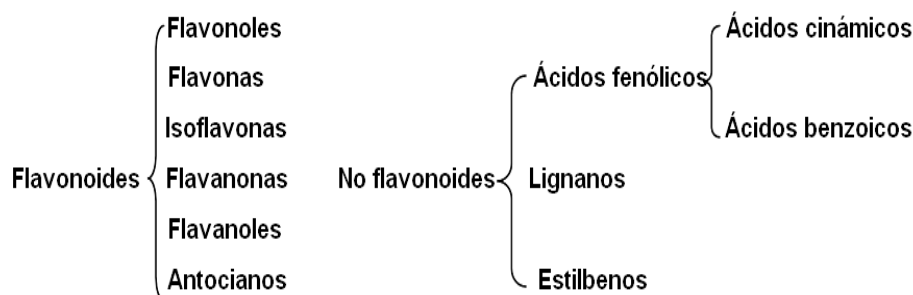
Además de estos parámetros, existen unas coordenadas cromáticas establecidas por la *Commission Internationale de l'Éclairage* (CIE) que permiten una definición del color mucho más precisa. En 1976, la CIE definió el llamado espacio CIELab en el que se trata de obtener una representación espacial de la totalidad de los colores. Mediante las coordenadas **L***, **a*** y **b*** se pueden representar las graduaciones entre colores opuestos, así **L*** va desde el blanco hasta el negro y define la claridad, **a*** va desde el verde hasta el rojo y **b*** desde el amarillo al azul. Las coordenadas **a*** y **b*** pueden transformarse

matemáticamente en las coordenadas esféricas H^* y C^* que definen el hue o tono y la saturación respectivamente.

Los valores de los parámetros cromáticos en un vino dependen ampliamente de su composición en compuestos fenólicos, ya que estos, además de influir sobre otras características del vino, actúan como materia colorante. La composición fenólica y las reacciones entre los distintos compuestos fenólicos determinarán el color del vino y su estabilidad en el tiempo.

4.1.2 COMPUESTOS FENÓLICOS RESPONSABLES DEL COLOR

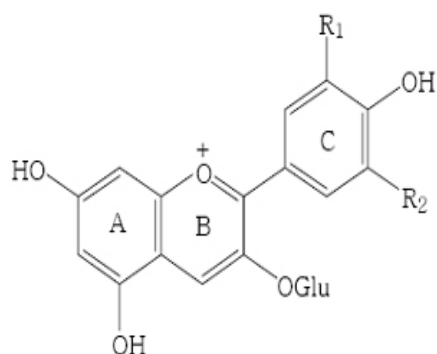
Los polifenoles son compuestos naturales formados por anillos aromáticos que se encuentran en una gran variedad de frutas y verduras. En las plantas pueden actuar como antioxidantes, como defensa frente a la radiación ultravioleta e incluso en mecanismos de protección frente a patógenos (Manach et al., 2005). Se clasifican en función del número de anillos aromáticos que poseen y en función del tipo de sustituyentes. Se puede distinguir entre flavonoides, que son aquellos con una estructura de 3 anillos aromáticos C6-C3-C6 (flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanoles y antocianos) y no flavonoides (ácidos cinámicos, ácidos benzoicos, lignanos y estilbenos) (**Figura 4.1**). En los vinos tintos normalmente están presentes ácidos cinámicos y benzoicos, flavonoles, flavanoles, antocianos y algunos estilbenos como el resveratrol, aunque los que mayor influencia tienen sobre el color del vino tinto son los antocianos y los taninos (Bautista-Ortín, 2005). No obstante, los ácidos cinámicos y benzoicos, al oxidarse, pueden influir sobre este parámetro dando lugar a procesos de pardeamiento (Zamora, 2003) o junto a otros compuestos fenólicos como los flavonoles pueden actuar en procesos de estabilización de las formas coloreadas de los antocianos.

Figura 4.1. Clasificación de los polifenoles.

4.1.2.1 Antocianos

Los antocianos son compuestos fenólicos de tipo flavonoide formados por dos anillos bencénicos (A y C) unidos por un heterociclo oxigenado (B) insaturado y catiónico denominado ión flavilio (2-fenilbenzopirilio) que presenta una deslocalización electrónica responsable de las características cromóforas. El ión flavilio se une a través de un enlace glucosídico a una o dos moléculas de glucosa. Las formas heterosídicas se denominan antocianinas y son mucho más estables que las formas agliconas o antocianidinas. En *Vitis vinífera* los antocianos que encontramos son monoglucósidos con un enlace glucosídico en posición 3 (en otras especies como *Vitis riparia* o *Vitis rupestris* aparecen como diglucósidos con enlaces glucosídicos en la posiciones 3 y 5). Existen distintos tipos de moléculas de antocianinas dependiendo del número de hidroxilos (-OH) y de grupos metilo (-CH₃) que actúen como sustituyentes en el anillo C (**Figura 4.2**). Una de las posiciones del azúcar puede estar esterificada con ácido caféico, ácido acético o ácido p-cumárico formando antocianos acilados.

Figura 4.2. Estructura química de las principales antocianinas en el vino.



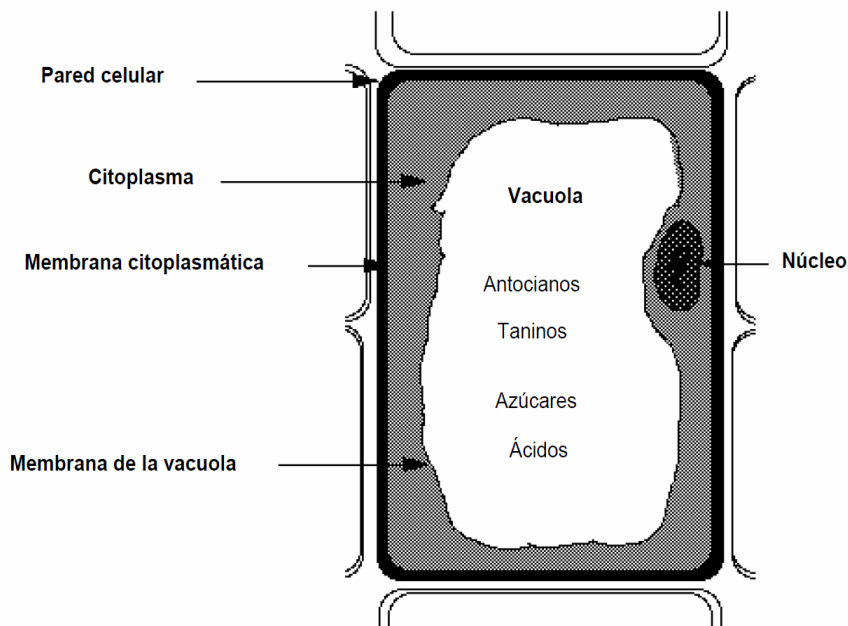
Antocianina	R1	R2
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH ₃	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

En la uva, los antocianos se encuentran en variedades tintas y están localizados exclusivamente en las células de la piel, aunque en variedades tintoreras también se pueden encontrar antocianos en la pulpa (Bakker y Timberlake, 1985). Se localizan en las células externas de la hipodermis y, a nivel subcelular, se encuentran dentro de las vacuolas donde pueden estar libres o acumulados en unas vesículas esféricas denominadas antocianoplastos (González et al., 2003) (**Figura 4.3**). Los antocianos los podemos encontrar en equilibrio entre la sal flavilio (roja), una base anhídrido (púrpura) y una base carbinol (incolora), aunque al pH de las vacuolas de los hollejos, el equilibrio se encuentra poco desplazado hacia la base anhídrido, por lo que su color púrpura no contribuye al color de las células. El color azulado de las uvas tintas es consecuencia de las altas concentraciones de antocianos en las vacuolas, de los efectos de la dispersión de la luz y de la presencia de clorofila en las capas epidérmicas.

La variabilidad de antocianos debida a su diversidad estructural permite diferenciar variedades de uva (Ortega-Regules, 2006). Así, en función del tipo de antocianos encontrados y de su concentración, es posible establecer un

perfil antociánico para una determinada variedad, lo que permite su utilización como herramienta taxonómica (Casavecchia et al., 2007; Romero-Cascales, 2008).

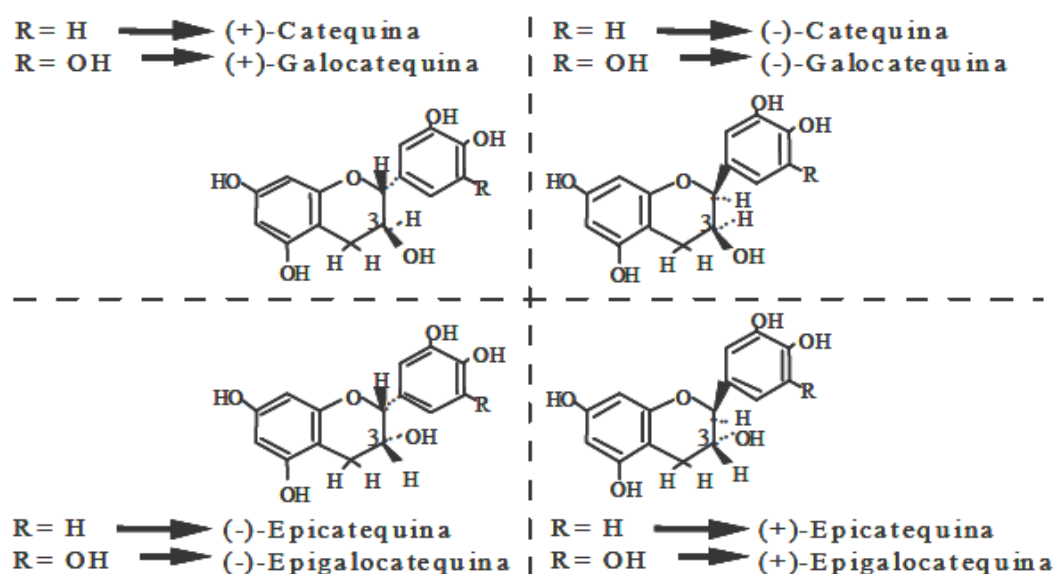
Figura 4.3. Localización de antocianos a nivel subcelular.



4.1.2.2 Taninos

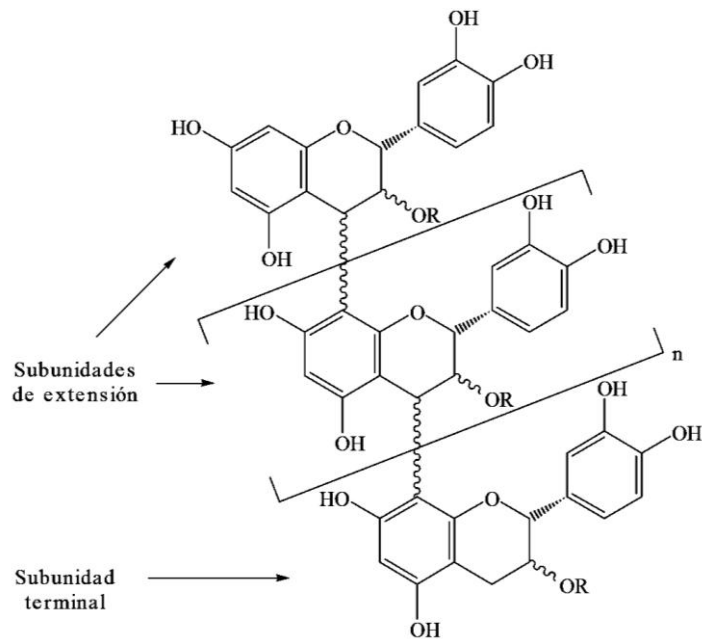
Los taninos son polímeros formados por unidades monoméricas de flavan-3-oles. También se denominan proantocianidinas, porque en presencia de ácidos minerales liberan antocianidinas por ruptura de las uniones intermonoméricas. Los flavan-3-oles, al igual que las antocianidinas, son compuestos tipo flavonoide formados por dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado, esta vez saturado, que contiene un sustituyente hidroxilo (-OH). Dependiendo de la posición espacial de este sustituyente respecto al anillo bencénico se pueden distinguir varios isómeros (**Figura 4.4**).

Figura 4.4. Estructura química de los principales flavan-3-oles monómeros.



En *Vitis vinífera* los principales flavan-3-oles monómeros son: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina y (-)-epigallocatequina. No obstante, la mayor parte de los flavanoles se encuentran en forma de oligómeros y de polímeros (Sánchez-Iglesias, 2007). Las formas oligoméricas corresponden a polímeros formados por un número amplio de unidades de flavanoles (de tres a una decena). Las formas poliméricas (**Figura 4.5**) representan la mayor parte de los 3-flavonoles (Romero-Cascales, 2008). El esqueleto de los polímeros puede estar formado por diversas formas de monómeros. Teniendo en cuenta estas formas, dos grupos de proantocianidinas están presentes en la uva: las procianidinas (formadas por catequina, epicatequina y epicatequina-3-galato) y las prodelfinidinas (formadas por galocatequina y epigallocatequina).

En la uva, los taninos se encuentran en variedades tintas y en variedades blancas. Están localizados en el hollejo, en la pulpa y en la semilla y suelen estar asociados a otras macromoléculas como proteínas y polisacáridos. Las mayores concentraciones se encuentran en las semillas.

Figura 4.5. Estructura general de los taninos poliméricos.

Los hollejos contienen prodelphinidinas y procianidinas. Los taninos de los hollejos se sitúan en las vacuolas, bajo forma de gránulos o conglomerados, y también forman parte de las membranas y de las paredes celulares. Solamente los taninos de las vacuolas son fácilmente extraíbles.

Los taninos de las semillas no son extraíbles si no se disuelve el recubrimiento lipídico de las mismas, y son más o menos solubles según el grado de polimerización. En las semillas solo se pueden encontrar procianidinas y están presentes en mayor proporción que en el hollejo. Los taninos de las semillas presentan una mayor proporción de procianidinas galoiladas y un menor grado de polimerización que los taninos de los hollejos (Busse et al. 2010), aunque el grado de polimerización va aumentando durante la maduración, lo que los hace menos extraíbles (González-Neves et al., 2003).

Estos compuestos son los responsables de la astringencia y de la sensación de estructura o cuerpo del vino, debido a su interacción con las proteínas de la saliva (Cheynier et al, 2006). Intervienen en numerosas reacciones de condensación durante la maduración y el envejecimiento del vino, por lo que

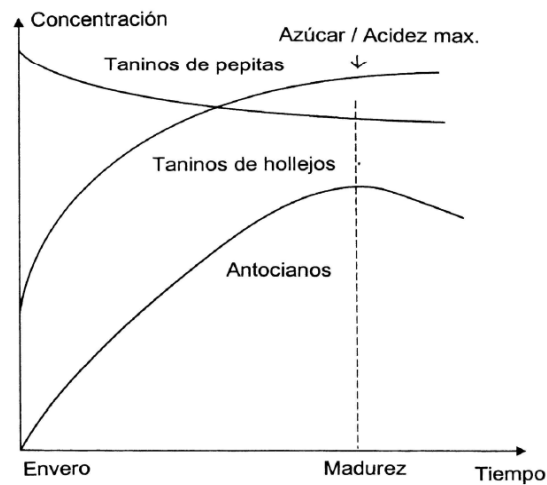
tienen gran influencia en la capacidad para mantener su color a lo largo del tiempo.

4.1.3 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN.

La síntesis de compuestos fenólicos en la uva se produce como consecuencia colateral de la formación y acumulación de azúcares en el grano de la baya (Guidoni et al., 2002; Bautista-Ortín, 2005). Las reacciones de síntesis de compuestos fenólicos están reguladas, entre otras, por la enzima fenilalanina-amonioliasa (PAL), que se encuentra en las células del hollejo y en algunos tejidos de las pepitas. Durante el período herbáceo la concentración de PAL es máxima en las pepitas y va disminuyendo conforme avanza la maduración (Roufelakis-Agelakis y Kliewer, 1986) explicando el hecho de haya una mayor concentración de polifenoles en el hollejo y de que la concentración de taninos en la pepita vaya disminuyendo al final de este período.

La concentración de antocianos y taninos en la uva depende de la variedad (García-Beneytez et al., 2002), de la madurez (Kennedy et al., 2002), de las prácticas vitícolas (Esteban et al., 2001), de las condiciones ambientales (Ojeda, 2007) y del área de producción (Mateus et al., 2001).

Los antocianos aparecen durante el envero y se acumulan durante la maduración, produciéndose al final un descenso en su concentración que suele coincidir con la sobremaduración de la uva. La cantidad de taninos en el hollejo también va a aumentar durante el periodo de madurez, alcanzando un máximo para después mantenerse más o menos constante. En cambio, la concentración de taninos de las semillas desciende desde el envero, al mismo tiempo que aumenta su grado de polimerización (**Figura 4.6**).

Figura 4.6. Evolución de antocianos y taninos durante la maduración.

La extracción de los compuestos fenólicos se produce durante la maceración y consiste en un proceso de difusión mediante el cual los compuestos fenólicos se liberan de las paredes celulares del hollejo, difundiendo en el mosto. El reblandecimiento de la baya durante la maceración viene acompañado de la aparición de actividades enzimáticas responsables de la degradación de la pared celular. La extracción no depende únicamente de la concentración de compuestos fenólicos en la uva sino que está condicionada por la degradación de las paredes celulares del hollejo. Las paredes celulares están compuestas por polisacáridos, compuestos fenólicos y proteínas, y están estabilizadas mediante enlaces iónicos y covalentes. La hemicelulosa, pectinas y proteínas estructurales están unidas con la matriz de celulosa, que es el esqueleto de la pared. La extracción de compuestos fenólicos requiere que la lámina media, rica en pectinas, sea degradada para liberar las células y que las paredes celulares se rompan para permitir que los compuestos fenólicos se difundan en el vino (Amrani y Glories, 1995).

Los taninos de las semillas solo son extraíbles si se disuelve el recubrimiento lipídico que las rodea. Son poco solubles en agua y más solubles en alcohol, por lo que la extracción es más fácil conforme avanza la fermentación alcohólica ya que el alcohol también facilita la extracción de los

taninos ligados a la membrana proteofosfolipídica de las células de la piel (Glories y Saucier, 2000).

El término “extractabilidad” se utiliza para conocer la facilidad de los compuestos fenólicos para ser extraídos. Así, el potencial fenólico de la uva vendrá dado por la concentración de compuestos fenólicos y por la capacidad para su extracción. Los parámetros clásicos de medida de la madurez de la uva (grado Baumé, acidez total, pH,...) sirven para medir el grado de maduración de la pulpa, pero no aportan información sobre la madurez del hollejo o de la pepita. Para conocer el estado de maduración de los hollejos o de las pepitas surgió el concepto de madurez fenólica. Existen varios métodos en los que la uva se somete, por un lado, a unas condiciones similares a las de la maceración y, por otro, a unas condiciones extremas de total extracción. Comparando la cantidad de compuestos fenólicos extraídos al simular la maceración, con el contenido extraído en condiciones extremas, se puede conocer el alcance de la extracción y calcular el índice de madurez de los hollejos y de las pepitas (Lamadón, 1995; Sant-Cricq et al., 1998).

La extracción de compuestos fenólicos va a depender entonces de su concentración, del grado de maduración de la uva y de la composición de las paredes celulares. Pero además de estos factores, también hay que tener en cuenta que los métodos de procesado durante la maceración influyen en la degradación de los tejidos celulares del hollejo. Durante este período, la extracción de compuestos fenólicos sigue una curva exponencial en dos fases, con un incremento y un posterior descenso (Boulton, 1995). La velocidad de extracción es proporcional al gradiente de concentración entre los sólidos y el mosto-vino. Los antocianos monómeros son extraídos en primer lugar, alcanzando un máximo en los primeros días de la fermentación para después decrecer (Bautista-Ortín, 2005). En cambio la disolución de los taninos de los hollejos comienza al mismo tiempo que la de los antocianos, pero evoluciona más lentamente y se ve favorecida en el momento de la aparición del etanol cuando arranca la fermentación alcohólica (Klenar et al., 2004). Por otro lado es necesario un tiempo de maceración mayor para la extracción de los taninos de las semillas, debido a la necesidad de una eliminación previa de los lípidos

presentes en éstas (Glories y Saucier, 2000). Durante la maceración se observa un aumento en la concentración de taninos hasta un máximo, manteniéndose constante después. Es preferible que los taninos provengan de los hollejos, ya que los taninos procedentes de las pepitas confieren al vino un carácter de verdor más astringente. Las técnicas que prolonguen la maceración en ausencia de alcohol son las que favorecerán la difusión de los taninos de los hollejos frente a los de las pepitas aunque según Busse-Valverde (2013) los taninos procedentes de las semillas también pueden comenzar a difundir en medio acuoso. Todas aquellas técnicas que aumentan el contacto sólido/líquido y que facilitan la degradación de las estructuras celulares del hollejo van a permitir una mejor extracción de los compuestos fenólicos.

Entre los métodos de elaboración utilizados para optimizar la extracción de compuestos fenólicos durante la maceración hay que destacar los remontados, la adición de enzimas exógenas, las maceraciones en frío, la optimización de los tiempos de maceración, la maceración carbónica, la selección de levaduras y algunas técnicas como el *delestage* o el *flash-détente*. No obstante también se han encontrado resultados contradictorios en la aplicación de algunas de estas técnicas (Romero-Cascales, 2008; Sánchez-Iglesias, 2007 y Sacchi et al., 2005).

4.1.4 EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL VINO

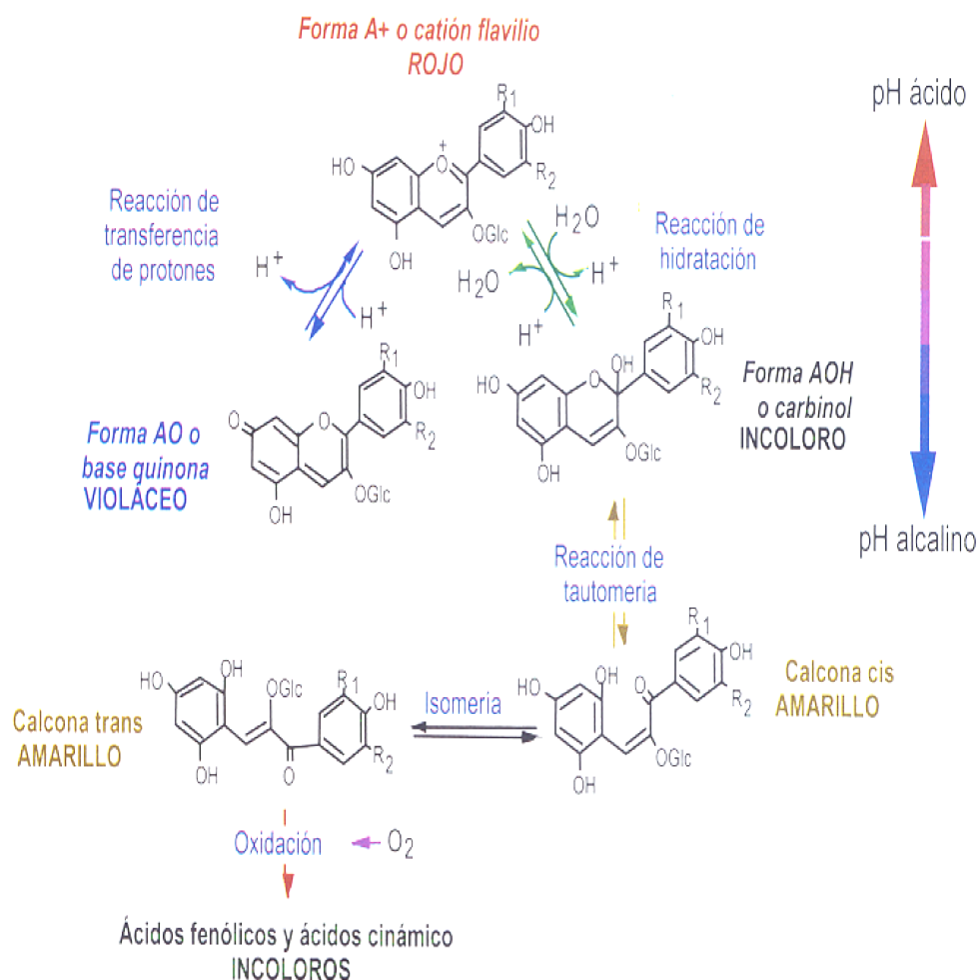
Durante la evolución y envejecimiento del vino se produce una pérdida de astringencia y una evolución del color hacia tonos más teja. Esto se debe principalmente a que los compuestos fenólicos sufren transformaciones de degradación o de estabilización. Estas reacciones suelen ser reacciones de combinación entre los propios compuestos fenólicos.

4.1.4.1 Fenómeno de copigmentación

En el vino, los antocianos pueden encontrarse con diferentes estructuras, dependiendo de las condiciones del medio (**Figura 4.7**). A valores de pH bajos, los antocianos se encuentran en forma del ión flavilio (rojo). Al aumentar el pH

se transforman de manera reversible en bases quinónicas, cuyo color varía de malva a azul, e incluso a amarillo (si el pH es superior a 7) (Ribéreau-Gayon et al., 1998). Al pH del vino (3-4) el ión flavilio, en medio acuoso, puede sufrir reacciones de hidratación, también reversibles, que dan lugar a la formación de hemiacetales incoloros (forma AOH o carbinol) y que están en equilibrio con sus isómeros abiertos (cis-chalcona y trans-chalcona). Estas últimas pueden oxidarse, irreversiblemente, hasta ácidos fenólicos incoloros. El catión flavilio también puede reaccionar con el SO_3H^- del medio (que es la forma mayoritaria del SO_2 en los vinos), formando un aducto sulfito incoloro. Esta reacción es reversible y el ión flavilio se recupera cuando, con el tiempo, se reduce la fracción anhidra libre del medio. Solo cuando los antocianos se encuentran en la forma del ión flavilio tienen una coloración roja.

Figura 4.7. Reacciones de los antocianos en el vino en función del pH.

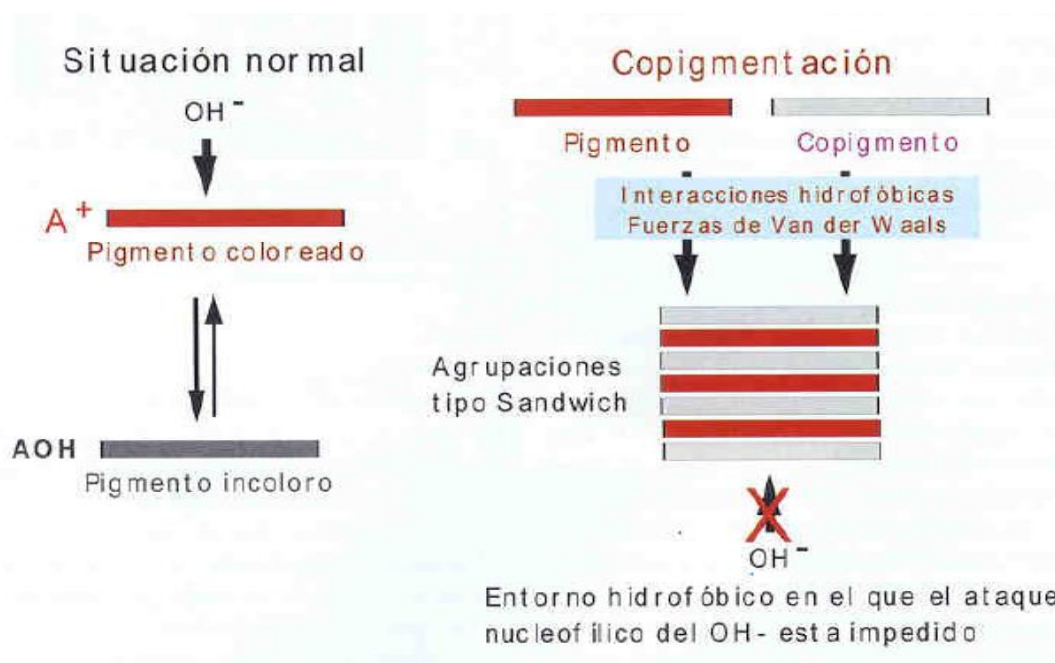


Los antocianos acilados tienen más estabilizadas sus formas coloreadas que los no acilados. Esto se debe a que el ácido, que se incorpora en forma de éster a una de las posiciones del azúcar, es capaz de situarse sobre el ión flavilio, protegiéndolo mediante impedimento estérico frente a reacciones de hidratación.

En las condiciones de pH del vino, la mayor parte de los antocianos se encuentran en forma hidratada incolora, aunque esta reacción se puede desplazar hacia la forma coloreada mediante algún mecanismo que estabilice el catión flavilio. Un mecanismo de estabilización conocido es el denominado fenómeno de **copigmentación**: los antocianos se unen de forma no covalente con otros compuestos fenólicos (denominados cofactores o copigmentos) presentes en el medio formando apilamientos lábiles (**Figura 4.8**). La copigmentación puede ser intramolecular cuando un antociano se une con otro antociano, o intermolecular cuando un antociano se une a otra molécula diferente (ácido cinámico, flavanol y flavonol o sus glicósidos). Las formas flavilium son atrapadas por los copigmentos, produciéndose un desplazamiento del equilibrio de la hidratación hacia las formas flavilium (rojas) o hacia bases quinónicas (azules). El resultado es un aumento de la cantidad de color (efecto hiperocrómico) o un cambio de tonalidad hacia el púrpura y azul (efecto batocrómico) (Vivar-Quintana et al., 2002).

Además de producir una estabilización del color de los antocianos, la copigmentación también provoca una disminución de las formas libres de los compuestos que actúan como copigmentos, por lo que estas estarán menos disponibles frente a reacciones de oxidación, condensación y polimerización durante el envejecimiento del vino.

Figura 4.8. Principio del proceso de copigmentación.



El color de un vino joven viene dado por la suma de pigmentos libres, pigmentos copigmentados y pigmentos poliméricos. La proporción de color debida a pigmentos copigmentados en vinos de menos de 6 meses de edad es aproximadamente de un 40% (Boulton, 2001). Con el envejecimiento el etanol destruye los complejos copigmentados, reduciéndose el color debido a la copigmentación.

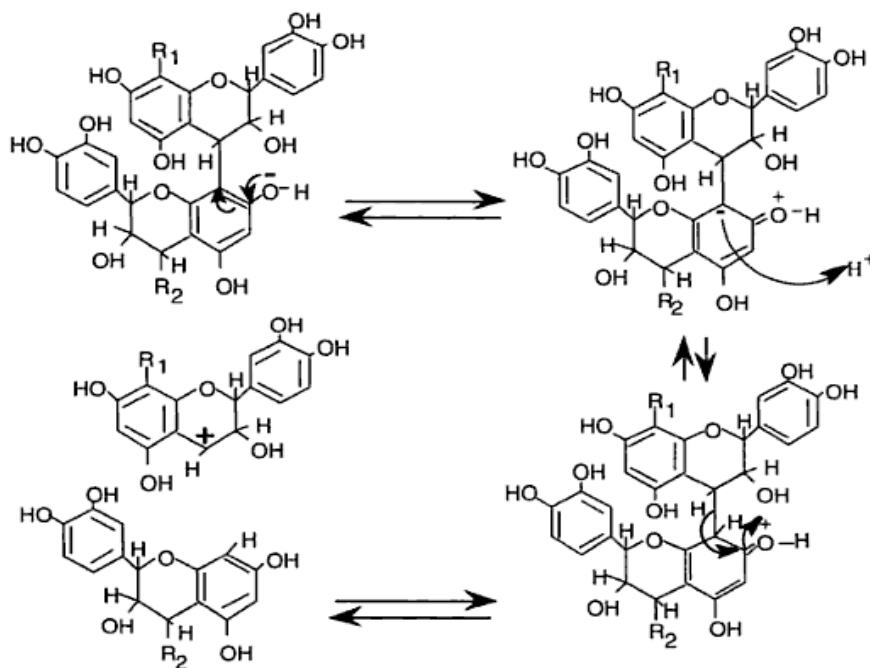
4.1.4.2 Polimerización de taninos

Los taninos presentan una clara tendencia a polimerizar en el vino de forma directa o mediante la mediación de acetaldehído. La polimerización da lugar a moléculas más grandes, lo que se traduce inicialmente en un incremento de la astringencia, una disminución del sabor amargo y un incremento del color amarillo. Pero si se alcanza un grado de polimerización elevado, las moléculas se vuelven insolubles y pueden llegar a precipitar (Zamora, 2003).

En función de la forma en la que los taninos pueden interactuar, se pueden distinguir dos tipos de polimerización:

- Polimerización lineal:** los taninos en medio ácido pueden formar un carbocatión que reacciona con la carga negativa de otro flavanol mediante uniones C4-C8 o C4-C6 produciéndose una polimerización homogénea u ordenada (**Figura 4.9**). Este tipo de polimerización no requiere la presencia de oxígeno, por lo que puede darse tanto en el depósito, en la barrica como en la botella. Los compuestos formados son de color amarillo, presentan las mismas propiedades astringentes que un tanino menos polimerizado y pueden precipitar en función de su complejidad, provocando una disminución de la astringencia y del sabor amargo del vino, pero también del cuerpo y de la capacidad para el envejecimiento.

Figura 4.9. Polimerización de taninos vía carbocatión.



- Polimerización cruzada:** se produce cuando las moléculas de proantocianidinas se unen de una forma heterogénea o desordenada. Este tipo de polimerización se produce en presencia de oxígeno y requiere la presencia de hierro o cobre como catalizadores. Puede producirse a través de dos mecanismos diferentes, uno de ellos

implica la formación de semiquinonas (**Figura 4.10**) que se unirán por vía radicalaria. El otro mecanismo implica la participación de etanol que, con la presencia de hierro o cobre, se oxida a acetaldehído. El acetaldehído en medio ácido actúa sobre las moléculas de flavonol provocando su unión mediante puente de etilo (**Figura 4.11**). Los compuestos formados mediante la polimerización cruzada son amarillos y presentan menor astringencia que los taninos de partida, ya que disminuye el número de grupos hidroxilo que pueden reaccionar con las proteínas de la saliva. La cinética de reacción es superior a la de la polimerización lineal, por lo que se produce una formación rápida de compuestos poliméricos capaces de precipitar en función del grado de polimerización y de la concentración.

Figura 4.10. Polimerización de taninos mediante formación de semiquinonas.

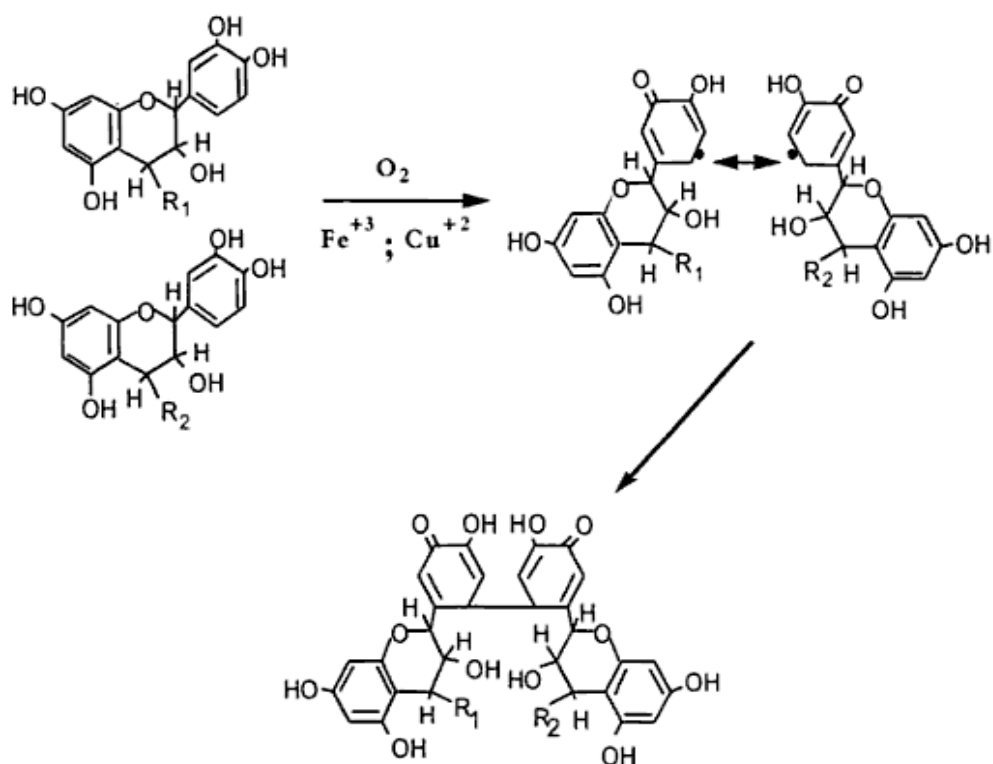
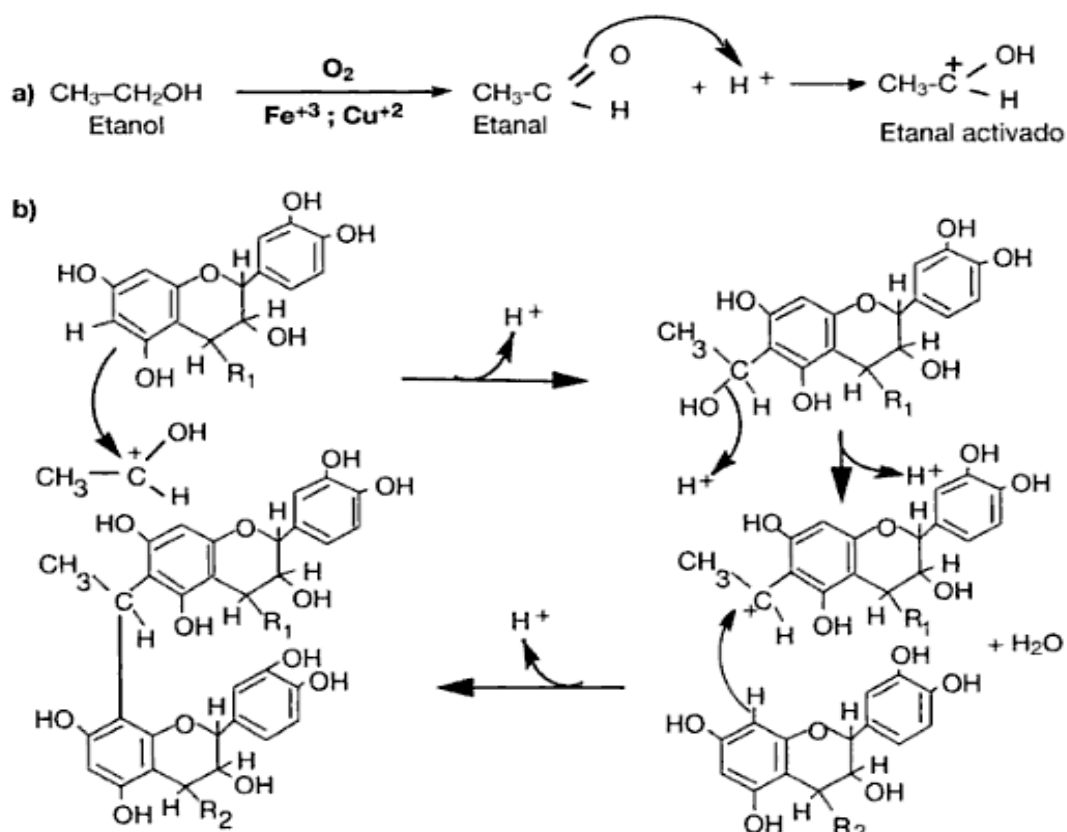


Figura 4.11. Polimerización de taninos por medio de acetaldehído.



4.1.4.3 Reacciones enzimáticas

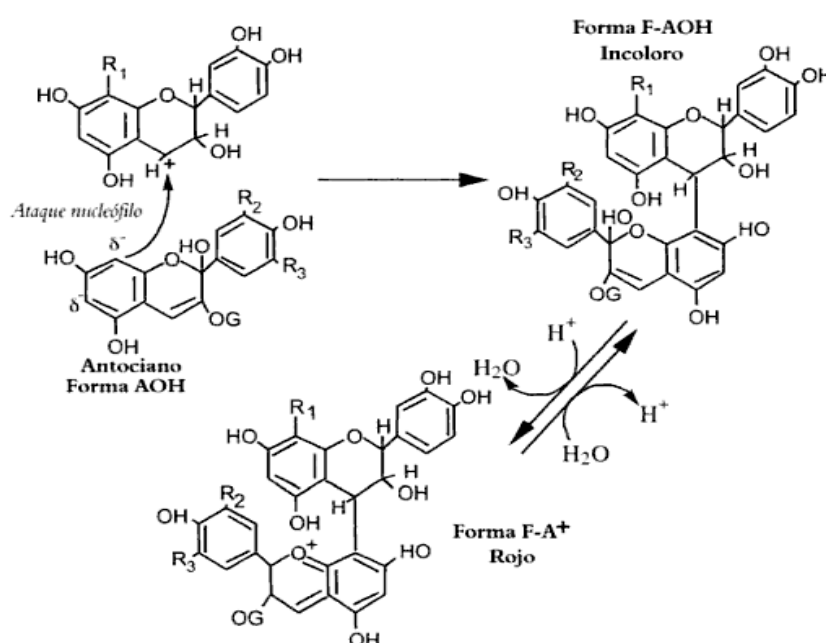
En las primeras etapas de elaboración del vino, cuando la actividad enzimática es mayor, se pueden producir reacciones enzimáticas que afectan a su color. Estas reacciones comienzan con el estrujado de la uva, en presencia de oxígeno, y suelen estar catalizadas por polifenoloxidasas (PPO), peroxidasa, glicosidasa y esterasa. La PPO no cataliza directamente las reacciones de oxidación de los antocianos, lo que hace es actuar sobre otros sustratos (como el ácido caftárico), generando o-quinonas. Estas o-quinonas son las que actúan sobre los antocianos, principalmente sobre los o-difenólicos (delfinidina, cianidina y petunidina), produciéndose una decoloración (Sarni et al., 1995). Las peroxidasas, esterasas y glicosidasas si que oxidan directamente a los antocianos, aunque estas se encuentra en menor proporción en la uva (Bautista-Ortín, 2005).

4.1.4.4 Reacciones de condensación

Conforme evoluciona el vino la concentración de antocianos libres va disminuyendo hasta incluso desaparecer sin que ello suponga una pérdida del color en la misma proporción. Algunos antocianos libres desaparecen porque sufren reacciones de degradación, sin embargo otros experimentan reacciones de condensación con los taninos que ayudan a estabilizar el color. Las reacciones de condensación son reacciones de adición nucleófila en las que los electrófilos presentan una deficiencia electrónica y tienden a extraer electrones de los nucleófilos, que tienen un exceso electrónico. Los antocianos y los taninos pueden actuar tanto como electrófilos como nucleófilos, por lo que las reacciones de condensación pueden ser:

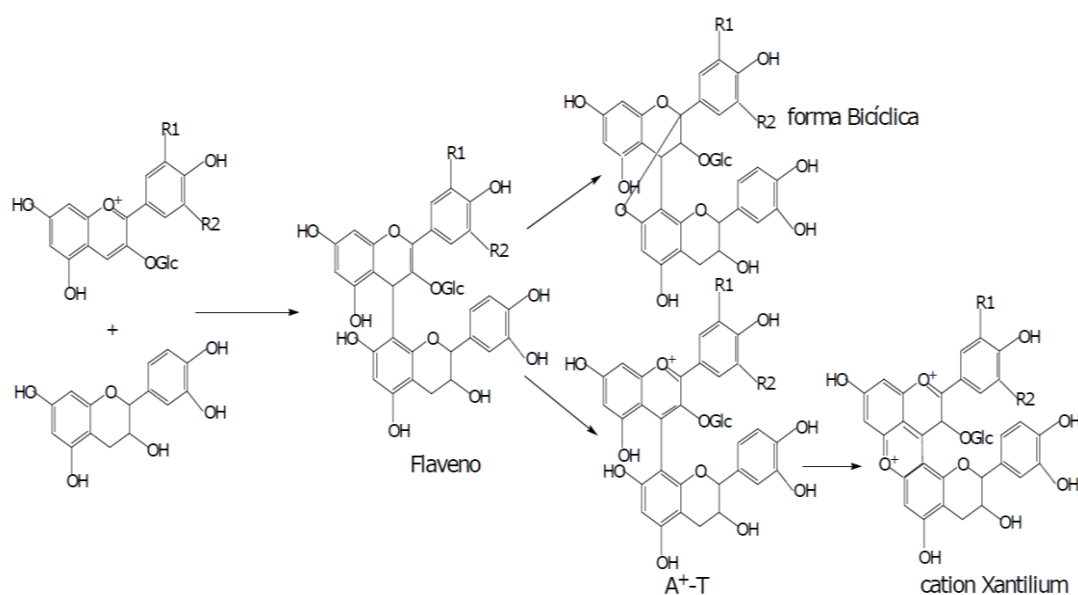
- **Condensación tanino-antociano:** los taninos se hidrolizan en medio ácido, formando un carbocatión que puede reaccionar con la forma hemiacetal del antociano (incolora), para formar un complejo también incoloro, pero que se colorea (rojo-anaranjado) tras su deshidratación (**Figura 4.12**). Este complejo coloreado puede decolorarse por la acción del SO₂ o por efecto de una hidratación.

Figura 4.12. Mecanismo de condensación tanino-antociano.



- **Condensación antociano-tanino:** la forma catiónica del antociano (ión flavilium) reacciona con las posiciones nucleofílicas del tanino (posiciones C8 y C6) formándose un compuesto incoloro que, en presencia de oxígeno, se colorea de rojo, y que es resistente a la decoloración por SO_2 (**Figura 4.13**).

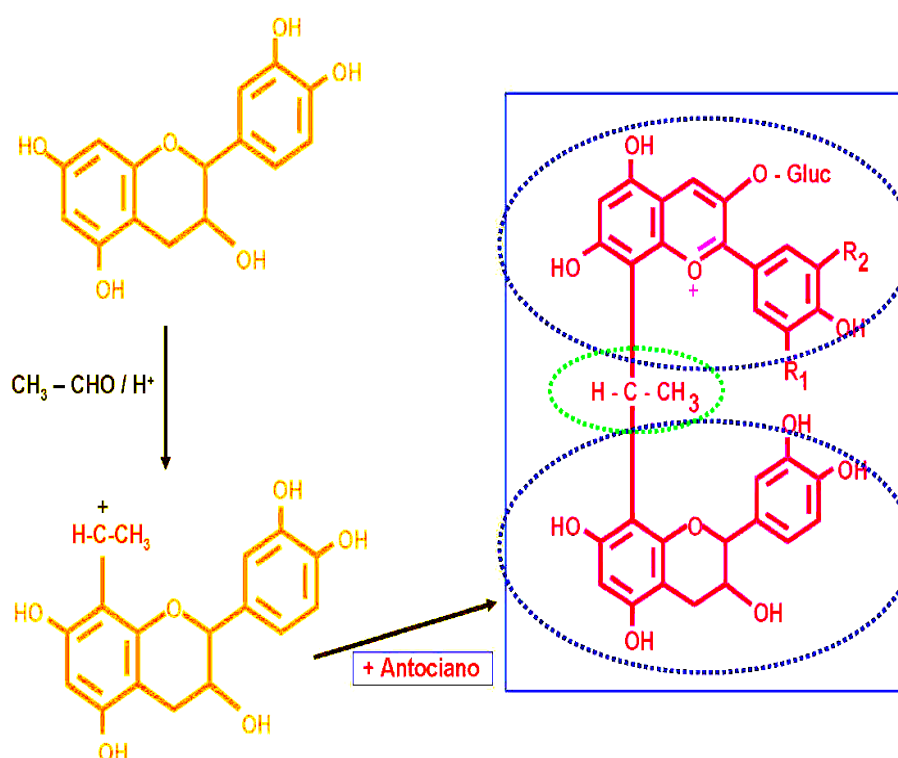
Figura 4.13. Mecanismo de condensación antociano-tanino.



- **Condensación mediada por acetaldehído:** otro tipo de reacción en la que participan los antocianos y los taninos, es una reacción en la que se produce una unión entre moléculas al reaccionar con acetaldehído, creándose una unión por puente de etilo. Los productos obtenidos pueden ser: tanino-etil-tanino, tanino-etil-antociano y antociano-etil-antociano (**Figura 4.14**), estos dos últimos son de color púrpura y muy resistentes a la decoloración por hidratación o por SO_2 . El tamaño molecular de estos productos es variable. El acetaldehído, al igual que en la polimerización cruzada de taninos, puede proceder de la oxidación del etanol, aunque también puede tener su origen en las levaduras, las bacterias acéticas y la autoxidación de compuestos fenólicos (Liu y Pilone, 2000). Este tipo de unión entre antocianos y taninos puede sufrir

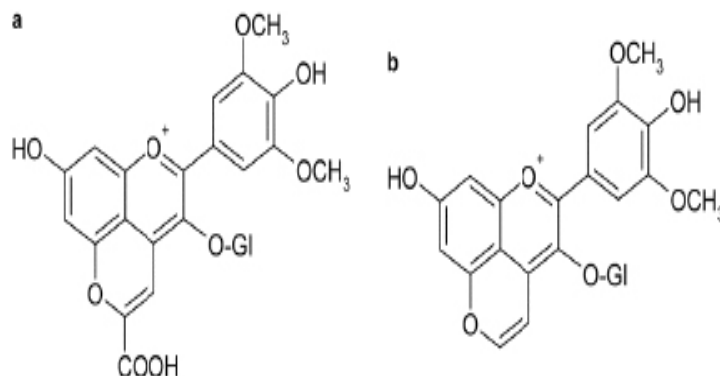
la ruptura del enlace por puente de etilo, dando lugar de nuevo a los precursores que volverían a reaccionar provocando una reorganización estructural.

Figura 4.14. Condensación tanino-etil-antociano.



4.1.4.5 Reacciones de cicloadición. Formación de piranoantocianos

En el vino, los antocianos pueden experimentar reacciones de cicloadición con compuestos de bajo peso molecular, dando lugar a la formación de estructuras con un anillo aromático más, conocidas con el nombre de piranoantocianos (Fulcrand et al., 1998). Los compuestos de bajo peso molecular que reaccionan con los antocianos son mayoritariamente metabolitos producidos por las levaduras, con un doble enlace polarizado, como el ácido pirúvico o el acetaldehído. Los principales derivados formados por la cicloadición de antocianos con el ácido pirúvico y el acetaldehído son, respectivamente, la vitisina A y la vitisina B (**Figura 4.15**)

Figura 4.15. Estructura química de la vitisina A (a) y de la vitisina B (b).

También se pueden dar reacciones de cicloadición entre antocianos y vinilfenoles formando aductos antociano-vinilfenol, e incluso entre derivados pirúvicos de antocianos y vinilfenoles. Estos últimos derivados se denominan portisinas, por haber sido aislados por primera vez en vinos de Oporto (Mateus et al., 2005).

Los piranoantocianos absorben a longitudes de onda menores que los antocianos, por lo que se les ha asociado con el color anaranjado que presentan los vinos durante el envejecimiento (excepto las portisinas que presentan una coloración azul-violácea) (Sánchez-Iglesias, 2007). Son muy estables y resistentes a las variaciones de pH y sulfuroso (Romero-Cascales, 2008).

4.1.4.6 Influencia de las características del vino sobre la evolución de los compuestos fenólicos

Todas las reacciones descritas (copigmentación, polimerización de taninos, oxidaciones enzimáticas, condensaciones y cicloadiciones) compiten entre sí a

lo largo de la elaboración y envejecimiento del vino. El predominio de unas sobre otras, y por tanto la evolución del color y de las propiedades organolépticas del vino, dependerá de las características del vino en cuestión. El factor más influyente es, sin duda, la proporción antocianos/taninos, aunque también hay que tener en cuenta otros parámetros como son las cepas de levadura empleadas en la vinificación, el pH del vino y, por supuesto, la presencia de oxígeno.

- **Proporción antocianos / taninos:** si la concentración entre antocianos y taninos es similar se produce una situación ideal para la combinación entre ellos y por tanto para la estabilización del color, en la que todas las reacciones de combinación son posibles. Pero cuando la concentración de antocianos es superior a la de taninos, no todos los antocianos podrán combinarse, quedando por tanto antocianos libres susceptibles de sufrir oxidaciones hacia fenoles incoloros. En esta situación no se ve favorecida la polimerización de taninos, ya que la mayor parte de ellos se habrá combinado con los antocianos. Para corregir esta deficiencia tánica se puede aumentar la concentración de taninos activando las maceraciones o añadiendo taninos exógenos. También puede ocurrir que la concentración de taninos sea mayor que la de antocianos (variedades pobres en antocianos o cosechas poco maduras), en este caso las combinaciones entre antocianos y taninos podrán tener lugar, pero los taninos en exceso tenderán a polimerizar, siendo esta la reacción predominante que provocaría una evolución del color hacia tonalidades amarillas. Una buena solución puede ser el uso de maceraciones prefermentativas que favorezcan la extracción de antocianos pero no la de taninos de las semillas, o bien, el coupage con otros vinos ricos en antocianos.
- **Levaduras:** el acetaldehído y el ácido pirúvico intervienen en los mecanismos de formación de piranoantocianos y de los productos de condensación, reacciones que estarán más o menos favorecidas dependiendo de la mayor o menor presencia de estos compuestos en el vino. El acetaldehído y el ácido pirúvico son liberados durante el

metabolismo de las levaduras, por lo que su concentración en el vino depende principalmente de la cepa de levadura utilizada en la vinificación (Morata et al., 2004).

- **pH del vino:** el pH del vino es un factor importante en las reacciones de combinación entre antocianos y taninos. A pH bajo se ve favorecida la formación de derivados por puente de etilo (ya que se facilita la protonación del acetaldehído) y la ruptura de los taninos poliméricos catalizada por ácidos, paso clave en la formación de polímeros T-A⁺ y tanino-piranoantociano. A pH elevado los antocianos compiten con los taninos en las reacciones de adición nucleófila (aunque a los rangos de pH del vino las condensaciones T-A⁺ y T-etil-A no están limitadas por la disponibilidad de la forma hidratada) (Bautista-Ortín, 2005).
- **Presencia de oxígeno:** el oxígeno juega un papel fundamental en las reacciones de oxidación enzimática y química. La oxidación enzimática predomina en los mostos, mientras que la oxidación química se produce principalmente durante la crianza y envejecimiento del vino. En los vinos tintos el pardeamiento producido por la oxidación enzimática de los polifenoles es limitado, sin embargo la oxidación química contribuye mucho al proceso de maduración. Reacciones como la polimerización de taninos, las cicloadiciones o las condensaciones por puente de etilo, requieren una etapa previa de oxidación. Por ello, la presencia de oxígeno es importante y debe ser favorecida con operaciones como los remontados, los trasiegos o la microoxigenación. No obstante, el aporte de oxígeno debe ser controlado, ya que un exceso puede provocar la oxidación de un gran número de compuestos o la formación de polímeros muy grandes con gran capacidad de precipitación que produciría una pérdida de color (Cano-López et al., 2006).

4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA UVA EN EL MOMENTO DE LA VENDIMIA

El efecto de las diferentes técnicas enológicas sobre la calidad de los vinos estudiados puede estar influenciado por las características de la uva en el momento de la vendimia (Llaudy et al., 2005). Tradicionalmente el momento de la vendimia se ha definido según la evolución de los componentes mayoritarios de la baya (azúcares y ácidos), atendiendo así a la denominada “madurez tecnológica”, pero actualmente se considera que la valoración de la uva destinada a la elaboración de un vino tinto de calidad debe incluir una evaluación de su potencial fenólico (Saint-Criq et al., 1998; González-Neves et al., 2010a; Kountoundakis et al., 2010).

La **Tabla 4.1** muestra las características químico-físicas de la uva en el momento de la vendimia en las campañas 2007 y 2009. En esta tabla se recogen los datos correspondientes tanto a la madurez tecnológica como a la madurez fenólica.

El peso de la uva fue significativamente diferente en las tres variedades, siendo Monastrell la que presentó mayor peso de baya, seguida de Syrah y Cabernet Sauvignon. Estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores (Reyero et al., 1999) que observaron que las uvas de Monastrell alcanzan mayor tamaño porque tienen una rápida respuesta ante la disponibilidad hídrica. El tamaño de la baya tiene especial importancia porque a mayor tamaño de uva, menor es el ratio piel/pulpa, lo que significa que los compuestos fenólicos y aromáticos se encontrarán más diluidos en el mosto (Gil-Muñoz et al., 2009).

Tabla 4.1. Características químico-físicas de la uva en el momento de la vendimia, campañas 2007 y 2009.

Año	Variedad	Peso 100 bayas (g)	°Brix	pH	Acidez Total (°)	Ac. Málico (g/L)	Ac. Tartárico (g/L)	IMC (%)	IMP (%)	IPT	AT
2007	Cabernet Sauvignon	98,82a	24,75b	3,86b	2,89a	0,85a	5,11a	48,96a	52,60b	61,66c	1441,70b
	Syrah	119,06b	25,53c	3,82a	3,18b	1,28b	5,52b	55,01b	48,79a	50,41b	1448,48b
	Monastrell	155,24c	23,81a	3,87b	3,29b	1,54c	5,04a	56,14b	61,43c	38,27a	846,96a
2009	Cabernet Sauvignon	91,44a	25,47a	3,76b	3,27a	2,01b	4,13b	36,05b	65,71c	63,28c	540,96b
	Syrah	134,19b	26,2a	3,95c	4,30b	3,43c	3,65a	32,70a	59,99b	45,08a	444,30a
	Monastrell	159,75c	25,52a	3,59a	3,41a	1,77a	3,78a	50,68c	54,22a	56,03b	634,78c

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: (*): acidez total expresada en g/L de ácido tartárico; IMC: índice de madurez celular; IMP: índice de madurez de las pepitas; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L mosto).

En el año 2007 se encontró un contenido de azúcares significativamente diferente entre las tres variedades. Syrah fue la variedad que presentó mayor °Brix, seguida de Cabernet Sauvignon y de Monastrell. Estas diferencias no se apreciaron en la campaña 2009, aunque sí se observó que las tres variedades tenían mayor contenido de azúcares que en la campaña anterior. La acidez total de las tres variedades también fue mayor en la campaña del 2009 que en la del 2007. En el 2007 Syrah y Monastrell tuvieron una acidez total y un contenido de ácido málico significativamente mayores que Cabernet Sauvignon. En el 2009 fue Syrah la que mostró mayor acidez que Monastrell y Cabernet Sauvignon.

La relación azúcares/acidez da información de la madurez de la pulpa. Conforme avanza la maduración aumenta el contenido de azúcares y disminuye la acidez de modo que una relación cercana al máximo constituye un índice de madurez total (Carbonneau et al., 2000). En la campaña 2007 la uva contenía menor cantidad de azúcares que en la campaña 2009, pero también presentaba menor acidez, aunque en ambas campañas la acidez de la uva fue relativamente baja, con valores de pH superiores a 3,6 (excepto Monastrell en el 2009 que presentó un pH de 3,59). Estos valores bajos de acidez son típicos en climas cálidos (Bergqvist et al., 2001). Una acidez con valores de pH por encima de 3,6 incrementa la actividad de los microorganismos, disminuye la intensidad de color de los vinos, reduce el sulfuroso libre y afecta por tanto a la estabilidad del vino en el tiempo (Bautista-Ortín, 2005). Para evitar esta situación fue necesario corregir los valores de acidez del mosto en el momento de la elaboración, adicionando ácido tartárico hasta un valor de 5,5 g/L de acidez total.

Respecto a los parámetros relacionados con la madurez fenólica, también se encontraron diferencias significativas entre las tres variedades. Monastrell fue la variedad que presentó mayor índice de madurez celular (IMC). Estas diferencias fueron especialmente significativas en la campaña 2009, donde el valor del IMC para Monastrell (50,68%) fue mucho mayor que el de Cabernet Sauvignon (36,05%), y este un poco mayor que el de Syrah (32,70%). Estos resultados parecen estar relacionados con la morfología de las células de la

piel. Ortega-Regules et al., (2008) estudiaron la composición y morfología de las paredes celulares de los hollejos de diferentes variedades, observando que la piel de uva Monastrell presentaba mayor grosor que la de Syrah y Cabernet Sauvignon, porque estaba formada por un mayor número de capas celulares. Esto podría explicar el hecho de que Monastrell es una variedad que presenta cierta dificultad para la extracción de compuestos fenólicos durante el proceso de maceración. Sin embargo, hay que destacar que en la vendimia 2007 no se encontraron tantas diferencias en el IMC entre las tres variedades, sólo el IMC de Cabernet Sauvignon (48,96%) fue significativamente menor, y además tanto los valores del IMC de las uvas de Cabernet Sauvignon como el de las uvas de Syrah, ese año, fueron mucho mayores que los del 2009. El IMC representa el porcentaje de antocianos que no serán extraídos, por lo que es recomendable que sus valores sean bajos (inferiores al 30%) (Zamora, 2003). En nuestro estudio sólo las uvas de Cabernet Sauvignon y de Syrah vendimiadas en 2009 tuvieron valores del IMC próximos al 30%. Algunos autores señalan que la facilidad para extraer los antocianos está relacionada con la degradación de las estructuras celulares de los hollejos por la actividad de pectinasas endógenas y que, por lo tanto, el IMC disminuye al avanzar la maduración (González et al., 2001). Los altos valores encontrados en la vendimia 2007 indicarían que ese año la uva alcanzó una menor madurez fenólica, coincidiendo además con un menor contenido de azúcares, es decir, con una menor madurez tecnológica. Comparando los valores del IMC de la uva en las dos campañas estudiadas, se observó que la facilidad para extraer los compuestos fenólicos parece depender de la variedad, pero también se vio afectada por el grado de madurez de la uva en las variedades Syrah y Cabernet Sauvignon.

El índice de madurez de las pepitas (IMP) representa el porcentaje de taninos que aportarán las semillas. La facilidad con la que los taninos de las semillas son extraídos disminuye al aumentar la madurez de la uva, debido a una menor solubilización como consecuencia del aumento del grado de polimerización (González-Neves et al., 2010a). En la campaña 2007 la uva de la variedad Monastrell fue la que presentó mayor IMP, seguida de Cabernet Sauvignon y de Syrah. En la campaña 2009 fue la uva de Cabernet Sauvignon la que tuvo mayor IMP, seguida de Syrah y Monastrell. Se puede destacar que,

comparando el estado de madurez de la uva entre las dos campañas, cabría esperar que los valores de IMP en el 2009 fuesen menores que en el 2007 y, sin embargo, en Syrah y Cabernet Sauvignon no se observa esta tendencia, sino que, aún teniendo mayor madurez en la pulpa y en los hollejos, las pepitas se encontraban menos maduras que en la campaña anterior. Lasanta-Melero (2009) también observó que en uvas de la variedad Syrah cultivadas en climas cálidos, los índices de madurez celular y de madurez de las pepitas no evolucionaron de igual forma que la madurez tecnológica de la uva.

El índice de polifenoles totales (IPT) fue significativamente mayor en la uva de Cabernet Sauvignon en las dos campañas estudiadas. En el 2007 la uva de Monastrell fue la que mostró un menor índice de polifenoles totales y una menor concentración de antocianos, estos datos, junto con los de los índices de madurez, confirman el menor grado de madurez fenólica de la uva de esta variedad en la campaña 2007. A finales de octubre del 2007 la uva de Monastrell aún no había alcanzado un estado de maduración óptimo para la vendimia, pero las altas precipitaciones producidas a finales del mes (la **Tabla 3.1** del Capítulo 3, Materiales y Métodos, muestra los datos edafoclimáticos durante el período de maduración en las campañas 2007 y 2009) hicieron necesaria su recolección para evitar la aparición de plagas y un aumento excesivo del tamaño de baya, con la consiguiente dilución de los compuestos fenólicos en el mosto.

En la campaña 2009, la uva Monastrell era la que contenía mayor cantidad de antocianos totales (expresados en mg/L mosto). Ese año las uvas de Syrah y Cabernet Sauvignon, presentaron un contenido total de antocianos bastante menor que en la campaña 2007, dato que toma especial relevancia teniendo en cuenta que en el 2009 estas variedades alcanzaron un mejor estado de madurez. Glories (1999) indica que la no coincidencia entre el máximo de antocianos y la madurez tecnológica denota una no muy buena adaptación de la variedad al terruño y, por otro lado, muchos autores han observado una disminución de las concentraciones de antocianos en las últimas etapas de la maduración (Fournand et al., 2006; Ortega-Regules et al., 2008). En otros estudios se ha verificado que la anticipación del máximo de antocianos con

relación a la madurez tecnológica era más notoria en las situaciones de maduración deficiente (González-Neves et al., 2010b). Mattivi (2006) también observó una detención en la acumulación de antocianos y una disminución de su concentración en la fase final de la maduración en algunas variedades cultivadas en climas cálidos.

En el momento de la vendimia se estudió también el perfil antociánico de las uvas de las tres variedades. La **Tabla 4.2** recoge los resultados, expresados en mg/Kg de uva, obtenidos al analizar la composición de antocianos en uva mediante cromatografía líquida de alta resolución. Aunque la suma de los antocianos detectados por HPLC no coincide con los obtenidos espectrofotométricamente, debido a los distintos métodos de extracción empleados, si que fueron similares las diferencias observadas entre variedades y entre campañas. En el 2007 en la uva de Monastrell se encontró un contenido total de antocianos significativamente menor que en Syrah y Cabernet Sauvignon. También se observó que el contenido de antocianos totales de Cabernet Sauvignon y Syrah fue menor en la campaña 2009 que en la del 2007. En la campaña 2009, Monastrell presentó un mayor contenido de antocianos monoglucósidos que Cabernet Sauvignon y Syrah. Según Fernández-López et al., (1998) la uvas con un alto porcentaje de antocianos trihidroxilados (delfinidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido) son variedades muy pigmentadas. Coincidiendo con numerosos estudios (García-Beneytez, et al., 2002; Rio-Segade et al., 2008; Ryan y Revilla, 2003; Cholet y Darne, 2004; Fournad et al., 2006; Pomar et al., 2005), malvidina-3-glucósido fue el antociano monoglucósido presente en mayor proporción en las tres variedades.

En ambas campañas Syrah y Cabernet Sauvignon obtuvieron una mayor proporción de antocianos acilados que Monastrell. Estas altas proporciones de antocianos acilados en Cabernet Sauvignon y Syrah coinciden con los resultados obtenidos por Romero-Cascales (2008) y Monagas et al. (2003).

Tabla 4.2. Antocianos en uva (mg/Kg uva) determinados por HPLC, campaña 2007 y 2009.

Antociano	2007			2009		
	CS	Syrah	Monastrell	CS	Syrah	Monastrell
Delfinida-3-glucósido	54,91b	22,39a	32,85ab	36,38a	13,16a	58,54c
Cianidina-3-glucósido	5,59a	7,28a	37,14b	3,38a	3,10a	78,15b
Petunidina-3-glucósido	62,21a	46,42a	55,13a	56,22b	30,52a	88,44c
Peonidina-3-glucósido	40,21a	81,91a	89,00a	30,33a	38,94a	102,03b
Malvidina-3-glucósido	576,73b	401,26ab	290,91a	267,16a	216,54a	245,97a
Delfinidina Acetato	20,13b	1,88a	7,40a	20,96b	10,84a	5,66a
Cianinida acetato	11,73a	13,80a	3,40a	3,45b	2,00a	5,30c
Petunidina acetato	31,04b	19,76ab	9,49a	23,29c	16,79a	7,24a
Peonidina acetato	21,81b	35,52c	5,51a	26,11b	24,27b	6,42a
Malv.Acet+Delf.cum.	312,18b	130,40a	27,20a	284,92c	197,55b	27,20a
Peonidina cafeato	8,09a	11,82b	6,90a	5,04a	8,53b	7,51b
Cianidina caf+cum.	31,83a	34,19a	25,20a	2,56a	4,47a	17,88b
Petunidina cumarato	8,65a	33,22c	16,71b	7,79a	21,64b	21,99b
Malvidina cum. cis	7,25a	17,30a	6,34a	4,54a	6,50a	5,61a
Peonidina cumarato	8,87a	77,06b	13,94a	15,43a	37,18b	22,59a
Malv. Cumarato trans	98,62a	324,20b	89,32a	86,84a	184,96b	81,47a
Totales	1299,85b	1220,88b	716,46a	874,70a	817,01a	781,91a
No acilados	739,64a	559,25a	505,04a	393,78a	302,26a	573,04b
Acilados	560,20b	661,63b	211,42a	480,92b	514,75b	208,88a
Acetatos	396,90b	189,53a	53,00a	358,72c	251,46b	51,82a
Cumaratos	155,22a	460,29b	151,52a	117,16a	254,76b	149,54a

Letras diferentes en la misma fila y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: CS: Cabernet Sauvignon; Malv: malvidina; Delf: delfinidina; acet: acetato; cum: cumarato; caf: cafeato.

Tanto en el 2007 como en el 2009, Syrah contenía mayor proporción de derivados acetatos y Cabernet Sauvignon mayor proporción de derivados cumaratos, coincidiendo con lo señalado por Darne (1988) y Fernández-López et al., (1995). Es comúnmente aceptado que el perfil antociánico en la uva está fuertemente vinculado a la herencia genética de cada variedad, y que Monastrell es una variedad caracterizada por una baja proporción de antocianos acilados (Romero-Cascales et al., 2005). La presencia de antocianos acilados tiene especial importancia porque intervienen en procesos de estabilización del color del vino como la copigmentación intramolecular.

En la **Tabla 4.3** se muestra la composición de flavonoles en las uvas de Cabernet Sauvignon, Syrah y Monastrell, en el momento de la vendimia en las campañas 2007 y 2009.

Tabla 4.3. Flavonoles en uva (mg/Kg uva) determinados por HPLC, campañas 2007 y 2009.

Flavonoles	2007			2009		
	CS	Syrah	Monastrell	CS	Syrah	Monastrell
Miricetina-galactósido	2,71a	1,78a	2,04a	1,85a	2,18a	2,63a
Miricetina-glucósido	1,63b	0,97ab	0,67a	3,94a	2,92a	9,22b
Quercetina-galactósido	0,48a	0,95a	0,81a	0,96a	0,72a	3,47b
Quercetina-glucorónido	3,65a	3,08a	3,00a	11,50a	8,50a	17,10b
Quercetina-glucósido	2,00a	16,86b	5,92a	4,63a	5,77a	23,48b
Kampferol-galactósido	0,41a	0,21a	0,48a	0,48a	0,33a	0,48a
Kampferol-glucósido	0,41a	0,06a	0,42a	0,56a	0,55a	0,44a
Isorhamnitina-glucósido	1,22a	1,74a	0,62a	1,30b	2,27c	0,78a
Siringetina-glucósido	1,59a	0,92a	0,37a	1,39a	0,94a	0,45a
Total	14,11a	26,56b	14,32a	26,62a	24,18a	58,05b

Letras diferentes en la misma fila y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$.

Los flavonoles son los compuestos fenólicos responsables del color amarillo de los vinos blancos. En las variedades tintas y en los vinos tintos se encuentran en menor proporción, pero su presencia es de suma importancia, ya que forman complejos de copigmentación muy estables con los antocianos (Boulton, 2001). Además, los flavonoles, tanto por su actividad antioxidante como por otros mecanismos a nivel celular, podrían estar relacionados con los efectos beneficiosos para la salud de una ingesta moderada de vino (Castillo-Muñoz et al., 2007). En la uva, los flavonoles solo están presentes en sus formas glicosiladas, mientras que en el vino se pueden encontrar sus correspondientes agliconas, liberadas mediante procesos de hidrólisis ácida durante la vinificación. La glucosa es el azúcar que con más frecuencia podemos encontrar en la posición C-3 de las moléculas de flavonol, aunque también pueden existir otros azúcares como la galactosa o el ácido glucurónico ocupando esa posición para formar el correspondiente flavonol glucosidado (Makris et al., 2006).

Las concentraciones de flavonoles encontradas en las uvas analizadas se encuentran dentro de los rangos señalados por Makris et al., (2006). Coincidiendo con los resultados obtenidos por numerosos autores, los principales flavonoles encontrados en las uvas para las tres variedades fueron quercetina-3-glucurónido y quercetina-3-glucósido (Mattivi et al., 2006; Castillo-Muñoz et al., 2007; Figueredo-González et al., 2012), seguidos de miricetina-3-galactósido en la campaña 2007 (siendo ese año su concentración incluso superior que la de quercetina-3-glucósido en la uva de Cabernet Sauvignon) y de miricetina-3-glucósido en la campaña 2009. Hernández-Jiménez et al. (2009) también señalaron miricetina-3-glucósido como un flavonol mayoritario en uvas de Monastrell cultivadas en la misma zona que la de nuestro estudio.

En la campaña 2009, en las tres variedades, se encontraron mayores concentraciones de quercetina-3-glucurónido que en la campaña 2007. Respecto al contenido del otro flavonol mayoritario, quercetina-3-glucósido, las diferencias halladas entre una campaña y otra no siguieron la misma tendencia en las tres variedades. Así, en las uvas de Syrah el contenido de este flavonol fue mucho mayor en la campaña 2007 (16,86 mg/ Kg uva) que en la del 2009

(5,77 mg/ Kg uva). Algunos autores señalan que la biosíntesis de los flavonoles en la uva depende, en mayor medida que la de otros compuestos fenólicos, de algunos factores climáticos como la exposición solar, favoreciéndose su acumulación en la uva al aumentar las horas de radiación solar (Mattivi et al., 2006; Castillo-Muñoz et al., 2009; Koyama et al., 2012). Downey et al. (2004) estudiaron el efecto de la insolación sobre la composición fenólica en uvas de Syrah y observaron que la concentración de flavonoles, especialmente de quercetina-3-glucósido, se veía favorecida en uvas con mayor exposición a la radiación solar. Spayed et al. (2002) también observó un aumento significativo en la concentración de quercetina-3-glucósido en uvas de Merlot sometidas a una mayor insolación. Estos resultados coinciden con los encontrados en nuestro estudio en las uvas de Syrah, puesto que en la campaña 2007, cuando se encontró mayor concentración de quercetina-3-glucósido en esta variedad, las horas de exposición solar durante el período de maduración fueron mayores que las de la campaña 2009 (**Tabla 3.1** del Capítulo 3).

Sin embargo, en las uvas de Cabernet Sauvignon y de Monastrell la concentración de quercetina-3-glucósido fue mayor en la campaña 2009 que en la del 2007, a pesar de que en el año 2009 se habían registrado menos horas de exposición solar. Este resultado fue especialmente significativo en las uvas de Monastrell que, en el 2007, contenían 5,92 (mg/Kg uva) de quercetina-3-glucósido frente a los 23,48 (mg/ Kg uva) encontrados en el 2009. Castillo-Muñoz et al. (2007) también hallaron una proporción molar de quercetina-3-glucósido mucho mayor que la de otros flavonoles glucosidados en uvas de Syrah. El contenido total de flavonoles en las uvas de Cabernet Sauvignon y, especialmente, en las de Monastrell, fue mayor en la campaña 2009 que en la del 2007 debido, sobre todo, a las concentraciones de quercetina-3-glucósido y quercetina-3-glucurónido presentes en estas uvas en el año 2009. Algunos autores han señalado que, aunque la exposición solar juega un papel fundamental en la acumulación de flavonoles en las uvas, un exceso de radiación UV-B puede afectar negativamente al contenido de flavonoles glucosidados (Makris et al., 2006). Cantos et al. (2000) observaron un acusado descenso en el contenido de flavonoles en uvas de mesa de la variedad Napoleón cuando habían sido expuestas a un tratamiento bajo radiación UV-B.

El contenido de flavonoles en la uva debe depender además de otros factores como el grado de maduración o la variedad. Algunos autores indican que de igual forma que cada variedad presenta un perfil antociánico característico, también se puede hablar de un perfil varietal para la composición de flavonoles (Hermosín-Gutiérrez et al., 2005; Rodríguez-Montealegre, 2006), aunque los resultados obtenidos aún no son muy consistentes.

En la **Tabla 4.4** se recogen los datos obtenidos al estudiar la composición de proantocianidinas en los hollejos de las uvas de las tres variedades.

Al igual que con los anteriores parámetros analizados, una vez más se encontraron diferencias en las características de la uva entre las dos campañas estudiadas. En la campaña 2007 Cabernet Sauvignon mostró la mayor concentración de proantocianidinas en la piel (666,86 mg/Kg uva). González-Neves et al., (2004) también encontraron altas proporciones de proantocianidinas en las pieles de Cabernet-Sauvignon. En la campaña 2009 fue Monastrell la que presentó mayor concentración de proantocianidinas al expresar el resultado en $\mu\text{g/g}$ hollejo (4400,30 $\mu\text{g/g}$ hollejo), aunque al tener en cuenta el tamaño de la baya, expresando el resultado en mg/Kg de uva, no se encontraron diferencias significativas en el contenido total de proantocianidinas entre Monastrell y Cabernet Sauvignon, pero si respecto a Syrah que fue la que mostró una menor concentración (161,75 mg/kg). Las cantidades encontradas en las pieles de Monastrell en el 2009 y en las pieles de Syrah en el 2007 son similares a las observadas por otros autores para uvas cultivadas en la misma zona que la de nuestro estudio, sin embargo el resto de concentraciones son menores que las citadas por estos autores (Hernández-Jiménez et al., 2009). Cosme et al., (2009) también encontraron cantidades de proantocianidinas en las pieles de Cabernet Sauvignon mayores que las obtenidas en el 2007 y en el 2009. Aunque hay que tener en cuenta que otros autores (Hanlin y Downey, 2009; Chira et al, 2009) han observado diferencias importantes en la presencia de proantocianidinas en los hollejos dependiendo de la añada. Hanlin y Downey., (2009) observaron que la acumulación de taninos en los hollejos de las uvas de Syrah y Cabernet Sauvignon parecía depender del estado de maduración de la uva.

No se encontraron diferencias en el grado medio de polimerización (GMP) entre las tres variedades en la campaña 2007. Pero en el 2009, el GMP fue significativamente mayor en Cabernet Sauvignon (32,28) que en Syrah y Monastrell (16,58 y 13,61 respectivamente). Estos dos últimos valores se encontraban por debajo de los observados por Bogs et al., (2005) en el caso de Syrah, pero fueron similares a los hallados por Hernández-Jiménez et al., (2009) en el caso de Monastrell.

Respecto a la composición de las diferentes subunidades, Syrah fue la variedad que presentó mayor porcentaje de galoilación en las dos campañas, correspondiendo con el mayor porcentaje de (-)-epicatequina-3-O-galato de extensión. No se detectó (-)-epicatequina-3-O-galato terminal en los hollejos de las uvas analizadas, coincidiendo con los resultados obtenidos por Busse-Valverde et al. (2010). La subunidad más abundante fue (-)-epicatequina de extensión con un porcentaje significativamente mayor en Monastrell que en Syrah y Cabernet Sauvignon, seguida de (-)-epigallocatequina de extensión (excepto en la uva de Cabernet Sauvignon en la campaña 2007, en la que la fracción de (-)-epigallocatequina fue superior a la de (-)-epicatequina). Entre las subunidades terminales, (-)-epicatequina fue la más abundante en las tres variedades en la campaña 2007. En la campaña 2009, Monastrell y Cabernet Sauvignon también presentaron un mayor porcentaje de (-)-epicatequina como subunidad terminal, aunque en el caso de Syrah, fue (+)-catequina la que se encontró en mayor proporción. Downey et al. (2003) también encontraron una mayor fracción de (+)-catequina en la piel de uvas de Syrah.

Tabla 4.4. Composición de proantocianidinas en hollejos determinada por HPLC, campañas 2007 y 2009.

	2007			2009		
	CS	Syrah	Monastrell	CS	Syrah	Monastrell
µg/g hollejo	6544,56b	3084,17a	1613,11a	3171,08ab	2062,06a	4400,30b
µg/baya	793,23b	398,34a	293,37a	351,92a	215,06a	854,87b
mg/kg uva	666,86b	301,69a	176,88a	367,56b	161,75a	438,40b
GMP	20,60a	29,97a	19,94a	32,28b	16,58a	13,61a
%Galoilación	2,44a	5,54b	4,15ab	3,64a	9,03b	1,35a
%C_t	1,66b	0,90a	2,26b	1,52a	5,54a	3,50a
%E_t	3,45a	2,57a	3,69a	1,76a	1,21a	4,01b
%EG_t	nd	nd	nd	nd	nd	nd
%C_e	1,08a	1,21a	1,87b	1,45b	1,35b	1,11a
%E_e	44,64a	51,81b	68,40c	47,15a	54,05b	65,85c
%EG_e	2,44a	5,54b	4,15ab	3,64a	9,03b	1,35a
%EGC_e	46,73c	37,98b	19,63a	44,47b	28,82a	24,18a

Letras diferentes en la misma fila y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: CS: Cabernet Sauvignon; GMP: grado medio de polimerización; C_t: (+)-catequina terminal; E_t: (-)-epicatequina terminal; EG_t: (-)-epicatequina galato terminal; C_e: (+)-catequina de extensión; E_e: (-)-epicatequina de extensión; EG_e: (-)-epicatequina galato de extensión; EGC_e: (-)-epigalocatequina de extensión; nd: no detectado.

Los resultados obtenidos al analizar la composición de proantocianidinas en las semillas se muestran en la **Tabla 4.5**. En las semillas, el contenido total de proantocianidinas fue mucho mayor que en los hollejos, presentando además un menor grado de polimerización y un mayor porcentaje de galoilación (debido a la presencia de (-)-epicatequina-3-O-galato terminal, que estaba ausente en los hollejos). No se detectó epigallocatequina, tal y como cabía esperar, puesto que es una prodelfinidina que solo se encuentra en los hollejos (Labarbe et al., 1999). En la campaña 2007 el contenido total fue significativamente mayor en las semillas de Cabernet Sauvignon, seguidas de las de Monastrell y Syrah. En el 2009, todas las variedades presentaron mayor concentración de taninos en las semillas que en la campaña anterior, siendo Monastrell la que tuvo una concentración significativamente mayor que Syrah y Cabernet Sauvignon, aunque al expresar el resultado en mg/Kg uva, las diferencias fueron significativas entre Cabernet Sauvignon y Syrah, presentando Monastrell un valor intermedio entre ambas.

No se observaron diferencias en el GMP de los taninos de las semillas entre las tres variedades en ninguna de las campañas, y, al igual que en los hollejos, Syrah fue la variedad que presentó mayor proporción de subunidades galoiladas. Los valores encontrados están, en general, dentro de los rangos descritos por Prieur et al. (1994) para el porcentaje de galoilación (entre 13 y 29) y para el GMP (entre 2,3 y 5,21). La subunidad monomérica más abundante en las semillas fue (-)-epicatequina de extensión, que en la uva de Monastrell de la campaña 2009 se encontró además en un porcentaje significativamente mayor que en la uva de Syrah y en ésta, a su vez, mayor que en Cabernet Sauvignon. Respecto a las subunidades terminales, (-)-epicatequina-3-O-galato y (-)-epicatequina fueron las que se encontraron en mayor proporción en las tres variedades.

Tabla 4.5. Composición de proantocianidinas en semillas determinadas por HPLC, campañas 2007 y 2009.

	2007			2009		
	CS	Syrah	Monastrell	CS	Syrah	Monastrell
µg/g semillas	14549,99b	8654,17a	10821,52ab	28043,06a	25766,08a	38144,12b
µg/baya	1762,27b	1151,76a	2061,31b	1651,33a	1956,11a	2977,92b
mg/kg uva	1482,15c	872,89a	1238,97b	1725,14b	1476,38a	1515,54ab
GMP	5,53a	5,60a	5,91a	6,10a	5,71a	5,85a
%Galoilación	11,64a	14,40c	13,82b	11,49a	15,09c	13,85b
%C_t	6,56b	5,94a	5,66a	6,07a	5,66a	5,99a
%E_t	8,73a	7,72a	7,84a	7,56a	8,17a	8,29a
%EG_t	2,79a	4,18c	3,46b	2,79a	3,79b	2,97a
%C_e	7,03b	6,12a	7,13b	5,96a	6,09a	8,29a
%E_e	66,04a	65,81a	65,55a	68,91b	64,99a	63,58a
%EG_e	8,85a	10,22b	10,36b	8,71a	11,30b	10,88b
%EGC_e	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Letras diferentes en la misma fila y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: CS: Cabernet Sauvignon; GMP: grado medio de polimerización; C_t: (+)-catequina terminal; E_t: (-)-epicatequina terminal; EG_t: (-)-epicatequina galato terminal; C_e: (+)-catequina de extensión; E_e: (-)-epicatequina de extensión; EG_e: (-)-epicatequina galato de extensión; EGC_e: (-)-epigalocatequina de extensión; nd: no detectado.

Del análisis de la uva en el momento de la entrada en bodega se puede concluir que se observaron importantes diferencias entre las campañas 2007 y 2009 para las variedades Syrah y Cabernet Sauvignon. En la campaña 2007 la uva de estas variedades presentó menor contenido de azúcares y un índice de madurez celular (IMC) mucho mayor que en la campaña 2009. Por lo que, aunque el contenido de antocianos y de taninos procedentes de los hollejos en las dos variedades fue mayor en el 2007, el elevado IMC pone de manifiesto una mayor dificultad para la extracción de estos compuestos fenólicos. En la campaña 2009 las uvas de Syrah y Cabernet Sauvignon alcanzaron mayor madurez tecnológica y mayor madurez fenólica, sin embargo esta madurez no coincidió con un mayor contenido de antocianos ni de taninos en los hollejos, como tampoco coincidió con una mayor madurez de las semillas ya que se encontró un índice de madurez de las pepitas mayor que en el año 2007.

La uva de Monastrell en el 2009 también presentó mayor contenido de azúcares, menor IMC y menor concentración de antocianos que en la campaña 2007, aunque las diferencias entre las dos campañas no fueron tan acusadas como en Syrah y Cabernet Sauvignon. Sin embargo en la uva de Monastrell de la campaña 2009, a diferencia de lo observado en las otras dos variedades, se encontró menor IMP y mayor concentración de taninos en los hollejos, por lo que podría afirmarse que en el 2009 la uva de Monastrell experimentó una maduración tecnológica y fenólica más apropiada que las uvas de las variedades Syrah y Cabernet Sauvignon.

4.2.2 CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS Y FENÓLICAS DE LOS VINOS

4.2.2.1 Cabernet Sauvignon

Los resultados obtenidos al analizar los parámetros cromáticos de los vinos de Cabernet Sauvignon al finalizar la fermentación alcohólica se muestran en la **Tabla 4.6**. Los valores encontrados en la intensidad de color (IC) de los vinos de la campaña 2009 son similares a los señalados por Romero-Cascales et al. (2005) para vinos de Cabernet Sauvignon, analizados al final de la fermentación alcohólica y elaborados a partir de uvas procedentes de la misma zona vitícola que la de nuestro estudio. Fanzone et al. (2012) también encontraron valores similares a los nuestros en vinos de Cabernet Sauvignon elaborados con uvas cultivadas en climas cálidos. Sin embargo, en la campaña 2007 la IC de los vinos de Cabernet Sauvignon fue mucho mayor que la señalada en estos estudios, siendo además un 50% más alta que la de los vinos del 2009. Esta mayor coloración de los vinos del 2007 está directamente relacionada con la cantidad de antocianos presente en los vinos, que fue mucho mayor en los vinos del 2007 que en los del 2009. Tal y como se ha comentado anteriormente, se encontraron importantes diferencias entre la uva de partida en las dos campañas. La uva de Cabernet Sauvignon del 2007, a pesar de mostrar mayor índice de madurez celular, contenía una cantidad de antocianos casi tres veces mayor que la del 2009, lo que podría explicar las diferencias en la intensidad colorante y en el contenido de antocianos entre los vinos de las dos campañas. Kountoundakis et al. (2011) encontraron diferencias significativas entre los parámetros cromáticos de vinos de Cabernet Sauvignon de distintas añadas, observando que esas diferencias estaban relacionadas con el distinto grado de madurez de las uvas.

Tabla 4.6. Parámetros cromáticos de vinos de Cabernet Sauvignon a final de la fermentación alcohólica, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	IC	T	L*	a*	b*	C*	H*	FCA	FFA	FPP	% Rojo	% Amarillo	% Azul	IPT	AT
2007	T	25,52a	0,47e	3,77c	25,96b	6,50b	26,77c	14,05c	0,35a	0,47b	0,18b	61,14a	28,85e	10,01d	64,48b	878,52a
	CU	30,19c	0,44c	3,16ab	22,39a	5,45a	23,04b	13,67a	0,34a	0,51c	0,14a	62,82c	27,78c	9,40b	67,63d	923,23b
	NC	30,47c	0,43b	3,15ab	22,28a	5,42a	22,93ab	13,68a	0,35a	0,50c	0,15a	63,29d	27,39b	9,31a	66,31cd	961,47c
	MPF	29,27b	0,42a	3,37b	23,48ab	5,81ab	24,20b	13,86b	0,41b	0,39a	0,20d	63,68e	27,02a	9,30a	66,01c	1043,01e
	EC	30,58c	0,45d	2,91a	20,74a	5,03a	21,34a	13,61a	0,36a	0,46b	0,18b	62,34b	28,04d	9,62c	70,32e	1002,08d
	G	26,29a	0,45d	3,86c	26,42b	6,65b	27,25c	14,12c	0,36a	0,46b	0,18b	62,10b	28,20d	9,69c	63,14a	897,75ab
2009	T	14,30ab	0,48b	11,54ab	42,70ab	19,86ab	47,10ab	24,93ab	0,47ab	0,35ab	0,18b	61,17a	29,55b	9,28b	45,77a	587,93a
	NC	14,96b	0,47b	11,13a	42,26a	19,16a	46,41a	24,36a	0,50c	0,33a	0,18b	61,65a	29,19b	9,16ab	48,65b	593,06a
	MPF	16,46c	0,43a	10,47a	41,50a	18,04a	45,26a	23,46a	0,53d	0,33a	0,14a	63,80b	27,46a	8,74a	50,27b	679,94b
	EC	13,86a	0,47b	12,78b	44,55b	21,97b	49,68b	26,24b	0,44a	0,38c	0,18b	61,74a	29,16b	9,10ab	48,20ab	582,50a

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L).

En la **campana 2007** todos los vinos obtenidos mediante técnicas de frío y el vino obtenido por adición de un preparado enzimático comercial presentaron mejores características cromáticas que el vino testigo. En estos tratamientos se encontró mayor intensidad de color, mayor porcentaje de rojo, mayor índice de polifenoles totales y mayor contenido de antocianos que en el vino testigo. En todos estos parámetros, al comparar el vino testigo y el tratamiento de adición de enzima galactosidasa solo se encontraron diferencias en el índice de polifenoles totales, cuyo valor fue significativamente menor en el tratamiento.

Los valores encontrados en el tono fueron mayores en el vino testigo, que también presentó un mayor porcentaje de componente amarilla que los tratamientos de frío y enzimáticos. Entre los tratamientos, las técnicas de frío dieron lugar a vinos con menor tono, mayor porcentaje de componente roja y menor porcentaje de componente amarilla que las técnicas enzimáticas.

En el estudio de los parámetros de color CIELab, el vino testigo y el tratamiento con galactosidasa mostraron un comportamiento similar entre ellos, y diferente respecto al resto de tratamientos. La elaboración tradicional y el tratamiento con galactosidasa dieron lugar a vinos con mayor luminosidad (L^*), es decir, más transparentes, lo que coincide con el menor valor de IC encontrado en estos dos vinos. En ellos se observó una mayor saturación ($*C$) y mayor tonalidad o *hue* (H^*) debida a pigmentos amarillos. También se observó mayor valor de a^* y mayor valor de b^* , lo que indica un desplazamiento de los tonos púrpuras y violetas hacia tonos más rojos y amarillos (Casassa y Sari, 2007; Martínez et al., 2001)

Se estudió la contribución de los fenómenos de copigmentación en el color total del vino. En el tratamiento de maceración prefermentativa en frío (MPF), la fracción de color debida a antocianos copigmentados (41%) fue superior a las fracciones de color debidas a antocianos libres (39%) y a pigmentos poliméricos resistentes a la decoloración con SO_2 (20%), mientras que en el resto de los vinos los antocianos libres contribuían más al color que los antocianos copigmentados. La maceración prefermentativa en frío fue además la técnica con la que los vinos presentaban mayor concentración de antocianos

y un mayor porcentaje de color rojo. Este mayor porcentaje de rojo podría explicarse por una mayor contribución del fenómeno de copigmentación, que produjo una mayor estabilización de las formas coloreadas, desplazando las reacciones de equilibrio de los antocianos hacia el ión flavilio, de color rojo. Okubo et al. (2003) también observaron mayores valores de A_{520} (componente roja) en vinos jóvenes de Cabernet Sauvignon cuando estos habían sido sometidos a un tratamiento de maceración prefermentativa en frío. Gordillo et al. (2010) compararon el efecto de la maceración prefermentativa en frío frente a una elaboración tradicional en vinos de Tempranillo, observando un mayor grado de copigmentación en los vinos obtenidos mediante maceración prefermentativa en frío.

En la **campana 2009** los vinos obtenidos por maceración prefermentativa en frío presentaron mayor intensidad de color, con un mayor porcentaje de componente roja, y mayor concentración de antocianos que el vino testigo y que el resto de los tratamientos. También fue el tratamiento donde se encontró una mayor fracción de color debida a la presencia de antocianos copigmentados. En general todos los vinos presentaron mayor porcentaje de antocianos copigmentados que en el 2007. Este resultado podría deberse a una mayor presencia de cofactores en los vinos del 2009. Y aunque no se observó una mayor concentración de flavonoles (**Tabla 4.11**), sí que se encontró una mayor proporción de taninos al final de la fermentación alcohólica en los vinos de Cabernet Sauvignon del 2009 (**Tabla 4.12**). Rustione et al. (2012), en concordancia con lo propuesto por Boulton (2001), encontraron que la adición de taninos procedentes de extractos de semillas a uvas de Syrah, Sangiovese y Pinot Noir producía un aumento en el porcentaje de antocianos copigmentados, pero provocaba una inesperada pérdida de color. Atribuyeron esta pérdida de color a un efecto hipocrómico provocado por la copigmentación entre antocianos y taninos procedentes de las semillas, reduciendo así el efecto hipercrómico producido por otro tipo de cofactores.

En el vino obtenido por adición de nieve carbónica (NC), la fracción de antocianos copigmentados y el índice de polifenoles totales también fueron

mayores que en el testigo. Aunque en el resto de parámetros no se encontraron diferencias significativas.

El vino testigo y el vino obtenido mediante adición de un preparado enzimático comercial no mostraron diferencias en sus características cromáticas. Únicamente cabe señalar que en el vino obtenido por adición del preparado enzimático, se encontró una mayor fracción de color debida a antocianos libres y, por lo tanto, más susceptibles de sufrir oxidaciones hacia formas incoloras (Zamora, 2003).

En el momento del embotellado, tras la estabilización por frío de los vinos, se volvieron a analizar los parámetros cromáticos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4.7**. Se observó una disminución en la intensidad de color de todos los vinos, en la concentración de antocianos y en la fracción de color debida a antocianos copigmentados, produciéndose un aumento del porcentaje de color debido a pigmentos poliméricos. La formación de un máximo de color en los vinos a mitad de la fermentación y la posterior pérdida de este color una vez finalizada la fermentación es un hecho bien conocido y que ha sido ampliamente reportado (Ribéreau-Gayon, 1974; Nagel y Wulf, 1979; Van-Balen, 1984; Ribéreau-Gayon et al., 1998). Esta pérdida de color se atribuye generalmente a una disminución en el contenido de antocianos, aunque el descenso de la intensidad colorante suele producirse en mayor proporción que la de antocianos, por lo que parte de la pérdida del color puede ser también debida a la ruptura de los complejos copigmentados (Boulton, 2001).

En vinos jóvenes, con menos de 6 meses en botella, el color debido a la copigmentación puede suponer hasta un 40% del color total (Boulton, 2001), aunque en los vinos estudiados este porcentaje se encontró entre el 9 y 10%. Darias-Martín et al. (2007) atribuyeron las diferencias halladas en los valores de antocianos copigmentados en vinos jóvenes a los diferentes niveles de cofactores, a las diferencias en la concentración de antocianos y a las diferentes técnicas de vinificación. No obstante, los valores encontrados en nuestros vinos fueron menores que los indicados por estos autores, lo que sugiere que nuestros vinos sufrieron una rápida evolución, con una elevada polimerización

de taninos. Durante el transcurso de la vinificación, antocianos y taninos pueden combinarse mediante reacciones de condensación, los taninos también experimentar reacciones de polimerización y los antocianos pueden sufrir numerosas reacciones, como oxidaciones, hidrataciones o cicloadiciones, aunque estas últimas son características en vinos más evolucionados (Sánchez-Iglesias, 2007). Algunas de estas reacciones ayudan a estabilizar el color del vino o producen virajes de color, pero otras pueden producir decoloraciones. La evolución del color dependerá de la mayor o menor proporción en la que se produzcan todas estas reacciones.

En la **campana 2007** no se observaron tantas diferencias entre los vinos tratados y el vino testigo en el momento del embotellado como se habían encontrado al final de la fermentación alcohólica. En el momento del embotellado todos los tratamientos tenían un mayor porcentaje de color rojo que el vino testigo, sin embargo la intensidad de color solo fue significativamente mayor en el vino obtenido por adición de nieve carbónica. En el tratamiento con el preparado enzimático comercial se encontraron las mayores concentraciones de antocianos, con diferencias significativas respecto al testigo.

En la **campana 2009** los vinos embotellados tenían menor intensidad de color y menor contenido de compuestos fenólicos que en el 2007. No se observaron diferencias significativas en la intensidad de color entre el testigo y las técnicas de frío. El tratamiento enzimático produjo un vino menos coloreado que la elaboración tradicional. Además, el vino testigo presentó mayor fracción de color debida a antocianos copigmentados y mayor porcentaje de color rojo que los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos entre los vinos.

Tabla 4.7. Parámetros cromáticos de vinos de Cabernet Sauvignon en el momento del embotellado, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	IC	T	L*	a*	b*	C*	H*	FCA	FFA	FPP	% Rojo	% Amarillo	% Azul	IPT	AT
2007	T	19,38a	0,56d	5,62a	33,49a	9,68a	34,87a	16,12a	0,10a	0,47c	0,44a	57,04a	31,71c	11,25b	53,68ab	477,82b
	CU	19,14a	0,52b	5,84a	34,22a	10,08a	35,67a	16,39a	0,10a	0,39a	0,51a	58,12b	30,18a	11,70b	50,36a	400,00a
	NC	21,96b	0,50a	5,49a	33,18a	9,47a	34,50a	15,91a	0,16a	0,44abc	0,40a	59,68c	29,98a	10,34a	53,62ab	518,56b
	MPF	19,79a	0,53bc	5,99a	34,43a	10,33a	35,95a	16,66a	0,19a	0,41ab	0,41a	58,22b	31,09b	10,69a	54,81bc	557,06bc
	EC	20,10a	0,54c	6,13a	34,89ab	10,58a	36,47ab	16,85a	0,12a	0,44abc	0,44a	58,23b	31,30bc	10,47a	57,96c	601,28c
	G	18,52a	0,54c	6,94b	36,68b	11,97b	38,58b	18,06b	0,15a	0,41ab	0,44a	58,07b	31,41bc	10,52a	53,03ab	540,81bc
2009	T	12,29ab	0,59a	8,01b	37,98b	13,75b	40,40b	19,84a	0,11b	0,34a	0,55a	54,01b	32,12a	13,86a	38,31a	235,15a
	NC	14,50b	0,62b	2,95a	19,75a	5,08a	20,39a	14,33a	0,10ab	0,34a	0,57a	51,97a	32,28a	15,74a	40,75a	238,38a
	MPF	12,81ab	0,60ab	6,11ab	33,82ab	10,49ab	35,43ab	17,07a	0,09a	0,33a	0,58a	53,08ab	31,85a	15,07a	38,62a	214,15a
	EC	12,08a	0,60ab	6,78ab	31,49ab	11,50ab	33,59ab	18,71a	0,10ab	0,32a	0,59a	52,82ab	31,80a	15,39a	38,62a	204,32a

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L).

Con la evolución del vino, tras 6 meses de embotellado, los vinos presentaron características cromáticas similares a las del momento del embotellado (**Tabla 4.8**). No se observó un descenso acusado en la intensidad de color (valores comprendidos entre 16-20 en el 2007, y entre 8-12 en el 2009), aunque si se encontró una esperado descenso en la concentración de antocianos, coincidiendo con lo señalado por Zafrilla et al., (2003) y Pérez-Magariño y González-San José (2004). Gutiérrez et al. (2005) también observaron una disminución en la concentración de antocianos monoméricos en vinos de Cabernet Sauvignon tras 9 meses de embotellado. Esta pérdida se debe principalmente a los procesos de polimerización y condensación, principalmente entre antocianos y taninos (Bourin et al., 2011), y también a la formación de `piranoantocianos durante el proceso de elaboración y envejecimiento (Vivar-Quintana et al., 2002; Mateus et al., 2005). Es bien conocido que conforme evoluciona el vino, la concentración de antocianos disminuye sin que ello suponga una pérdida de color en la misma proporción, debido a que las numerosas reacciones en las que se ven involucrados los antocianos pueden ayudar a estabilizar el color del vino (Boulton, 2001; Cheynier et al., 2006; Fulcrand et al., 2006; Cavalcanti et al., 2011).

En el **2007**, el vino obtenido por adición de nieve carbónica siguió siendo el más coloreado, con tonalidades más rojas que los otros vinos. Con la maceración prefermentativa en frío y con el preparado enzimático también se observaron intensidades de color mayores que con la elaboración tradicional. Respecto al contenido polifenólico, excepto la técnica de congelación de la uva, en todos los tratamientos se observó una concentración de antocianos mayor que en el vino testigo, que presentó además un índice de polifenoles totales significativamente menor que con la maceración prefermentativa en frío y que las dos técnicas enzimáticas. Entre los tratamientos, al igual que ocurría en el momento del embotellado, fue el tratamiento con el preparado enzimático comercial el que presentó las mayores concentraciones de antocianos, siendo también mayor su fracción de antocianos copigmentados.

En el **2009**, en el análisis realizado después de 6 meses de embotellado, un vez más se observó que los vinos eran menos coloreados que en el 2007 y que

su contenido en antocianos también era menor que en la campaña anterior, con muy poca contribución de los antocianos copigmentados al color total del vino. Con el envejecimiento del vino es normal observar una disminución en el fenómeno de copigmentación, debido a la acción del etanol sobre los complejos copigmentados (Boulton, 2001). Con el tratamiento de maceración prefermentativa en frío se observó una menor concentración de antocianos que el vino testigo. Ninguno de los vinos obtenidos con los tratamientos mostró mejores características cromáticas que el vino obtenido mediante una elaboración tradicional.

Se podría concluir que en los vinos de Cabernet Sauvignon en la **campaña 2007**, todos los tratamientos mostraron mejores características cromáticas que el vino testigo al final de la fermentación alcohólica. En el momento del embotellado y con la evolución del vino en botella el vino obtenido por adición de nieve carbónica fue el vino más coloreado y, respecto a la concentración de compuestos fenólicos, el tratamiento de adición del preparado enzimático comercial fue el que presentó una mayor concentración de antocianos.

En **la campaña 2009** los vinos contenían niveles más bajos de compuestos fenólicos y fueron vinos menos coloreados que en la campaña 2007. Al final de la fermentación alcohólica la maceración prefermentativa en frío presentó mejores características cromáticas que el testigo y que el resto de tratamientos, aunque con la técnica de la nieve carbónica también se observó un mayor contenido de compuestos fenólicos que con la elaboración tradicional. En el momento del embotellado sólo la nieve carbónica dio lugar a un vino con mayor intensidad de color que el testigo, pero no mejoró el resto de parámetros estudiados. Al evolucionar el vino, ninguno de los tratamientos mantuvo mejores características cromáticas que el vino testigo.

Tabla 4.8. Parámetros cromáticos de vinos de Cabernet Sauvignon 6 meses después del embotellado, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	IC	T	L*	a*	b*	C*	H*	FCA	FFA	FPP	% Rojo	% Amarillo	% Azul	IPT	AT
2007	T	16,71a	0,57c	4,76a	30,23a	8,20a	31,32a	15,13a	0,05a	0,20a	0,75c	55,15a	31,21abc	13,64d	44,54a	269,82a
	CU	17,86ab	0,54ab	5,51a	32,96a	9,49a	34,31a	16,04a	0,09ab	0,24ab	0,67bc	57,20bc	30,67ab	12,12c	46,83ab	340,37ab
	NC	20,69c	0,52a	4,88a	30,96a	8,41a	32,09a	15,19a	0,10ab	0,25ab	0,65b	58,38d	30,36a	11,26abc	48,89ab	389,12b
	MPF	19,70bc	0,55bc	5,03a	31,15a	8,67a	32,34a	15,46a	0,13b	0,26b	0,60ab	57,05b	31,36abc	11,60bc	50,90b	417,14bc
	EC	19,58bc	0,55bc	5,87a	33,84a	10,13a	35,33a	16,58a	0,20c	0,24ab	0,56a	57,63c	31,74c	10,63a	55,97c	486,02c
2009	G	18,24ab	0,55bc	6,25a	34,76a	10,77a	36,40a	17,12a	0,13b	0,29b	0,59ab	57,34bc	31,57bc	11,09ab	50,56b	422,50bc
	T	11,80a	0,63a	6,10a	32,58a	10,39a	34,22a	17,27a	0,06a	0,21a	0,73a	51,63c	32,66a	15,70a	37,20a	178,33b
	NC	11,40a	0,65a	4,18a	26,45a	7,06a	27,37a	14,90a	0,03a	0,19a	0,78ab	50,18b	32,75a	17,07b	37,39a	159,00ab
	MPF	8,65a	0,69b	7,57a	34,71a	11,94a	36,71a	18,98a	0,02a	0,17a	0,81b	48,67a	33,78a	17,56b	30,88a	111,33a
	EC	10,04a	0,67ab	7,02a	30,81a	10,65a	32,72a	17,93a	0,03a	0,19a	0,78ab	49,58ab	33,16a	17,26b	35,06	140,67ab

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L).

La composición fenólica, especialmente la composición de antocianos y taninos, juega un papel muy importante en la calidad de los vinos, por lo que, además de analizar los parámetros cromáticos, se realizó un estudio de los compuestos fenólicos individuales presentes en los vinos al final de la fermentación alcohólica.

La **Tabla 4.9** muestra la concentración de antocianos analizados por cromatografía líquida en los vinos de Cabernet Sauvignon en la campaña 2007. Tal y como se espera en vinos jóvenes, el mayor porcentaje correspondió a los antocianos monoglucósidos y malvidina-3-O-glucósido fue el antociano monoglucósido más abundante, como es usual en vinos tintos (Gómez-Galleto et al., 2012a; Hermosín-Gutiérrez y García-Romero, 2004; Gómez y Heredia, 2004) siendo su concentración significativamente superior en el tratamiento de maceración prefermentativa en frío, seguido del enzima comercial y de la nieve carbónica. Cianidina-3-glucósido fue el antociano monoglucósido presente en menor proporción en todos los vinos. Algunos autores han señalado que este antociano es el que se encuentra en menor concentración en la mayoría de las variedades de *Vitis Vinífera* (Darné y Glories, 1988; Mazza et al., 1999; González-Neves et al., 2001). La concentración de derivados acetatos fue mucho mayor que la de derivados cumaratos en todos los vinos, tal y como cabía esperar en vinos de Cabernet Sauvignon (Moreno-Pérez et al., 2010). Entre los antocianos acilados el más abundante fue la malvidina acetato (malvidina-3-(6"-acetil)-glucósido), que se cuantificó conjuntamente con la delphinidina cumarato y cuyos valores fueron significativamente mayores en los tratamientos de frío y en el tratamiento con el enzima comercial que en el vino testigo.

Los vinos de maceración prefermentativa en frío y de adición del enzima comercial también mostraron mayor contenido de vitisina A y vitisina B, respectivamente, que el vino testigo. Aunque la formación de los piranoantocianos, compuestos responsables de la estabilización del color anaranjado en vinos evolucionados, se produce mayoritariamente durante el envejecimiento del vino, algunos estudios indican que comienzan a aparecer en las primeras etapas de la fermentación alcohólica, ya que se forman a partir de

metabolitos de las levaduras, como el ácido pirúvico y al acetaldehído (Gómez-Gallego, 2012b; De Freitas y Mateus, 2011). Algunos autores han afirmado que la concentración de piranoantocianos en el vino parece depender de la variedad y de la añada (Fanzone et al., 2012) así como de las prácticas viticulturales y enológicas (Monagas y Bartolomé, 2012). En un estudio llevado a cabo en vinos de Grenache, Rentzch et al. (2007), observaron que la formación de vitisina A y vitisina B tenía lugar exclusivamente durante la fermentación alcohólica y dependía de las técnicas enológicas empleadas.

Coincidiendo con los resultados obtenidos espectrofotométricamente al final de la fermentación alcohólica, en los vinos de Cabernet Sauvignon del 2007 el mayor contenido de antocianos totales, tanto acilados como no acilados, correspondió al vino obtenido por maceración prefermentativa en frío, seguido por los tratamientos con nieve carbónica y con el preparado enzimático comercial. Heredia et al., (2009) compararon el efecto de dos técnicas de frío, maceración prefermentativa en frío y adición de nieve carbónica, sobre el contenido total de antocianos en vinos de Syrah y, coincidiendo con los resultados de nuestro estudio, también observaron que la maceración prefermentativa en frío aumentaba, en mayor proporción que la adición de nieve carbónica, la presencia de antocianos en los vinos. Respecto al contenido de derivados acetatos, tanto con la maceración prefermentativa en frío, con la adición de nieve carbónica y con el preparado enzimático comercial se obtuvo un mayor contenido de acetatos, por lo que en estos vinos los antocianos se encontraban más estabilizados ya que los antocianos acilados tienen más estabilizadas las formas coloreadas, porque el ácido es capaz de proteger, mediante impedimento estérico, a la molécula de antociano frente a reacciones de hidratación.

Una vez más se observaron diferencias entre los vinos de las dos campañas estudiadas. En la campaña 2009 (**Tabla 4.10**), la concentración de antocianos en los vinos fue menor que en el 2007. Con la adición del preparado enzimático se obtuvo una concentración de antocianos totales, acilados, no acilados y vitisinas superior al testigo. La maceración prefermentativa en frío también dio lugar a un vino con un mayor contenido de antocianos acilados que la

elaboración tradicional, aunque no se observaron diferencias en el contenido total de antocianos. No se hallaron diferencias en el perfil antociánico entre el vino testigo y el tratamiento por adición de nieve carbónica. Llaudy et al., (2005) también observaron que la aplicación de nieve carbónica en la vinificación de uvas Cabernet Sauvignon en dos vendimias diferentes solo producía un aumento de la concentración de antocianos en el vino en la primera vendimia, cuando la uva se encontraba menos madura.

En términos generales, se puede concluir que en el estudio realizado sobre el contenido de antocianos en los vinos de Cabernet Sauvignon se observó una tendencia similar a la de los parámetros cromáticos generales. Las técnicas empleadas tuvieron más repercusión en la campaña del 2007, cuando la uva de Cabernet Sauvignon se encontraba menos madura. En la **campaña 2007** la concentración de antocianos aumentó significativamente con la maceración prefermentativa en frío y con la aplicación de nieve carbónica y del preparado enzimático comercial. Las técnicas de congelación de la uva y de adición de enzima β -galactosidasa no dieron lugar a una concentración de antocianos significativamente mayor que la del vino testigo. En la **campaña 2009** sólo con la aplicación del preparado enzimático comercial se observó un aumento en la concentración total de antocianos, aunque con la maceración prefermentativa en frío también aumentó la presencia de antocianos acilados.

Tabla 4.9. Antocianos (mg/L) por HPLC en vinos de Cabernet Sauvignon a final de la fermentación alcohólica, campaña 2007.

Antociano	T	CU	NC	MPF	EC	G
Delfinida-3-glucósido	29,96a	40,06b	40,81b	52,68c	49,43c	39,49b
Cianidina-3-glucósido	6,15a	4,95a	6,64ab	9,99b	6,88bc	5,53a
Petunidina-3-glucósido	32,34a	39,47ab	42,83b	56,02c	47,30b	39,65ab
Peonidina-3-glucósido	16,24a	18,70a	19,69a	30,06b	23,11ab	17,31a
Malvidina-3-glucósido	393,49bc	367,91a	411,01cd	459,79e	413,52d	384,97ab
Vitisina A	16,54a	17,74a	18,08a	27,83b	17,55a	17,88a
Delfinidina Acetato	15,15a	18,55ab	22,25abc	28,86c	25,10bc	20,16abc
Vitisina B	11,71a	13,98ab	11,88a	11,23a	16,89c	12,20a
Acetil vitisina A	8,87a	10,20a	10,28a	11,43a	8,54a	10,97a
Cianinida acetato	6,23a	6,64a	7,49a	8,35a	11,53a	7,72a
Petunidina acetato	10,64ab	12,48ab	13,59ab	21,70c	14,71b	9,88a
Peonidina acetato	7,68a	11,34ab	11,85ab	15,56b	9,08a	10,30a
Malv.acet+Delf.cumarato	146,77a	159,37b	183,14c	177,33c	161,14b	154,77ab
Peonidina cafeato	3,98a	5,74a	5,15a	5,04a	5,02a	4,75a
Cianidina caf+cum	5,51a	7,20a	7,85a	9,28a	7,63a	7,63a
Petunidina cumarato	5,37a	6,15a	6,85ab	10,47b	6,71ab	8,24ab
Malvidina cumarato cis	4,32a	4,06a	5,73a	9,45a	4,81a	5,22b
Peonidina cumarato	3,66a	5,13a	6,07a	7,09a	4,10a	4,32a
Malv. Cumarato trans	31,79a	35,15bc	38,34c	43,81d	33,74ab	35,24bc
Totales	756,36a	784,82ab	869,51b	995,97c	866,77b	796,21ab
No acilados	478,17a	471,09a	520,98bc	608,54d	540,24c	486,94ab
Acilados	241,10a	271,81abc	308,30cd	336,94d	283,56bc	268,21ab
Acetatos	186,47a	208,38ab	238,32cd	251,80d	221,55bc	202,82ab
Cumaratos	50,65a	57,69a	64,82a	53,40a	56,99a	60,64a
Vitisinas	37,11a	41,92a	40,24a	50,49a	42,97a	41,06a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n = 3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; acet: acetato; caf: cafeato; cum: cumarato.

Tabla 4.10. Antocianos (mg/L) por HPLC en vinos de Cabernet Sauvignon a final de la fermentación alcohólica, campaña 2009.

Antociano	T	NC	MPF	EC
Delfinida-3-glucósido	21,040a	20,863a	21,389a	24,021b
Cianidina-3-glucósido	2,034b	1,445a	1,672a	1,424a
Petunidina-3-glucósido	25,309a	24,660a	25,124a	29,676b
Peonidina-3-glucósido	9,675a	8,810a	9,088a	9,687a
Malvidina-3-glucósido	278,402a	269,944a	273,312a	325,469b
Vitisina A	5,544ab	5,237a	5,571ab	5,782b
Delfinidina Acetato	8,029a	7,809a	7,817a	9,306b
Vitisina B	4,471a	4,250a	4,609a	4,748a
Acetil vitisina A	2,770a	2,791a	2,929a	3,223a
Cianinida acetato	0,655a	1,099a	1,064a	0,792a
Petunidina acetato	11,676a	11,957a	12,199a	13,927b
Peonidina acetato	7,519a	7,757a	9,363b	10,792c
Malv.acet+Delf.cumarato	143,708ab	140,496a	151,899b	175,762c
Peonidina cafeato	0,707a	0,819a	0,844a	1,013a
Cianidina caf+cum	3,944a	4,218a	3,838a	4,721b
Petunidina cumarato	2,289a	2,352a	2,185a	3,191b
Malvidina cumarato cis	2,324a	2,295a	2,345a	2,811b
Peonidina cumarato	4,218ab	3,657a	4,140ab	4,685b
Malv. Cumarato trans	31,139a	29,315a	31,595a	40,576b
Totales	565,452a	549,775a	570,984a	671,607b
No acilados	336,460a	325,723a	330,586a	390,277b
Acilados	216,208ab	211,774a	227,290b	267,578c
Acetatos	171,587a	169,118a	182,343b	210,580c
Cumaratos	43,914a	41,837a	44,103a	55,984b
Vitisinas	12,784ab	12,278a	13,108ab	13,752b

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; acet: acetato; caf: cafeato; cum: cumarato;

Por cromatografía líquida también se determinó el contenido de flavonoles en los vinos al final de la fermentación alcohólica (**Tabla 4.11**). Los valores encontrados en la composición de flavonoles se encuentran dentro de los rangos señalados por Makris et al. (2006) y son similares a los hallados por Fanzone et al. (2012) en vinos de Cabernet Sauvignon.

Coincidiendo con lo publicado por numerosos autores (Martínez-Pinilla et al., 2012; Castillo-Muñoz et al., 2009; Gómez-Alonso et al., 2007; Hermosín-Gutierrez et al., 2005) miricetina-3-glucósido fue el flavonol presente en mayor proporción en todos los vinos, seguida de quercetina-3-glucorónido y quercetina-3-glucósido.

En la **campaña 2007** el contenido total de flavonoles en los vinos obtenidos con las tres técnicas de frío (63,26 mg/L, 62,13 mg/L y 61,78 mg/L con la congelación de la uva, adición de nieve carbónica y maceración prefermentativa en frío respectivamente) y con la adición del preparado enzimático comercial (60,33 mg/l) fue significativamente mayor que el del vino testigo (50,69 mg/L). Teniendo en cuenta que la cantidad de flavonoles en la uva de Cabernet Sauvignon del 2007 (14,11 mg/Kg uva) fue mucho menor que la encontrada en la uva del 2009 (26,62 mg/Kg uva), adquiere especial importancia que no hubiese muchas diferencias entre los dos años en el contenido total de flavonoles en los vinos obtenidos con estas técnicas, y que, sin embargo, en el vino testigo del 2007 si se encontrase una concentración menor de flavonoles que en el del 2009. Este hecho pone de manifiesto que las técnicas de frío y la adición del enzima comercial ayudaron más en el 2007 a degradar las paredes celulares de los hollejos, favoreciendo la difusión de los flavonoles. En el 2007 la maceración prefermentativa en frío dio lugar a un vino con mayor contenido de miricetina-3-glucósido que el resto de tratamientos y con un mayor contenido de quercetina glucurónido que el vino testigo. La concentración de quercetina-3-glucósido en los vinos obtenidos por congelación de la uva y por adición de nieve carbónica también fue significativamente mayor que en el vino testigo.

Tabla 4.11 Flavonoles (mg/L) por HPLC en vinos de Cabernet Sauvignon a final de fermentación alcohólica, campañas 2007 y 2009

Año	Tratamiento	Miricetina galactósido	Miricetina glucósido	Quercetina galactósido	Quercetina glucurónido	Quercetina glucósido	Kampferol galactósido	Kampferol glucósido	Isorhamnetina glucósido	Siringetina glucósido	Totales
2007	T	5,33ab	18,34a	3,40a	10,24ab	7,15a	0,70a	0,72a	3,42a	1,40ab	50,69a
	CU	8,76c	17,83a	4,70a	9,75a	10,97c	1,58a	1,40ab	3,59a	1,54b	63,23b
	NC	8,48bc	19,18a	3,62a	12,27b	10,60bc	1,40a	1,24ab	3,87a	1,47b	62,13b
	MPF	5,03a	22,87b	5,24a	12,53b	7,34ab	1,43a	3,23b	2,91a	1,19ab	61,78b
	EC	5,65abc	19,28a	3,74a	11,02ab	9,14abc	7,78a	2,15ab	2,70a	1,46b	60,33b
	G	3,78a	18,75a	4,29a	11,85ab	8,25abc	1,28b	3,03b	2,84b	0,97a	54,07ab
2009	T	3,13a	18,11a	3,58ab	17,80a	9,84a	0,41a	2,45a	5,12a	1,38a	61,83a
	NC	3,20a	18,96ab	3,80ab	18,88a	11,66ab	0,39a	3,68a	5,61ab	1,35a	67,52ab
	MPF	3,54a	20,80b	4,12b	18,95a	13,11b	0,56b	3,69a	6,31b	1,89b	72,96b
	EC	3,00a	18,10a	3,43a	17,12a	10,97a	0,31a	2,90a	5,09a	1,45a	62,38a

Letras diferentes en la misma columna, para cada año, muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa.

En la **campaña 2009** la maceración prefermentativa en frío fue la única técnica que influyó positivamente sobre el contenido de flavonoles en los vinos, dando lugar a un vino con un contenido total de flavonoles (72,96 mg/L) significativamente mayor que el del vino testigo (61,83 mg/L). A excepción de la concentración de miricetina-3-galactosido, quercetina-3-glucoronido y kampfrol-3-glucósido, el resto de flavonoles estudiados se encontraron en una concentración significativamente mayor en este tratamiento. Los flavonoles son unos de los principales compuestos que actúan como cofactores en la copigmentación de los antocianos (Martínez-Pinilla et al., 2012), esto explicaría el hecho de que al final de la fermentación alcohólica fuesen los vinos obtenidos por maceración prefermentativa en frío los que presentasen mayor fracción de color debida a la presencia de antocianos copigmentados.

En este año, 2009, el tratamiento con nieve carbónica no aumentó significativamente el contenido de flavonoles respecto al vino control. Heredia et al. (2009), en un estudio realizado en la vinificación de uvas de la variedad Syrah, hallaron que el contenido de compuestos fenólicos en el vino dependía de la técnica de refrigeración empleada, encontrando un aumento significativo de los mismos cuando se había utilizado una maceración prefermentativa en frío pero no cuando se había empleado la adición de nieve carbónica. Atribuyeron estas diferencias al hecho de que, probablemente, la nieve carbónica no había alcanzado de forma homogénea a la totalidad de la pasta. En nuestro caso, teniendo en cuenta que en la campaña anterior la nieve carbónica si produjo un aumento significativo en la concentración de flavonoles, el resultado del 2009 parece tener relación con el estado de madurez de la uva de partida. La nieve carbónica contribuyó a una mejor difusión de los compuestos fenólicos cuando la uva se encontraba más verde (campaña 2007), con unas paredes celulares más rígidas y, por lo tanto, más susceptibles a la ruptura provocada por el efecto del hielo. Pero no se observaron diferencias respecto a una elaboración tradicional cuando la uva de Cabernet Sauvignon se encontraba más madura (campaña 2009). Estos resultados coinciden con los observados por Llaudy et al. (2005) en vinos de Cabernet Sauvignon, en los que estudiaron la adición de nieve carbónica en tres campañas sucesivas, observando diferencias favorables en el contenido de

compuestos fenólicos en los vinos macerados con nieve carbónica solo en aquellas campañas en las que la uva no estaba suficientemente madura.

El tratamiento de adición de un preparado enzimático comercial tampoco produjo un aumento significativo en el contenido de flavonoles en la campaña 2009. Nuevamente este resultado parece estar relacionado con la madurez de la uva. Pero hay que tener en cuenta que el preparado enzimático comercial sí que produjo un aumento significativo en la concentración de antocianos en el 2009, por lo que la acción de las actividades enzimáticas no se vio tan afectada por el grado de madurez de la uva como la acción de las técnicas de frío. Esto significa que también otros factores deben influir sobre la acción de las actividades enzimáticas. Mulero et al. (2011) y Ducasse et al., (2010) observaron que la acción de preparados con actividades enzimáticas favorecía positivamente la presencia de compuestos fenólicos en los vinos cuando la uva de partida presentaba bajos niveles de estos compuestos, pero no afectaba al contenido total de polifenoles cuando se usaban uvas con un contenido inicial alto de estos compuestos. Estos resultados coinciden con los de nuestro estudio, ya que el preparado enzimático comercial si favoreció la extracción de antocianos en el 2009 cuando la uva presentó una baja concentración de antocianos, a pesar de que la uva se encontraba suficientemente madura. Y, sin embargo, no favoreció la extracción de flavonoles en el 2009 porque además de que la uva estaba más madura, la concentración de flavonoles era elevada (26,62 mg/Kg uva), o al menos más elevada que en el 2007 (14,11 mg/Kg uva).

Además del estudio de la composición de antocianos y flavonoles, se realizó un análisis de la composición de proantocianidinas en los vinos.

Es ampliamente conocido que al comienzo de la maceración, cuando la temperatura es aún moderada y la concentración de etanol es todavía baja, la extracción de las proantocianidinas tiene lugar lentamente. La extracción aumenta conforme avanza la fermentación alcohólica, al aumentar la temperatura y la presencia de alcohol (Canals et al., 2005; Sacchi et al., 2005). No obstante hay que distinguir entre la extracción de las proantocianidinas procedentes de los hollejos y las que provienen de las semillas. Aquellas que provienen de los hollejos comienzan a ser extraídas al mismo tiempo que los antocianos, pero con una cinética más lenta que estos (Kountoundakis, 2010). Las proantocianidinas de las semillas comienzan a difundirse con mayor incidencia más tarde, aproximadamente a mitad de la fermentación, cuando la presencia de alcohol en la pasta de maceración es lo suficientemente elevada para poder disolver el recubrimiento lipídico de la cutícula de las semillas, aunque se ha demostrado que en un medio acuoso ya empiezan a difundirse (Hernández-Jiménez et al, 2011). Con procesos de maceración largos pueden predominar en el vino las proantocianidinas procedentes de las semillas, influyendo en la composición cualitativa del vino, dando lugar a vinos muy tánicos y astringentes (Gil-Muñoz et al., 1999; Llaudy et al., 2008).

En nuestro estudio se evaluó el efecto de las diferentes técnicas de frío y enzimáticas sobre la composición de proantocianidinas en los vinos obtenidos. La **Tabla 4.12** muestra la composición de proantocianidinas en los vinos de Cabernet Sauvignon analizados al final de la fermentación alcohólica.

Aunque la cantidad de proantocianidinas hallada en los vinos fue inferior a la encontrada por Romero-Cascales (2005) en vinos de Cabernet Sauvignon procedentes de la misma zona vitícola, se encuentra dentro de los rangos (289-776 mg/L) señalados por Cosme et al. (2009) en un estudio sobre la concentración de proantocianidinas realizado en vinos de Cabernet Sauvignon durante 3 campañas diferentes.

La concentración total de proantocianidinas fue menor en los vinos del 2007 (entre 289,08 y 455,43 mg/L) que en los vinos del 2009 (entre 514,82 y 676,87 mg/L). Harbetson et al. (2008) encontraron una gran variabilidad en la concentración de proantocianidinas (58-1895 mg/L) al analizar un total de 364 vinos comerciales de Cabernet Sauvignon. Esta gran variabilidad es atribuida al diferente grado de maduración de la uva empleada, a las diferentes prácticas vitícolas y a las distintas técnicas enológicas utilizadas para la vinificación (Kassara y Kennedy, 2010; Harbetson et al., 2012).

Las unidades monoméricas presentes en mayor proporción en todos los vinos fueron (-)-epicatequina de extensión y (-)-epigallocatequina de extensión. Respecto a las unidades terminales, fue (+)-catequina la que se encontró en una mayor concentración. Estos resultados coinciden con los hallados por Busse-Valverde et al. (2010) en vinos de Cabernet Sauvignon.

En la **campaña 2007** los vinos obtenidos con las tres técnicas de frío presentaron una concentración total de proantocianidinas significativamente mayor que el vino testigo y que los vinos obtenidos con los tratamientos enzimáticos. Se observó un incremento del 57,6%, 55,7% y 47,5% con la congelación de la uva, la maceración prefermentativa en frío y la nieve carbónica, respectivamente, al comparar el contenido total de proantocianidinas con el del vino testigo. En otros estudios realizados en vinos de Cabernet Sauvignon, la maceración prefermentativa en frío también produjo un aumento en la concentración de proantocianidinas (Nel, 2010; Lasanta-Melero, 2009). Álvarez et al. (2006) también observaron este efecto tanto con la maceración prefermentativa en frío como con la adición de nieve carbónica en vinos de Monastrell. Respecto a la congelación previa de la uva, no existen muchas referencias sobre su efecto en la extracción de proantocianidinas en vinos tintos, aunque Threlfall et al. (2006) sí que observaron un aumento en el contenido total de polifenoles en mostos de Cabernet Sauvignon cuando las uvas habían sido previamente congeladas.

Tabla 4.12 Composición de proantocianidinas en vinos de Cabernet Sauvignon a final de la fermentación alcohólica, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	PT	GMP	%G	%C _t	%E _t	%EG _t	%C _e	%E _e	%EG _e	%EGC _e
2007	T	289,08a	6,75a	4,96c	12,22c	2,44ab	0,16a	5,19c	46,33ab	4,80b	28,86b
	CU	455,43b	6,85a	3,26a	11,02abc	3,63ab	0,07a	4,42b	46,53ab	3,19a	31,14c
	NC	426,51b	6,28a	4,05b	10,01a	5,74b	0,18a	4,51b	44,42a	3,88a	31,26c
	MPF	450,15b	8,18b	4,09b	10,59ab	1,37a	0,32a	2,37a	48,34b	3,78a	33,24d
	EC	372,61ab	7,37ab	5,24cd	12,40b	1,05a	0,13a	5,54c	48,08b	5,11bc	27,69ab
	G	374,74ab	6,62a	5,87d	11,65bc	3,46ab	0,17a	5,62c	46,72ab	5,70c	26,68a
2009	T	514,82a	5,53b	1,59ab	10,44a	7,85ab	0,20a	4,88a	46,03a	1,39ab	29,21b
	NC	615,87b	4,60ab	2,63b	12,85a	8,73ab	0,18a	4,96a	46,09a	2,45b	24,74ab
	MPF	676,96b	4,10a	1,7ab	13,73a	10,51b	0,33b	11,58a	45,70a	1,37ab	16,78a
	EC	598,32ab	4,89ab	1,24a	12,06a	8,26a	0,14a	4,45a	46,93a	1,10a	27,07ab

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; PT: proantocianidinas totales (mg/L); GMP: grado medio de polimerización; %G: porcentaje de galoilación; %C_t: porcentaje de (+)-catequina terminal; %E_t: porcentaje de (-)-epicatequina terminal; %EG_t: porcentaje de (-)-epicatequina-galato terminal; %C_e: porcentaje de (+)-catequina de extensión; %E_e: porcentaje de (-)-epicatequina de extensión; %EG_e: porcentaje de (-)-epicatequina-galato de extensión; %EGC_e: porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión;

En los vinos obtenidos con las técnicas de frío se observó además una mayor proporción de (-)-epigallocatequina de extensión. La (-)-epigallocatequina detectada en los vinos solo puede proceder de los hollejos (Busse-Valverde, 2010), lo que significa que estos tratamientos aumentaron la extracción de proantocianidinas procedentes de los hollejos. Esto también coincide con el hecho de que los vinos de estos tratamientos fueron los que presentaron una menor proporción de unidades galoiladas, lo que significa una menor contribución de taninos de las semillas (Prieur et al., 1994). En el vino obtenido por maceración prefermentativa en frío se observó además un mayor grado medio de polimerización de las proantocianidinas, lo que corrobora una mayor presencia de taninos de los hollejos (Labarbe et al., 1999). En un estudio realizado por Koyama et al., (2007) también se halló un aumento del grado medio de polimerización de las proantocianidinas en vinos de Cabernet Sauvignon obtenidos mediante maceración prefermentativa en frío y Cheynier et al. (2006) indicaron que las maceraciones a bajas temperaturas favorecían la extracción de taninos de los hollejos.

En los vinos obtenidos mediante la adición de enzimas también se observó una mayor concentración de proantocianidinas que en el vino testigo, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Resultados contrarios a los nuestros fueron hallados por Nel (2010), que observó un aumento significativo en la cantidad de proantocianidinas en vinos de Cabernet Sauvignon a los que se había adicionado un preparado enzimático. Aunque los trabajos realizados por Ducasse et al. (2010) en vinos de Merlot tratados con enzimas, mostraron que no siempre se producía un aumento en el grado de polimerización y en la proporción de (-)-epigallocatequina en los vinos tratados, sino que los resultados parecían depender en gran medida de las características de cada vendimia. Bautista-Ortín (2005) también encontró resultados contradictorios sobre el efecto de los enzimas en el contenido de taninos en vinos de Monastrell.

En la **campaña 2009** tampoco se observó un aumento significativo en la concentración de proantocianidinas en el vino obtenido por adición de un preparado enzimático. Los tratamientos con nieve carbónica y con maceración

prefermentativa en frío sí que dieron lugar a vinos con un contenido total de proantocianidinas significativamente mayor que el vino testigo. Aunque con estos tratamientos no se observó un aumento significativo de la proporción de taninos procedentes de los hollejos. De hecho, con la maceración prefermentativa en frío se observó un porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión y un grado medio de polimerización significativamente menores que en el vino testigo. Esto significa que con este tratamiento se incrementó la presencia de taninos procedentes de las semillas. Teniendo en cuenta que la maceración prefermentativa en frío tuvo lugar en ausencia de alcohol, este resultado requiere especial atención ya que evidencia que la acción del etanol no es la única responsable de la degradación de la cutícula de las semillas y que otros factores, como las bajas temperaturas en una maceración prefermentativa, así como la presencia de un medio acuoso y no etanólico también afectan a la estructura de las semillas facilitando la extracción de los taninos.

Sin embargo en el 2007 no se había observado que la maceración prefermentativa en frío favoreciese la extracción de taninos de las semillas, sino todo lo contrario, incrementó la extracción de proantocianidinas de los hollejos. Tal y como hemos comentado reiteradamente, las características de las uvas de partida son de especial importancia para comprender los distintos efectos producidos por este tratamiento. En la uva de Cabernet Sauvignon de la campaña 2007 se encontró un mayor índice de madurez celular y un menor índice de madurez de las pepitas, es decir, unos hollejos más verdes y unas pepitas más maduras que en la uva del 2009. Los resultados muestran que cuanto más rígidas se encuentran las estructuras celulares, mayor es la ruptura provocada por el frío. Esto explicaría que en el 2007 la maceración prefermentativa en frío facilitase la extracción de proantocianidinas de los hollejos, mientras que en el 2009, cuando las pieles se encontraban más maduras y las semillas más verdes, incrementase la extracción de taninos de las semillas. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de conocer las características de la uva de partida para poder realizar una correcta vinificación.

Los vinos del 2009 presentaron un mayor porcentaje de (-)-epicatequina terminal que los del 2007. Este dato también nos indica que la uva del 2009 presentaba unos hollejos más maduros ya que, según algunos autores (Pérez-Magariño y González-San José, 2004; Bautista-Ortín, 2005), en vinos procedentes de uvas con un menor índice de madurez celular se observa un aumento en los valores de (-)-epicatequina.

Tras analizar los resultados de todos los parámetros estudiados en los vinos de Cabernet Sauvignon durante las dos campañas, se puede concluir que los tratamientos mejoraron las características de los vinos cuando la uva se encontraba menos madura.

En la **campaña 2007** las tres técnicas de frío y el preparado enzimático comercial dieron lugar a vinos con mejores características cromáticas y mayor concentración de antocianos y flavonoles que el vino testigo al final de la fermentación alcohólica. La concentración de taninos procedentes de los hollejos también se vio favorecida con los tratamientos de frío. La suma de las actividades enzimáticas presente en el preparado comercial facilitó una mayor degradación de las paredes celulares que el enzima con una única actividad β -galactosidasa. Al evolucionar el vino, los tratamientos con nieve carbónica, maceración prefermentativa en frío y adición del preparado enzimático siguieron manteniendo mejores características cromáticas que el vino testigo.

En la **campaña 2009** se observó que al final de la fermentación alcohólica únicamente la maceración prefermentativa en frío daba lugar a un vino con mejores parámetros cromáticos y que, junto al preparado enzimático, esta técnica aumentaba la concentración de antocianos. Pero con la evolución del vino no se observaron diferencias entre los vinos tratados y el vino testigo. Las técnicas de frío provocaron un aumento de la presencia de taninos procedentes de las semillas.

4.2.2.2 Syrah

Se estudió el efecto de las técnicas de frío sobre las características cromáticas de los vinos de Syrah y sobre su evolución con el tiempo. También se determinó la composición de antocianos, flavonoles y proantocianidinas al final de la fermentación alcohólica.

La **Tabla 4.13** muestra los resultados obtenidos al analizar los parámetros cromáticos al final de la fermentación alcohólica en las campañas 2007 y 2009. Los vinos de Syrah presentaron en general un color menos intenso y menor contenido de antocianos que los vinos de Cabernet Sauvignon (**Tabla 4.6**). Estas diferencias cromáticas entre los vinos de Syrah y Cabernet Sauvignon podrían explicarse por las diferencias encontradas en la uva. En la campaña 2009 la uva de Syrah contenía menor concentración de antocianos que la uva de Cabernet Sauvignon. En la campaña 2007, aunque no se encontraron diferencias en el contenido de antocianos entre las dos variedades, la uva de Syrah presentó mayor índice de madurez celular (55,01%) que la uva de Cabernet Sauvignon (48,96%), es decir, la uva de Syrah mostró mayor dificultad para la extracción de antocianos durante el período de maceración. Además, la uva de Syrah presentó menor contenido de taninos en los hollejos y peor proporción antocianos/taninos que la uva de Cabernet Sauvignon.

En la **campaña 2007**, comparando el efecto de las diferentes técnicas sobre las características cromáticas de vinos de Syrah se observó que al final de la fermentación alcohólica, excepto con la maceración prefermentativa en frío, con todos los demás tratamientos se obtuvieron vinos con una intensidad de color significativamente mayor que la del vino testigo. Los valores encontrados en la intensidad de color al final de la fermentación alcohólica de los vinos del 2007 son similares a los hallados por Romero-Cascales (2008) para vinos elaborados a partir de uvas de Syrah de la misma zona vitícola. En los vinos obtenidos por congelación de la uva y por adición de nieve carbónica el tono fue significativamente menor que en el vino testigo.

En el estudio de los parámetros de color CIELab en el año 2007 se observó una clara diferencia entre tratamientos enzimáticos por un lado, tratamientos de frío por otro y, finalmente, elaboración tradicional. El vino testigo presentó los valores más altos y los vinos de los tratamientos de frío mostraron valores menores que el testigo pero mayores que los de los tratamientos enzimáticos. Los vinos obtenidos mediante los tratamientos fueron vinos con un color más intenso (menor L^*) que el vino testigo y con tonalidades más desplazadas hacia la zona de los púrpuras y los violetas (menores a^* , b^* y H^*) (Martínez et al., 2001). Gómez-Mínguez et al. (2006) también encontraron que con la maceración prefermentativa en frío disminuían estos parámetros CIELab en vinos de Syrah al compararlos con los de una elaboración tradicional. Lasanta-Melero (2009) obtuvo resultados similares en vinos de Syrah al emplear técnicas de maceración prefermentativa frío, aunque con la adición de enzimas exógenas no observó diferencias en los valores CIELab entre los vinos tratados y los no tratados, si bien es cierto que la adición de enzimas tuvo lugar una vez terminada la etapa de maceración. Palacios et al., (2003) halló un aumento significativo en la intensidad colorante en vinos de Syrah tratados con dos tipos de enzimas, siendo además el enzima más rico en celulasa y hemicelulasa el que producía mejores efectos.

Respecto a la contribución de los fenómenos de copigmentación al color de los vinos en la campaña 2007, el tratamiento de adición de nieve carbónica fue el único con una fracción de color debida a antocianos copigmentados significativamente mayor que el testigo. En este tratamiento también se encontró una menor contribución de los pigmentos poliméricos y un valor mayor de la componente roja. Esta mayor contribución del color rojo al color total del vino tendría su explicación, según Boulton (2001) y Vivar-Quintana et al., (2002), en el hecho de que la copigmentación de antocianos produjo un efecto hipercrómico, con una estabilización de las formas flavilium (rojas). En la técnica de congelación de la uva, cuya fracción de antocianos copigmentados fue mayor, aunque no significativamente, que el vino testigo, también se observó una mayor contribución, si significativa, de la componente roja.

En el 2007, los vinos obtenidos por adición de enzima β -galactosidasa, por congelación de la uva y por adición de nieve carbónica fueron los que presentaron una mayor concentración de antocianos. En los vinos de las técnicas enzimáticas se encontró un índice de polifenoles totales superior al del vino testigo y a de los tratamientos por frío. Hay que destacar que la actividad enzimática β -galactosidasa no tuvo mucha influencia sobre las características cromáticas de los vinos de Cabernet Sauvignon y, sin embargo, en los vinos de Syrah de la campaña 2007 fue la que dio lugar al vino con mayor intensidad de color y con mayor índice de polifenoles totales Palacios et al. (2003) también observaron que el efecto de los enzimas de maceración sobre las características cromáticas era más notable en los vinos de Syrah que en los de Cabernet Sauvignon. Aunque no existen muchos trabajos donde se haya estudiado el empleo de enzimas de vinificación con actividad principal β -galactosidasa, sí que se ha estudiado el papel de esta actividad enzimática en el reblandecimiento de la baya durante la maduración y algunos autores consideran que es la enzima que actúa en las primeras etapas del ablandamiento del fruto siendo su papel en el reblandecimiento más importante que el de la pectinesterasa (PE) o la poligalacturonasa (PG) (Mohd Ali et al., 1995; Lazan et al., 1995). Por otro lado, Romero-Cascales (2008) observó que la acción de diferentes preparados enzimáticos sobre las características cromáticas de vinos de Monastrell dependía del grado de madurez de la uva, así, para uvas poco y muy maduras el efecto de la adición de enzimas era menor que en uvas de madurez intermedia. La uva de Syrah de la campaña 2007 presentó una madurez intermedia entre la uva de Cabernet Sauvignon del año 2007 y la de Syrah de la campaña 2009, en cuyos vinos tampoco se observó la influencia de la adición del preparado enzimático.

Los vinos de Syrah de la **campaña 2009** analizados al final de la fermentación alcohólica presentaron menor intensidad de color que los de la campaña 2007, aunque los valores observados fueron superiores a los encontrados por Fanzone et al. (2012) en vinos de Syrah elaborados a partir de uvas cultivadas en climas cálidos. Al comparar el efecto de los distintos tratamientos, solo se encontraron diferencias significativas en los parámetros de color CIELab, en los que los tratamientos de frío dieron lugar a valores

significativamente mayores que el testigo. Esto significa, tal y como se ha explicado anteriormente, que el testigo presentaba tonalidades más azuladas y violetas, características de un vino tinto joven (Lasanta-Melero, 2009). Además, el vino obtenido por adición de nieve carbónica presentó un contenido de taninos menor que el vino testigo. En el resto de parámetros no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el vino de elaboración tradicional. Las técnicas de frío y enzimáticas no mejoraron las características cromáticas de los vinos de Syrah en esa campaña.

Nuevamente el distinto comportamiento de los vinos entre una campaña y otra pudo tener una explicación en las diferencias encontradas en la uva. En la campaña 2007 la uva de Syrah tuvo un índice de madurez celular muy elevado (55,01%), mientras que en el 2009 el valor fue mucho menor (32,70 %). Las técnicas enológicas empleadas dieron buenos resultados en el 2007, facilitando la ruptura de las células de los hollejos cuando estos presentaban dificultad para la extracción de los compuestos fenólicos. En el 2009 la piel se encontraba más degradada en el momento de la vendimia, debido a los procesos de maduración, así las técnicas empleadas no tuvieron ningún efecto puesto que la piel ya estaba lo suficientemente degradada para permitir una extracción fácil de los compuestos fenólicos. Estos resultados coinciden con los publicados por Deltail (2004), Llaudy et al. (2005) y Álvarez et al. (2006).

Tabla 4.13 Parámetros cromáticos de vinos de Syrah a final de la fermentación alcohólica, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	IC	T	L*	a*	b*	C*	H*	FCA	FFA	FPP	% Rojo	% Amarillo	%Azul	IPT	AT
2007	T	15,51a	0,50c	11,54c	42,91d	19,88c	47,31d	24,76c	0,32ab	0,45a	0,23bcd	60,93a	30,24b	8,83bcd	49,75a	508,08a
	CU	23,85bc	0,38a	7,90b	38,43c	13,62b	40,77c	19,50b	0,34bc	0,47a	0,19ab	66,73b	25,53a	7,74a	56,66ab	768,07bc
	NC	22,66bc	0,38a	7,90b	38,29c	13,63b	40,65c	19,52b	0,40c	0,44a	0,16a	66,83b	25,13a	8,04ab	54,75a	884,14c
	MPF	19,86ab	0,46abc	8,38b	38,88c	14,45b	41,49c	20,34b	0,30ab	0,50a	0,20abc	62,51ab	28,77ab	8,72abc	58,16ab	664,58ab
	EC	21,89bc	0,49bc	5,78a	33,82b	9,96a	35,26b	16,39a	0,26a	0,50a	0,24cd	60,54a	29,84a	9,62cd	65,94bc	702,30abc
	G	25,94c	0,51c	4,11a	27,43a	7,08a	28,33a	14,42a	0,27ab	0,47a	0,26d	60,08a	30,13a	9,79d	73,84c	783,99bc
2009	T	11,46ab	0,48a	15,25ab	47,52a	25,96ab	54,16a	28,62ab	0,43ab	0,41a	0,15b	60,99a	29,45a	9,56a	44,10ab	579,33a
	NC	10,30a	0,49a	16,88c	49,31b	28,32c	56,86b	29,87c	0,41a	0,44a	0,15b	60,77a	29,57a	9,66a	40,33a	578,00a
	MPF	12,84b	0,43a	16,52bc	49,23b	27,97bc	56,62b	29,58bc	0,48b	0,39a	0,12a	46,95a	29,42a	23,63a	44,47b	608,67a
	EC	11,57ab	0,48a	14,94a	47,07a	25,43a	53,51a	28,38a	0,44ab	0,41a	0,15b	61,03a	29,37a	9,60a	43,37b	591,00a

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L).

Los resultados obtenidos a analizar los parámetros cromáticos en el momento del embotellado, tras la estabilización por frío de los vinos, se muestran en la **Tabla 4.14**. Los vinos obtenidos con los tratamientos en la campaña 2007 siguieron presentaron mayor intensidad de color que los vinos de los tratamientos del 2009.

En la **campaña 2007** las diferencias entre tratamientos y testigo fueron similares a las encontradas al final de la fermentación alcohólica. Todos los tratamientos dieron lugar a vinos con mayor intensidad colorante que el vino testigo. Los valores de los parámetros de color CIELab fueron mayores en el vino testigo que en el resto de los vinos, aunque no se observaron diferencias entre los valores CIELab de los tratamientos enzimáticos y de los tratamientos de frío. Las técnicas de congelación de la uva y de adición de nieve carbónica siguieron presentando una mayor contribución de la componente roja al color total del vino, aunque no se observaron diferencias significativas en la fracción de antocianos copigmentados entre los vinos. Con la maceración prefermentativa en frío y con el enzima de actividad β -galactosidasa se observó un mayor porcentaje de antocianos libres y un menor porcentaje de antocianos poliméricos que en el vino testigo. En todos los vinos, en el momento del embotellado, disminuyó el porcentaje de antocianos copigmentados respecto a los valores encontrados al final de la fermentación alcohólica. Excepto con la congelación de la uva, con el resto de técnicas empleadas se obtuvieron vinos con una mayor cantidad de antocianos que el vino testigo, siendo las técnicas enzimáticas las que presentaron los valores más altos, además en estos dos tratamientos el índice de polifenoles totales también fue significativamente mayor. La adición del enzima con actividad β -galactosidasa fue la técnica con la que el vino mostraba mejores características cromáticas.

En la **campaña 2009** siguieron sin encontrarse diferencias entre tratamientos y testigo al analizar los vinos en el momento del embotellado. En todos los vinos la fracción de color debida a antocianos copigmentados también fue menor que la obtenida al final de la fermentación alcohólica.

Tabla 4.14. Parámetros cromáticos de vinos de Syrah en el momento del embotellado, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	IC	T	L*	a*	b*	C*	H*	FCA	FFA	FPP	% Rojo	% Amarillo	% Azul	IPT	AT
2007	T	6,93a	0,63a	21,64b	52,02b	32,89b	61,67b	31,92b	0,16a	0,30a	0,54b	54,49a	33,96a	11,55ab	30,34a	116,97a
	CU	10,77b	0,49a	12,76a	44,66a	21,57a	49,60a	25,76a	0,17a	0,31a	0,52b	58,92b	28,66a	12,42b	33,74ab	172,65ab
	NC	14,22bc	0,48a	9,36a	40,38a	16,11a	43,50a	21,64a	0,15a	0,46b	0,39a	59,49b	28,72a	11,79ab	36,94ab	259,81bc
	MPF	11,79b	0,57a	12,32a	43,93a	21,13a	48,75a	25,67a	0,17a	0,40ab	0,43ab	56,59ab	32,02a	11,39ab	41,65bc	214,48b
	EC	13,73bc	0,57a	10,39a	41,53a	17,88a	45,23a	23,22a	0,17a	0,41b	0,42ab	56,79ab	32,09a	11,12ab	47,98cd	263,12bc
	G	16,73c	0,59a	9,04a	39,09a	15,58a	42,24a	20,95a	0,16a	0,45b	0,39a	56,39ab	33,24a	10,36a	55,22d	337,33c
2009	T	10,09a	0,63a	11,14a	42,12a	18,89a	46,17a	24,15a	0,10a	0,41a	0,49a	52,70a	32,96a	14,34a	38,48a	280,87a
	NC	9,83a	0,66b	12,04a	42,99a	20,37a	47,61a	25,19a	0,14a	0,44b	0,42a	52,08a	34,13b	13,79a	37,62a	249,92a
	MPF	10,48a	0,62a	10,91a	42,00a	18,54a	45,93a	23,73a	0,14a	0,44b	0,42a	53,06a	32,80a	14,14a	37,13a	215,44a
	EC	10,50a	0,63a	11,05a	42,03a	18,83a	46,05a	24,13a	0,12a	0,43ab	0,45a	52,92a	33,34ab	13,74a	36,49a	275,21a

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L).

En la **Tabla 4.15** se muestran los resultados de los parámetros cromáticos analizados tras 6 meses de embotellado. En la **campaña 2007** se observó un esperado descenso en la intensidad de color de los vinos y en el contenido de antocianos, debido a la precipitación de pigmentos poliméricos de elevado tamaño molecular y a las reacciones de oxidación y degradación que sufren los antocianos al disminuir el fenómeno de copigmentación y quedar expuestos en su forma libre (Bakker et al, 1993; Gómez-Plaza et al., 2001; Boulton, 2001). Aunque hay que destacar que en los vinos obtenidos por adición de enzimas el descenso de la intensidad colorante (16,1% en el vino del preparado enzimático comercial y 7,5% en el del enzima natural galactosidasa) fue menor que en el resto de los vinos (27,5 %, 40,2 %, 37,8% y 21,6% en el vino testigo y en los de congelación de la uva, adición de nieve carbónica y maceración prefermentativa en frío respectivamente). Los vinos obtenidos con las técnicas enzimáticas siguieron presentando, además, mayor índice de polifenoles totales y mayor concentración de antocianos y taninos que el vino testigo. En todos estos parámetros no se encontraron diferencias entre los tratamientos de frío y el testigo.

Al analizar los parámetros de color CIELab, una vez más con las técnicas enzimáticas se observó un color más intenso (menor L*) que en el vino testigo y menores valores de a*, b* y H*, es decir, tonalidades más desplazadas hacia la zona de los púrpuras y los violetas (Martínez et al., 2001).

Con las técnicas enzimáticas, junto con la maceración prefermentativa en frío, también se observó una mayor proporción de antocianos copigmentados, siendo el preparado enzimático comercial el que dio lugar a los valores más altos.

En la **campaña 2009**, con la evolución de los vinos en botella, siguieron sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos y el vino testigo.

Tabla 4.15. Parámetros cromáticos de vinos de Syrah 6 meses después del embotellado, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	IC	T	L*	a*	b*	C*	H*	FCA	FFA	FPP	% Rojo	% Amarillo	% Azul	IPT	AT
2007	T	5,02a	0,70b	28,56c	54,28e	31,75b	63,10c	30,00a	0,05a	0,20a	0,75c	11,60a	52,22a	36,17c	26,13a	68,84a
	CU	6,44a	0,53a	21,06b	51,70cd	27,58ab	58,61bc	28,08a	0,07ab	0,24ab	0,69bc	12,90b	56,76b	30,34ab	26,30a	89,04ab
	NC	8,84ab	0,51a	13,70a	44,52ab	21,79ab	49,58ab	26,02a	0,09ab	0,25ab	0,66b	13,73b	56,97b	29,29a	28,45a	128,61ab
	MPF	9,24ab	0,60ab	15,78ab	46,86bc	24,80ab	53,03abc	27,87a	0,12b	0,26b	0,62ab	12,01ab	54,99ab	33,00abc	38,55ab	149,41ab
	EC	11,54bc	0,59ab	12,53a	43,44ab	21,08ab	48,38ab	25,50a	0,14c	0,24ab	0,59a	11,76ab	55,53ab	32,72ab	44,01bc	187,73b
	G	15,48c	0,61b	9,96a	40,05a	17,13a	43,81a	22,06a	0,10b	0,29b	0,61ab	10,59ab	55,60ab	33,81bc	55,76c	289,07c
2009	T	8,07a	0,68a	10,36b	38,57a	15,99b	41,77a	22,41b	0,03a	0,19a	0,78a	49,11a	33,40b	17,48a	29,24a	110,67a
	NC	10,23a	0,66a	7,80ab	36,83a	13,14ab	39,14a	19,45ab	0,04a	0,26b	0,70a	50,12a	33,27b	16,61a	33,06a	176,33a
	MPF	10,02a	0,64a	7,80ab	36,81a	12,78ab	38,98a	19,08ab	0,06a	0,22ab	0,73a	50,46a	32,34a	17,21a	33,59a	158,67a
	EC	9,67a	0,67a	5,73a	29,39a	9,27a	30,85a	16,87a	0,01a	0,22ab	0,77a	48,66a	32,83ab	18,50a	31,83a	130,00a

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L).

En las **Tablas 4.16 y 4.17** se muestran los resultados obtenidos al analizar el contenido de antocianos monoméricos en vinos de Syrah, al final de la fermentación alcohólica, en las campañas 2007 y 2009 respectivamente. El antociano monomérico más abundante en todos los vinos fue malvidina-3-glucósido, seguido de malvidina acetato, resultados que coinciden con los encontrados por Fanzone et al. (2012) en vinos de Syrah.

La gran dificultad frente a la extracción de compuestos fenólicos mostrada por la uva de Syrah en el año 2007 (con un índice de madurez celular del 55,01%), se vio reflejada en el contenido total de antocianos encontrado en el vino testigo al final de la fermentación alcohólica, cuyo valor (318,63 mg/L) fue menor que el correspondiente al de la campaña 2009 (557,66 mg/L) a pesar de que la concentración de antocianos hallados en la uva de Syrah en la vendimia 2007 había sido mayor que en la vendimia 2009.

Coincidiendo con los resultados obtenidos en el estudio de los parámetros cromáticos, los tratamientos funcionaron mejor en la campaña 2007, cuando el hollejo de la uva se encontraba menos degradado. En esa campaña, en los vinos obtenidos por congelación de la uva, adición de nieve carbónica y adición de enzima β -galactosidasa, el contenido total de antocianos fue significativamente mayor que en el vino testigo. En estos tres tratamientos se encontró una mayor proporción de antocianos esterificados con ácido acético que en el vino testigo, y en los tratamientos de adición de nieve carbónica y de enzima galactosidasa se observó además una mayor concentración de ésteres del ácido p-cumárico. La concentración de vitisinas fue significativamente mayor en el tratamiento con β -galactosidasa. El preparado enzimático comercial dio lugar a una concentración de antocianos intermedia entre la del vino testigo y el enzima β -galactosidasa. Palacios et al. (2009) observaron que la concentración de antocianos en vinos de Syrah a los que se habían adicionado preparados enzimáticos dependía de la actividades presentes en estos y, al igual que nosotros, hallaron mejores resultados cuando el preparado no contenía actividades celulasa y hemicelulasa. Heredia et al. (2009) observaron que las técnicas de vinificación en frío provocaban un aumento significativo en la concentración total de antocianos y en la proporción de

antocianos acilados en vinos de Syrah. Lasanta-Melero (2009) también encontró un aumento en la cantidad de antocianos presentes en vinos de Syrah al utilizar una maceración prefermentativa en frío, aunque observó un efecto negativo sobre la concentración de antocianos con la adición de preparados enzimáticos ricos en actividades β -glucosidasa y antocianasa que, probablemente, provocaban la hidrólisis del enlace glicosilado de los antocianos.

En la **campaña 2009** los tratamientos de frío no provocaron un aumento significativo en la concentración de antocianos. Coincidiendo con los resultados en los vinos de Cabernet Sauvignon y con los hallados por otros autores (Delteil, 2004; Cuenta et al. 2004; LLaudy et al, 2005; Kountoundakis et al, 2009), las técnicas de frío no fueron tan efectivas cuando la uva se encontraba más madura. Sin embargo, con el tratamiento con el preparado enzimático comercial sí que se observó ese año un contenido de antocianos totales y de antocianos cumaratos significativamente mayor que en el vino testigo. Aunque algunos autores han encontrado que la acción de los enzimas tampoco es efectiva en la vinificación de uvas más maduras (Romero-Cascales, 2008) existen algunos estudios (Mulero et al., 2011; Ducasse et al., 2010) en los que se ha observado que la acción de preparados con actividades enzimáticas favorecía positivamente la presencia de compuestos fenólicos en los vinos cuando la uva de partida presentaba bajos niveles de estos compuestos, pero no afectaba al contenido total de polifenoles cuando se usaban uvas con un contenido inicial alto. Estos resultados coinciden con los de nuestro estudio, ya que el preparado enzimático comercial si favoreció la extracción de antocianos en el 2009 cuando la uva presentó una baja concentración de estos compuestos, a pesar de que la uva se encontraba suficientemente madura. Este mismo efecto, tal y como se ha comentado anteriormente, también se observó en los vinos de Cabernet Sauvignon. Los resultados parecen indicar que el efecto de las técnicas de frío depende en gran medida de la rigidez de las paredes celulares de la uva, mientras que las técnicas enzimáticas dependen también de las actividades presentes en los preparados y de la concentración inicial de compuestos fenólicos en la uva.

Tabla 4.16. Antocianos (mg/L) por HPLC para vinos de Syrah a final de la fermentación alcohólica, campaña 2007.

Antociano	T	CU	NC	MPF	EC	G
Delfinida-3-glucósido	8,68a	13,19a	20,53b	10,04a	10,68a	20,44b
Cianidina-3-glucósido	2,68a	2,89a	3,36ab	2,24a	3,41ab	5,03b
Petunidina-3-glucósido	19,09a	27,72ab	41,67c	22,58a	22,01a	36,46bc
Peonidina-3-glucósido	20,37a	23,44a	30,15a	31,57a	24,71a	53,00b
Malvidina-3-glucósido	220,77a	343,70b	477,98c	281,00ab	250,20ab	317,18ab
Vitisina A	10,91a	8,26a	11,09a	8,37a	9,37a	11,43a
Delfinidina Acetato	8,49ab	9,92ab	10,48ab	6,86a	7,36a	12,56b
Vitisina B	5,71a	9,40bc	5,89a	6,95ab	8,63bc	11,12c
Acetil vitisina A	6,30a	7,36a	8,01ab	7,37a	8,05ab	11,02c
Cianinida acetato	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Petunidina acetato	7,00ab	8,97ab	9,93b	6,34a	6,70ab	8,68ab
Peonidina acetato	14,25ab	15,59ab	18,79bc	13,03a	12,84a	20,86c
Malv.acet+Delf.cumarato	75,54a	124,16b	169,41c	89,88ab	78,27a	103,40ab
Peonidina cafeato	3,66a	4,22a	3,90a	4,49a	4,97a	9,51b
Cianidina caf+cum	4,90a	6,00a	5,83a	6,00a	6,97a	12,19b
Petunidina cumarato	7,01ab	9,27ab	11,36b	5,82a	9,04ab	17,58c
Malvidina cumarato cis	5,51a	7,03ab	9,49bc	5,17a	5,58a	10,92c
Peonidina cumarato	11,95a	13,69ab	18,74bc	13,23ab	11,74a	21,61c
Malv. Cumarato trans	45,13a	41,12a	58,55b	36,82a	48,27ab	71,57c
Totales	470,95a	675,92bc	915,16c	557,75ab	528,80ab	754,56bc
No acilados	181,06a	410,93bc	573,69c	347,42b	311,01ab	432,11bc
Acilados	122,29a	239,97bc	316,48c	187,65ab	191,74ab	288,88bc
Acetatos	70,19a	158,64bc	208,61c	116,11ab	105,17ab	145,50bc
Cumaratos	49,66a	77,11ab	103,97bc	67,04ab	81,60ab	133,87c
Vitisinas	22,92a	25,02ab	24,98ab	22,69ab	26,06a	33,57b

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; acet: acetato; caf: cafeato; cum: cumarato; nd: no detectado.

Tabla 4.17. Antocianos (mg/L) por HPLC para vinos de Syrah a final de la fermentación alcohólica, campaña 2009.

Antociano	T	NC	MPF	EC
Delfinida-3-glucósido	7,27a	11,64a	10,13a	11,95a
Cianidina-3-glucósido	1,64a	1,76a	1,22a	1,31a
Petunidina-3-glucósido	16,25a	25,32a	23,98a	26,98a
Peonidina-3-glucósido	9,72a	13,27a	10,97a	12,86a
Malvidina-3-glucósido	289,47a	296,75ab	287,86a	312,41b
Vitisina A	3,22ab	3,52b	3,25ab	2,97a
Delfinidina Acetato	6,25a	6,48a	6,44a	6,88a
Vitisina B	1,64a	2,49a	2,28a	2,21a
Acetil vitisina A	1,73a	1,72a	1,39a	1,52a
Cianinida acetato	1,29a	0,75a	0,54a	0,52a
Petunidina acetato	10,06a	10,07a	10,06a	10,41a
Peonidina acetato	10,17a	15,11a	14,99a	15,71a
Malv.acet+Delf.cumarato	129,01a	137,48a	133,11a	140,13a
Peonidina cafeato	0,82a	0,98a	0,95a	1,06a
Cianidina caf+cum	2,64a	3,52ab	3,14ab	4,13b
Petunidina cumarato	4,08a	5,71a	5,66a	6,68a
Malvidina cumarato cis	3,48a	2,74a	2,54a	3,25a
Peonidina cumarato	12,19b	11,27ab	10,92a	14,01c
Malv. Cumarato trans	46,74b	45,96b	40,96a	47,40b
Totales	557,66a	596,53ab	570,39ab	622,38b
No acilados	324,35a	348,74ab	334,16ab	365,50b
Acilados	226,73a	240,08ab	229,31ab	250,17b
Acetatos	156,79a	169,89a	165,15a	173,65a
Cumaratos	69,13ab	69,23ab	63,21a	75,46b
Vitisinas	6,58a	7,72a	6,92a	6,70a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; acet: acetato; caf: cafeato; cum: cumarato;

Respecto a la composición de flavonoles en los vinos de Syrah al final de la fermentación alcohólica (**Tabla 4.18**), miricetina-3-glucósido seguida de quercetina-3-glucósido, fueron los compuestos más abundantes en todos los vinos, coincidiendo con los resultados hallados por Sánchez-Palomo et al. (2005) en vinos de Syrah. Los valores encontrados en la concentración total de flavonoles fueron similares a los reportados por Fanzone et al. (2012) en vinos de Syrah procedentes de uvas cultivadas en climas cálidos.

En la **campana 2007** todas las técnicas, excepto la maceración prefermentativa en frío, dieron lugar a vinos con mayor contenido de flavonoles que el vino obtenido mediante la elaboración tradicional. De forma análoga a lo observado en la concentración de antocianos, las técnicas de frío más agresivas (congelación de la uva y la adición de nieve carbónica) dieron mejores resultados que la maceración prefermentativa en frío. Este resultado podría estar relacionado con las características fisiológicas de la uva de Syrah ya que, al poseer unas estructuras celulares más rígidas que otras variedades, las técnicas que provocan un mayor *shock* térmico favorecen en mayor medida la ruptura celular, facilitando la extracción de compuesto fenólicos (Busse-Valverde et al., 2011; Gil-Muñoz et al., 2009).

En la **campana 2009** los tratamientos no mejoraron el contenido de flavonoles en los vinos. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de flavonoles entre los vinos tratados y el vino testigo. Tal y como se había observado en los parámetros cromáticos y en la concentración de antocianos, el efecto añada también fue notable en la extracción de flavonoles. Las técnicas empleadas no favorecieron la extracción de estos compuestos fenólicos cuando la uva de Syrah presentó menor índice de madurez celular.

Tabla 4.18. Flavonoles (mg/L) por HPLC en vinos de Syrah a final de fermentación alcohólica, campañas 2007 y 2009

Año	Tratamiento	Miricetina galactósido	Miricetina glucósido	Quercetina galactósido	Quercetina glucurónido	Quercetina glucósido	Kampferol galactósido	Kampferol glucósido	Isorhamnetina glucósido	Siringetina glucósido	Totales
2007	T	2,98a	11,35a	2,39a	3,92a	8,29a	1,82a	0,97a	1,93a	7,95b	43,74a
	CU	3,61a	20,15c	3,78b	6,29a	12,90b	1,58a	1,15a	5,87bc	10,87c	73,72bc
	NC	2,67a	30,07d	4,33b	9,59b	14,33b	1,71a	1,12a	7,34c	11,32c	90,09d
	MPF	2,33a	13,20ab	1,96a	4,79a	8,87a	0,31a	1,42a	3,50ab	9,72bc	50,82a
	EC	6,64b	15,08b	4,00b	6,22a	12,14b	1,55a	2,23a	2,00a	11,13c	68,97b
	G	9,14b	12,47ab	4,23b	6,09a	13,61b	2,14a	7,63b	15,69d	5,13a	82,22bc
	T	0,72a	17,53a	1,70a	6,65a	9,00a	0,20a	4,35c	6,49a	3,90a	56,70a
	NC	0,65a	17,53a	1,53a	6,00a	7,58a	0,14a	2,55a	5,79a	2,62a	50,42a
	MPF	0,83a	17,57a	1,87a	7,23a	9,91a	nd	3,89c	6,77a	2,81a	57,41a
	EC	0,63a	18,36a	1,80a	6,99a	9,06a	nd	3,22b	6,60a	2,81a	55,67a

Letras diferentes en la misma columna, para cada año, muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; nd: no detectado.

La **Tabla 4.19** muestra los resultados obtenidos al analizar la composición de proantocianidinas en los vinos de Syrah al final de la fermentación alcohólica. Los valores encontrados en la concentración total de proantocianidinas son inferiores a los hallados por Romero-Cascales (2008) en vinos de Syrah de la misma zona, aunque están dentro de los rangos indicados por otros autores (Harbetson et al., 2008; Cosme et al., 2009). Los valores del grado medio de polimerización son similares a los reportados por Cosme et al. (2009) en vinos de Syrah.

La unidad monomérica presente en mayor proporción en todos los vinos fue (-)-epicatequina de extensión. Coincidiendo con lo observado por Busse-Valverde (2010), los vinos de Syrah presentaron una menor proporción de (-)-epigallocatequina de extensión y un menor grado medio de polimerización que los vinos de Cabernet Sauvignon, lo que pone de manifiesto una menor contribución de taninos procedentes de los hollejos en los vinos de Syrah. En la uva de Syrah, en ambas campañas, (**Tabla 4.1.**) se encontró menor concentración de taninos en los hollejos que en la uva de Cabernet Sauvignon, y esto se reflejó en la menor presencia de estos taninos en los vinos.

Respecto a las unidades terminales, (+)-catequina terminal fue la que se halló en mayor porcentaje, aunque en la campaña 2007 también se encontró una proporción similar de (-)-epicatequina terminal, coincidiendo con lo observado por Mattivi et al. (2009) en un estudio realizado en vinos de Syrah. Algunos autores han señalado que una mayor presencia de (-)-epicatequina terminal en los vinos viene asociada a una mayor madurez de los hollejos (Pérez-Magariño y González-San José, 2004; Bautista-Ortín, 2005) y en los vinos de Cabernet Sauvignon nosotros también habíamos observado esta tendencia, sin embargo, en los vinos de Syrah, en la campaña 2007 se encontró una mayor proporción de (-)-epicatequina terminal que en los del 2009, a pesar de que la uva del 2007 presentó unos hollejos menos maduros.

Tabla 4.19. Composición de proantocianidinas en vinos de Syrah a final de la fermentación alcohólica, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	PT	GMP	%G	%C _t	%E _t	%EG _t	%C _e	%E _e	%EG _e	%EGC _e
2007	T	217,73a	3,49ab	10,13a	16,36b	11,80a	0,66a	9,30a	40,38a	9,47a	12,02a
	CU	308,38a	4,17bcd	5,22a	12,07ab	11,59a	0,35a	5,77a	47,70a	4,87a	17,65b
	NC	240,95a	4,77d	7,03a	10,47a	10,25a	0,47a	7,27a	48,54a	6,56a	16,45ab
	MPF	306,29a	3,08a	7,19a	13,35ab	17,90b	1,31a	4,88a	44,71a	5,88a	11,97a
	EC	348,04a	4,52cd	8,05a	11,23a	9,70a	1,39a	5,02a	51,51a	6,66a	14,48ab
	G	282,57a	3,94bc	6,35a	10,75a	12,97a	1,66a	5,11a	48,54a	4,69a	16,29ab
2009	T	314,75b	3,46b	5,86a	20,13a	7,19ab	1,61a	4,54a	48,19ab	4,25a	14,09b
	NC	243,98a	2,95a	9,41b	23,95b	8,26b	2,01ab	5,16b	44,22a	7,39b	9,01a
	MPF	350,94b	3,37ab	7,33ab	20,54a	6,22a	2,98b	5,01b	51,54b	4,35a	9,35a
	EC	301,88b	3,49b	6,79ab	19,46a	7,53ab	1,72ab	4,47a	47,64ab	5,07a	14,11b

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; PT: proantocianidinas totales (mg/L); GMP: grado medio de polimerización; %G: porcentaje de galoilación; %C_t: porcentaje de (+)-catequina terminal; %E_t: porcentaje de (-)-epicatequina terminal; %EG_t: porcentaje de (-)-epicatequina-galato terminal; %C_e: porcentaje de (+)-catequina de extensión; %E_e: porcentaje de (-)-epicatequina de extensión; %EG_e: porcentaje de (-)-epicatequina-galato de extensión; %EGC_e: porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión;

En la **campaña 2007** no se observaron diferencias significativas en el contenido total de taninos entre los vinos tratados y el vino testigo. Aunque sí que se observó un grado medio de polimerización significativamente mayor en los vinos obtenidos por adición de nieve carbónica y por adición del preparado enzimático comercial. La proporción de (-)-epigallocatequina de extensión también fue significativamente mayor en el vino obtenido por congelación de la uva que en el vino testigo. Esto significa que, aun no existiendo diferencias en el contenido total de taninos, con estas tres técnicas se vio favorecida la extracción de taninos procedentes de los hollejos (Labarbe et al., 1999; Busse-Valverde, 2010).

En la **campaña 2009** tampoco se observaron diferencias significativas en el contenido total de taninos entre las técnicas de maceración prefermentativa en frío, la adición del preparado enzimático comercial y el vino testigo. Con la nieve carbónica se obtuvo un vino con un contenido de taninos significativamente menor que con la elaboración tradicional. Con las técnicas de frío se observó una menor proporción de (-)-epigallocatequina de extensión y una mayor presencia de unidades galoiladas, es decir, una mayor contribución de taninos procedentes de las semillas (Prieur et al., 1994).

Se han encontrado resultados contradictorios en algunos estudios realizados sobre el efecto producido por estas técnicas de vinificación en la composición de proantocianidinas en vinos de Syrah. Lasanta-Melero (2009) observó que la maceración prefermentativa en frío provocaba un aumento en el contenido total de taninos, pero no encontró el mismo resultado con la adición de un preparado enzimático. Nel (2010) realizó un estudio del efecto de estas técnicas sobre vinos de Syrah durante dos campañas consecutivas (2008 y 2009). En la primera campaña observó que tanto los tratamientos de frío como los enzimáticos provocaban un aumento en la concentración de taninos en vinos de Syrah elaborados a partir de uvas poco maduras cultivadas en zonas cálidas, pero tenían un efecto negativo cuando las uvas de partida se encontraban maduras. Sin embargo, en la segunda campaña no encontró ningún efecto en ninguno de los dos casos. También observó que cuando las uvas habían sido cultivadas en zonas más frías, en todos los casos era la

adición de un preparado enzimático comercial la que provocaba un aumento del contenido de taninos.

En nuestro estudio, aunque las técnicas no provocaron un aumento en el contenido total de taninos, sí que se observó un efecto positivo sobre la extracción de taninos en los hollejos con la nieve carbónica y el preparado enzimático comercial cuando los hollejos se encontraban menos maduros (campaña 2007). Y, sin embargo, en la campaña 2009, cuando los hollejos se encontraban más maduros pero las semillas se encontraban más verdes, las técnicas de frío favorecieron la extracción de taninos de las semillas. Este resultado, que coincide con lo observado en los vinos de Cabernet Sauvignon, parece corroborar que cuanto más rígidas se encuentran las estructuras celulares, mayor es la ruptura provocada por el frío.

Coincidiendo con lo observado en los vinos de Cabernet Sauvignon, el efecto de los tratamientos sobre las características cromáticas y sobre la composición fenólica de los vinos de Syrah fue más significativo cuando la uva de partida se encontraba menos madura.

En la **campaña 2007** todos los tratamientos presentaron mejores características cromáticas que el vino testigo al final de la fermentación alcohólica y en el momento del embotellado. Tras 6 meses de embotellado, los tratamientos, especialmente los enzimáticos, siguieron presentando mejores características cromáticas que el vino testigo. Respecto a la composición al final de la fermentación alcohólica, la congelación de la uva, la adición de nieve carbónica y la adición del enzima con actividad β -galactosidasa dieron lugar a vinos con un mayor contenido de antocianos. Con estas tres técnicas y con el preparado enzimático comercial también se observó un aumento en el contenido de flavonoles. La extracción de taninos procedentes de los hollejos se vio favorecida con la adición de nieve carbónica y del preparado enzimático comercial.

En la **campaña 2009** no se observaron diferencias en los parámetros cromáticos entre los vinos tratados y el vino testigo. La concentración de

antocianos al final de la fermentación alcohólica solo fue significativamente mayor con la adición del preparado enzimático comercial. Los tratamientos no influyeron significativamente sobre la concentración total de flavonoles. Respecto a la composición de proantocianidinas, la nieve carbónica dio lugar a un vino con un menor contenido de taninos. Las dos técnicas de frío favorecieron la extracción de taninos procedentes de las semillas.

4.2.2.3 Monastrell

En la **Tabla 4.20** se muestran los resultados obtenidos al analizar los parámetros cromáticos en vinos de Monastrell, al final de la fermentación alcohólica, en las campañas 2007 y 2009.

Al finalizar la fermentación alcohólica, los vinos de Monastrell de la campaña 2009 fueron vinos más coloreados y presentaron mayor índice de polifenoles totales y mayor contenido de antocianos que los correspondientes vinos de Monastrell de la campaña 2007. En la campaña 2009 la uva de la variedad Monastrell presentó mayor facilidad para la extracción de compuestos fenólicos, con un índice de madurez celular del 50,68%, mientras que en la uva de Monastrell del año 2007 el índice de madurez celular fue 56,14%. Esto podría explicar el mayor contenido polifenólico encontrado en los vinos del 2009, así como la mayor intensidad de color de los vinos de Monastrell en esa campaña. Los valores encontrados en la intensidad de color en los vinos del 2009 son similares a los reportados por Romero-Cascales (2008) en vinos de Monastrell. Bautista-Ortín (2005) encontró valores más bajos en la intensidad de color de vinos de Monastrell y similares a los hallados en nuestro estudio durante la campaña 2007, cuando estos habían sido elaborados a partir de uvas con un mayor índice de madurez celular.

Al final de la fermentación alcohólica, en ninguna de las dos campañas, las técnicas enológicas tuvieron un efecto notablemente positivo sobre los parámetros cromáticos. Acaso destacar que, en la campaña 2007, el vino testigo presentó los valores más bajos en los parámetros de color CIELab, mientras que en el 2009, estos valores fueron los más altos precisamente en esta vinificación. Es decir, en el 2007 el vino testigo fue un vino más oscuro y con tonalidades más azules y violáceas que los vinos de los tratamientos, mientras que en el 2009 sucedió lo contrario. En la campaña 2007 el vino testigo y el vino obtenido por congelación de la uva presentaron mayor índice de polifenoles totales que los otros vinos y fue también en el vino testigo donde se encontró la mayor concentración de antocianos.

Tabla 4.20. Parámetros cromáticos de vinos de Monastrell a final de la fermentación alcohólica, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	IC	T	L*	a*	b*	C*	H*	FCA	FFA	FPP	% Rojo	% Amarillo	% Azul	IPT	AT
2007	T	10,69a	0,51a	20,20a	52,55a	34,29a	62,77a	33,05a	0,34a	0,42b	0,24a	7,43a	61,32a	31,24a	38,57b	388,21b
	CU	9,68a	0,55a	22,04ab	54,08ab	36,87ab	65,46a	34,25ab	0,35a	0,43b	0,22a	7,59a	60,01a	32,40a	38,45b	350,75ab
	NC	8,75a	0,48a	24,87bc	57,02c	40,84bc	70,14b	35,61bc	0,35a	0,43b	0,22a	6,82a	63,15a	30,03a	32,83a	312,27ab
	MPF	7,99a	0,58a	25,40c	56,31bc	41,74c	70,11b	36,55c	0,38a	0,27a	0,35b	7,35a	58,78a	33,86a	31,52a	271,87a
	EC	8,23a	0,52a	24,77bc	56,54bc	40,57bc	69,59b	35,65bc	0,35a	0,40b	0,25a	7,34a	60,78a	31,88a	32,23a	291,86a
2009	G	8,53a	0,50a	25,16bc	57,01c	40,95bc	70,20b	35,66bc	0,36a	0,43b	0,21a	7,04a	62,03a	30,93a	31,07a	295,75a
	T	20,16a	0,44a	13,17c	45,77c	22,69c	51,09c	26,32c	0,59a	0,32a	0,10a	63,77a	27,60a	8,63a	55,84a	697,70a
	NC	19,41a	0,41a	11,09ab	42,94ab	19,12ab	47,01ab	23,99ab	0,58a	0,29a	0,13b	65,41a	26,82a	7,77a	57,64a	663,83a
	MPF	20,93a	0,41a	10,14a	41,53a	17,48a	45,06a	22,80a	0,55a	0,33a	0,12b	65,70a	26,78a	7,52a	59,21a	682,00a
	EC	19,65a	0,40a	12,58bc	45,12bc	21,68bc	50,07bc	25,61bc	0,57a	0,32a	0,10a	66,33a	26,49a	7,18a	58,12a	722,90a

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L).

Al analizar los parámetros cromáticos en el momento del embotellado, tras la estabilización por frío de los vinos (**Tabla 4.21**) tampoco se observó que los tratamientos mejorasen las características cromáticas de los vinos.

En la **campana 2007** el vino obtenido con la elaboración tradicional siguió presentado valores de los parámetros CIELab menores que los de los tratamientos y, además, fue el vino con mayor intensidad de color, mayor índice de polifenoles totales y mayor contenido de antocianos.

En la **campana 2009**, en el momento del embotellado, tampoco se encontraron diferencias importantes entre los vinos tratados y el vino testigo. Únicamente, al estudiar los parámetros de color CIELab se observó que en el vino obtenido por adición del preparado enzimático comercial los valores eran significativamente menores que en el testigo, seguidos por los de la maceración prefermentativa en frío y por los de la nieve carbónica. En todos los vinos de esta campaña la intensidad de color y la concentración total de antocianos, en el momento del embotellado, disminuyeron notablemente respecto a los valores encontrados al final de la fermentación alcohólica. Coincidiendo con la disminución en el contenido de antocianos también se produjo un descenso en la fracción de color debida a antocianos copigmentados y a antocianos libres, y un incremento del porcentaje debido a pigmentos poliméricos. Se observó además un incremento de la componente amarilla, hecho que también induce a pensar en una polimerización de taninos, ya que, según Zamora (2003), la presencia de taninos polimerizados provoca un desplazamiento del color del vino hacia tonalidades más amarillas.

Tabla 4.21. Parámetros cromáticos de vinos de Monastrell en el momento del embotellado, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	IC	T	L*	a*	b*	C*	H*	FCA	FFA	FPP	% Rojo	% Amarillo	% Azul	IPT	AT
2007	T	10,17b	0,73a	16,90a	48,47a	28,24a	56,11a	30,15a	0,12a	0,42a	0,46a	19,00a	47,83a	33,17a	30,32b	165,42a
	CU	7,43a	0,64a	19,43ab	50,73ab	31,19ab	59,56b	31,57ab	0,13ab	0,34a	0,53a	12,02a	53,62a	34,36a	28,71ab	125,74a
	NC	7,70a	0,58a	19,34ab	51,34ab	31,02ab	59,98ab	31,13ab	0,12a	0,41a	0,47a	11,38a	56,26a	32,36a	26,80ab	146,96a
	MPF	6,41a	0,75a	25,14b	50,46ab	34,23b	61,07ab	34,14ab	0,12a	0,40a	0,48a	11,21a	51,49a	37,30a	23,89a	110,59a
	EC	6,85a	0,62a	22,00ab	53,29b	33,62b	63,01c	32,22ab	0,13ab	0,42a	0,45a	11,19a	54,92a	33,89a	26,13ab	131,99a
	G	6,93a	0,59a	21,63ab	53,07b	32,77b	62,38ab	31,68b	0,15b	0,35a	0,50a	11,38a	55,79a	32,83a	24,61ab	129,82a
2009	T	11,89ab	0,60a	7,18b	36,86b	12,27b	38,84b	18,40b	0,16a	0,33a	0,51a	52,94a	31,75a	15,31ab	34,69a	189,02a
	NC	11,02a	0,60a	9,32d	40,08c	15,89d	43,12c	21,63d	0,15a	0,31a	0,53a	53,48a	31,91a	14,61a	34,38a	172,16a
	MPF	11,36a	0,59a	8,48c	38,88bc	14,47c	41,48c	20,41c	0,14a	0,33a	0,53a	53,48a	31,64a	14,88a	35,82a	174,55a
	EC	12,63b	0,60a	4,85a	30,18a	8,31a	31,30a	15,36a	0,15a	0,33a	0,52a	52,44a	31,57a	15,98b	36,76a	191,14a

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L).

Al analizar los parámetros cromáticos transcurridos 6 meses tras el embotellado (**Tabla 4.22**) en la **campaña 2007** el vino testigo presentó mayor intensidad de color y mayor contenido de antocianos que los vinos tratados, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En la **campaña 2009**, tras 6 meses de embotellado, tampoco se encontraron grandes diferencias entre los parámetros cromáticos de los vinos de Monastrell tratados y el vino testigo. El vino obtenido por adición del enzima con actividad β -galactosidasa ya no presentó valores CIELab menores que el testigo, como había ocurrido en el momento del embotellado. Únicamente se observó que el vino obtenido por maceración prefermentativa en frío presentaba los valores más altos de los parámetros L^* y H^* , lo que significa que este vino tenía más luminosidad, es decir, era más transparente y presentaba tonos más amarillos y anaranjados.

En otros estudios si se ha encontrado un efecto positivo de las técnicas de frío o enzimáticas sobre las características cromáticas de vinos de Monastrell, aunque existen algunos resultados contradictorios. Bautista-Ortín (2005) observó que la adición de enzimas de maceración aumentaba la concentración de compuestos fenólicos en vinos de Monastrell, pero que el efecto de los enzimas se veía reducido al aumentar el grado de maduración. Sin embargo, Romero-Cascales (2008) señaló que el efecto de la adición de enzimas en la vinificación de uvas de Monastrell era sólo notable cuando se utilizaban uvas con un grado de maduración apropiado para la vinificación y que, por el contrario, no tenía repercusión cuando se utilizaban uvas poco o muy maduras. Álvarez et al. (2006) encontraron un efecto positivo sobre los parámetros cromáticos en vinos de Monastrell al emplear la maceración prefermentativa en frío, con y sin nieve carbónica, especialmente si se utilizaban uvas con un bajo grado de maduración. Garijo (2001) comparó el efecto de diferentes temperaturas de maceración prefermentativa en la vinificación en rosado de uvas de Monastrell, observando que una maceración prefermentativa a 15°C daba lugar a vinos con mayor intensidad de color y mayor contenidos de antocianos que las maceraciones prefermentativas a menor temperatura (5°C y 10°C).

Tabla 4.22. Parámetros cromáticos de vinos de Monastrell 6 meses después del embotellado, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	IC	T	L*	a*	b*	C*	H*	FCA	FFA	FPP	% Rojo	% Amarillo	% Azul	IPT	AT
2007	T	6,92a	0,67a	21,02a	50,50a	30,17a	58,82b	30,85a	0,07ab	0,25b	0,68a	12,28a	52,67a	35,05a	27,10a	107,53a
	CU	5,19a	0,72a	25,68a	51,13a	28,31a	58,57b	29,08a	0,05a	0,19a	0,76b	13,35a	50,57a	36,08ab	23,76a	68,84a
	NC	5,78a	0,63a	22,69a	51,14a	25,84a	57,35ab	26,83a	0,08ab	0,21ab	0,70a	13,70a	52,80a	33,50ab	22,48a	81,86a
	MPF	5,41a	0,89a	24,60a	44,04a	30,03a	53,91a	34,44a	0,08ab	0,23ab	0,69a	14,36a	46,37a	39,28c	20,73a	66,33a
	EC	5,74a	0,68a	21,97a	49,59a	27,38a	56,65ab	28,91a	0,08ab	0,21ab	0,71a	14,00a	51,19a	34,81ab	22,80a	77,88a
	G	5,70a	0,67a	22,32a	48,63a	24,38a	54,48ab	26,82a	0,10b	0,19a	0,71a	14,19a	51,71a	34,10c	21,37a	80,92a
2009	T	7,32a	0,69a	11,12a	40,09a	16,63a	43,45a	22,23ab	0,07a	0,16a	0,77b	49,34a	34,22a	16,44a	27,03a	94,00a
	NC	7,70a	0,72a	10,58a	39,00a	16,28a	42,27a	22,66ab	0,06a	0,17a	0,77b	48,66a	34,91a	16,43a	27,69a	92,67a
	MPF	6,77a	0,71a	14,51b	43,11a	19,76a	47,42a	24,62b	0,06a	0,18a	0,76ab	49,07a	34,84a	16,09a	26,86a	83,67a
	EC	7,71a	0,70a	9,72a	38,13a	14,57a	40,83a	20,84a	0,09a	0,17a	0,75a	48,91a	34,40a	16,69a	27,74a	94,33a

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L).

Las **Tablas 4.23 y 4.24** muestran los valores de los antocianos individuales obtenidos por HPLC en los vinos de Monastrell, medidos al final de la fermentación alcohólica en las campañas 2007 y 2009 respectivamente.

Coincidiendo con los datos obtenidos espectrofotométricamente, el contenido total de antocianos al final de la fermentación alcohólica fue mayor en los vinos de Monastrell del 2009 que en los del 2007. Tal y como se ha explicado anteriormente, esta mayor proporción de antocianos en el vino en la campaña 2009 pudo deberse a que, ese año, la uva de Monastrell presentó menor índice de madurez celular y, por lo tanto, mayor facilidad para la extracción de compuestos fenólicos.

En todos los vinos, malvidina-3-glucósido fue el antociano mayoritario. Tal y como cabía esperar, la proporción de antocianos acilados en los vinos de Monastrell fue mucho menor que la que presentaron los vinos de Syrah y Cabernet Sauvignon, debido principalmente a que en los vinos de Monastrell no se encontraron grandes concentraciones de malvidina acetato. Romero-Cascales et al., (2005) también observaron que la proporción de antocianos acilados presente en vinos de Monastrell era inferior que la encontrada en vinos de Syrah, Cabernet Sauvignon y Merlot.

El contenido de antocianos no acilados en la campaña 2009 fue mucho mayor que en la campaña anterior. Esto podría explicar que, según lo observado en el estudio de los parámetros cromáticos, en el 2009 los vinos sufriesen un descenso más acusado en la intensidad colorante durante su evolución, ya que las formas no aciladas de los antocianos son más susceptibles de sufrir reacciones de degradación

En ambas campañas, ninguna de las técnicas empleadas dio lugar a vinos con un contenido total de antocianos mayor que el vino testigo. Aunque sí que se observó que, en la campaña 2009, en el vino obtenido mediante maceración prefermentativa en frío, la concentración de antocianos acilados fue mayor que en el vino testigo.

Tabla 4.23. Antocianos (mg/L) por HPLC para vinos de Monastrell a final de la fermentación alcohólica, campaña 2007.

Antociano	T	CU	NC	MPF	EC	G
Delfinida-3-glucósido	15,585a	15,639a	12,308a	11,100a	9,891a	9,878a
Cianidina-3-glucósido	8,790b	8,208ab	5,850ab	5,603a	5,167a	5,205a
Petunidina-3-glucósido	24,061a	24,120a	20,918a	17,927a	17,193a	19,237a
Peonidina-3-glucósido	32,382b	25,253ab	21,492a	23,704a	17,086a	17,888a
Malvidina-3-glucósido	140,343a	139,470a	131,266a	121,082a	120,058a	124,393a
Vitisina A	8,296ab	9,894b	6,611a	6,514a	7,007a	7,339a
Delfinidina Acetato	6,561a	5,979a	3,505a	3,050a	4,025a	5,046a
Vitisina B	4,658a	5,356a	4,374a	3,421a	3,414a	3,860a
Acetil vitisina A	3,989a	4,394a	3,402a	2,461a	3,419a	3,638a
Cianinida acetato	5,291b	5,350b	5,179b	2,206a	3,363ab	2,952ab
Petunidina acetato	7,093a	3,782a	3,543a	2,217a	2,899a	2,967a
Peonidina acetato	4,109a	4,156a	3,312a	2,604a	3,101a	3,066a
Malv.acet+Delf.cumarato	12,765a	12,647a	11,100a	8,721a	10,489a	11,202a
Peonidina cafeato	4,136a	2,675a	2,074a	1,898a	2,079a	3,277a
Cianidina caf+cum	5,074a	5,402a	5,204a	3,609a	4,653a	5,075a
Petunidina cumarato	5,393a	5,182a	4,215a	3,611a	4,545a	5,048a
Malvidina cumarato cis	2,919a	3,053a	2,625a	2,342a	2,293a	3,112a
Peonidina cumarato	5,283a	4,733a	4,403a	4,791a	3,953a	4,112a
Malv. Cumarato trans	10,096a	15,626a	15,425a	12,461a	13,366a	14,264a
Totales	306,822b	300,919b	266,809ab	159,549a	238,001ab	251,558ab
No acilados	221,161a	212,689a	191,834a	179,415a	169,396a	176,600a
Acilados	68,719a	68,585a	60,588a	47,512a	54,765a	60,121a
Acetatos	35,818b	31,914ab	26,641ab	18,799a	23,876ab	25,232ab
Cumaratos	28,764a	33,996a	31,873a	17,877a	28,810a	31,611a
Vitisinas	16,942ab	19,644b	14,387ab	12,397a	13,840b	14,837ab

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; acet: acetato; caf: cafeato; cum: cumarato;

Tabla 4.24. Antocianos (mg/L) por HPLC para vinos de Monastrell a final de la fermentación alcohólica, campaña 2009.

Antociano	T	NC	MPF	EC
Delfinida-3-glucósido	32,204a	35,871a	37,269a	18,869a
Cianidina-3-glucósido	20,186a	20,206a	24,567a	25,290a
Petunidina-3-glucósido	56,893a	60,542a	55,296a	28,573a
Peonidina-3-glucósido	60,756a	60,842a	75,791a	74,451a
Malvidina-3-glucósido	259,155a	277,751a	334,632b	294,421ab
Vitisina A	2,867a	2,977a	4,200b	2,910a
Delfinidina Acetato	0,606a	1,634a	1,623a	0,982aa
Vitisina B	0,520a	0,520a	0,838a	0,608a
Acetil vitisina A	0,808ab	0,520a	1,392b	1,066ab
Cianinida acetato	1,784a	2,128a	2,032a	2,691a
Petunidina acetato	2,258a	2,022a	3,570a	1,766a
Peonidina acetato	2,842ab	2,638a	4,683b	1,865a
Malv.acet+Delf.cumarato	8,366a	18,561ab	22,695b	14,907ab
Peonidina cafeato	0,664a	0,737a	6,674a	4,542a
Cianidina caf+cum	8,724a	8,456a	7,516a	8,992a
Petunidina cumarato	7,230b	7,949b	5,139ab	1,473a
Malvidina cumarato cis	2,328a	2,489a	3,659a	5,636a
Peonidina cumarato	9,690a	9,694a	13,031b	11,476ab
Malv. Cumarato trans	36,929a	38,496ab	46,671b	40,197ab
Totales	514,811a	554,033a	651,278a	594,724a
No acilados	429,195a	455,212a	527,555a	441,605a
Acilados	81,421a	94,804ab	117,293b	94,527ab
Acetatos	15,856a	26,983ab	34,603b	22,211ab
Cumaratos	64,901a	67,085a	76,016b	67,774ab
Vitisinas	4,195a	4,016a	6,430b	4,585a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p>95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; acet: acetato; caf: cafeato; cum: cumarato;

Al analizar el contenido y composición de flavonoles en los vinos de Monastrell al final de la fermentación alcohólica (**Tabla 4.25**) también se observó que los vinos de la campaña 2009 contenían mayor concentración total de flavonoles que los vinos del 2007. Los flavonoles, al igual que los antocianos, están localizados en el hollejo de la uva y, puesto que la uva de Monastrell de la campaña 2009 presentó menor índice de madurez celular, cabía esperar que los vinos de esta campaña fuesen también más ricos en flavonoles que los vinos del 2007. Además, en la uva de Monastrell del 2009 también se había encontrado un contenido de flavonoles (58,05 mg/Kg uva) mucho mayor que en la uva del 2007 (14,32 mg/kg uva).

En todos los vinos quercetina-3-glucósido y miricetina-3-glucósido fueron los flavonoles individuales más abundantes aunque en los vinos del 2009 también se encontró una alta proporción de quercetina-3-glucurónido. Esta diferencia en la concentración de quercetina-3-glucurónido entre las dos añadas se había observado también en la uva de partida, siendo la concentración de este flavonol mucho mayor en la uva de Monastrell del 2009 (17,10 mg/Kg uva) que en el 2007 (3,00 mg/Kg uva). Las concentraciones de los glucósidos de quercetina y miricetina halladas en los vinos de Monastrell están dentro de los rangos señalados por Makris et al. (2006) en un estudio sobre los perfiles flavonólicos en vinos tintos y, al igual que nosotros, Martínez-Pinilla et al. (2012) también encontraron quercetina-3-glucurónido como uno de los flavonoles mayoritarios en vinos de Monastrell.

Respecto al efecto de los distintos tratamientos, tal y como se observó al estudiar la composición de antocianos de los vinos, tampoco se encontraron diferencias significativas en el contenido total de flavonoles entre los vinos tratados y el vino testigo. Únicamente se podría destacar que en la campaña 2009, en el tratamiento con nieve carbónica la concentración de los glucósidos de miricetina y siringetina, y la concentración de quercetina-3-glucurónido fueron significativamente mayores que las del vino testigo, aunque, sin embargo, el testigo presentó mayor cantidad del flavonol mayoritario, quercetina-3-glucósido.

Aunque no existen muchos estudios centrados en el efecto de las técnicas de frío sobre la extracción de flavonoles en vinos de Monastrell, sí que existen algunas referencias sobre el efecto de la adición de enzimas. Mulero et al. (2011) estudiaron la influencia de la adición de preparados enzimáticos sobre el contenido de flavonoles en vinos de Monastrell y, al igual que nosotros, observaron que el uso de enzimas no provocaba un aumento significativo en la concentración de estos compuestos fenólicos.

Tabla 4.25. Flavonoles (mg/L) por HPLC en vinos de Monastrell a final de fermentación alcohólica, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	Miricetina galactósido	Miricetina glucósido	Quercetina galactósido	Quercetina glucurónido	Quercetina glucósido	Kampferol galactósido	Kampferol glucósido	Kampferol galactósido	Kampferol glucósido	Isorhamnetina glucósido	Siringetina glucósido	Totales
2007	T	2,57b	12,82a	2,27b	2,79ab	10,21c	1,58a	1,11b	3,90a	1,51a	38,76a		
	CU	2,58b	12,47a	1,91ab	3,22ab	9,72bc	1,89a	1,04ab	3,98a	1,92a	38,73a		
	NC	2,31ab	12,43a	1,87ab	3,61b	7,76ab	1,59a	1,25b	3,45a	1,69a	35,96a		
	MPF	1,25a	10,26a	1,22a	2,77ab	7,18a	1,15a	0,62a	3,66a	0,71a	28,82a		
	EC	2,17ab	12,97a	2,12ab	2,92ab	10,28c	1,99a	1,12b	2,69a	1,43a	37,69a		
	G	1,72ab	9,51a	2,15ab	2,27a	8,18abc	0,39a	1,19b	1,70a	0,85a	27,96a		
2009	T	2,11a	28,69a	7,94a	22,64a	60,30b	2,47b	9,34a	1,32a	1,06a	135,87a		
	NC	6,63c	35,85b	7,44a	27,69b	46,95a	2,04a	8,24a	2,47b	2,31d	139,62a		
	MPF	3,54b	31,55a	6,94a	24,29a	51,21ab	1,97a	8,35a	2,04ab	2,11c	132,00a		
	EC	2,34a	29,81a	7,70a	23,05a	55,14ab	2,50b	9,11a	1,58ab	1,23b	132,46a		

Letras diferentes en la misma columna, para cada año, muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa.

En la **Tabla 4.26** se muestran los resultados obtenidos al analizar la composición de proantocianidinas en los vinos de Monastrell en ambas campañas. Tal y como se observó en el contenido de antocianos y flavonoles, los vinos del 2009 también presentaron una mayor concentración total de proantocianidinas que los vinos del 2007. Las concentraciones encontradas en el 2007 (entre 134,92 y 231,08 mg/L) fueron especialmente bajas, siendo inferiores a las reportadas en otros estudios realizados en vinos de Monastrell de la misma zona (Romero-Cascales et al., 2005). Las concentraciones en los vinos del 2009 (entre 479,02 y 686,97 mg/L) si fueron similares a las encontradas en estos estudios.

El porcentaje de (-)-epicatequina de extensión, que puede provenir únicamente de los hollejos, fue mucho menor en los vinos del 2007 que en los del 2009. Además los vinos del 2007 mostraron un menor grado medio de polimerización y un mayor porcentaje de galoilación. Estos resultados indican que en los vinos del 2007 hubo mayor contribución de proantocianidinas provenientes de las semillas, lo que se podría explicar por el hecho de que la uva de Monastrell del 2007 presentó unas semillas menos maduras (IMP del 61,43%) que la uva de Monastrell del 2009 (IMP del 54,22%).

La unidad monomérica más abundante en todos los vinos fue (-)-epicatequina de extensión, y respecto a las unidades terminales, fue (+)-catequina terminal la que se encontró en mayor proporción, resultados que coinciden con los hallados por Busse-Valverde et al., (2011) en vinos de Monastrell.

En la campaña 2007 el tratamiento por congelación de la uva mostró el mayor contenido de proantocianidinas totales, aunque sin diferencias significativas respecto al testigo. En el resto de tratamientos se encontró un menor contenido total de proantocianidinas.

En la campaña 2009 con la maceración prefermentativa se observó un contenido total de proantocianidinas significativamente mayor que en el vino testigo y que en el resto de tratamientos. Aunque también se observó que con

esta técnica el porcentaje de unidades galoidadas fue mayor que en el resto de los vinos y que, además, este vino contenía una menor proporción de (-)-epigallocatequina de extensión. Es decir que la maceración prefermentativa en frío favoreció la extracción de taninos de las semillas, resultado que coincide con los observados en los vinos de Cabernet Sauvignon y Syrah elaborados a partir de uvas con semillas poco maduras. Álvarez et al. (2006) observaron un aumento en la concentración y polimerización de proantocianidinas al utilizar la maceración prefermentativa en frío en vinos de Monastrell aunque, en su caso, observaron el mismo efecto con el uso de nieve carbónica. Bautista-Ortín et al. (2005) observaron que el efecto de diferentes preparados enzimáticos sobre la extracción de taninos en vinos de Monastrell parecía depender del grado de maduración de la uva, encontrando un aumento significativo solo en aquellos casos en los que la uva se encontraba menos madura.

Los resultados obtenidos al analizar los parámetros cromáticos y la composición fenólica en los vinos de Monastrell no mostraron un efecto añada tan acusado como en los vinos de Cabernet Sauvignon y de Syrah, si bien es cierto que tampoco se hallaron tantas diferencias entre las uvas de Monastrell del 2007 y del 2009 como las encontradas en las otras variedades. Aunque algunos estudios han mostrado cierto efecto positivo al emplear la maceración prefermentativa en frío, la adición de nieve carbónica o la adición de preparados enzimáticos en la vinificación de uvas de Monastrell con un bajo grado de maduración (Garijo, 2001; Álvarez et al., 2005; Bautista-Ortín, 2005; Romero-Cascales, 2008), en nuestro estudio no se observó que las técnicas empleadas mejorasen claramente los parámetros cromáticos ni la composición fenólica de los vinos de Monastrell.

Las paredes celulares de los hollejos de Monastrell tienen mayor espesor y poseen mayor cantidad de material celular que las paredes celulares de los hollejos de otras variedades como Cabernet Sauvignon o Syrah (Ortega-Regules et al., 2008). Esto supone una mayor barrera frente a la difusión de los compuestos fenólicos localizados en el interior de las células, lo que explicaría la gran dificultad mostrada por las uvas de Monastrell para la extracción de dichos compuestos y la peor respuesta, respecto a las uvas de Cabernet

Características cromáticas y fenólicas

Sauvignon o Syrah, ante el uso de técnicas de frío o de adición de enzimas de maceración.

Tabla 4.26 Composición de proantocianidinas en vinos de Monastrell a final de la fermentación alcohólica, campañas 2007 y 2009.

Año	Tratamiento	PT	GMP	%G	%C _t	%E _t	%EG _t	%C _e	%E _e	%EG _e	%EGC _e
2007	T	191,14bc	3,56ab	7,49ab	17,78b	9,44a	0,95a	7,59a	49,41a	6,54ab	8,29a
	CU	231,08c	3,70ab	6,28a	16,86ab	9,28a	1,49a	6,29a	51,49a	4,79a	9,81a
	NC	166,11ab	3,68ab	6,23a	16,35ab	9,83a	1,10a	6,16a	51,25a	5,13a	10,18a
	MPF	134,92a	3,15a	8,90ab	15,27ab	14,77b	1,86a	8,62a	44,74a	7,05ab	7,70a
	EC	146,97a	4,06b	9,94b	14,15a	9,01a	1,53a	6,89a	50,26a	8,41b	9,75a
	G	140,33a	3,76ab	9,05ab	14,33a	10,80ab	1,45a	8,48a	46,33a	7,60ab	11,02a
2009	T	479,02a	5,40a	2,22ab	12,27b	5,87ab	0,38a	2,67a	57,35a	1,85ab	19,62ab
	NC	491,09a	7,82b	1,63a	8,18a	5,25a	0,32a	4,34c	58,94a	1,31a	21,65b
	MPF	686,97b	5,36a	3,51c	11,12ab	6,86b	0,70b	3,25b	57,06a	2,81c	18,20a
	EC	519,13a	5,75ab	2,61b	11,24ab	5,74a	0,42a	3,47b	56,75a	2,19b	20,20ab

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; PT: proantocianidinas totales (mg/L); GMP: grado medio de polimerización; %G: porcentaje de galilación; %C_t: porcentaje de (+)-catequina terminal; %E_t: porcentaje de (-)-epicatequina terminal; %EG_t: porcentaje de (-)-epicatequina-galato terminal; %C_e: porcentaje de (+)-catequina de extensión; %E_e: porcentaje de (-)-epicatequina de extensión; %EG_e: porcentaje de (-)-epicatequina-galato de extensión; %EGC_e: porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión;

4.2.3 ANÁLISIS MULTIFACTORIAL

Debido al gran número de datos obtenidos en este estudio, fue conveniente realizar un análisis multifactorial de la varianza (MANOVA) para evaluar el efecto de los distintos factores (variedad de uva, tratamiento empleado y momento de la vinificación) sobre cada una de las variables cromáticas estudiadas durante las dos campañas.

La **Tabla 4.27** recoge los resultados obtenidos en el análisis multifactorial de la varianza de los parámetros cromáticos en la **campaña 2007**. Tal y como se puede observar todos los tratamientos, independientemente de la variedad, dieron lugar a vinos con una mayor intensidad de color y un mayor contenido de antocianos que los vinos testigo. Fueron las técnicas de adición de enzimas y de adición de nieve carbónica aquellas en las que se observó un aumento más significativo de estos parámetros. Los tratamientos de adición de enzimas también produjeron un aumento significativo del índice de polifenoles totales. En los vinos obtenidos mediante una elaboración tradicional se observó mayor valor del croma (C^*), pero con tonalidades más desplazadas hacia los amarillos (mayor b^*).

Respecto a las diferentes variedades, los vinos de Cabernet Sauvignon fueron notablemente los más coloreados, presentando una mayor concentración de antocianos, un mayor índice de polifenoles totales y una mayor fracción de antocianos copigmentados. Por el contrario, los vinos de Monastrell fueron los que presentaron menor intensidad de color y menor contenido de compuestos fenólicos.

Como era de esperar, con la evolución de los vinos se observó una caída de los valores de intensidad de color y del contenido de compuestos fenólicos. Disminuyó la fracción de color debida a antocianos copigmentados y aumentó el porcentaje de color debido a pigmentos poliméricos.

Tabla 4.27. Análisis multifactorial de la varianza de los parámetros cromáticos en la campaña 2007.

	IC	T	L*	a*	b*	C*	H*	FCA	FFA	FPP	% Rojo	% Amarillo	% Azul	IPT	AT
T	12.98a	1.59a	14.89c	43.38c	22.40d	49.19c	25.12b	0.17a	0.35a	0.47c	41.11ab	21.21bc	37.67a	40.54a	331.25a
CU	14.51bc	1.79b	13.71bc	42.26bc	20.46bc	47.29b	23.82ab	0.18a	0.35a	0.47c	40.42ab	20.73abc	38.85a	41.38a	359.85b
NC	15.67d	1.85b	12.38ab	41.01ab	19.17ab	45.66ab	22.84a	0.20c	0.38b	0.42a	41.20ab	19.55a	39.26a	41.23a	409.20cd
MPF	14.38b	1.66a	14.00c	41.06ab	21.24cd	46.76b	25.00b	0.20c	0.35a	0.49b	40.21a	21.68c	38.11a	42.92a	388.28c
EC	15.63cd	1.67a	12.48ab	40.85ab	19.58ab	45.70ab	23.22a	0.20c	0.37b	0.43ab	41.71ab	20.53abc	37.76a	47.04b	416.03cd
G	15.82d	1.67a	12.14a	40.35a	18.59a	44.85a	22.31a	0.19bc	0.37b	0.43ab	42.19b	20.35ab	37.46a	47.62b	419.77d
Syrah	14.47b	1.94b	12.37b	42.34b	19.33b	46.74b	23.54b	0.19a	0.37b	0.44b	38.36b	17.60b	44.05a	45.79b	366.01b
Cabernet Sauvignon	22.44c	1.99b	4.92a	30.11a	8.48a	31.30a	15.47a	0.21b	0.38b	0.42a	30.00a	10.70a	59.30b	56.61c	618.14c
Monastrell	7.45a	1.19a	22.51c	51.99c	32.91c	61.66c	32.14c	0.19a	0.33a	0.47c	33.73ab	11.20a	55.07b	27.96a	178.03a
FFA	19.77c	1.68a	11.57a	38.59a	19.37a	43.75a	22.70a	0.34c	0.44c	0.21a	39.06a	16.69a	44.25c	53.42c	662.66c
Embotellado	13.25b	1.77b	13.11b	43.10b	21.02b	48.29b	24.54b	0.14b	0.40b	0.46b	38.57a	18.75b	42.68b	40.54b	292.80b
6M	11.34a	1.67a	15.12c	42.77b	20.33ab	47.67b	24.00b	0.10a	0.24a	0.67c	45.80b	26.58c	27.62a	36.39a	206.72a
Tratamiento x Variedad	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0.0011	P<0.0001	P<0.0001	0.0983	0.0107	0.0025	P<0.0001	P<0.0001
Tratamiento x Momento	0.0116	0.6008	0.0261	0.0313	0.3240	0.0428	0.9122	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0.8349	0.4238	0.5543	0.1762	0.0025
Variedad x Momento	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0.0652	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
Tratamiento x Variedad x Momento	0.7829	0.8500	0.4218	0.1054	0.4454	0.0653	0.8055	0.0003	P<0.0001	P<0.0001	0.2958	0.9494	0.3248	0.9986	0.0208

Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas según test de Duncan (p<0.05) n=3. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L); T.T: taninos totales (mg/L); FFA: final de fermentación alcohólica; 6M: 6 meses después del embotellado.

Los resultados del análisis multifactorial de la varianza de los parámetros cromáticos en la **campaña 2009** se muestran en la **Tabla 4.28**.

Los resultados no mostraron diferencias significativas entre tratamientos y testigo en la mayor parte de los parámetros cromáticos. Aunque no se puede asegurar que estos resultados fuesen independientes de la variedad, puesto que se observaron interacciones ($P > 0.0001$) entre los factores tratamiento y variedad.

En esta campaña no se observaron tantas diferencias entre los parámetros cromáticos de los vinos de las diferentes variedades. Acaso destacar que los vinos de Syrah mostraron menor intensidad de color, menor índice de polifenoles totales y mayor fracción de color debida a antocianos libres que los vinos de Cabernet Sauvignon y Monastrell.

Con la evolución de los vinos también se observó un esperado descenso de la intensidad de color y del contenido de compuestos fenólicos en los vinos. Disminuyó la fracción de color debida a antocianos copigmentados, aumentando el porcentaje de pigmentos poliméricos. Se redujo el porcentaje de la componente azul en la contribución al color total de los vinos, aumentando las componentes roja y amarilla.

Los resultados del análisis multifactorial de la varianza mostraron que los tratamientos enológicos empleados tuvieron más repercusión sobre los vinos de la campaña 2007.

Tabla 4.28. Análisis multifactorial de la varianza de los parámetros cromáticos en la campaña 2009.

	IC	T	L*	a*	b*	C*	H*	FCA	FFA	FPP	% Rojo	% Amarillo	% Azul	IPT	AT
Tratamiento	T	11.93a	1.77a	10.43a	40.47b	17.38b	44.13b	0.23a	0.30a	0.47a	31.53a	13.40a	55.07a	38.96a	328.11a
	NC	12.15a	1.76a	9.55a	37.73a	16.05ab	41.13a	0.22a	0.31a	0.47a	31.65a	13.43a	54.93a	39.72a	324.82a
	MPF	11.98a	1.76a	10.28a	40.18b	16.83ab	43.65b	0.23a	0.30a	0.47a	31.21a	14.98a	53.01a	39.65a	325.38a
	EC	12.26a	1.78a	9.49a	37.36a	15.80a	40.96a	0.22a	0.31a	0.48a	31.34a	13.72a	54.94a	39.58a	325.79a
Variedad	Syrah	10.42a	1.69a	11.70c	41.99c	19.63c	46.47c	0.20a	0.35c	0.44a	31.91b	14.87a	53.24a	37.48a	329.51a
	Cabernet Sauvignon	12.76b	1.77ab	7.89a	34.88a	13.32a	37.44a	0.21a	0.29b	0.51c	31.31a	13.66a	55.03ab	40.81c	327.06a
	Monastrell	13.05b	1.84b	10.23b	40.14b	16.60b	43.50b	0.26a	0.27a	0.47b	31.08a	13.13a	55.80b	40.15b	321.50a
Momento de elaboración	FFA	15.49c	2.17c	13.04b	44.96b	22.31b	50.24b	0.50c	0.36b	0.14a	28.40a	9.97a	61.61c	49.66c	630.57c
	Embotellado	11.62b	1.64b	8.24a	36.51a	14.03a	39.19a	0.12b	0.36b	0.51b	32.35b	14.74b	52.95b	37.31b	220.03b
	6M	9.12a	1.48a	8.54a	35.54a	13.21a	37.98a	0.05a	0.19a	0.76c	33.55c	16.92c	49.53a	31.47a	127.47a
Interacciones	Tratamiento x Variedad	0.0133	0.9017	0.0036	0.0025	0.0031	0.0024	0.0128	0.0130	0.0005	0.8245	0.4469	0.6888	0.3177	0.0471
	Tratamiento x Momento	0.0025	0.9603	0.0531	0.1027	0.1141	0.1102	0.2895	0.3648	0.6005	0.3590	0.5481	0.7748	0.1770	0.0003
	Variedad x Momento	P<0.0001	0.0002	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0.1108	0.0381	P<0.0001	P<0.0001
	Tratamiento x Variedad x Momento	0.1035	0.4887	0.0039	0.0089	0.0046	0.0078	0.0051	0.0912	0.5758	0.1408	0.2160	0.4743	0.4463	0.1174

Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p < 0.05$) $n = 3$. Abreviaturas: T: testigo; CU.: congelación de la uva; NC.: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L); TT: taninos totales (mg/L); FFA: final de fermentación alcohólica; 6M: 6 meses después del embotellado.

**5. INFLUENCIA SOBRE LAS
CARACTERÍSTICAS AROMÁTICAS
DE LOS VINOS**

5.1 INTRODUCCIÓN

El aroma es una de las principales características organolépticas de un vino. La percepción del aroma es el resultado de la interacción entre un gran número de compuestos químicos y los receptores sensoriales. Tras la apreciación visual en la degustación de un vino, el consumidor realiza una apreciación olfativa y finalmente gustativa. Las sustancias aromáticas son compuestos volátiles que se perciben directamente a través del olfato y, posteriormente, por vía retronasal durante la deglución. El término “flavor” se utiliza para describir conjuntamente la percepción nasal directa y la realizada por vía retronasal (Hadley et al., 2004).

El aroma de un vino es muy complejo. Esta complejidad se debe a que es el resultado final de una larga secuencia biológica, bioquímica y tecnológica, y al gran número de componentes volátiles que lo forman (Bayonove et al., 2000). Se han identificado compuestos volátiles en concentraciones que oscilan desde nanogramos hasta gramos por litro (Styger et al., 2011). Los compuestos volátiles presentes en el vino son muy diversos: ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, fenoles, lactonas, terpenos, C13-norisoprenoides, pirazinas y derivados azufrados, siendo alcoholes, ésteres y ácidos los que se encuentran en mayor concentración. La mayor o menor presencia de estos compuestos en un vino depende de muchos factores, como son la variedad, el clon, la añada, la zona de cultivo, las prácticas culturales, la manipulación de la uva antes de la fermentación, las fermentaciones, el envejecimiento y la conservación (Boido et al., 2003). Así, los constituyentes del aroma de un vino han sido clasificados según su origen a lo largo de la cadena de elaboración (Cordonnier y Bayonove, 1981) como: **varietales**, característicos de la variedad de la uva y de las prácticas culturales realizadas en la vid; **prefermentativos**, formados durante la etapas que van desde la vendimia hasta el principio de la fermentación alcohólica; **fermentativos**, producidos durante la fermentación alcohólica y durante la fermentación maloláctica en el caso de que esta tenga lugar, y **postfermentativos**, que son los constituyentes aromáticos generados durante el envejecimiento y conservación del vino. Los constituyentes varietales y prefermentativos son los responsables del aroma primario y los

constituyentes fermentativos y postfermentativos son los responsables de los aromas secundario y terciario respectivamente.

5.1.1 AROMA PRIMARIO

Se considera aroma primario al generado por los constituyentes aromáticos varietales y prefermentativos. Los compuestos químicos responsables del aroma primario se encuentran principalmente en el hollejo de la uva (Gómez et al., 1994) y pueden estar en forma olorosa (odorante) o como precursores no olorosos (odorígenos). Los odorantes son sustancias volátiles libres. Los odorígenos, que son más abundantes, se encuentran ligados a otros compuestos y pueden estar en formas glicosiladas. Las formas glicosiladas están formadas por agliconas odorantes (terpenoles, fenoles, C₆,...) unidas a azúcares. En vinos de variedades neutras (Monastrell, Cabernet Sauvignon, Syrah, Tempranillo, Merlot,...) la mayor parte de los aromas varietales proceden de la liberación de las agliconas de sus precursores (Salinas, 2005). Los azúcares que constituyen los precursores son fundamentalmente glucosa, arabinosa, rammnosa y apiosa. Durante los procesos de vinificación los precursores se pueden transforman en compuestos olorosos. La liberación de las agliconas en la vinificación se produce lentamente con el envejecimiento, ya que en vinos jóvenes las formas glicosiladas son relativamente estables (Günata et al., 1988).

Los **terpenoles** y los **carotenoides** son los principales compuestos responsables del aroma varietal. La biosíntesis de estos compuestos comienza con la formación de ácido mevalónico a partir de glucosa, vía acetil-CoA. Los terpenoles intervienen ampliamente en la tipicidad de cepas aromáticas tipo Moscatel. Los monoterpenos son los terpenoles más abundantes y se pueden encontrar en la uva en forma libre o en forma glicosiladas, aumentando la proporción de las formas glicosiladas con la maduración de la uva (Fenoll et al, 2009). Aportan notas frutales muy características, como es el caso del linalol o el geraniol. También se pueden encontrar terpenoles en forma de sesquiterpenos (como la rotundona, característica del aroma picante en vinos de Syrah) (Siebert et al., 2006), óxidos terpénicos, aldehídos como el geranial o

el citronelal, dioles terpénicos y, en menor medida, hidrocarburos terpénicos tipo limoneno y algunos ácidos como el ácido transgeránico.

Los carotenoides son los precursores de compuestos aromáticos muy olorosos tipo isoprenoide. Son poco solubles en medio acuoso pero se degradan por acción de la luz y de las oxidasas (polifenoloxidasas y lipoxigenasa principalmente), con la ruptura de la baya y durante la fermentación, sufriendo oxidaciones acopladas y generando fragmentos más pequeños de 9, 10, 11, 12 y 13 átomos de carbono, que son más solubles. Los C13-norisoprenoides son los que presentan características aromáticas más interesantes como es el caso de la β -ionona, β -damascenona, β -damascona y el β -ionol, que presentan notas a violeta, frutas exóticas, rosa y flores respectivamente. Se manifiestan fundamentalmente durante el envejecimiento del vino y son los responsables de que variedades no aromáticas den lugar a vinos de alta calidad (Winterhalter et al., 1990).

Otros compuestos relacionados con la tipicidad aromática de la cepa son los **tioles volátiles**, característicos de la variedad Cabernet Sauvignon y de las cepas emparentadas, a las que aportan notas de verdor. En la uva se encuentran en formas no olorosas, pero durante la fermentación alcohólica por acción de las levaduras, se rompen los enlaces de cisteína, liberándose así las formas tiol. (Swiegers y Pretorius, 2007).

Los **compuestos C6** constituyen también un importante grupo de sustancias aromáticas libres, formadas en las etapas prefermentativas de la vinificación. Se localizan principalmente en los hollejos de la uva y se forman a partir de los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de la membrana, por vía enzimática. Los efectos mecánicos de los tratamientos prefermentativos provocan fenómenos de ruptura a nivel celular, permitiendo a los sistemas enzimáticos entrar en contacto con los sustratos presentes en el hollejo. La presencia de oxígeno, durante la vendimia y el despalillado, también favorecen el ataque enzimático, y por lo tanto la formación de estos aromas. Los principales compuestos C6 encontrados en el vino son aldehídos (hexanal, cis-

3-hexenal y trans-2-hexenal) y sus correspondientes alcoholes, que aportan al vino aromas herbáceos y sabores amargos.

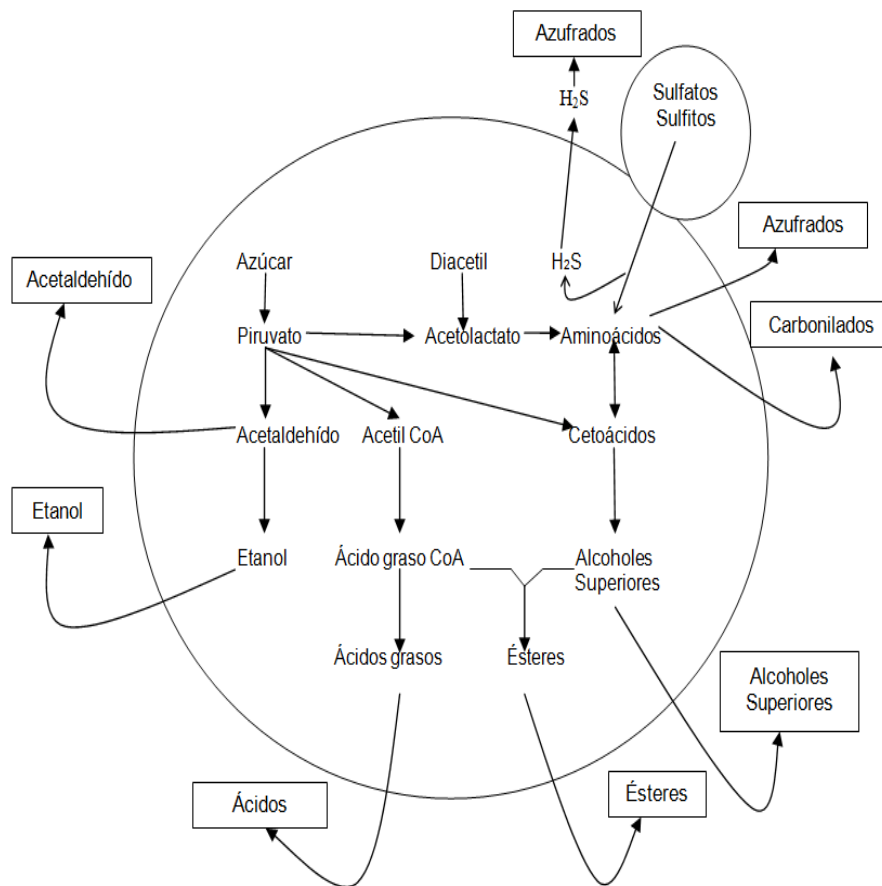
5.1.2 AROMA SECUNDARIO

Los compuestos responsables del aroma secundario son los constituyentes fermentativos, formados principalmente por las levaduras durante la fermentación alcohólica y por las bacterias lácticas en el caso de la fermentación maloláctica. Las sustancias volátiles generadas en los procesos fermentativos son muy numerosas y complejas, y son las responsables de la nota vinosa común a todos los vinos, especialmente en los vinos jóvenes. Los principales compuestos químicos que constituyen el aroma secundario son alcoholes, ésteres, aldehídos y ácidos, siendo los alcoholes superiores y los ésteres los más abundantes.

Durante la **fermentación alcohólica** las cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, mediante sus enzimas celulares, degradan los dos azúcares fermentables de la uva, la glucosa y la fructosa, para producir etanol y dióxido de carbono. Pero también se forman, a través de la fermentación glicero-pirúvica, glicerol y ácido pirúvico. El ácido pirúvico actúa como intermedio en la formación de numerosos productos secundarios. La **Figura 5.3** muestra la formación de los principales compuestos aromáticos durante la fermentación alcohólica, procedentes de los metabolismos glucídico, nitrogenado, lipídico y azufrado (Rojas, 2002). Estos compuestos se pueden clasificar, según la familia química, en: alcoholes, ácidos grasos y sus ésteres, compuestos carbonilados y compuestos azufrados. Entre los productos derivados de la fermentación alcohólica también se encuentran etanol, glicerol, ácido acético y acetaldehído, que, aunque no tienen unas características aromáticas muy relevantes, pueden jugar un papel importante debido a sus altas concentraciones. Así, una elevada concentración de etanol puede hacer disminuir las intensidades aromáticas frutales o florales en un vino (Le Berre et al., 2007). Al glicerol se le ha atribuido históricamente una contribución positiva al sabor y complejidad de un vino, aunque algunos estudios han demostrado que la adición de glicerol no afecta a la percepción gustativa en un vino modelo

(Lubbers et al., 2001). El ácido acético y el acetaldehído, a elevadas concentraciones, aportan aromas desagradables de vinagre y de verdor respectivamente.

Figura 5.3. Formación de compuestos aromáticos durante la fermentación alcohólica (Rojas, 2002).



Los principales **alcoholes superiores** sintetizados durante la fermentación alcohólica son n-propanol, isobutanol, los alcoholes amílico e isoamílico y el feniletanol. Su contenido total medio en el vino es del orden de 400 a 500 mg/L, a mayores concentraciones aportan notas fuertemente alcohólicas o vinosas, Sólo a bajas concentraciones contribuyen con aromas agradables de verdor. Los precursores de estos compuestos son los aminoácidos existentes en el mosto y los que sintetizan las levaduras a partir de los azúcares (Garijo, 2001).

Los **ácidos grasos** y sus **ésteres**, junto con los alcoholes superiores, son considerados los principales marcadores del aroma fermentativo. Los ácidos grasos tienen olores juzgados como desagradables, aunque su concentración en el vino no suele sobrepasar su umbral de percepción, sin embargo son necesarios para un buen equilibrio del aroma fermentativo, puesto que los ésteres derivados constituyen el grupo mayoritario de los compuestos responsables del aroma del vino (Etiévant, 1991; Ferreira et al., 1995). Los ácidos grasos se forman porque el proceso de alargamiento del acetil-CoA se ve interrumpido por hidrólisis. Los ácidos grasos reaccionan con los alcoholes superiores para dar lugar a los ésteres correspondientes. Pero esta reacción no enzimática es demasiado lenta para producir la gran cantidad de ésteres que se encuentran normalmente en el vino. La gran mayoría de los ésteres se forman por vía enzimática, mediante la activación inicial de los ácidos grasos por combinación con la coenzima A (CoA) (Lambrechts y Pretorius, 2000). Así, los ésteres etílicos (como el octanoato de etilo, hexanoato de etilo o butanoato de etilo) se forman a partir de la etanolisis de la acil-CoA, que es un intermedio del metabolismo de los ácidos grasos. Los acetatos (como el acetato de isoamilo, acetato de propilo, acetato de hexilo o acetato de pentilo) son el resultado de la reacción entre la acetil-CoA y los alcoholes superiores formados por la degradación de los aminoácidos (Saerens et al, 2008). Entre los ácidos, sólo los ácidos carboxílicos C4 a C10 son considerados influyentes en el aroma, puesto que son los que tienen suficiente volatilidad o pueden estar en concentraciones elevadas. Los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico, que aportan notas lácticas, son los más característicos y a concentraciones entre 4 y 10 ppm contribuyen con un olor suave y redondo al aroma global del vino, aunque a concentraciones elevadas (>20ppm) pueden considerarse desagradables (Shinohara, 1985). Los ésteres etílicos y los acetatos aportan las notas frutales características de los vinos jóvenes. Su formación depende ampliamente de las condiciones de fermentación. En condiciones anaeróbicas estrictas y con fermentaciones a baja temperatura, se dan los factores más favorables para su formación (Nykänen, 1986; Cuénat et al., 1996; Garijo, 2001).

Los **compuestos carbonilados** son formados por las levaduras mediante la descarboxilación de los ácidos α -cetónicos durante la biosíntesis de los alcoholes superiores. Suelen estar en cantidades no detectables, debido a la fuerte capacidad de la levadura para reducirlos a alcoholes y a que, al pH del vino, reaccionan con el dióxido de azufre y con el etanol para formar, respectivamente, derivados sulfíticos y acetales. Sólo algunos compuestos carbonilados son capaces de influir en el aroma. Entre ellos hay que destacar la acetoina y el diacetilo y otros compuestos menores como el fenilacetaldehído (Bayonove et al.; 2000).

Entre los **compuestos azufrados** se encuentran tioles, sulfuros y tioésteres. Suelen tener una naturaleza sensorial negativa, con caracteres de reducción (descriptores de huevo podrido o verdura cocida) que constituyen un problema en la vinificación, ya que pueden enmascarar las características frutales y varietales de un vino. Se dividen en compuestos azufrados ligeros o pesados, según sea su peso molecular. Presentan un umbral de percepción bajo que disminuye según aumenta el peso molecular. Se forman como intermedios de reducción durante la síntesis de los aminoácidos. El sulfuro de hidrógeno requiere especial interés, ya que puede provocar un temido aroma a reducción. Su formación tiene lugar durante la síntesis de los aminoácidos cisteína y metionina, donde actúa como intermedio de reducción de los sulfatos y sulfitos presentes en el mosto y añadidos por el viticultor. En situaciones de carencia de nitrógeno asimilable, el H_2S no puede combinarse para formar los aminoácidos y se acumula en la matriz del vino.

Los **compuestos nitrogenados** volátiles más abundantes en el vino son las acetamidas y las amidas. Son producidas mediante la acetilación de las aminas primarias por medio de las levaduras. Se consideran poco influyentes sobre el aroma del vino, porque al pH del vino se encuentran en formas protonadas no volátiles o porque sus umbrales de detección son muy elevados (Etiévant, 1991).

Las **lactonas** producidas durante la fermentación se obtienen por la esterificación intramolecular de los hidroxiaácidos. Los 5-hidroxiaácidos conducen

a las Δ -lactonas y los 4-hidroxiácidos a las γ -lactonas, estas últimas son las más abundantes y se clasifican en γ -butirolactonas y en alquil- γ -lactonas. Las lactonas formadas durante la fermentación tienen una influencia débil sobre el aroma. Son las lactonas producidas durante el envejecimiento del vino en barrica las que aportan notas aromáticas importantes (Rodríguez, 2011).

Los principales **fenoles volátiles** producidos por las cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son el 4-vinilfenol, el 4-vinilguayacol y, en menor medida, la vainillina, que aportan notas a clavel, clavo y vainilla respectivamente. Se forman por las levaduras mediante decarboxilación enzimática de los ácidos cumárico y ferúlico. El contenido en fenoles volátiles en vinos tintos es mucho menor que en blancos, debido a la presencia en las uvas tintas de fracciones fenólicas inhibitorias de la actividad cinamoildescarboxilasa de la levadura (Chatonnet et al., 1993). La formación de etilfenoles en cantidades importantes provoca un defecto fenolado en el vino, aunque suele ser atribuido a contaminación por levaduras *Brettanomyces dekkeri* (Chatonnet et al., 1995).

Durante la **fermentación maloláctica** también se produce un cambio en el perfil aromático del vino. Generalmente se observan unos efectos positivos ya que, además de una disminución de la acidez, se produce una disminución de las notas vegetales excesivas. Los compuestos carbonilados son los que sufren una mayor variación durante la fermentación maloláctica, concretamente el diacetilo y su producto de semireducción la acetoína. Se forman a partir del ácido cítrico, vía ácido pirúvico (Catania y Avagnina, 2007). El descriptor del diacetilo es la mantequilla, y es el aroma más asociado a la fermentación maloláctica. Entre los ácidos formados durante la fermentación maloláctica el más importante es, sin duda, el ácido L-(+)-láctico por degradación del ácido málico. Las bacterias lácticas homofermentativas también degradan los azúcares fermentables, casi exclusivamente, en ácido láctico. Las bacterias heterofermentativas los degradan en varios metabolitos entre los que se encuentran el ácido láctico y el ácido acético, responsable del picado del vino. Otros ácidos formados por las bacterias lácticas son el ácido pirúvico, el ácido succínico y el ácido 4-hidroxibutírico, pero no tienen influencia sobre el aroma.

Respecto a los ésteres, algunos autores han citado un aumento del lactato y succinato de etilo, que aportan notas lácticas y de café, y del acetato de etilo (notas desagradables a pegamento) (Bayonove et al., 2000; Suarez-Lepe, 2003). También se ha encontrado una disminución en el contenido en alcoholes amílicos e isoamílicos y, en algunas ocasiones, un aumento del contenido en n-propanol y 2-butanol (Suarez-Lepe, 2003).

5.1.3 AROMA TERCIARIO

El aroma terciario o “bouquet” está caracterizado por los constituyentes postfermentativos, originados durante el envejecimiento y la conservación del vino, tanto en botella como en bodega. La composición de los compuestos volátiles se modifica debido a las reacciones fisicoquímicas y biológicas, apareciendo compuestos nuevos y transformándose los existentes. El aroma afrutado de los vinos jóvenes desaparece y evoluciona hacia un aroma más complejo. Se pueden distinguir dos modos de maduración de un vino en función de la presencia o ausencia de oxígeno, produciéndose fenómenos de oxidación o reducción respectivamente.

Entre los vinos criados en condiciones oxidantes se pueden distinguir dos categorías según los procesos oxidativos implicados. Una de ellas es la de los vinos Madeira, Oporto y algunos vinos dulces franceses, donde la oxidación es de naturaleza físico-química producida únicamente por el contacto con el aire durante el envejecimiento. En la otra categoría se produce una oxidación biológica como resultado del desarrollo de levaduras de velo, es el caso de vinos como el Jerez o el Tokaï. Tanto con el envejecimiento oxidativo químico como con el biológico, se produce un aumento en la concentración de compuestos como ésteres, aldehídos, acetales y lactonas (Etiévant, 1991).

En los vinos envejecidos en botella son las reacciones de reducción las que controlan la formación de aromas terciarios. La falta de oxígeno genera un potencial de oxido-reducción bajo. Los alcoholes superiores evolucionan muy poco en estas condiciones y los ésteres sufren un reajuste muy lento por hidrólisis o esterificación. Los monoterpenoles experimentan modificaciones

moleculares, debido a las reacciones ácido-catalizadas que tienen lugar durante el envejecimiento, así, los derivados hidroxilados no olorosos del linalol pueden dar lugar a terpenos olorosos como los óxidos furánicos y, por otro lado, se puede producir un enriquecimiento en terpenoles cíclicos. Estos terpenoles tienen umbrales de percepción elevados, lo que explica la pérdida del aroma frutal en vinos de cepas aromáticas (Bayonove et al., 2000). Aumenta la concentración de compuestos norisoprenoides como la β -damascenona (Strauss et al., 1986) y se ponen de manifiesto otros norisoprenoides que estaban bajo formas glicosiladas, como el 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TNT) (Winterhalter, 1990). La presencia de algunos vinilfenoles, como el 4-vinilfenol y el 4-vinilguayacol, se ve atenuada, disminuyendo así el defecto fenolado que estos compuestos pueden provocar (Chatonnet et al., 1993).

Durante el proceso de crianza de los vinos en bodega, la madera aporta un conjunto de sustancias aromáticas que modifican su carácter organoléptico. Su mayor o menor presencia depende de diversos factores como son el tiempo de contacto, el origen de la madera o el tipo de tostado (Garde-Cerdán et al., 2004; Ortega-Heras et al., 2007; Rodríguez, 2011). Compuestos como la vainillina, el eugenol y las whiskylactonas tienen una gran repercusión debido a su bajo umbral de percepción (Garijo, 2001).

5.1.4 PERCEPCIÓN DE LAS NOTAS AROMÁTICAS

Un aspecto importante de todos los compuestos que contribuyen al aroma es la sensación que produce su olfacción. Esta sensación abarca tres cualidades: sensación cualitativa, relativa a la identificación del olor; sensación cuantitativa, relativa a la intensidad del olor y sensación afectiva, relacionada con la aceptación o rechazo que el olor genera. Estas tres cualidades permiten describir con propiedad el aroma de un producto.

Para que una sustancia produzca la sensación de olor debe alcanzar la pituitaria en cantidad suficiente para desencadenar una respuesta que recoja el cerebro. La volatilidad es una condición necesaria, pero no suficiente, para que

una sustancia huela. Es necesario también que tenga un grupo osmóforo y una estereoquímica adecuada. Para conocer la importancia sensorial de una sustancia se necesitan dos valores: su concentración y su umbral de detección olfativa en la matriz que se estudia, en nuestro caso, el vino. El umbral de detección se define como la concentración mínima de la sustancia capaz de ser percibida por una media de la población (Cacho et al., 2001). El cociente entre la concentración de una sustancia y su umbral de detección olfativa se conoce como valor de aroma (OAV) y se considera que una sustancia no participa en el aroma cuando su valor de aroma es menor que la unidad. La **Tabla 5.1** recoge los descriptores aromáticos, los umbrales de detección y los rangos de concentración habituales de los principales compuestos aromáticos presentes en vinos tintos jóvenes.

Estudios recientes han sugerido que algunos compuestos cuyo valor de aroma es menor que la unidad pueden contribuir al aroma del vino y, al contrario, compuestos con un OAV mayor que la unidad, a veces no contribuyen individualmente al aroma del vino (Cacho et al., 2001; Francis y Newton, 2005; Ferreira, 2007). Esto se debe a que el concepto y los datos de valores de aroma permiten juzgar de manera objetiva la contribución de los distintos compuestos aromáticos, pero no tiene en cuenta los efectos sinérgicos y antagónicos de los odorantes. Así, en función de estos efectos, los compuestos que comparten características aromáticas se pueden agrupar en familias (Ferreira, 2007). Algunos compuestos no contribuyen individualmente al aroma global del vino, pero conjuntamente tienen un efecto aditivo y pueden transmitir notas aromáticas específicas. Otros compuestos no transmiten notas aromáticas específicas incluso aunque actúen conjuntamente, pero si son capaces de contribuir a las notas genéricas. Compuestos como los alcoholes superiores y los ácidos grasos integran un buffer aromático responsable de la nota “vinosa” común a todos los vinos, en el que no es posible identificar las notas de los componentes individuales.

Tabla 5.1. Descriptor aromático, rango de concentración y umbral de detección de los principales compuestos aromáticos en vinos tintos jóvenes (Cedrón, 2004; Francis y Newton, 2005).

Compuestos	Descriptor	Concentración (µg/L)	Umbral de detección (µg/L)
Alcoholes			
Propanol	Alcohólico, dulzón	5000-125000	300000
Isobutanol	Alcohólico, disolvente	25700-86900	40000
Alcohol isoamílico	Malta, quemado	83953-333032	30000
2-Feniletanol	Floral, rosa, polen	9000-153269	14000
Alcoholes C6			
1-Hexanol	Hierba cortada, resina	2100-13200	8000
Cis-3-hexenol	Hierba cortada	7.2-651	400
Acetatos			
Acetato isoamilo	Plátano	118-4300	30
Acetato de hexilo	Manzana madura, frutal	0-4800	670-2400
Acetato de etilo	Pegamento, piña	150-257000	12300
Acetato de butilo	Frutal, dulzón	10-1200	1830
2-Feniletacetato	Rosa, polen, tabaco	0.54-800	250
Ésteres etílicos			
Butirato de etilo	Manzana	69.2-371	20
Propianato de etilo	Fruta sintética, manzana	Trazas-20000	1800
Isobutirato de etilo	Dulce, caucho	9.8-94	15
Isovalerato de etilo	Frutal	2.2-36.1	3
Hexanoato de etilo	Piel de manzana, fruta	153-622	5-14
Octanoato de etilo	Frutal, dulzón	138-783	2-5
Decanoato de etilo	Frutal, dulzón	14.5-215	200
Ácidos			
Ácido isobutírico	Mantequilla, queso	434-2345	2300
Ácido isovalérico	Rancio, ácido, sudor	305-1151	33.4
Ácido acético	Vinagre, agrio	69110-313310	200000
Ácido butírico	Queso, rancio	434-4719	173
Ácido hexanóico	Grasa, lácteo	853-3782	420
Ácido octanóico	Grasa, lácteo	562-4667	500
Ácido decanóico	Grasa, lácteo	62.1-857	1000
Monoterpenos			
Linalol	Floral, lavanda	1.7-10.1	25.2
Geraniol	Rosa, geranio	0.91-44.4	30
Fenoles Volátiles			
4-Etilguayacol	Especiado, clavo	nd-116	33
4-Vinilguayacol	Clavo, curry	0.2-15	10-40
Norisoprenoides			
β-Damascenona	Manzana, rosa, polen	0.29-4.7	0.05
β-Ionona	Floral, violeta, frambuesa	0.032-0.9	0.09
Otros compuestos			
Metionol	Coliflor hervida, cebolla	166-2398	1000
Diacetilo	Lácteo, mantequilla	50-5000	4000

El análisis cualitativo de los compuestos volátiles del vino ha puesto de manifiesto que existen más de 1000 compuestos aromáticos que pueden estar presentes en los vinos (Styger et al., 2011), pero el número de odorantes activos, con concentraciones superiores a su umbral de percepción y con repercusión en las notas aromáticas, no suele superar los 60 componentes y sólo unos 20 odorantes se encuentran en la mayoría de los vinos, constituyendo así la base del aroma (Cacho et al., 2006). De estos 20 compuestos, sólo unos pocos se encuentran normalmente a altas concentraciones (octanoato de etilo, β -damascenona, hexanoato de etilo y acetato de isoamilo) con valores de aroma superiores a las 20 unidades y otros pocos presentan valores de aroma superiores a 5 unidades (alcoholes isoamílicos, 2-feniletanol, ésteres etílicos de los ácidos isobutírico e isovalérico, ácidos hexanoico y octanoico y el diacetilo). Todos estos compuestos se generan durante la fermentación, excepto la β -damascenona, que proviene directamente de las uvas. Otros compuestos que también están siempre presentes, pero generalmente con un valor de aroma pequeño, son el etanal, el ácido acético y el acetato de etilo.

En los vinos tintos jóvenes, más del 70% de las unidades de aroma corresponden a subproductos generados durante la fermentación (López, 1999). Los compuestos que más contribuyen al aroma son los ésteres etílicos y los acetatos que le aportan un aroma frutal (hexanoato de etilo, octanoato de etilo, butirato de etilo, acetato de isoamilo), los ácidos butírico, hexanoico y octanoico (descriptor lácticos y grasos), los alcoholes isoamílico y fenilacético (notas alcohólicas o fusel), el diacetilo (notas a mantequilla) y la β -damascenona (descriptor floral).

5.1.5 INFLUENCIA DE LAS TÉCNICAS ENOLÓGICAS SOBRE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA.

La formación de los compuestos aromáticos en la uva está condicionada por diversos factores edafológicos y agronómicos, como son la variedad, el clon, el tipo de portainjerto, las horas de insolación, el tipo de suelo y las prácticas culturales como el riego, la poda, la fertilización o la aplicación de plaguicidas.

Numerosos estudios se han centrado en conocer cómo influyen todos estos factores sobre el contenido de aromas varietales (Zoecklein et al., 1998; Gómez-Plaza et al., 1999; Bureau et al., 2000a y 2000b; Oliveira et al., 2004; Oliva et al., 2008; Zamuz et al., 2009).

En la uva, la mayor parte de los compuestos aromáticos se localiza en los hollejos (Pogorzelski et al., 2007). La transferencia de estos compuestos desde la uva al mosto está influenciada por las condiciones de la vinificación. Durante la fermentación alcohólica, con el metabolismo de las levaduras, se liberan glucosidasas que pueden hidrolizar los enlaces glucosídicos de los odorígenos varietales, liberándose así las formas olorosas (Hernández-Orte et al., 2008). Es durante la fermentación, por acción de las levaduras, cuando se generan la mayor parte de compuestos aromáticos (alcoholes superiores, ácidos, esterés,...), por lo que la cantidad relativa de estos compuestos en el vino está condicionada por la composición del medio de fermentación (pH, azúcares, aminoácidos y precursores aromáticos) (Lee et al., 2004; Hernández-Orte et al., 2005). Otros factores influyentes son las condiciones de temperatura y presencia de oxígeno en las que tiene lugar la fermentación, ya que también afectan al metabolismo de las levaduras (Plata et al., 2005). Las altas temperaturas y las oxidaciones provocan una disminución en la concentración de compuestos aromáticos presentes en el mosto. Por el contrario, las técnicas que favorecen la maceración de las partes sólidas de la uva y la liberación de los precursores aromáticos glicosilados, producen un aumento en el perfil aromático de los vinos (Piñeiro et al., 2006; Selli et al., 2006).

La maceración prefermentativa en frío resulta una técnica muy útil para aumentar la concentración de compuestos varietales en el mosto y, posteriormente, en el vino, debido a la cesión de compuestos volátiles libres y ligados de los hollejos y a la liberación de agliconas de las formas ligadas, mediante la actividad residual de las levaduras propias de la uva (Sánchez-Palomo et al., 2009). Cuando la maceración prefermentativa se lleva a cabo con bajadas bruscas de temperatura, mediante congelación del mosto, se produce una rápida ruptura de las paredes celulares, provocada por el aumento de volumen del líquido intracelular, que rompe las membranas produciéndose

una fácil extracción de los compuestos aromáticos (Álvarez et al., 2006). Si la congelación se produce con adición de nieve carbónica en estado sólido, se previenen además posibles oxidaciones de los compuestos aromáticos, ya que el gas generado por la sublimación del dióxido de carbono es capaz de desplazar completamente al oxígeno presente en el medio (Celotti y Mechelet, 2004).

Casassa et al. (2006) compararon la aplicación de una técnica prefermentativa en frío (6°C) con otra postfermentativa en caliente (40° C) en la elaboración de vinos Merlot. La concentración de precursores glicosilados fue significativamente mayor en los vinos obtenidos con la maceración previa en frío.

La maceración prefermentativa en frío también provocó un aumento en la concentración de ésteres etílicos y acetatos en estudios realizados en vinos de Tempranillo (Morro-Urda, 2009). En vinos de Monastrell se ha citado un aumento de ésteres y acetatos con el uso de esta técnica, aunque la concentración era aún significativamente mayor al emplear nieve carbónica como método de congelación del mosto (Álvarez et al., 2006).

El uso de enzimas macerativos también favorece la liberación de los precursores glicosilados, ya que se facilita la hidrólisis enzimática de los enlaces glucosídicos. La fracción de compuestos volátiles libres, tales como monoterpenos, norisoprenoides o fenoles volátiles, también aumenta con la adición de enzimas, lo que hace que esta técnica tenga especial interés para incrementar el potencial aromático en vinos de variedades neutras (Castro-Vázquez et al., 2002).

Castro-Vazquez et al. (2002) evaluaron la influencia de la adición de un preparado enzimático comercial en la vinificación de uvas de las variedades Airén y Macabeo con bajos niveles terpénicos, observando que la concentración final de terpenos en el vino aumentaba significativamente respecto a una vinificación sin adición enzimática.

Un estudio similar para evaluar la adición de dos preparados enzimáticos con actividades β -glucosidadas fue realizado por Lasanta-Melero (2009) en vinos de las variedades Syrah, Merlot y Tempranillo. Los dos preparados producían un notable aumento en la concentración de terpenos en las tres variedades estudiadas. También se observó un aumento en los niveles de compuestos C13-norisoprenoides y, para Merlot y Syrah, de alcoholes superiores. Aunque los preparados enzimáticos produjeron una disminución en la concentración de ésteres etílicos.

5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestro estudio se centró en el análisis de los compuestos aromáticos fermentativos que contribuyen en mayor medida al aroma de un vino tinto joven. Los compuestos analizados se clasificaron en familias de compuestos volátiles (alcoholes superiores, acetatos, ésteres etílicos, ácidos carboxílicos y alcoholes C6) atendiendo a los diferentes grupos orgánicos funcionales y a sus descriptores sensoriales característicos.

5.2.1 CABERNET SAUVIGNON

Los resultados obtenidos al analizar los vinos de Cabernet Sauvignon de la **campaña 2007** al final de la fermentación alcohólica, en el momento del embotellado y 6 meses después, se recogen en la **Gráfica 5.1.** y en las **Tablas 9.1, 9.2, y 9.3** de los Anexos.

Los alcoholes superiores, también denominados alcoholes fusel, fueron la familia de compuestos volátiles con mayor concentración en todos los vinos analizados, siendo los alcoholes amílicos y el 2-feniletanol los más abundantes, con valores superiores a su umbral de detección. Los vinos presentaron una concentración total de alcoholes superiores comprendida entre 476,12-819,98 mg/L. Estos valores se encuentran dentro de los rangos descritos por Cedrón-Fernández (2004). Según Vidrich y Hribar (1999) el contenido óptimo de alcoholes fusel en el vino debería estar entre 80-540 mg/L. A concentraciones superiores los vinos presentan un excesivo carácter alcohólico, a excepción del 2-feniletanol, que a esas concentraciones aporta notas aromáticas a rosa (Garijo, 2001).

Respecto al efecto de las diferentes técnicas empleadas, al final de la fermentación alcohólica en el vino obtenido por adición del enzima natural β -galactosidasa se encontraron mayores concentraciones de alcoholes superiores que en el vino testigo. En el momento del embotellado no se observaron diferencias entre los distintos tratamientos y el testigo. Tras 6 meses de embotellado fue en el vino obtenido por congelación de la uva donde

se observó una presencia significativamente mayor de estos alcoholes. Algunos autores han indicado que la acción de los tratamientos de frío y enzimáticos sobre la composición aromática de los vinos parece depender de la variedad (Piñeiro et al., 2006), aunque ciertos estudios realizados sobre una misma variedad ha dado lugar a resultados contradictorios. Así, Álvarez et al. (2006) encontraron un aumento significativo en el contenido de alcoholes superiores en vinos de Monastrell sometidos a maceración prefermentativa en frío con y sin nieve carbónica, mientras que Salinas et al. (2003) no observaron ningún incremento significativo en la concentración de alcoholes fusel al utilizar la maceración prefermentativa en frío o la adición de diferentes enzimas en la vinificación de uvas de Monastrell.

Los acetatos, junto con los ésteres etílicos, son considerados los mayores responsables de las notas frutales, utilizadas frecuentemente para describir el perfil aromático de los vinos. Ambas familias de compuestos volátiles constituyen el grupo mayoritario de los compuestos responsables del aroma del vino (Etiévant, 1991). Su concentración en el vino varía dependiendo de la madurez de la uva, de las técnicas de maceración empleadas, de la cinética de las levaduras implicadas en la fermentación y de la aireación del mosto (De la Roza, 2003). Las concentraciones de los acetatos cuantificados en nuestro estudio (acetato de isoamilo, acetato de hexilo y 2-feniletacetato) están dentro de los rangos indicados por Francis y Newton (2005). El acetato de isoamilo fue el acetato que se encontró en mayores concentraciones, entre 0,25-1,85 mg/L. Al analizar los vinos al final de la fermentación alcohólica, los tratamientos de congelación de la uva y de maceración prefermentativa en frío dieron lugar a concentraciones de acetatos significativamente mayores que el vino testigo, y en el momento del embotellado las diferencias respecto al testigo se observaron en todos los tratamientos. Con la evolución de los vinos, después de 6 meses de embotellado, la concentración de acetato de isoamilo fue mayor en los vinos tratados que en el testigo, aunque al evaluar la concentración total solo las técnicas de frío siguieron mostrando un contenido total mayor que el testigo.

Al final de la fermentación alcohólica el éster etílico más abundante fue el etil-3-hidroxibutirato (0,41-0,75 mg/L). En ese momento de la vinificación, sólo la congelación de la uva mostró valores mayores en el contenido total de ésteres etílicos que el vino testigo. En el momento del embotellado, el etil-3-hidroxibutirato continuó siendo el éster más abundante (0,35-0,53 mg/L), seguido del hexanoato de etilo (0,19-0,028 mg/L). Los tratamientos de congelación de la uva y de adición de nieve carbónica, fueron los que dieron lugar a las mayores concentraciones de ésteres etílicos. Tras 6 meses en botella, los vinos obtenidos por los tres tratamientos de frío presentaron mayores contenidos en ésteres que los tratamientos enzimáticos y que el tratamiento tradicional.

El contenido de acetatos y de ésteres etílicos en los vinos se vio más afectado por las técnicas utilizadas, especialmente por las técnicas de frío, que el contenido de alcoholes superiores. Álvarez et al., (2006) y Morro (2009) también encontraron un efecto positivo en el contenido de acetatos y ésteres etílicos en vinos sometidos a maceración prefermentativa en frío y a la adición de nieve carbónica. Ortega-Heras et al. (2009) observó el mismo efecto tanto con la maceración prefermentativa en frío como con la adición de enzimas, aunque no con la adición de nieve carbónica. Lasanta-Melero (2009) reportó que la maceración prefermentativa en frío provocaba un aumento en la concentración de acetatos y ésteres etílicos en vinificaciones de Tempranillo, pero no en Syrah o Merlot, y que con la adición de enzimas de actividad β -glucosidasa se observaba un aumento de la cantidad de fenoles volátiles y de terpenos, pero que no afectaba a la concentración de acetatos o ésteres etílicos. Estos resultados hacen pensar que el diferente efecto de las técnicas depende de la variedad de uva empleada en la vinificación, así como del tipo de actividad presente al utilizar enzimas de maceración.

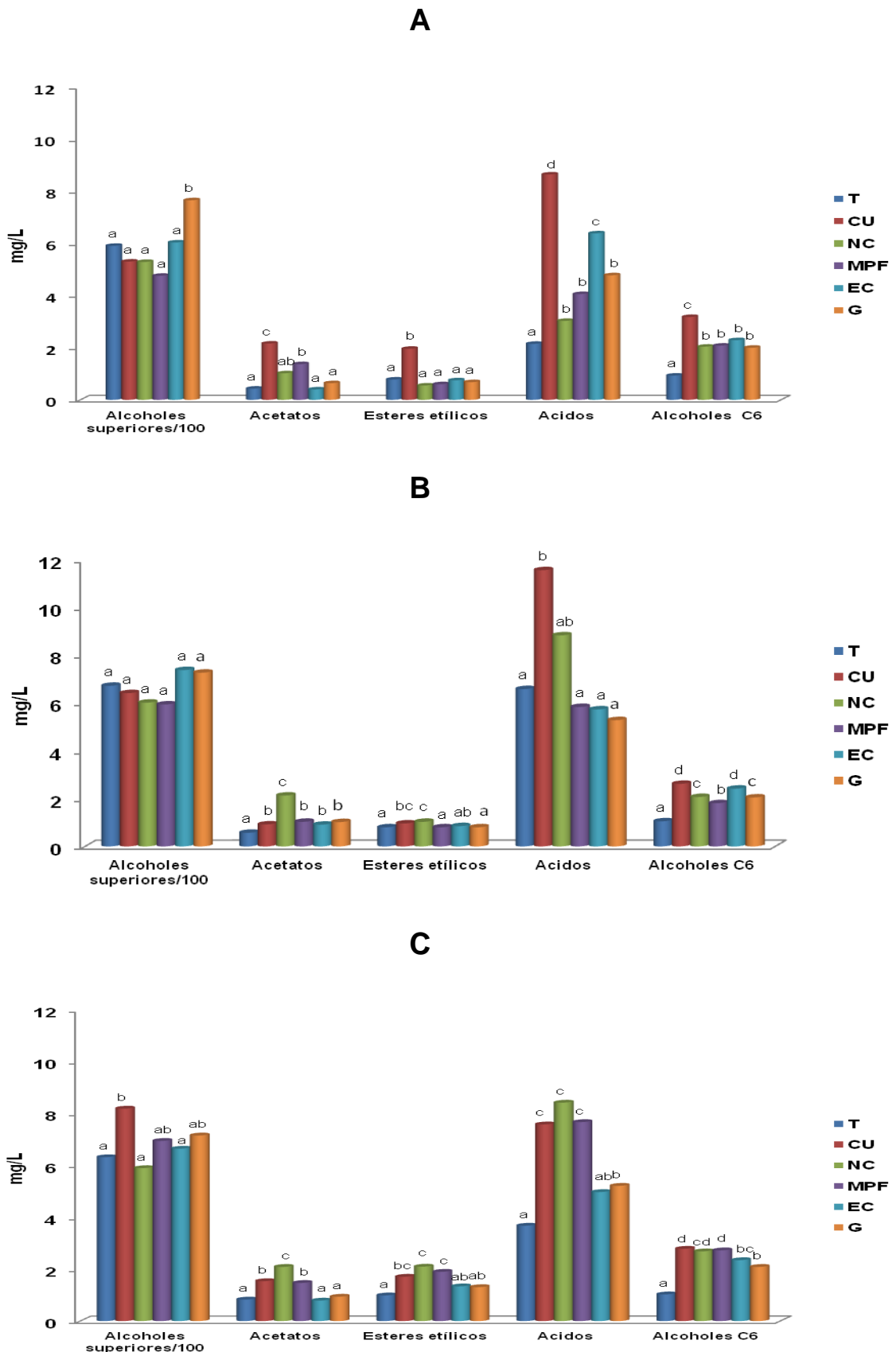
Entre los ácidos carboxílicos estudiados, los ácidos hexanoico (1,17-2,86 mg/L) y octanoico (0,83-8,47 mg/L) fueron los más abundantes y presentaron concentraciones superiores a su umbral de detección. Estos ácidos aportan aromas lácticos al vino, de modo que cuando se encuentran en rangos de concentración comprendidos entre 4 y 10 ppm, pueden considerarse como

notas de calidad (Shinohara, 1985; Edwards et al., 1990). En las determinaciones realizadas al final de la fermentación alcohólica, todos los vinos mostraron un contenido total de ácidos significativamente mayor que el vino testigo, destacando especialmente la concentración de ácidos encontrada en el vino obtenido por congelación de la uva (8,65 mg/L). En el momento del embotellado con este tratamiento también se observó un contenido mayor de ácidos que con la elaboración tradicional. Con la evolución del vino, tras 6 meses de embotellado, se observó una disminución en la concentración total de ácidos. Esta tendencia pudo ser debida a pérdidas producidas por la esterificación de los ácidos con el etanol (Garijo, 2001). En ese momento, los vinos obtenidos con los tratamientos de frío y con adición de galactosidasa presentaron contenidos de ácidos significativamente mayores que el vino testigo.

Entre todos los compuestos aromáticos estudiados, fue en el contenido de alcoholes C6 donde se observó un efecto más acusado de las técnicas de frío y enzimáticas empleadas. Tanto al final de la fermentación alcohólica, en el momento del embotellado como 6 meses después del embotellado, todos los tratamientos dieron lugar a vinos con mayor contenido en alcoholes C6 que el vino testigo. Estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores (Castro-Vazquez et al., 2002; Lasanta-Melero, 2009; Albanese et al., 2012). Con la evolución del vino, y coincidiendo con los resultados obtenidos en el resto de compuestos estudiados, en los vinos obtenidos con los tres tratamientos de frío fue donde se encontró una mayor concentración, seguidos por los tratamientos enzimáticos y finalmente por el vino testigo. Garijo (2001) y Salinas et al. (2003) no observaron un aumento significativo de alcoholes C6 en vinos de Monastrell sometidos a una maceración prefermentativa en frío. Petrozziello et al. (2011) observaron un menor contenido de alcoholes C6 con la adición de nieve carbónica en vinos de Langhe D.O.C. Nebbiolo, justificándolo con la rápida sublimación del CO₂, que pudo producir una disminución en la lipoxidación enzimática determinante para la liberación de estos aromas. Los compuestos C6 son sustancias aromáticas libres localizadas principalmente en los hollejos de la uva. Se forman por vía enzimática a partir de los ácidos grasos poliinsaturados. Todos los tratamientos que faciliten la

ruptura de los hollejos a nivel celular, favorecerán el ataque enzimático a los ácidos grasos, generando una mayor formación de compuestos C6. Su presencia en los vinos comunica olores y sabores herbáceos y astringentes, que pueden ser considerados como un defecto del aroma (Etiévant, 1991). Los valores de alcoholes C6 encontrados en los vinos estudiados están dentro de los rangos indicados por Cedrón (2004). El 1-hexanol fue el que presentó mayores concentraciones (0,90-2,99 mg/L) coincidiendo con lo observado por Jiang y Zhang (2010) en vinos de Cabernet-Sauvignon.

Gráfica 5.1. Composición aromática en vinos de Cabernet Sauvignon, campaña 2007 (A: final de la fermentación alcohólica; B: momento de embotellado; C: 6 meses después del embotellado).



En la **Tabla 5.2** y las gráficas **9.4**, **9.5** y **9.6** de los Anexos se recogen los datos obtenidos al analizar la composición aromática de los vinos de Cabernet Sauvignon en la **campaña 2009**.

El contenido de alcoholes superiores (699,1-917,4 mg/L) fue superior al encontrado en los vinos de la campaña anterior. Las técnicas enológicas empleadas no incrementaron la presencia de estos alcoholes en los vinos. No se encontraron diferencias entre los vinos al final de la fermentación alcohólica. En el momento del embotellado y con la evolución del vino 6 meses después del embotellado, el vino testigo fue el que presentó una mayor concentración de estos compuestos, sin diferencias significativas respecto al tratamiento enzimático pero si respecto a los tratamientos de frío.

Los alcoholes superiores son los responsables de las notas alcohólicas o vinosas características de los vinos jóvenes. A concentraciones superiores a 400 o 500 mg/L los vinos presentan un excesivo carácter alcohólico que enmascara las notas aromáticas positivas que pueden aportar otros compuestos (Ferreira, 2007; Styger et al., 2011). En ambas campañas en todos los momentos analizados, el contenido total de alcoholes fusel en los vinos superó los 400 mg/L, por lo que el hecho de que las técnicas de frío y enzimáticas no aumentasen significativamente la presencia de estos compuestos, especialmente en la campaña 2009, puede considerarse positivo para la calidad final del vino. Salinas et al. (2003) también observaron que la maceración prefermentativa en frío y la adición de enzimas, durante y después de la maceración, no provocaba un aumento de alcoholes superiores en la vinificación de vinos rosados de Monastrell.

El contenido total de acetatos (1,07-4,17 mg/L) y de ésteres etílicos (1,33-2,34 mg/L) en los vinos de Cabernet Sauvignon de la campaña 2009 también fue mayor que el encontrado en los vinos del 2007.

Al final de la fermentación alcohólica sólo en el vino obtenido por adición de nieva carbónica se observó un contenido de acetatos significativamente mayor que el del vino testigo. En el momento del embotellado y 6 meses después, con

ninguno de los tratamientos se produjo un aumento en el contenido de acetatos, de hecho el vino obtenido por maceración prefermentativa en frío mostró un contenido menor que el vino testigo al analizarlos 6 meses después del embotellado. Con la evolución del vino se observó un descenso en la concentración de estos compuestos. Ha sido frecuentemente demostrado que bajo las condiciones reductoras durante la conservación en botella, se producen cambios en la composición aromáticas de los vinos (Günata et al., 1988; Lasanta-Melero, 2009) y que la presencia de acetatos puede disminuir debido a reacciones de hidrólisis (Chisholm et al., 1995).

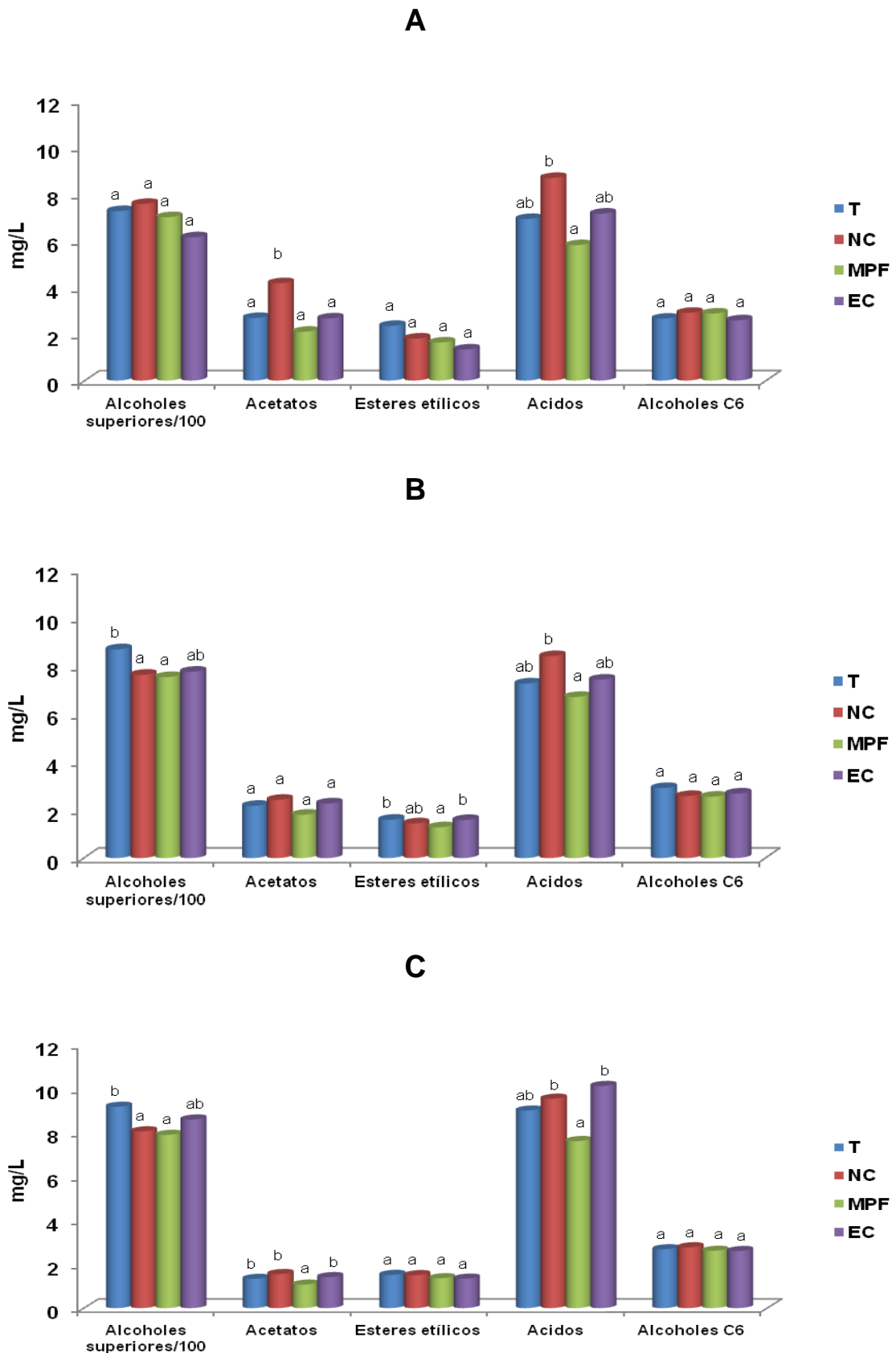
Ortega-Heras et al. (2009) encontraron que la maceración prefermentativa en frío y la adición de un preparado enzimático provocaban un aumento en la concentración de acetatos en vinos de Mencía. Pero, al igual que nosotros, al repetir la experiencia en una campaña posterior no observaron este aumento e incluso el nivel de acetatos en los vinos obtenidos por maceración prefermentativa en frío era menor que el del vino testigo. Atribuyeron los resultados a la heterogeneidad entre vendimias debidas a posibles diferencias entre los grados de maduración.

Respecto al contenido de ésteres etílicos, tanto al final de la fermentación alcohólica, en el momento del embotellado o 6 meses después, en ninguno de los tratamientos se observó un contenido significativamente mayor que el del vino testigo.

La concentración total de los ácidos carboxílicos estudiados (5,80- 10,12 mg/L) también fue superior a la encontrada en los vinos del 2007. Las notas lácticas aportadas por estos ácidos solo resultan negativas cuando se encuentran en concentraciones superiores a 10 mg/L (Edwards et al., 1990). En los tres momentos estudiados, el vino obtenido por adición de nieve carbónica fue el que presentó una mayor concentración de estos compuestos, aunque sin diferencias significativas respecto al tratamiento enzimático y al vino testigo, pero si respecto a la maceración prefermentativa en frío.

Hay que destacar que, en esta campaña, el contenido de alcoholes C6 en los vinos (que también fue superior al encontrado en los vinos de la campaña anterior), no se vio afectado por la acción de ninguno de los tratamientos, mientras que en la campaña 2007 todos los tratamientos aumentaron la presencia de estos compuestos en los vinos. Tal y como se ha comentado anteriormente los compuestos C6 se forman por ataque enzimático a partir de los ácidos grasos poliinsaturados. Se encuentran en forma libre en los hollejos de la uva y su presencia no depende de la acción de las levaduras, sino que forman parte del aroma prefermentativo. Los efectos mecánicos de los tratamientos prefermentativos provocan fenómenos de ruptura a nivel celular, permitiendo a los sistemas enzimáticos entrar en contacto con los sustratos del hollejo y favoreciendo la liberación de estos compuestos. El hecho de que en la campaña 2009 los tratamientos no influyeran en la mayor o menor presencia de alcoholes C6 en los vinos pone de manifiesto que la degradación de los hollejos no se vio afectada por las técnicas empleadas. Sin embargo en la campaña 2007, cuando los hollejos se encontraron menos maduros, los tratamientos empleados (especialmente las técnicas de frío) favorecieron la degradación de las estructuras de las paredes celulares. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio de los parámetros cromáticos en los vinos de Cabernet Sauvignon.

Gráfica 5.2. Composición aromática en vinos de Cabernet Sauvignon, campaña 2009 (A: final de la fermentación alcohólica; B: momento de embotellado; C: 6 meses después del embotellado).



5.2.2 SYRAH

En la **Gráfica 5.3** y en las **Tablas 9.7, 9.8 y 9.9** de los Anexos se recogen los valores obtenidos al estudiar la composición aromática de los vinos de Syrah en la **campaña 2007**.

Los alcoholes superiores fueron los compuestos volátiles que se encontraron en mayor concentración en todos los vinos, aunque con valores inferiores (330,13-651,57 mg/L) a los observados en los vinos de Cabernet Sauvignon, coincidiendo con lo publicado en otros estudios (Tredoux et al., 2008). Los alcoholes isoamílicos, seguidos del 2-feniletanol fueron los alcoholes mayoritarios. Piñeiro et al. (2006) también encontraron esta proporción entre los distintos alcoholes fusel en vinos de Syrah. Al final de la fermentación alcohólica y en el momento del embotellado, en el vino obtenido por adición de nieve carbónica se observó una concentración mayor de alcoholes fusel que en el vino testigo. Al evolucionar el vino, fue en el tratamiento por congelación de la uva donde se encontró una mayor concentración de estos compuestos, pero sin diferencias significativas respecto al tratamiento con nieve carbónica o respecto al testigo. Los tratamientos enzimáticos y el tratamiento de maceración prefermentativa en frío fueron los que dieron lugar a una menor concentración de alcoholes superiores.

En los vinos obtenidos por adición de nieve carbónica también se encontró un contenido mayor de acetatos que en el vino testigo y que en el resto de tratamientos. El acetato de isoamilo, cuyo descriptor aromático a plátano tiene especial importancia en términos de bouquet del vino (Ribereau-Gayon, 2006), fue el que experimentó un mayor incremento con este tratamiento. Las concentraciones de acetato de isoamilo al final de la fermentación alcohólica, en el momento del embotellado y seis meses después, se vieron incrementadas, respectivamente, un 50%, 65% y 52% al comparar el tratamiento con nieve carbónica con la elaboración tradicional.

Al final de la fermentación alcohólica no se observó que las técnicas enológicas empleadas tuviesen un efecto significativo respecto al contenido de

ésteres etílicos en los vinos, pero durante la evolución de la vinificación, al llegar el momento del embotellado y 6 meses después de este se apreciaron dos tendencias que merecen especial atención: el contenido total de ésteres etílicos aumentó en todos los vinos e incrementaron las diferencias entre algunos tratamientos y el vino testigo. Con la evolución del vino, en los tratamientos de congelación de la uva y de maceración con nieve carbónica se fue encontrando un contenido de ésteres etílicos significativamente mayor que en el vino testigo y que en los vinos obtenidos por maceración prefermentativa en frío y por adición de las diferentes enzimas. La gran mayoría de los ésteres se forman por vía enzimática, mediante la activación inicial de los ácidos grasos por combinación con la coenzima A (CoA) (Lambrechts y Pretorius, 2000). Así, los ésteres etílicos (como el octanoato de etilo, hexanoato de etilo o butanoato de etilo) se forman a partir de la etanolisis de la acil-CoA, que es un intermedio del metabolismo de los ácidos grasos. El hecho de que el contenido de ésteres etílicos aumentase con la evolución de los vinos pone de manifiesto que, con el transcurso del tiempo, se produjeron reacciones de etanolisis que liberaron a los ésteres de sus precursores y que las técnicas de congelación de la uva y adición de nieve carbónica favorecieron la presencia de estos precursores (ácidos grasos), ya que fue en los vinos obtenidos con estos tratamientos donde se observó un mayor aumento en la concentración de estos compuestos al evolucionar la vinificación. Lasanta-Melero (2009) encontró una tendencia similar al estudiar el perfil aromático en vinos de Syrah, observando que los contenidos de ésteres etílicos de cadenas ramificadas como el isobutirato de etilo y los contenidos de algunos terpenos y norisoprenoides con estructuras evolucionadas, aumentaban con el tiempo de embotellado y que este aumento era más significativo en los vinos de Syrah que habían sido sometidos a tratamientos de frío (aunque en su caso solo se realizaron maceraciones prefermentativas en frío y no se evaluaron técnicas como la congelación de la uva o la adición de nieve carbónica).

Entre los ácidos carboxílicos analizados, los ácidos hexanoico y octanoico fueron los que se encontraron en mayor concentración. Al final de la fermentación alcohólica el vino obtenido con la nieve carbónica fue el que presentó una mayor concentración total de ácidos, aunque con diferencias

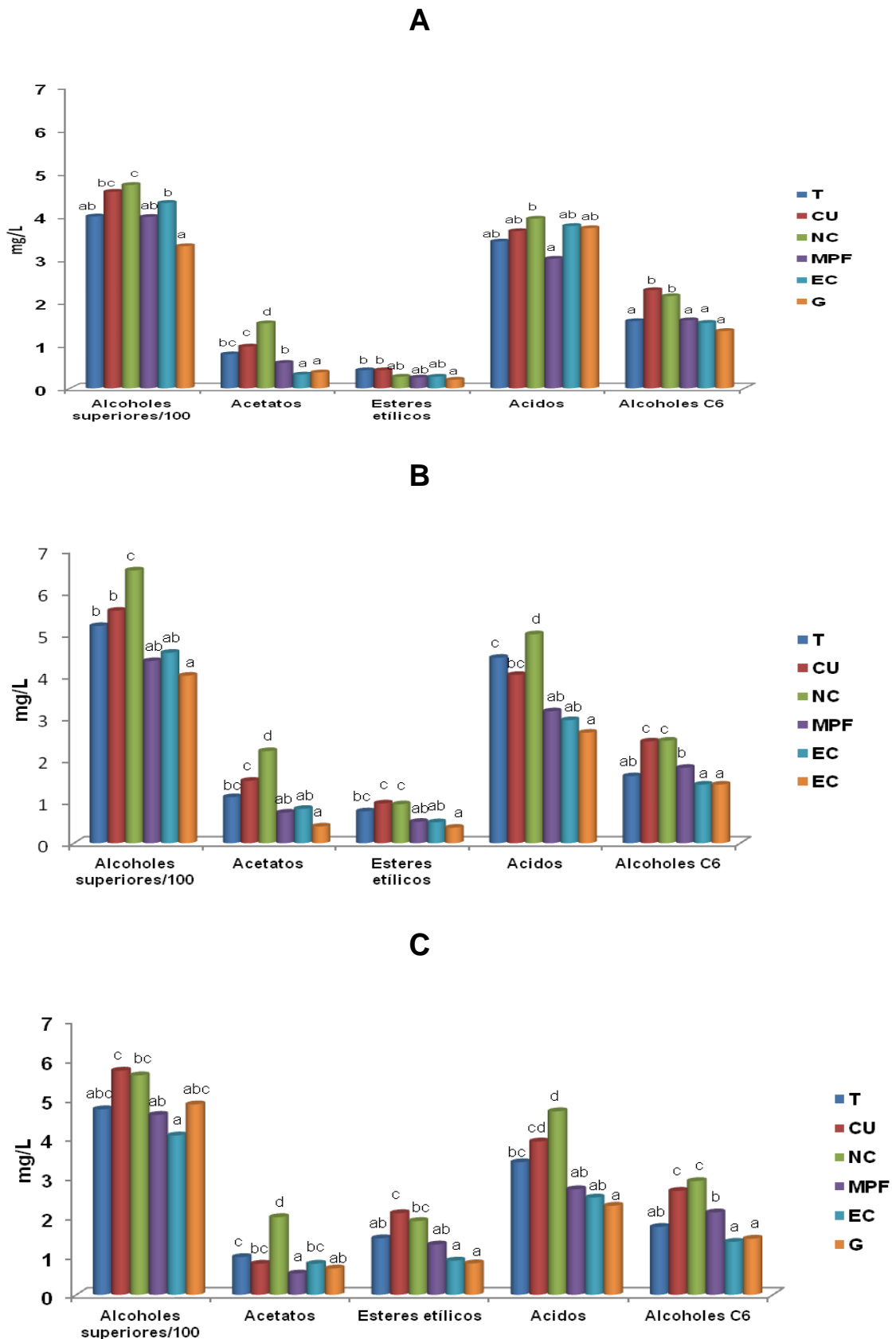
significativas solo respecto a la maceración prefermentativa en frío. Con la evolución de los vinos también se apreció una mayor diferenciación entre los tratamientos. En el momento del embotellado el tratamiento con nieve carbónica presentó una concentración total de ácidos significativamente mayor que el resto de tratamientos. Al analizar los vinos 6 meses después del embotellado fueron de nuevo los tratamientos de congelación de la uva y de maceración con nieve carbónica los que presentaron un mayor contenido de estos compuestos y, por el contrario, con la maceración prefermentativa en frío y con las técnicas de adición de enzimas la concentración de estos compuestos fue inferior a la obtenida en la vinificación testigo.

Entre los alcoholes C6 estudiados, el 1-hexanol se encontró en mayores concentraciones (1,33-2,65 mg/L) que el cis-3-hexenol (0,05-0,15 mg/L). Piñeiro et al. (2006) encontraron valores medios de 1-hexanol (1,30 mg/L) y cis-3-hexenol (0,14 mg/L) muy similares a los nuestros al cuantificar la fracción de compuestos volátiles no terpénicos en vinos comerciales de Syrah. Nuevamente los tratamientos de congelación de la uva y de maceración con nieve carbónica fueron los que dieron lugar a vinos con un mayor contenido de estos compuestos. Con la evolución del vino la presencia de alcoholes C6 en estos tratamientos continuó siendo significativamente mayor que la del vino testigo. En los vinos obtenidos por maceración prefermentativa en frío no se observaron diferencias respecto al testigo, pero si respecto a los tratamientos enzimáticos, cuyas concentraciones fueron significativamente menores.

No se han encontrado muchos estudios sobre el perfil aromático de vinos de Syrah sometidos a maceraciones con nieve carbónica o a elaboraciones con una congelación previa de las uvas. Aunque si se han encontrado algunas referencias de maceraciones prefermentativas en frío o de adición de enzimas. Albanese et al. (2012) observaron que la maceración prefermentativa en frío provocaba un aumento en la concentración de ésteres etílicos en vinos de Syrah, sin embargo no afectaba a las concentraciones de alcoholes superiores, alcoholes C6 o acetatos. Lasanta-Melero (2009) estudió el efecto de la maceración prefermentativa en frío y de la adición de enzimas con actividades β -glucosidasas en vinos de Syrah y observó que la maceración en frío (sin

nieve carbónica) solo aumentaba significativamente la concentración total de alcoholes C6, pero no la de alcoholes superiores, acetatos o ésteres etílicos. Los preparados enzimáticos con actividad β -glucosidasa provocaban un aumento en la concentración de alcoholes superiores, alcoholes C6 y, especialmente, en la de compuestos aromáticos terpénicos y norisoprenoides cuyos precursores se encuentran bajo formas glicosiladas, pero no influían sobre el contenido total de acetatos o ésteres.

Gráfica 5.3. Composición aromática en vinos de Syrah, campaña 2007 (A: final de la fermentación alcohólica; B: momento de embotellado; C: 6 meses después del embotellado).



Los resultados obtenidos al evaluar la composición aromática de los vinos de Syrah durante la **campaña 2009** se reflejan en la **Gráfica 5.4** y en las **Tablas 9.10, 9.11 y 9.12** de los Anexos.

Tal y como se observó en los vinos de Cabernet Sauvignon, los vinos del Syrah de la campaña 2009 también presentaron mayor cantidad de compuestos aromáticos que los del 2007.

Comparando la concentración de alcoholes superiores entre los distintos tratamientos, fue con la adición del preparado enzimático comercial con la que se observó una mayor cantidad de estos compuestos, pero sin diferencias estadísticamente significativas respecto a los otros tratamientos o respecto al testigo en ninguno de los tres momentos analizados. Los alcoholes amílicos fueron los que se encontraron en mayor proporción en todos los vinos, seguidos del isobutanol y del 2-feniletanol.

La concentración de acetatos tampoco se vio afectada por las distintas técnicas empleadas cuando se analizaron los vinos al final de la fermentación alcohólica y en el momento del embotellado. Aunque al repetir el análisis 6 meses después del embotellado sí que se observó que el tratamiento enzimático presentaba una concentración significativamente mayor que los tratamientos de frío y ligeramente mayor que el testigo. Este resultado se debió a que en los tratamientos de frío la concentración de acetatos sufrió un gran descenso con la evolución del vino, mientras que en el tratamiento enzimático y en el vino testigo este descenso no fue tan acusado. La presencia de acetatos en vinos jóvenes disminuye con el tiempo debido, principalmente, a reacciones de hidrólisis (Du Plessis, 1983; Günata et al., 1988; Chisholm et al., 1995).

Al final de la fermentación alcohólica las distintas técnicas tampoco influyeron sobre la concentración de ésteres etílicos, pero en el momento del embotellado la maceración prefermentativa en frío mostró un contenido mayor que los otros dos tratamientos y estos, a su vez, mayor que el testigo. Con la evolución del vino se observó un efecto similar que el sufrido en el contenido de acetatos, es decir, en los vinos obtenidos con las técnicas de frío el contenido

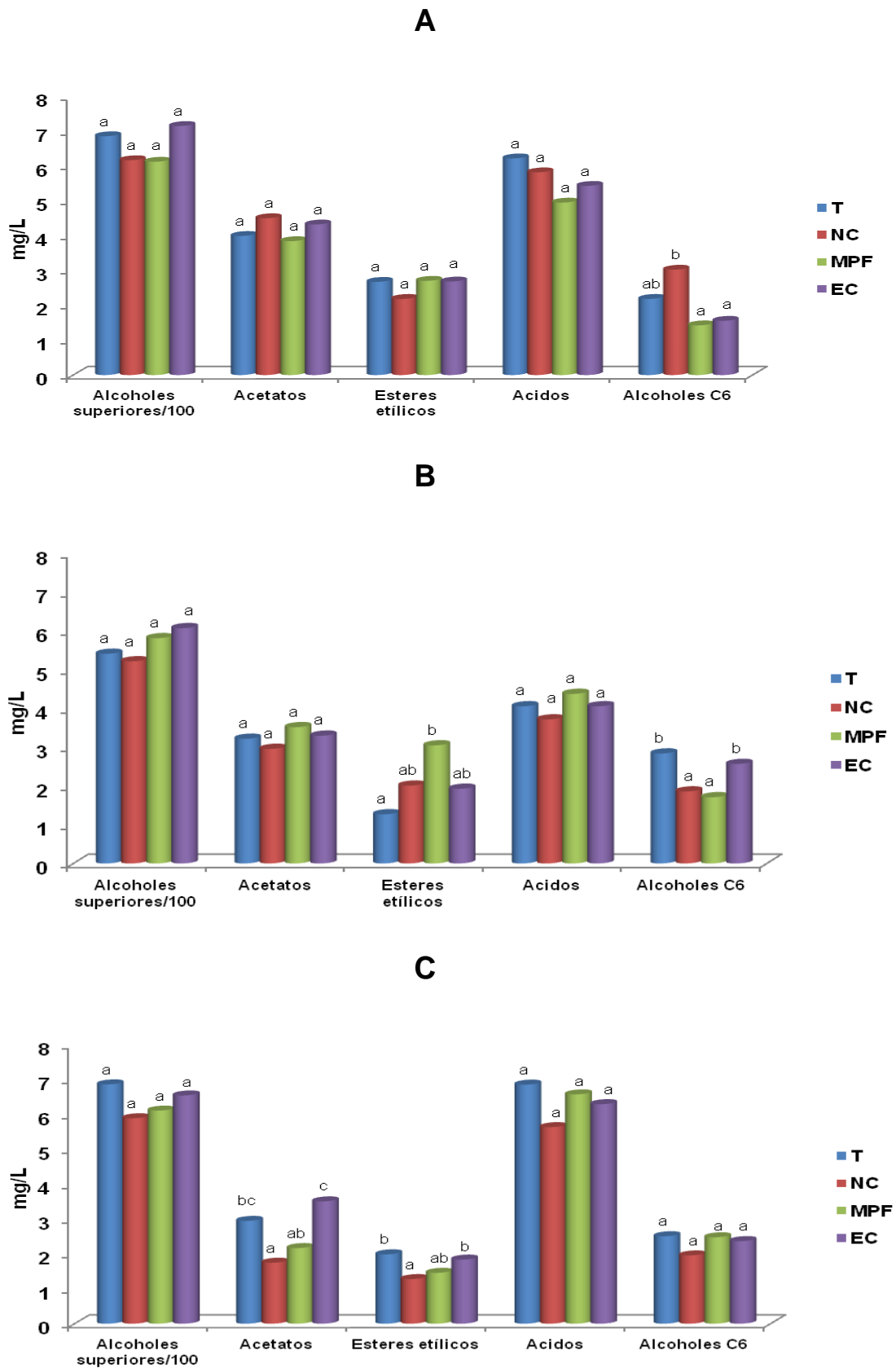
de ésteres etílicos disminuyó en mayor proporción que el vino obtenido por adición enzimática. En el vino testigo no se produjo esta disminución, es más, se observó un aumento del contenido de ésteres. Los ésteres etílicos se forman durante la fermentación alcohólica por esterificación enzimática, posteriormente su concentración puede disminuir por reacciones de hidrólisis, aunque también puede incrementar por esterificaciones de tipo químico (Martínez et al, 1998).

La presencia de ácidos en los vinos no se vio afectada por las técnicas utilizadas, no observándose diferencias significativas entre tratamientos y testigo en ninguno de los momentos analizados.

Al final de la fermentación alcohólica el contenido de alcoholes C6 en el tratamiento con nieve carbónica fue mayor, aunque no significativamente, que en el testigo y mayor, significativamente, que en los otros tratamientos. Sin embargo, en el momento del embotellado, fueron el vino testigo y el obtenido por adición del preparado enzimático los que presentaron una mayor concentración de alcoholes C6. Con la evolución del vino, 6 meses después del embotellado, no se observaron diferencias entre tratamientos y testigo.

Tal y como se observó en el estudio de los parámetros cromáticos, el efecto de las distintas técnicas sobre las características aromáticas de los vinos de Syrah también pareció depender ampliamente de la añada. En el 2007 las técnicas de congelación de la uva y de adición de nieve carbónica provocaron un mayor aumento en el contenido de la mayoría de los compuestos aromáticos, mientras que en el 2009 casi no se observaron diferencias entre los tratamientos y el vino testigo. Además, en el 2009, los vinos obtenidos con las técnicas de frío acusaron una mayor pérdida del carácter afrutado con la evolución del vino, ya que fueron los que sufrieron una mayor pérdida de acetatos y de ésteres etílicos.

Gráfica 5.4. Composición aromática en vinos de Syrah, campaña 2009 (A: final de la fermentación alcohólica; B: momento de embotellado; C: 6 meses después del embotellado).



5.2.3 MONASTRELL

En la **Gráfica 5.5** y en las **Tablas 9.13, 9.14 y 9.15** de los Anexos se recogen los datos obtenidos al analizar la composición aromática de los vinos de Monastrell en la **campaña 2007**.

Los alcoholes superiores fueron los compuestos aromáticos mayoritarios, con concentraciones comprendidas entre 393,77 mg/L y 652,86 mg/L. La cantidad de alcoholes encontrada en los vinos de Monastrell en esta campaña fue similar a la encontrada en los vinos de Syrah, pero inferior a la hallada en los vinos de Cabernet Sauvignon. Los alcoholes amílicos fueron los que se encontraron en mayor proporción, seguidos del 2-feniletanol y del isobutanol. Álvarez et al. (2006), en un estudio realizado en vinos de Monastrell, hallaron concentraciones de alcoholes amílicos similares a los de nuestro estudio. Aunque Gómez-Plaza et al. (1999) encontraron menores concentraciones de alcoholes amílicos en vinos de Monastrell elaborados de uvas procedentes de la misma zona. La formación de estos alcoholes está ligada al metabolismo de los aminoácidos y su presencia en los vinos depende de la composición inicial de las uvas y, especialmente, de las condiciones de la fermentación y de la densidad de las levaduras (Selli et al., 2006).

Al final de la fermentación alcohólica en el vino testigo y en los vinos obtenidos por maceración prefermentativa en frío y por adición de enzima con actividad β -galactosidasa, fue donde se encontró una mayor presencia de alcoholes superiores, aunque sin diferencias significativas respecto a los tratamientos de congelación de la uva o de adición del preparado enzimático comercial, pero sí respecto a la tratamiento con nieve carbónica. En el momento del embotellado no se observaron diferencias entre tratamientos y testigo. Al realizar el análisis 6 meses después del embotellado, el tratamiento por congelación de la uva fue el que presentó mayor cantidad de estos compuestos, seguido del vino testigo y de la nieve carbónica, y por último, los tratamientos enzimáticos y de maceración prefermentativa en frío.

Entre los acetatos estudiados, el acetato de isoamilo y el 2-feniletil acetato fueron los más abundantes. Al final de la fermentación alcohólica con la elaboración tradicional fue como se obtuvo una mayor concentración de acetatos, aunque en el momento del embotellado los tratamientos de nieve carbónica y de enzima β -galactosidasa mostraron mayor concentración que el testigo. Con la evolución de los vinos embotellados se observó que en todos los vinos, a excepción de los obtenidos por maceración prefermentativa en frío, se producía un aumento en el contenido de acetatos. Tal y como se ha explicado anteriormente, la concentración de acetatos suele disminuir por reacciones de hidrólisis, aunque también puede incrementar por esterificaciones de tipo químico (Martínez et al, 1998). El vino obtenido por adición de enzima β -galactosidasa fue el que presentó un mayor contenido de acetatos.

La concentración de ésteres etílicos, que junto con los acetatos son los máximos responsables del carácter afrutado de los vinos tintos jóvenes, osciló entre 0,36 mg/L y 1,85 mg/L. Al final de la fermentación alcohólica y en el momento del embotellado el etil-3-hidroxi-butirato fue el más abundante en todos los vinos, con valores similares a los encontrados por Garijo (2001) en vinos rosados de Monastrell, aunque en ese estudio encontró una mayor proporción de octanoato de etilo. Gómez-Plaza et al. (1999) también encontraron mayores cantidades de octanoato de etilo en vinos elaborados a partir de diferentes clones de Monastrell. No obstante, en nuestro estudio, con la evolución del vino se observó un notable aumento en la concentración de la mayoría de los ésteres estudiados, así, en el caso del octanoato de etilo, cuya concentración a final de fermentación alcohólica y en el momento del embotellado fue de 0,01-0,02 mg/L e incluso no fue detectado en algunos vinos, se encontró en concentraciones comprendidas entre 0,16 mg/L y 0,21 mg/L cuando se analizaron los vinos 6 meses después del embotellado. Respecto al efecto de los distintos tratamientos sobre la concentración de ésteres etílicos en los distintos momentos analizados, solo en el momento del embotellado se observó que los tratamientos con la nieve carbónica y el enzima β -galactosidasa mostraban una concentración de ésteres etílicos superior al testigo.

La concentración total de los ácidos estudiados estuvo comprendida entre 2.96 mg/L y 4.64 mg/L, siendo el ácido octanoico, seguido del hexanoico, los ácidos mayoritarios, coincidiendo con lo encontrado por Garijo (2001). A estas concentraciones las notas lácticas aportadas por estos ácidos pueden considerarse notas de calidad (Edwards et al., 1990). Al final de la fermentación alcohólica en los tratamientos con nieve carbónica, con maceración prefermentativa en frío y con adición del preparado enzimático la concentración de ácidos fue mayor que en el vino testigo y mayor también que en los tratamientos por congelación de la uva y por adición de enzima β -galactosidasa. En el momento del embotellado no se observaron diferencias entre tratamientos y testigo, y 6 meses después del embotellado fueron los vinos obtenidos por congelación de la uva y por adición de nieve carbónica los que presentaron una mayor concentración de ácidos.

Al final de la fermentación alcohólica no se observaron diferencias en el contenido de alcoholes C6 entre vinos tratados y vino testigo, aunque con la evolución de los vinos se encontró que las técnicas de frío parecían tener mayor efecto que las enzimáticas. Así, en el momento del embotellado la nieve carbónica y la maceración prefermentativa en frío mostraron mayor cantidad de alcoholes C6 que el vino testigo y, a los 6 meses, con el tratamiento de congelación de la uva también se encontró mayor concentración de alcoholes C6 que con la elaboración tradicional.

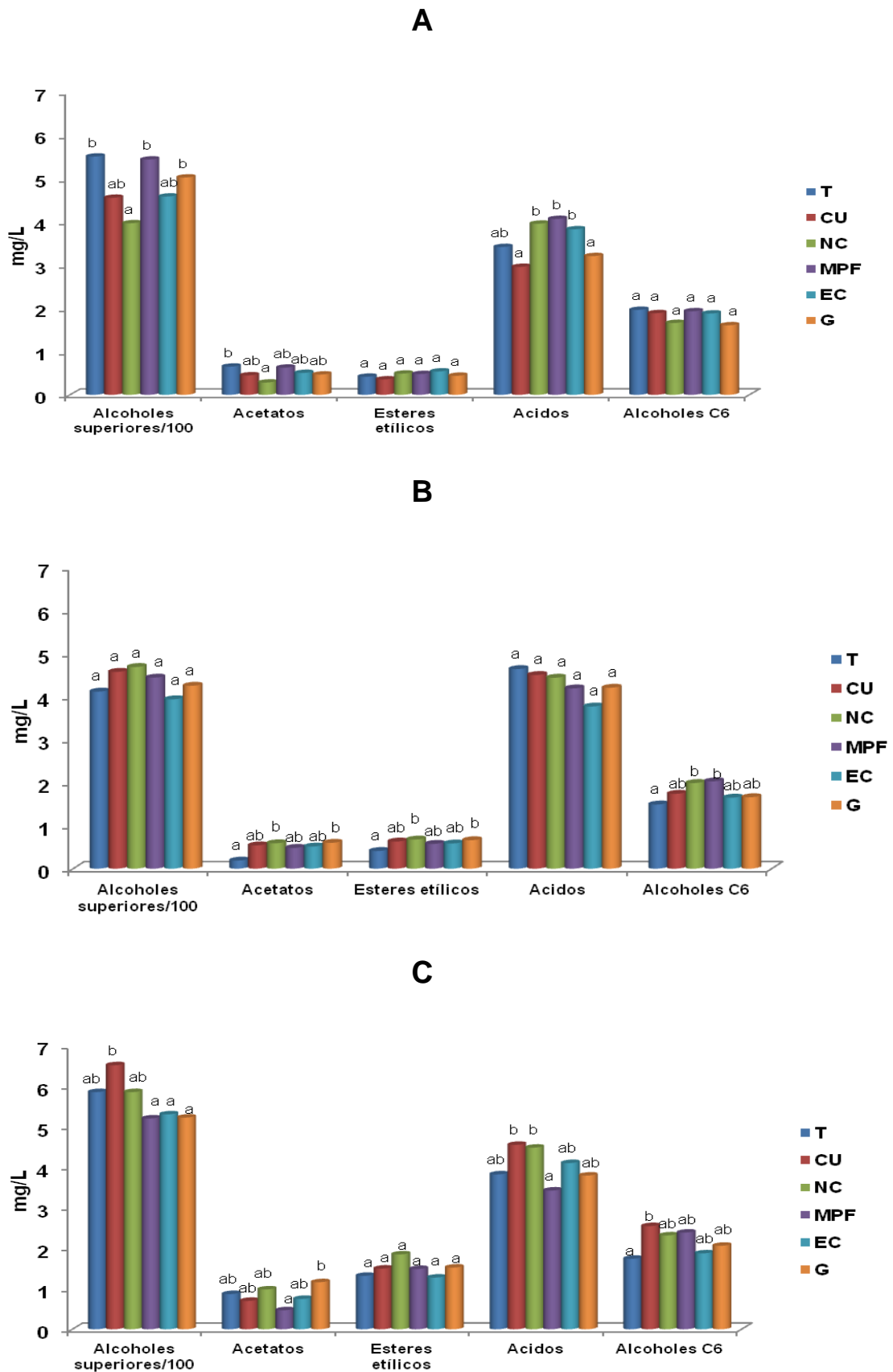
Tras analizar los resultados obtenidos en el estudio de la composición aromática en los vinos de Monastrell en el 2007, se podría decir que algunas familias de compuestos volátiles respondieron mejor a unas técnicas mientras que con otras familias se obtuvo mejor resultado con otras. Algunas diferencias encontradas al final de la fermentación alcohólica desaparecieron en el momento del embotellado. Con el tiempo de embotellado aparecieron diferencias entre tratamientos debidas a la distinta evolución sufrida por los compuestos aromáticos. Podríamos resumir que al analizar los vinos 6 meses después del embotellado el tratamiento de congelación de la uva dio lugar a un vino con mayor cantidad de alcoholes superiores, ácidos y alcoholes C6 que el vino testigo. Con ese tiempo de embotellado, el tratamiento con nieve

carbónica también dio lugar a un vino con mayor concentración de ácidos, y con la adición de enzima β -galactosidasa se observó un mayor contenido de acetatos que el del vino testigo. Los vinos obtenidos con el preparado enzimático comercial mostraron una composición aromática muy similar a la del testigo. Con la maceración prefermentativa en frío se observó que, a los 6 meses, los vinos contenían menor cantidad de acetatos y de ésteres que el vino testigo.

Álvarez et al. (2006) estudiaron el efecto de la maceración prefermentativa en frío, con y sin nieve carbónica, en la vinificación de uvas de Monastrell. Al analizar los vinos 6 meses después de haber sido embotellados observaron que la maceración en frío con y sin nieve carbónica provocó un aumento en la concentración de la mayor parte de los acetatos y de los ésteres etílicos, así como en la concentración de isobutanol, 2-feniletanol y alcoholes amílicos, aunque el incremento en la concentración de algunos compuestos era ligeramente mayor cuando se había usado nieve carbónica como método de maceración en frío.

Salinas et al. (2003) también estudiaron el efecto de la maceración en frío y de la adición de enzimas de maceración en la vinificación en rosado de uvas de Monastrell, observando que tanto la maceración prefermentativa en frío como la adición de enzimas con actividad pectolítica provocaban un aumento en la concentración de ésteres, sin embargo daban lugar a vinos con menor contenido en compuestos C6.

Gráfica 5.5. Composición aromática en vinos de Monastrell, campaña 2007 (A: final de la fermentación alcohólica; B: momento de embotellado; C: 6 meses después del embotellado).



Los resultados obtenidos al estudiar la composición aromática de los vinos de Monastrell en la **campaña 2009** se muestran en la **Gráfica 5.6** y en las **Tablas 9.16, 9.17 y 9.18** de los Anexos.

Al final de la fermentación alcohólica con los tratamientos con nieve carbónica y con el preparado enzimático se observó una mayor concentración de alcoholes superiores y de acetatos. Pero al embotellar los vinos y 6 meses después del embotellado desaparecieron esas diferencias. El contenido de alcoholes superiores en el tratamiento por maceración en frío, al analizar los vinos 6 meses después del embotellado, fue significativamente menor que en el testigo y que en el resto de tratamientos.

En el vino obtenido con el preparado enzimático comercial, la concentración de ésteres etílicos al final de fermentación alcohólica fue mayor que en el resto de los vinos aunque con la evolución de los vinos sucedió algo similar a lo observado con los alcoholes superiores y con los acetatos, es decir, ya no se encontraron diferencias entre este tratamiento y el resto de los vinos.

La nieve carbónica y el enzima comercial, al final de la fermentación alcohólica, también dieron lugar a un mayor contenido de ácidos que el testigo. Aunque en el momento del embotellado fue el vino testigo el que mostró un mayor contenido de estos compuestos. Transcurridos 6 meses el vino obtenido por adición del preparado enzimático volvió a presentar mayor concentración de ácidos que el vino testigo y, sobre todo, mayor concentración que los otros dos tratamientos. Este resultado está relacionado con lo observado en la concentración de acetatos y de ésteres etílicos: al final de la fermentación alcohólica el tratamiento enzimático mostraba mayor concentración de estos compuestos, pero con la evolución del vino desaparecieron las diferencias respecto a los otros vinos y, por el contrario, aumentaron las diferencias respecto a la concentración de ácidos. Este hecho podría explicarse porque en el vino obtenido con este tratamiento los acetatos y los ésteres etílicos sufrieron más reacciones de hidrólisis que en los otros vinos, lo que se reflejó en un aumento en la concentración de los ácidos correspondientes. La maceración

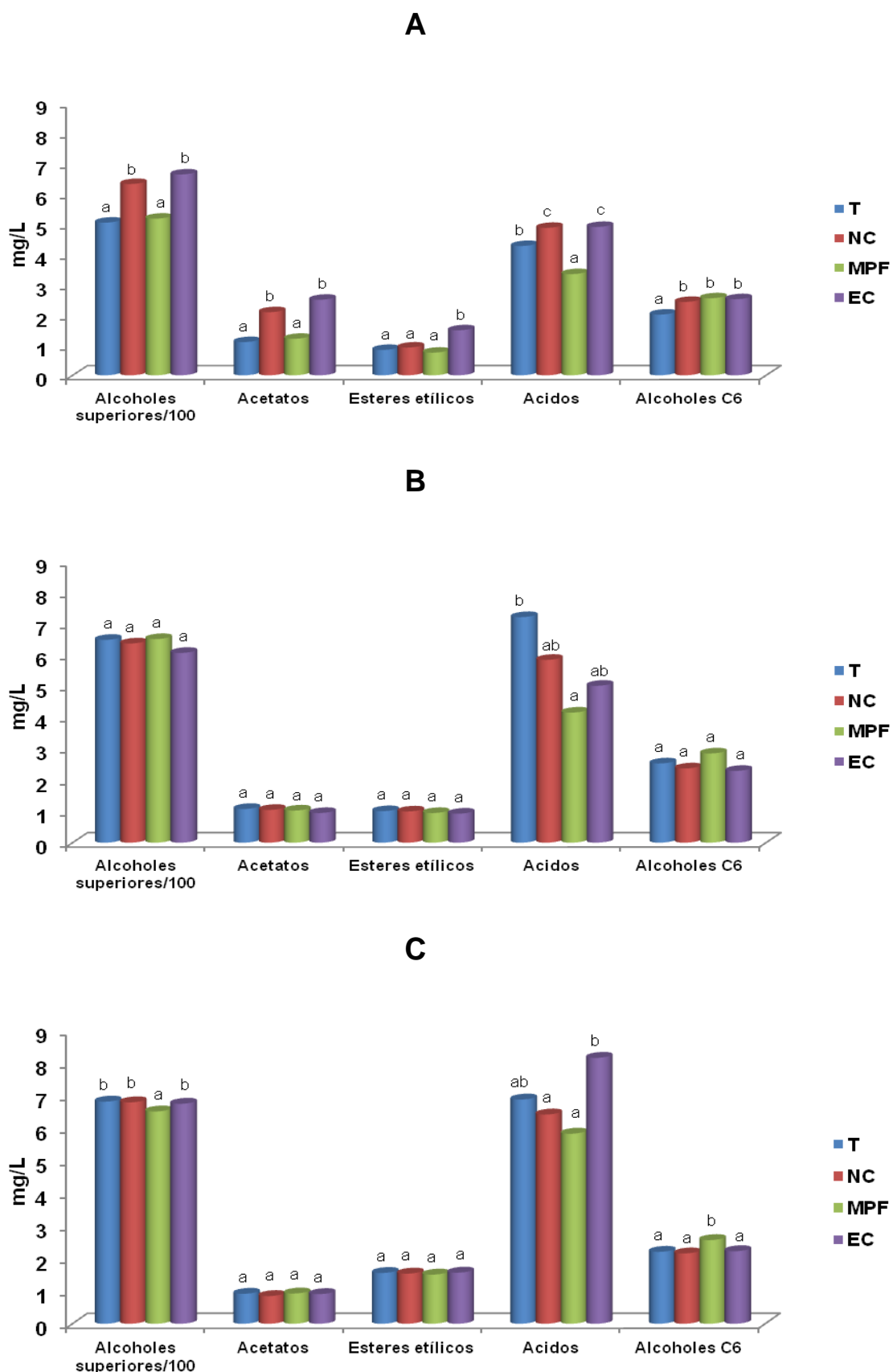
prefermentativa en frío dio lugar, en todos los momentos analizados, a los vinos con menor contenido de ácidos.

Respecto a la concentración de alcoholes C6, al final de la fermentación alcohólica todos los tratamientos produjeron un aumento en la presencia de estos compuestos al compararlos con los del vino testigo. Aunque nuevamente las diferencias se hicieron menos notable al transcurrir la vinificación, de forma que 6 meses después del embotellado sólo en el vino obtenido por maceración prefermentativa en frío presentaba un contenido de alcoholes C6 significativamente mayor que el del testigo.

Podríamos concluir que en la campaña 2009 el tratamiento con nieve carbónica y, especialmente, con el preparado enzimático comercial fueron los que más influyeron sobre la concentración de alcoholes superiores, acetatos, ésteres y ácidos, aunque las diferencias encontradas al final de la fermentación alcohólica desaparecieron al evolucionar los vinos (excepto en el contenido de ácidos mostrado con el preparado enzimático). Al igual que en la campaña anterior, la maceración prefermentativa en frío no tuvo mucha influencia sobre el contenido de estos compuestos, aunque sí provocó un aumento en la concentración de alcoholes C6.

Coincidiendo con lo observado en el estudio de los parámetros cromáticos, los efectos de las distintas técnicas sobre la composición aromáticas de los vinos de Monastrell no se vio muy marcada por el efecto añada. Tal y como se explicó en el capítulo anterior, las uvas de Monastrell de ambas campañas no mostraron tantas diferencias entre sí como las uvas de Cabernet Sauvignon y de Syrah, lo que explicaría que en los vinos de Monastrell se observara menor diferencia del efecto de los tratamientos entre un año y otro.

Gráfica 5.6. Composición aromática en vinos de Monastrell, campaña 2009 (A: final de la fermentación alcohólica; B: momento de embotellado; C: 6 meses después del embotellado).



**6. INFLUENCIA SOBRE LAS
CARACTERÍSTICAS SENSORIALES
DE LOS VINOS**

6.1 INTRODUCCIÓN.

El análisis físico-químico y microbiológico del vino nos permite conocer su composición, sus características analíticas y su estabilidad, pero es el análisis sensorial el que nos permite emitir un juicio completo sobre su calidad y sus características específicas y diferenciadoras.

La Real Academia de la Lengua define la cata como “la operación que consiste en analizar y apreciar los caracteres organolépticos, y más concretamente, las características olfativas y gustativas de un producto”. Los principales objetivos de la cata son detectar e identificar las sensaciones y tener la capacidad de expresarlos.

Un catador debe poseer un conocimiento previo del producto a valorar para poder ejercer un juicio objetivo del mismo. El catador debe ser capaz de asimilar e integrar el vocabulario calificador específico, identificar cualitativamente los parámetros sensitivos aislados (colores, olores, aromas, sabor y textura) y cuantificar estas características con precisión. El entrenamiento es una herramienta imprescindible que permite a cada catador tener fidelidad y precisión en la descripción sensorial.

El lugar donde se realiza la cata debe cumplir ciertos requisitos, de forma que los catadores no tengan ninguna influencia visual, auditiva u olfativa del entorno. Debe contar con una buena iluminación, a ser posible luz natural o, en su defecto, luz blanca. La sala debe ser de colores claros o neutros y estar bien ventilada y sin olores extraños ni ruidos. La temperatura de la sala debe ser de unos 18-19 °C.

Durante la cata, se deben facilitar al catador las herramientas necesarias para la valoración: una escupidera, agua y pan (para eliminar los compuestos del vino que reaccionan con las papilas gustativas tras la cata) y, por supuesto, la ficha de cata donde el catador anotará las observaciones pertinentes. La copa o catavinos debe ser homologado, con forma de tulipán, y debe estar situada sobre un fondo blanco para una mejor percepción de la fase visual.

La preparación y presentación de los vinos a catar también debe seguir una metodología para evitar influencias externas que provoquen errores en la cata. Las muestras deben prepararse en un lugar que no sea visible para los catadores, para que estos no tengan ningún juicio previo del vino a catar. Se suele utilizar un código identificativo de 3 cifras en cada muestra, para respetar el anonimato del vino. La temperatura de servicio dependerá del tipo de vino, en el caso de vinos tintos jóvenes debe estar entre 16-18°C.

Para evitar la fatiga sensorial del catador, el número de vinos a catar debe ser moderado. A partir de 15 o 20 muestras, y con intervalos de 5 minutos entre análisis, se comienza a llegar al límite de saturación de un panel. El panel o grupo de catadores está compuesto por un número más o menos elevado de personas, en el que cada catador está considerado como una repetición de la medida.

6.1.1 FASES DE LA CATA

La ejecución de la cata se lleva a cabo en tres fases consecutivas: fase visual, fase olfativa y fase gustativa.

A través de la fase visual se establece la primera toma de contacto con el vino y permite predecir ciertas características de las siguientes fases. El examen visual nos informa sobre la apariencia externa de los vinos. Las sensaciones visuales son la limpidez, la brillantez, la viscosidad y el color. En la apreciación del color destacan dos aspectos, la intensidad y la tonalidad, que proporcionan información sobre la cantidad de compuestos extraídos y sobre el grado de evolución de un vino respectivamente.

La fase olfativa es fundamental en la cata del vino. Permite apreciar las cualidades y defectos del vino y está muy relacionada con la fase gustativa, ya que los aromas también se perciben durante la deglución, por vía retronasal. La descripción aromática es muy compleja, debido a la multitud de sustancias odorantes presentes en el vino, y se divide, de manera general, en tres etapas:

- Medir la intensidad del aroma.
- Definir las características del aroma.
- Juzgar la calidad del aroma.

La fase gustativa constituye el momento en el que el vino pasa a la boca y reviste una gran dificultad, ya que están implicados varios sentidos: las papilas gustativas (gusto), los receptores táctiles y térmicos de la boca (tacto) y la mucosa olfativa (olfato), incluso el oído. La fase gustativa también se divide en varias etapas:

- Identificar los sabores fundamentales (dulce, salado, ácido y amargo), midiendo su intensidad y el equilibrio entre ellos.
- Clasificar los aromas encontrados en boca.
- Evaluar la calidad, el equilibrio y la persistencia gustativa.
- Juzgar la armonía global de todas las sensaciones.

6.1.2 TIPOS DE PRUEBAS SENSORIALES

Los distintos tipos de pruebas sensoriales se pueden clasificar en tres categorías:

1. **Pruebas de diferenciación:** Su finalidad es determinar si existen diferencias entre vinos. Entre estas destacan las pruebas “dúo-trío” (una muestra marcada “R” sirve de referencia y el catador debe determinar la muestra idéntica a “R” entre otras dos muestras que se le presentan al mismo tiempo), la prueba “A-no A” (una muestra “A” es presentada al catador, que debe memorizar sus características, después se le presentan sucesivamente otras muestras diferentes y el catador debe evaluar las que son idénticas a “A” y las que son diferentes a “A”) y, finalmente, la prueba “triangular” (se dispone de 3 muestras, dos son idénticas y la tercera es diferente, el catador debe distinguir la muestra que es diferente). La prueba triangular es la prueba de diferenciación más utilizada.

- 2. Pruebas de clasificación:** Se utilizan para clasificar vinos de acuerdo a algún elemento diferenciador. La más simple es la prueba por parejas, en la que a cada catador se le presentan dos vinos y se le pide, por ejemplo, determinar cuál de los dos es el más ácido. También se pueden emplear para clasificar distintos vinos según un orden de intensidad creciente o decreciente. Otros tipos de prueba de clasificación son aquellas en las que cada muestra presentada debe ser colocada en una categoría, previamente definida y bien conocida por el catador.

- 3. Pruebas descriptivas:** En las que también se realiza una clasificación, pero con una información más completa, puesto que se cuantifican las diferencias entre los vinos. Se basan en la detección y la descripción de los aspectos sensoriales cualitativos y cuantitativos del vino. Se utiliza una terminología estandarizada y los catadores deben dar valores cuantitativos proporcionales a la intensidad percibida del atributo evaluado.

El tipo de prueba sensorial elegido como método de evaluación dependerá del objetivo que se persiga al analizar los vinos.

El análisis sensorial proporciona gran información y, aunque durante mucho tiempo se consideró una técnica complementaria, se ha convertido en una técnica imprescindible para el buen conocimiento de los vinos, gracias a una aproximación cada vez más rigurosa del método analítico y al tratamiento matemático de los resultados obtenidos.

6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El análisis sensorial se utilizó como herramienta para conocer la repercusión de los tratamientos de frío y enzimáticos en la degustación de los vinos, comparándolos con los vinos obtenidos mediante una elaboración tradicional.

En la campaña 2007 se realizaron catas triangulares en el momento del embotellado y 6 meses después del embotellado, enfrentando el vino testigo con los vinos obtenidos en cada uno de los tratamientos, con el fin de evaluar si los catadores eran capaces de diferenciar entre el testigo y el tratamiento. También se pidió a los catadores que indicasen cuál era el vino preferido. Se utilizó la técnica del “juicio forzado”, en la que solo se tienen en cuenta las respuestas correctas para cuantificar las preferencias. Se realizó un análisis descriptivo de los vinos, transcurridos 6 meses tras el embotellado. La intensidad de cada uno de los atributos fue valorada en una escala de uno a diez, dando mayor puntuación a mayor sensación. Durante la campaña 2009 las catas triangulares y descriptivas se llevaron a cabo al finalizar la fermentación alcohólica y 6 meses después del embotellado.

6.2.1 CABERNET SAUVIGNON

La **Tabla 6.1** muestra los resultados obtenidos en las catas triangulares de los vinos de Cabernet Sauvignon.

En los vinos analizados en la **campaña 2007** en el momento del embotellado, los catadores no encontraron diferencias significativas entre los vinos tratados y el vino testigo. Sin embargo, al evolucionar el vino y repetir la cata triangular 6 meses después, los catadores fueron capaces de distinguir significativamente todos los tratamientos, mostrando preferencia por los vinos tratados al enfrentarlos al vino testigo (excepto en el vino obtenido por adición de enzima galactosidasa, en el que el 50% de los catadores prefirió el testigo y el otro 50% prefirió el tratamiento). El número de aciertos mostró un alto nivel de significancia ($p < 0,001$) en el caso de los vinos obtenidos por congelación de la uva y en los vinos con adición de preparado enzimático comercial. Estos

resultados coincidieron con los resultados obtenidos en los parámetros cromáticos en los vinos de Cabernet Sauvignon en la campaña 2007, en los que se observó que las diferencias entre los tratamientos y el testigo, especialmente en valores de intensidad de color y antocianos totales, aumentaban con la evolución del vino en botella. Aunque en el análisis descriptivo de los vinos de Cabernet Sauvignon en esa campaña (**Figura 6.1**) no se encontraron grandes diferencias entre los tratamientos y el vino testigo, los vinos con mayor calificación fueron los vinos obtenidos por congelación previa de la uva y por adición de nieve carbónica. Fue en la evaluación de la calidad olfativa donde se observaron más diferencias entre estos dos tratamientos y el resto de los vinos. El resultado pudo deberse a que, a los 6 meses, las técnicas de frío dieron lugar a vinos con mayores valores de ésteres etílicos y, especialmente, de acetatos que aportan notas frutales de calidad (Morro-Urda, 2009).

Respecto a la **campaña 2009**, en las catas triangulares de los vinos de Cabernet Sauvignon, los catadores no encontraron muchas diferencias entre los vinos tratados y el testigo. En la cata realizada a final de fermentación alcohólica, el número de aciertos solo fue significativo para el tratamiento de maceración prefermentativa en frío y, en la cata triangular a los 6 meses, para el tratamiento enzimático. En ambos casos, los catadores marcaron mayoritariamente el vino testigo como preferido. Las catas descriptivas de esta campaña (**Figura 6.2**) también muestran que, a final de fermentación alcohólica, las puntuaciones para todos los vinos fueron muy similares. La intensidad olfativa fue el único atributo en el que se observaron diferencias, siendo el vino testigo el mejor puntuado, seguido por el tratamiento con nieve carbónica. Estos dos vinos fueron los que presentaron mayor contenido de alcoholes superiores al final de la fermentación alcohólica y, aunque las concentraciones no fueron estadísticamente mayores que en el resto de tratamientos, es posible que los catadores apreciaran mayores intensidades olfativas ya que, en valores absolutos, las concentraciones alcanzaron valores muy superiores a los umbrales de percepción. Los alcoholes superiores son los responsables de las notas alcohólicas o vinosas características de los vinos

jóvenes, por lo que la intensidad olfativa depende, en gran medida, de su mayor o menor concentración en el vino (Garijo, 2001).

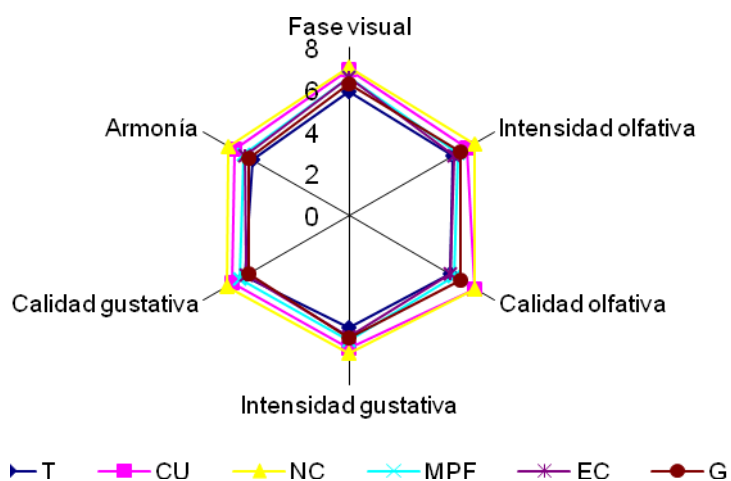
En la cata descriptiva realizada a los 6 meses si se observaron diferencias en la evaluación de los atributos. El vino testigo fue el que obtuvo mejor puntuación, especialmente al evaluar la calidad olfativa y los atributos gustativos. En los resultados de los parámetros cromáticos y aromáticos de los vinos de Cabernet Sauvignon a los 6 meses, el vino testigo fue el que presentó mayor contenido de antocianos y de alcoholes superiores y ésteres etílicos. Esto podría explicar la mejor puntuación del vino testigo en la calificación de los atributos gustativos y de la armonía en la cata descriptiva realizada a los 6 meses.

Tabla 6.1. Catas triangulares de los vinos de Cabernet Sauvignon.

Año	Momento	Muestras	Número repetición	Número aciertos	Muestra Preferida	
					Testigo	Tratamiento
2007	EPF	T vs CU	10	3	1	2
		T vs NC	10	4	2	2
		T vs MPF	10	6	0	6
		T vs EC	10	6	1	5
		T vs G	10	6	2	4
	6M	T vs CU	9	8***	2	6
		T vs NC	9	7**	1	6
		T vs MPF	9	6*	1	5
		T vs EC	9	8***	4	4
		T vs G	9	7**	1	6
2009	FFA	T vs NC	10	4	3	1
		T vs MPF	10	7*	4	3
		T vs EC	10	5	2	3
	6M	T vs NC	9	4	4	0
		T vs MPF	9	4	0	4
		T vs EC	9	8***	5	3

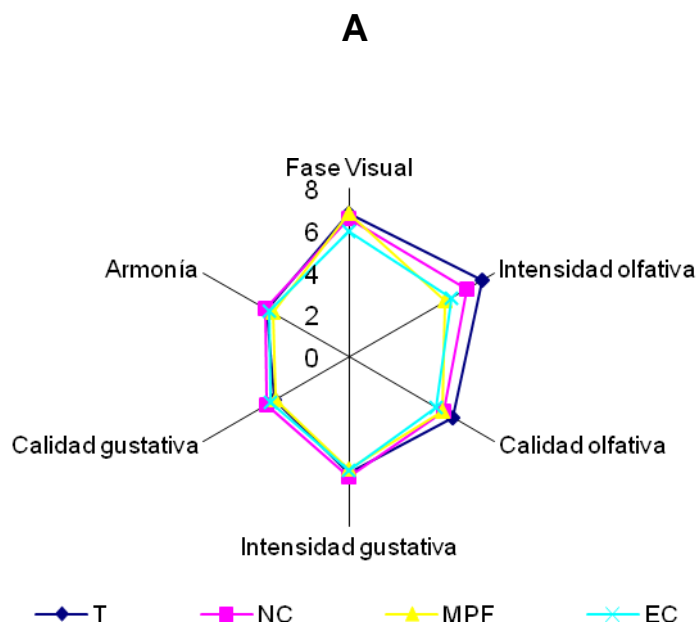
Abreviaturas: EPF: estabilización por frío; 6M: 6 meses; FFA: final de fermentación alcohólica; T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; *número de aciertos estadísticamente significativo ($p < 0,05$); **número de aciertos estadísticamente significativo ($p < 0,01$); ***número de aciertos estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

Figura 6.1. Cata descriptiva de vinos de Cabernet Sauvignon realizada 6 meses después del embotellado, campaña 2007.

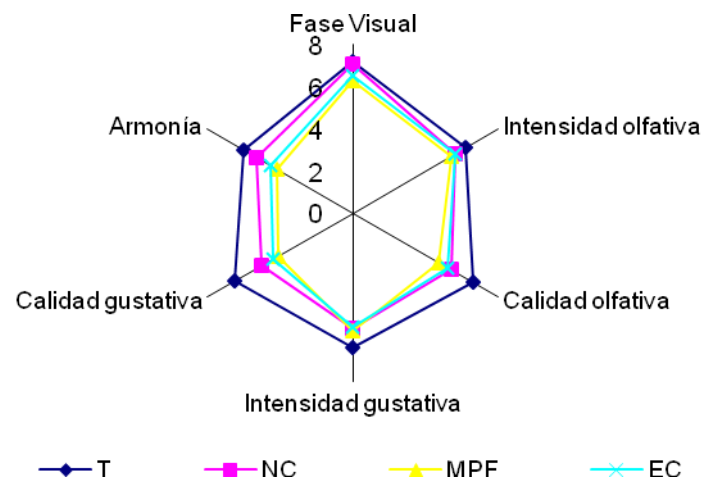


Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa.

Figura 6.2. Catas descriptivas de vinos de Cabernet Sauvignon, campaña 2009. (A: final de fermentación alcohólica; B: 6 meses de embotellado).



B



Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial.

6.2.2 SYRAH

En la **campaña 2007**, las catas triangulares de los vinos de Syrah (**Tabla 6.2**), mostraron que los catadores fueron capaces de diferenciar entre el vino testigo y todos los tratamientos, tanto en el momento del embotellado como 6 meses después, obteniéndose un alto nivel de significancia ($p < 0,001$) en el número de aciertos de todas las catas realizadas. Los resultados mostraron la preferencia de los catadores por todos los vinos tratados con técnicas de frío, especialmente del obtenido por congelación previa de la uva, al enfrentarlos con el vino testigo. Respecto a los tratamientos de adición de enzimas macerativos, se observó que en el momento del embotellado solo el 40% de los catadores los marcó como preferidos, sin embargo, al repetir la cata 6 meses, casi el 90% de los catadores prefirió los vinos tratados enzimáticamente. Si comparamos estos resultados con los obtenidos para los parámetros cromáticos, 6 meses después del embotellado, observamos que la intensidad de color de los vinos con los tratamientos enzimáticos fue la que menos disminuyó con el tiempo, presentando valores significativamente mejores que el resto de los vinos, con un mayor porcentaje de color debido a antocianos copigmentados y con mayor índice de polifenoles totales y, por consiguiente, mayor contenido de antocianos y taninos totales. Esto pone de manifiesto que la adición de enzimas macerativos en vinos de Syrah produjo, al evolucionar el vino, una mayor estabilización del color. Aunque en el momento del embotellado también se encontraron diferencias entre los tratamientos enzimáticos y el testigo, estas diferencias se hicieron más notables con el tiempo, lo que podría explicar, en parte, que los catadores mostraran mayor preferencia hacia estos vinos cuando la cata triangular se realizó 6 meses después del embotellado.

En la cata descriptiva de los vinos de Syrah en la campaña 2007 (**Figura 6.3**) también se observó que el vino testigo fue el menos valorado en la evaluación de la fase visual, de la calidad olfativa, de la calidad gustativa y de la armonía, resultados que coinciden con los obtenidos en la cata triangular. El tratamiento de adición de un preparado enzimático comercial fue el mejor puntuado al valorar la calidad olfativa y gustativa. En este vino no se

observaron concentraciones significativamente mayores de compuestos aromáticos que pudieran aportar calidad a un vino joven, aunque sí que se encontraron, junto con el otro tratamiento enzimático, menores concentraciones de alcoholes C6. Por lo tanto, es probable que los vinos obtenidos por adición de enzimas presentasen menores sensaciones de verdor y amargor. Por otro lado, algunos autores han señalado que las condiciones que favorecen la extracción de compuestos polifenólicos, causan también el aumento de la concentración de precursores aromáticos que, con la evolución del vino y mediante hidrólisis ácida, pueden generar compuestos norisoprenoides (Petrozziello et al., 2011), aumentando así la calidad olfativa del vino con el tiempo. No obstante, este tipo de compuestos no fue objeto de nuestro estudio, puesto que tienen más importancia en aquellos vinos destinados a largos periodos de envejecimiento. Las diferencias entre tratamientos y testigo disminuyeron cuando los atributos evaluados fueron la intensidad olfativa y gustativa. La explicación para esta observación podría encontrarse en el hecho de que el contenido en alcoholes superiores fue, estadísticamente, muy similar entre tratamientos y testigo. Sólo se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de congelación de la uva y nieve carbónica respecto al tratamiento de adición del preparado enzimático comercial, siendo este último el que presentó menores concentraciones, más próximas a los valores en los que estos compuestos pueden aportar notas aromáticas de calidad (Styger et al., 2011).

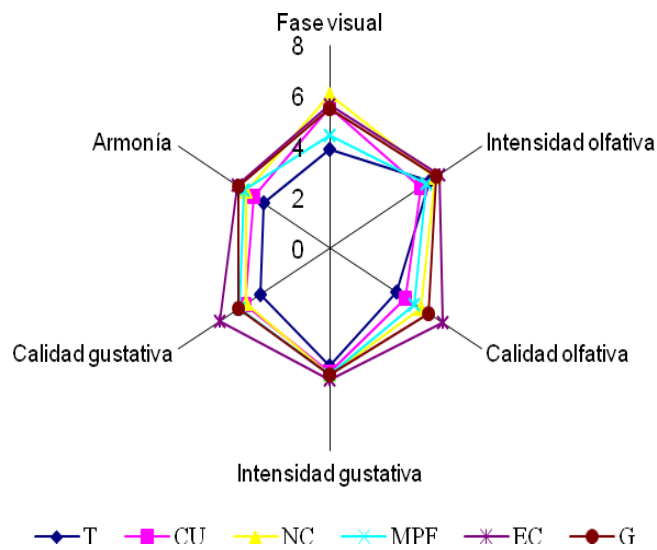
En la **campaña 2009**, el análisis sensorial confirmó que, ese año, los vinos de Syrah se vieron poco afectados por los tratamientos. Los catadores no fueron capaces de diferenciar significativamente entre tratamientos y vino testigo, ni al final de la fermentación alcohólica ni a los 6 meses de embotellado (**Tabla 6.2**). En las catas descriptivas (**Figura 6.4**) tampoco se observaron apenas diferencias en la valoración de los vinos. Se podría destacar una pequeña diferencia en la intensidad gustativa a final de la fermentación alcohólica, donde el tratamiento con nieve carbónica fue peor valorado. Este tratamiento presentó una concentración de flavonoles y taninos significativamente menor en ese momento, lo que podría explicar su peor valoración en la intensidad gustativa.

Tabla 6.2. Catas triangulares de los vinos de Syrah.

Año	Momento	Muestras	Número repetición	Número aciertos	Muestra Preferida	
					Testigo	Tratamiento
2007	EPF	T vs CU	10	9***	1	8
		T vs NC	10	10***	4	6
		T vs MPF	10	9***	3	6
		T vs EC	10	10***	6	4
		T vs G	10	10***	6	4
	6M	T vs CU	9	9***	1	8
		T vs NC	9	9***	2	7
		T vs MPF	9	9***	4	5
		T vs EC	9	9***	1	8
		T vs G	9	9***	1	8
2009	FFA	T vs NC	10	4	2	2
		T vs MPF	10	1	1	0
		T vs EC	10	4	3	1
	6M	T vs NC	9	5	1	4
		T vs MPF	9	5	1	4
		T vs EC	9	4	1	3

Abreviaturas: EPF: estabilización por frío; 6M: 6 meses; FFA: final de fermentación alcohólica; T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; *número de aciertos estadísticamente significativo ($p < 0,05$); **número de aciertos estadísticamente significativo ($p < 0,01$); ***número de aciertos estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

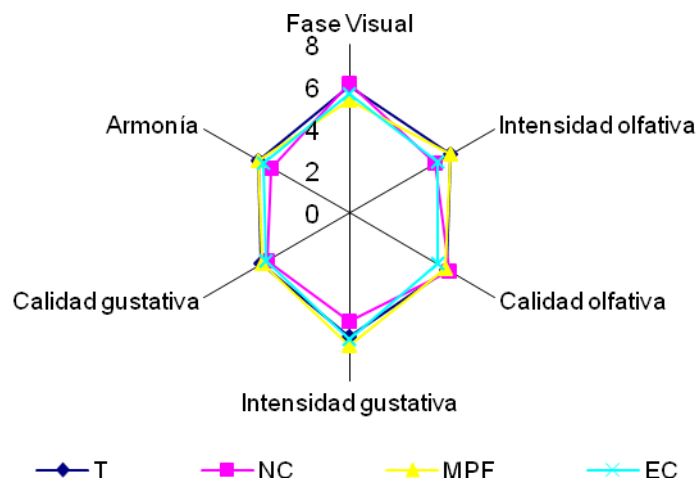
Figura 6.3. Cata descriptiva de vinos de Syrah realizada 6 meses después del embotellado, campaña 2007.

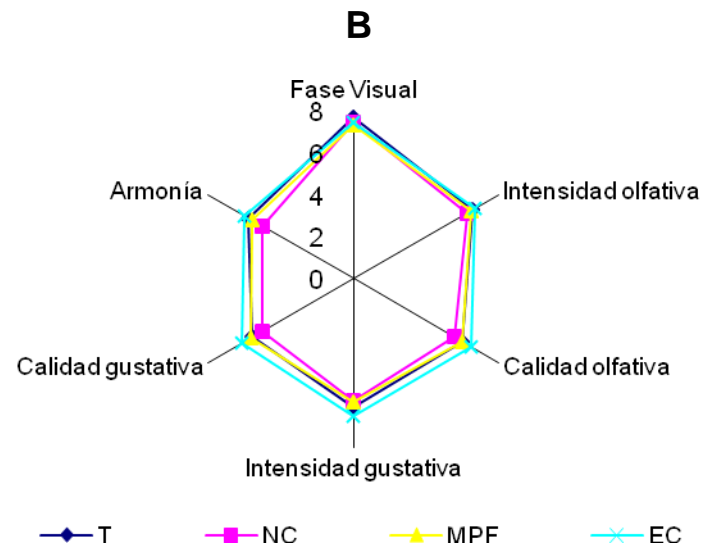


Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa.

Figura 6.4. Catas descriptivas de vinos de Syrah, campaña 2009. (A: final de fermentación alcohólica; B: 6 meses de embotellado).

A





Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial.

6.2.3 MONASTRELL

En el análisis sensorial de los vinos de Monastrell en la **campaña 2007** se obtuvo un resultado similar al de los parámetros cromáticos, fenólicos y aromáticos. Los vinos de esta variedad fueron los menos afectados por los tratamientos durante esta campaña. Los catadores no fueron capaces de diferenciar significativamente los tratamientos enzimáticos respecto al vino testigo, tal y como muestran los resultados de las catas triangulares (**Tablas 6.3**). Respecto a los tratamientos de frío, en el momento del embotellado, los resultados mostraron un número de aciertos significativo en el caso de la congelación de la uva y de la adición de nieve carbónica (aunque con niveles de significancia mucho menores que los observados en Syrah o Cabernet Sauvignon). Los catadores solo mostraron preferencia por el vino obtenido por adición de nieve carbónica. Al repetir la cata, 6 meses después del embotellado, los catadores ya no fueron capaces de diferenciar entre el tratamiento por congelación de la uva y el testigo. En el caso de la nieve carbónica, el número de aciertos siguió siendo significativo, aunque dejó de ser mayoritariamente preferido al enfrentarlo con el testigo. En esta segunda cata, los catadores si diferenciaron significativamente entre el vino obtenido por maceración prefermentativa en frío y el vino testigo, siendo el tratamiento de maceración en frío el marcado como preferido. Sin embargo, en la cata descriptiva (**Figura 6.5**) realizada a los 6 meses de embotellado, este vino obtuvo las puntuaciones más bajas al evaluar la fase visual y la intensidad olfativa. El tratamiento por congelación de la uva también obtuvo bajas puntuaciones en la descripción de la calidad gustativa y de la armonía. Los resultados de la cata descriptiva no parecen coincidir con las preferencias mostradas por los catadores en la cata triangular. Si tenemos en cuenta el bajo número de aciertos y la poca significancia de estos, comparándolos con los obtenidos en vinos de Syrah y de Cabernet Sauvignon durante la campaña 2007, podríamos decir que en los vinos de Monastrell los tratamientos no produjeron grandes diferencias en las características sensoriales.

En las catas triangulares de la **campaña 2009 (Tabla 6.3)**, el número de aciertos a final de la fermentación alcohólica solo fue significativo para el

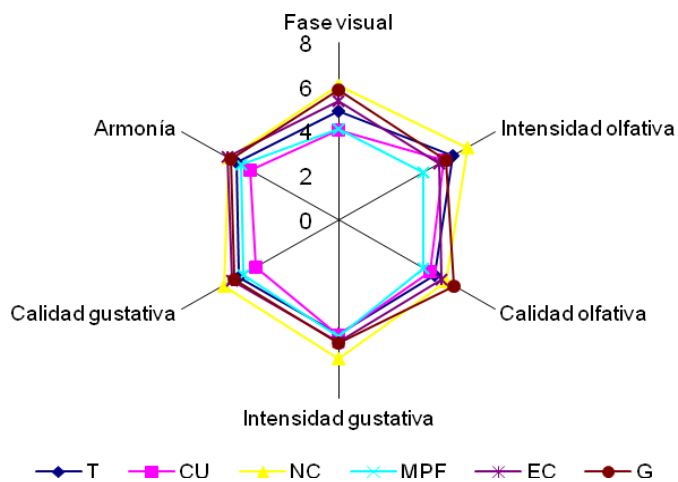
tratamiento de maceración prefermentativa en frío, que fue mayoritariamente preferido por los catadores al enfrentarlo con el vino testigo. En la cata triangular realizada 6 meses después, el número de aciertos fue significativo para este mismo tratamiento y para el tratamiento de adición de un preparado enzimático comercial, aunque, en ambos casos, el vino testigo fue preferido frente a los tratamientos. En las catas descriptivas de final de fermentación alcohólica y 6 meses después del embotellado (**Figura 6.6**) se observaron pocas diferencias en la valoración de los vinos. El vino obtenido por maceración prefermentativa en frío obtuvo una puntuación ligeramente mayor al evaluar los atributos olfativos al final de la fermentación alcohólica, lo que podría explicar la preferencia de los catadores por este vino en la cata triangular. En la cata descriptiva tras 6 meses de embotellado, el tratamiento con nieve carbónica fue el menos valorado en los atributos olfativos y gustativos, aunque sin grandes diferencias en la valoración respecto al resto de vinos.

Tabla 6.3. Catas triangulares de los vinos de Monastrell.

Año	Momento	Muestras	Número repetición	Número aciertos	Muestra Preferida	
					Testigo	Tratamiento
2007	EPF	T vs CU	10	7*	5	2
		T vs NC	10	8*	2	6
		T vs MPF	10	6	3	3
		T vs EC	10	4	2	2
		T vs G	10	6	2	4
	6M	T vs CU	7	4	2	2
		T vs NC	7	6**	3	3
		T vs MPF	7	7***	2	5
		T vs EC	7	4	1	3
		T vs G	7	4	1	3
2009	FFA	T vs NC	10	6	1	5
		T vs MPF	10	7*	2	5
		T vs EC	10	3	2	1
	6M	T vs NC	9	3	2	1
		T vs MPF	9	8**	6	2
		T vs EC	9	7**	5	2

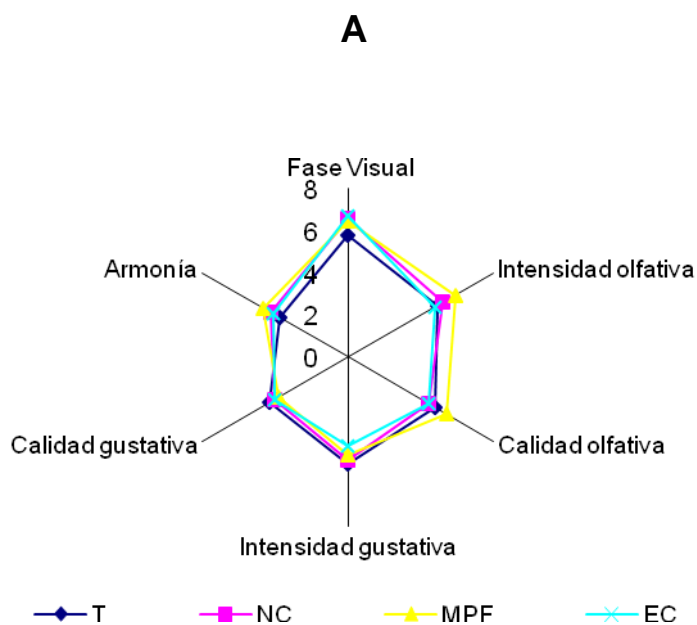
Abreviaturas: EPF: estabilización por frío; 6M: 6 meses; FFA: final de fermentación alcohólica; T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; *número de aciertos estadísticamente significativo ($p < 0,05$); **número de aciertos estadísticamente significativo ($p < 0,01$); ***número de aciertos estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

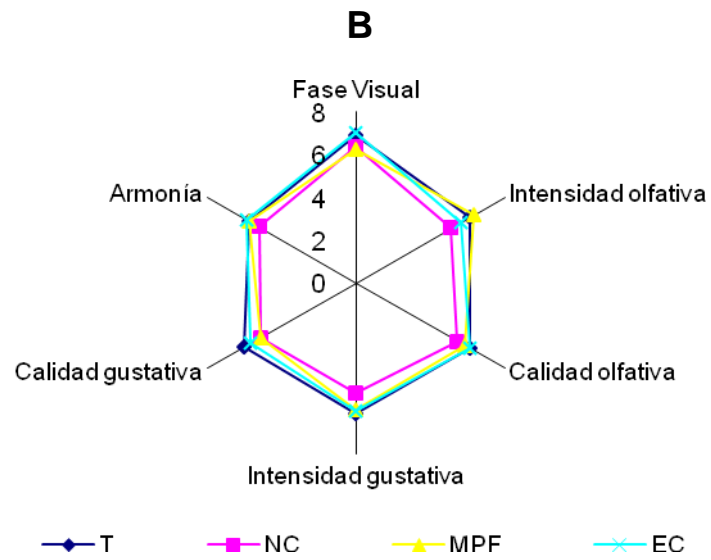
Figura 6.5. Cata descriptiva de vinos de Monastrell realizada 6 meses después del embotellado, campaña 2007.



Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa.

Figura 6.6. Catas descriptivas de vinos de Monastrell, campaña 2009. (A: final de fermentación alcohólica; B: 6 meses de embotellado).





Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial.

7. INFLUENCIA DE LA ZONIFICACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE VINOS DE MONASTRELL

7.1 INTRODUCCIÓN

La calidad del vino está fuertemente influenciada por la calidad de la uva empleada en el proceso de vinificación. Factores como el clima, el suelo y las prácticas culturales están íntimamente relacionadas con el desarrollo morfológico de la baya, influyendo sobre los procesos de inducción, sobre la diferenciación floral y sobre las rutas de síntesis derivadas de la fotosíntesis, como es la síntesis de azúcares y, a partir de ellos, la de ácidos y metabolitos secundarios responsables del color, cuerpo y aroma del vino. Las características climáticas, la composición del suelo y su capacidad de drenaje tienen una gran importancia sobre la composición de la uva y, por tanto, sobre la calidad final del vino. El concepto de “*Terruño*” o “*Terroir*” condiciona que, dependiendo de la zona, una misma variedad vinífera pueda producir uvas con diferente composición.

7.1.1 FACTORES EDAFOCLIMÁTICOS

El clima es el resultado de las condiciones atmosféricas generales donde se asienta el viñedo. En general, la vid en los climas cálidos produce vendimias ricas en azúcares y polifenoles y pobres en acidez, mientras que en climas fríos se obtienen vendimias con bajas concentraciones en azúcares y polifenoles y elevada acidez (Mateus et al., 2001). Así, factores como la temperatura, la pluviosidad, la insolación y la composición del suelo tendrán una gran influencia sobre las características de la baya y, por tanto, sobre la calidad final del vino.

7.1.1.1 Temperatura

La temperatura es un factor esencial para un desarrollo vegetativo bueno y para una maduración completa de la uva. Durante el reposo invernal, la vid es capaz de resistir temperaturas extremas de incluso -12°C . Sin embargo, tras la brotación, las heladas de primavera pueden destruir los brotes jóvenes si la temperatura del aire desciende por debajo de -2.5°C (Andrades-Rodríguez y González-San José, 1995).

Durante la maduración, para alcanzar concentraciones de azúcares y ácidos orgánicos satisfactorias, la temperatura media debe alcanzar al menos 18°C. Las temperaturas bajas provocan un bajo nivel de polifenoles en las uvas, al igual que ocurre con temperaturas muy elevadas, ya que la síntesis de estos compuestos se inhibe por encima de los 35°C. (Kliewer y Torres, 1972). El rango óptimo para la síntesis de antocianos está entre 17-26°C, siendo en los climas cálidos donde se producen uvas más coloreadas ya que el óptimo de temperatura coincide con la maduración (Bautista-Ortín, 2005). La acumulación de antocianos y taninos se ve favorecida cuando se produce una alternancia de temperaturas altas y bajas entre las horas del día y de la noche (Cresy, 2001). Además, una marcada diferencia entre la temperatura nocturna y la diurna también favorece una maduración lenta del fruto, lo que lleva consigo el desarrollo óptimo de los constituyentes aromáticos.

También se ha demostrado que altas temperaturas en la proximidad de la vendimia provocan una gran disminución de la acidez. Meriaux (1982) encontró correlaciones negativas entre la suma de los grados/día del periodo de maduración y la acidez de los mostos.

7.1.1.2 Pluviosidad

Las lluvias de invierno no tienen influencia directa sobre la fisiología de la vid. El agua penetra en el suelo donde puede ser drenada o retenida. Cuando es retenida constituye una reserva que se utilizará durante el verano. Es conveniente que los veranos sean cálidos y secos. Los veranos húmedos y las lluvias en época de crecimiento favorecen el ataque de plagas. Las precipitaciones anuales deben estar alrededor de 600 mm, y entre los meses de Abril a Septiembre los valores óptimos deben estar entre 250 y 300 mm (Andrades-Rodríguez, 1995).

La disponibilidad hídrica de la cepa tiene una gran influencia sobre el contenido en compuestos fenólicos (Jackson y Lombard, 1993). Muchos autores sostienen que el contenido en compuestos fenólicos disminuye drásticamente en años muy lluviosos debido, probablemente, al tamaño

alcanzado por las bayas y, por lo tanto, a la menor relación hollejo/pulpa (Fregoni, 1977; Guilloux, 1981; Koundouras et al., 1999). Aunque, por otro lado, existe un nivel crítico de alimentación hídrica por debajo del cual disminuye el almacenamiento de azúcares en la baya.

7.1.1.3 Insolación.

Uno de los principales factores que influye sobre la síntesis de compuestos fenólicos es la insolación. Por una parte es imprescindible para garantizar la fotosíntesis, necesaria para abastecer de energía a la planta, y por otra parte actúa directamente sobre la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Zamora, 2003). La fenilalanina es transformada en ácido cinámico gracias a la acción del enzima PAL, después el ácido cinámico es utilizado para la síntesis de todos los compuestos fenólicos (Shirley, 1998). El enzima PAL se ve fuertemente activado por la presencia de luz, mientras que en la oscuridad se produce una desactivación (Hiratsuka, 2001).

El mínimo anual de horas de insolación necesarias para el cultivo de la vid se estima entre 1500 y 1600, de las cuales unas 1200 deben recibirse en el periodo vegetativo (Winkler, 1978). Aunque un exceso de horas de insolación puede producir deficiencias en la calidad del vino, con una elevada graduación alcohólica y un bajo contenido de ácido málico (Andrades-Rodríguez, 1995).

7.1.1.4 Suelo.

El suelo se puede considerar como el resultado de la interacción entre el clima y agentes activos (seres vivos) y pasivos (tipo de roca y relieve) (Gómez-Miguel, 2003).

En terrenos fértiles, ricos en materia orgánica y con un alto contenido de nitrógeno se producirá un gran desarrollo de la parte vegetativa de la planta, lo que provocará una síntesis proteica muy activa que necesitará utilizar una gran cantidad de la fenilalanina disponible en la uva. En esas condiciones no se podrá disponer de suficiente fenilalanina para sintetizar compuestos fenólicos,

por lo que se obtendrán cosechas muy abundantes pero pobres en compuestos fenólicos (Koundouras et al., 1999).

Por el contrario, en suelos poco fértiles y con cierto estrés hídrico se producirá menos desarrollo vegetativo, lo que significa que no se necesitará tanta fenilalanina para la síntesis proteica. Por lo tanto, habrá más fenilalanina disponible para la síntesis de compuestos fenólicos. Se obtendrán cosechas menores pero con uvas ricas en compuesto fenólicos.

De manera general se puede afirmar que terrenos pobres, sueltos, calizos y pedregosos dan lugar a vendimias de alta calidad, mientras que de terrenos fértiles se obtendrán altas producciones pero de peor calidad (Bautista-Ortín, 2005).

7.1.2 CONCEPTO DE ZONIFICACIÓN

Puesto que los factores edafoclimáticos juegan un papel muy importante en el desarrollo de la baya y, por tanto, en la calidad final del vino, resulta imprescindible estudiar las características climáticas y edafológicas de los terrenos vitícolas para conocer cómo afectarán a la producción.

La zonificación se define como la investigación del territorio con el fin de repartirlo en zonas relativamente homogéneas como resultado de la interacción entre el viñedo y el ambiente (Fregoni, 1998). La zonificación agroecológica de áreas cultivadas tiene por objeto determinar espacios con distintas aptitudes para la producción agrícola.

En España la producción de vinos de calidad se centra fundamentalmente en un sistema de distribución territorial basado en las Denominaciones de Origen y a este respecto, P. Huglin consideraba ya en 1978 que se deben basar en *“la delimitación de zonas con condiciones ecológicas particularmente privilegiadas o, como rara vez se dice, simplemente originales”*.

En la vid, la zonificación permite indicar que variedades tienen más adaptación en cada lugar, conocer las limitaciones ambientales para el cultivo y sentar las bases de estudios sobre tipicidad y originalidad de la producción que permitan establecer áreas con indicación geográfica o denominación de origen y dentro de ellas, subzonas singulares por su potencialidad de dar vinos de calidad diferenciada (Atenza-Juárez et al., 2008).

Hidalgo (1980), realizó una primera zonificación climática de las áreas vitícolas en España, utilizando diversos índices, válida a nivel macroclimático. Pero el análisis a escala mesoclimática requiere circunscribir áreas de extensión más limitadas y un buen conocimiento de las condiciones locales, para lo que se necesita contar con un gran número de estaciones meteorológicas. La caracterización de zonas vitícolas plantea en España problemas específicos por las características peculiares del territorio, por el tamaño, distribución e índice de ocupación vitícola en las distintas Denominaciones de Origen.

Para realizar un estudio global de zonificación es necesaria una compleja investigación interdisciplinar (edafológica, geológica, cartográfica, enológica, estadística, informática e, incluso, económica).

Atenza-Juárez et al. (2008) realizó un estudio de zonificación vitícola de la variedad Monastrell en la D.O. Jumilla, obteniendo como resultado un parcelario digital de la zona productora cuyas unidades cartográficas sintetizan las relaciones entre el factor edáfico (drenaje, contenido de agua disponible, pH y profundidad del suelo), el factor morfológico del terreno (modelo digital de elevaciones, pendientes y orientación), y el factor climático (integrales térmicas e índices climáticos) para cada parcela registrada en la Denominación de Origen. Para facilitar el tratamiento de la información generada en la zonificación, ésta se integró en un Sistema de Información Geográfica (SIG) que conjuntamente con la información de calidad de la producción sirve para delimitar las áreas más adecuadas para obtención de vinos de calidad de uva Monastrell. El modelo obtenido puede ser extrapolado a las otras Denominaciones de Origen de la Región de Murcia.

La D.O. Jumilla se sitúa entre el Norte de la Región de Murcia y el Sureste de la provincia de Albacete, se trata de una altiplanicie rodeada de montañas que actúa como comarca de transición entre la llanura manchega y las tierras mediterráneas. Se trata de un territorio elevado (entre 400 y 900 m.s.n.) con suelos pardos y pardo-rojizos, calizos, sueltos y pedregosos, con una textura franca y franco-arenosa que les confiere una buena aireación. Poseen gran capacidad hídrica y mediana permeabilidad, aprovechando bien el agua disponible. Son suelos pobres en materia orgánica, con un pH alto y baja salinidad. El clima es duro, continental, aunque influido por el relativamente próximo Mediterráneo. Es un clima soleado (unas 300 horas de sol al año), árido y de escasas lluvias (alrededor de 300 l/m² anuales) que pueden llegar a ser torrenciales en algunas ocasiones. La temperatura media anual es de 16°C, con inviernos fríos que alcanzan temperaturas bajo cero y veranos calurosos donde se superan los 40°C. El periodo de heladas tiene lugar normalmente entre los meses de noviembre y marzo.

La D.O. Bullas abarca los municipios de Bullas, Mula, Ricote, Cehegín, Lorca, Caravaca y Moratalla. Se sitúa en altitudes que oscilan entre 400 y 800 m.s.n. El terreno es de topografía accidentada, con altitud creciente de sur a norte, que origina pequeños microclimas propios. El suelo es pardo-calizo, con bajo contenido en materia orgánica, buen drenaje y elevado nivel de caliza. Posee veranos muy calurosos, aunque el clima es generalmente más frío que en otras denominaciones murcianas, con fuertes vientos y heladas esporádicas entre los meses de octubre y abril. La temperatura media es de 15,6°C. En septiembre y octubre se pueden producir lluvias torrenciales y tormentas.

La D.O. Yecla comprende el término municipal de Yecla, a una altitud comprendida entre 400 y 800 m.s.n. Los suelos son de roca caliza, profundos y de gran permeabilidad, aprovechando bien las escasas lluvias (alrededor de 300 mm al año). Tiene inviernos muy fríos y veranos muy cálidos, con una temperatura media anual de 19,9 °C.

7.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En esta campaña se estudiaron las características de la uva en el momento de la vendimia y se compararon los parámetros cromáticos entre los vinos de las diferentes zonas obtenidos mediante una elaboración tradicional y analizados al final de la fermentación alcohólica. También se estudió el efecto de los tratamientos de frío y enzimáticos en la vinificación de las uvas de Monastrell de cada una de las zonas.

7.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA UVA EN EL MOMENTO DE LA VENDIMIA.

En la **Tabla 7.1** se recogen los resultados obtenidos al analizar las características fisicoquímicas de la uva en el momento de la vendimia. Las bayas de las uvas de Monastrell procedentes de la Cañada del Judío fueron las de mayor peso, y las de las zonas de Albatana y Chaparral las uvas de menor peso. No se observó diferencias en el contenido de azúcares entre las uvas de la Cañada del Judío, Albatana o Chaparral, sin embargo las uvas de la zona de Montealegre sí que presentaron un contenido de azúcares significativamente menor, coincidiendo además con un menor pH y una mayor acidez debida a una mayor concentración de ácido málico. Las uvas de Montealegre fueron también en las que se encontró una mayor índice de madurez celular (62,16 %) y un menor contenido de polifenoles totales. Los resultados parecen indicar que las uvas de esta zona se encontraban menos maduras y con menor facilidad frente a la extracción de compuestos fenólicos que las otras tres zonas, a pesar de que fueron las últimas en ser vendimiadas. En la **Tabla 3.2** del capítulo de Materiales y Métodos, en la que se recogen los datos edafoclimáticos de esta campaña, se puede observar que la zona de Montealegre se vendimió en octubre, mientras que las de Albatana y Chaparral se vendimiaron en septiembre y la de Cañada del Judío en agosto. Sin embargo, a pesar del largo período de maduración de las uvas de Montealegre, éstas alcanzaron menor madurez tecnológica y fenólica, lo que pudo ser debido a que en esa zona durante los meses de septiembre y octubre se registraron bajos valores de horas de sol y de temperatura media. Una menor insolación influye directamente sobre el enzima PAL, que se ve menos activado para la

transformación de fenilalanina en ácido cinámico, necesario para la síntesis de todos los compuestos fenólicos (Zamora, 2003). Por otro lado, el rango óptimo de temperatura para la formación de antocianos está entre 17-26 °C (Bautista-Ortín, 2005) y en la zona de Motealegre, las temperaturas de los meses de septiembre y octubre fueron, respectivamente, 18,90 °C y 14,43 °C. Esta zona es la que se encuentra a una mayor altitud (777, 43 m.s.n) y, en altitud, es posible observar una disminución de unos 0,6 °C por cada 100 metros (Hancock, 2005).

El índice de madurez de las pepitas (% IMP) fue elevado y muy similar en las cuatro zonas, sólo se encontraron diferencias entre la zona de la Cañada del Judío y la de Albatana, siendo esta última la que mostró un IMP un poco inferior (56,96 %).

Las uvas de las zonas de Albatana y Cañada del Judío tuvieron una concentración de antocianos y un índice de polifenoles totales significativamente mayor que las de Montealegre y Chaparral. De hecho, el contenido de antocianos de las uvas de Chaparral fue incluso menor que el de las uvas de Montealegre. En la **Tabla 3.2** se puede observar que en el Chaparral, en el último mes de la maduración, las horas de sol y la temperatura fueron inferiores que en la Cañada del Judío y en Albatana, coincidiendo además con una mayor precipitación. Estos factores influyeron en una menor síntesis de antocianos en las uvas de esta zona.

Tabla 7.1. Características químico-físicas de la uva en el momento de la vendimia, campaña 2008

Zona	Peso 100 bayas (g)	°Brix	pH	Acidez Total ^a	Ac. Málico (g/L)	Ac. Tartárico (g/L)	IMC (%)	IMP (%)	IPT	AT
Cañada del Judío	178c	24,87b	3,82b	3,91c	1,90b	5,60d	42,91a	59,55b	64,43c	1.160,55c
Albatana	157a	24,87b	3,85b	3,31b	1,45a	4,04a	43,36a	56,96a	65,10c	1245,03d
Montealegre	166b	20,13a	3,52a	5,25d	3,19d	4,47b	62,16b	57,86ab	33,84a	942,80b
Chaparral	154a	25,19b	4,12c	3,12a	2,58c	5,15c	41,75a	58,54ab	44,67b	799,04a

Letras diferentes en la misma columna y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 0,05$) $n=3$.
 Abreviaturas: ^a : acidez total expresada en g/L de ácido tartárico; IMC: índice de madurez celular; IMP: índice de madurez de las pepita; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L mosto).

Se realizó también un estudio de la composición de antocianos, flavonoles y proantocianidinas de las uvas en el momento de la vendimia.

La **Tabla 7.2** muestra los resultados obtenidos en el análisis, mediante HPLC, de la composición antocianica. Los valores de las concentraciones totales de antocianos fueron inferiores a los obtenidos espectrofotométricamente debido a las diferencias existentes entre los dos métodos. No obstante, en el análisis cromatográfico también se observó que las uvas de la zona de Albatana, seguidas de la de la Cañada del Judío, contenían mayor concentración de antocianos que las de Motealegre y Chaparral. Las uvas de Albatana presentaron mayor cantidad de antocianos no acilados que las de las otras zonas, pero también contenían mayor cantidad de acilados (acetatos y cumaratos). El antociano más abundante en todas las uvas fue la malvidina-3-glucósido, aunque en general los 5 antocianos monoglucósidos se encontraron en gran concentración, tal y como cabía esperar según el perfil antociánico característico de Monastrell, ya que es una variedad caracterizada por una baja concentración de antocianos acilados (Romero-Cascales et al., 2005). En la zona de Chaparral, la concentración de peonidina-3-glucósido fue incluso similar a la de malvidina-3-glucósido. Según Fernández-López et al. (1998) la uvas con un alto porcentaje de antocianos trihidroxilados (delfinidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido) son variedades muy pigmentadas.

En el estudio de la composición de flavonoles (**Tabla 7.3**) se observó que quercetina-3-glucósido, quercetina-3-glucurónido y miricetina-3-glucósido fueron los flavonoles más abundantes en las uvas de todas las zonas estudiadas, coincidiendo con el perfil encontrado en las uvas de Monastrell en la campaña 2009 y con lo señalado por Hernández-Jiménez et al. (2009) que también encontraron miricetina-3-glucósido como un flavonol mayoritario en uvas de Monastrell cultivadas en la D.O. Jumilla. Comparando la concentración total de flavonoles entre las distintas zonas se volvió a observar que las uvas de la zona de Albatana, seguidas de las de la Cañada del Judío fueron las que presentaron una mayor concentración de estos compuestos, tal y como había sucedido con la concentración de antocianos. Los flavonoles se sintetizan en

las capas más externas de la epidermis de los hollejos y, entre otras funciones, actúan como protectores de los tejidos frente a la radiación UV (Flint et al., 1985). La síntesis de estos compuestos tiene lugar en el cuajado y, principalmente, a partir del envero (Downey et al., 2004). Su biosíntesis depende, en mayor medida que la de otros compuestos fenólicos, de la exposición solar de la planta, de forma que un incremento de la exposición de los racimos favorece la acumulación de flavonoles (Cortell y Kennedy, 2006; Tarara et al., 2008; Castillo-Muñoz et al., 2009; Koyama et al., 2012).

La **Tabla 7.4** muestra los resultados obtenidos al estudiar la composición y concentración de proantocianidinas en los hollejos. Las uvas de la Cañada del Judío mostraron los valores más altos. Al expresar los resultados en $\mu\text{g}/\text{baya}$ o mg/Kg baya, las uvas de la Cañada del Judío seguidas por las de Albatana presentaron concentraciones significativamente mayores que las de Montealegre y Chaparral, siendo en las de esta última zona en las que se encontraron los valores más bajos. La acumulación de taninos en los hollejos también parece depender de los factores edafoclimáticos como el tipo de suelo, la temperatura y la pluviosidad (Hernández-Jiménez et al., 2009).

También se encontraron diferencias en el grado medio de polimerización (GMP), siendo las proantocianidinas de los hollejos de las uvas de Chaparral las que mostraron una composición de proantocianidinas más polimerizadas. El GMP fue muy similar entre las otras 3 zonas y con valores también muy similares a los encontrados por Busse-Valverde et al. (2010), aunque inferiores a los señalados por Hernández-Jiménez et al. (2009). Respecto a las unidades monoméricas, (+)-catequina fue la unidad monomérica terminal más abundante y (-)-epicatequina, seguida de (-)-epigallocatequina, las unidades de extensión presentes en mayor proporción.

La composición y concentración de proantocianidinas procedentes de las semillas se muestra en la **Tabla 7.5**. Como cabía esperar, las semillas contenían mayor concentración de proantocianidinas que los hollejos. La mayor diferencia entre la composición de proantocianidinas en los hollejos y las semillas es la ausencia de (-)-epigallocatequina en las semillas, y la menor

proporción en éstas de (-)-epicatequina-3-O-galato. (Prieur et al., 1994). Al expresar los resultados en $\mu\text{g/g}$ semillas, las mayores concentraciones se encontraron en las uvas de Chaparral y Montealegre, aunque al expresarlos en $\mu\text{g/baya}$, fueron las uvas de Montealegre y Albatana las que contenían mayor cantidad de proantocianidinas. Las proantocianidinas de las semillas de la Cañada del Judío presentaron un GMP significativamente mayor que las de Chaparral, es decir, las uvas de la Cañada del Judío contenían unas semillas más maduras que las de Chaparral ya que el GMP de las semillas aumenta con la maduración, siendo menos extraíbles conforme avanza la maduración (González-Neves et al., 2003). No se observaron diferencias significativas en el GMP de las otras zonas ni en el porcentaje de galoilación.

Tabla 7.2. Antocianos en uva (mg/Kg uva) determinados por HPLC, campaña 2008.

Antociano	C. Judío	Albatana	Montealegre	Chaparral
Delfinidina-3-glucósido	38,17b	27,87ab	34,09ab	21,21a
Cianidina-3-glucósido	67,42b	85,66c	22,05a	70,65b
Petunidina-3-glucósido	46,15ab	57,12b	62,19b	31,45a
Peonidina-3-glucósido	66,37a	147,72c	62,61a	117,03b
Malvidina-3-glucósido	219,29b	228,00b	175,25a	121,45a
Delfinidina Acetato	2,13a	3,89b	2,45ab	2,62ab
Cianinida acetato	3,16a	6,06b	2,33a	3,80a
Petunidina acetato	3,45a	7,74b	4,78a	3,16a
Peonidina acetato	3,67a	7,65b	3,08a	5,92b
Malv.Acet+Delf.cum.	17,09a	26,10b	16,22a	15,04a
Peonidina cafeato	1,37a	7,96c	4,58b	3,18ab
Cianidina caf+cum.	10,08a	29,72c	19,67b	12,39a
Petunidina cumarato	12,25ab	14,39b	10,90ab	8,99a
Malvidina cum. cis	9,28a	18,31c	7,61a	15,21b
Peonidina cum + Malv. Cumarato trans	37,95a	59,19b	46,48ab	38,61a
Totales	537,82b	727,37c	474,28a	470,70a
No acilados	437,41b	546,37c	356,a	361,78a
Acilados	100,42a	180,99b	118,10a	108,92a
Acetatos	29,51a	51,43b	28,85a	30,54a
Cumaratos	69,55a	121,60b	84,66a	75,20a

Letras diferentes en la misma fila y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: Malv: malvidina; Delf: delfinidina; acet: acetato; cum: cumarato; caf: cafeato.

Tabla 7.3. Flavonoles en uva (mg/Kg uva) determinados por HPLC, campaña 2008.

Flavonoles	C.Judío	Albatana	Montealegre	Chaparral
Miricetina-galactósido	0,42a	0,92a	0,44a	0,74a
Miricetina-glucósido	12,24b	10,92b	6,98a	7,04a
Quercetina-galactósido	3,38b	5,19c	1,64a	0,67a
Quercetina-glucorónido	9,73a	9,74a	8,66a	7,79a
Quercetina-glucósido	30,19b	49,12c	15,66a	16,95a
Kampferol-galactósido	0,94b	1,06b	0,59a	0,52a
Kampferol-glucósido	4,51b	8,10c	3,23ab	1,96a
Isorhamnitina-glucósido	0,57a	0,41a	0,38a	0,60a
Siringetina-glucósido	0,37a	0,77a	0,68a	0,53a
Total	63,64b	88,97c	39,49a	37,85a

Letras diferentes en la misma fila y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$.

Tabla 7.4. Composición de proantocianidinas en hollejos determinada por HPLC, campaña 2008.

	C.Judío	Albatana	Montealegre	Chaparral
µg/g hollejo	8691,30b	4139,51a	3706,93a	3388,37a
µg/baya	947,11d	644,06c	445,94b	310,57a
mg/kg uva	593,80c	313,87b	203,07a	202,86a
GMP	15,12a	15,14a	15,87a	34,22b
%Galoilación	1,78a	1,43a	3,11b	2,62b
%C_t	4,26b	4,22b	4,33b	1,92a
%E_t	2,36b	2,39b	1,99a	1,18a
%EG_t	nd	nd	nd	nd
%C_e	1,43b	1,72c	0,94a	1,92d
%E_e	62,71a	72,30b	63,97a	68,38b
%EG_e	1,78a	1,43a	3,11b	2,62b
%EGC_e	27,46c	17,94a	25,66bc	23,98b

Letras diferentes en la misma fila y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: CS: Cabernet Sauvignon; GMP: grado medio de polimerización; C_t: (+)-catequina terminal; E_t: (-)-epicatequina terminal; EG_t: (-)-epicatequina galato terminal; C_e: (+)-catequina de extensión; E_e: (-)-epicatequina de extensión; EG_e: (-)-epicatequina galato de extensión; EGC_e: (-)-epigalocatequina de extensión; nd: no detectado.

Tabla 7.5. Composición de proantocianidinas en semillas determinada por HPLC, campañas 2008.

	C.Judío	Albatana	Montealegre	Chaparral
µg/g semillas	17833,15a	16727,96a	21616,27b	21971,64b
µg/baya	1943,36a	2604,00b	2600,45b	2013,47a
mg/kg uva	1218,41a	1269,00a	1184,18a	1315,13a
GMP	6,40b	6,25ab	6,35b	6,06a
%Galoilación	14,29a	14,70a	13,40a	13,59a
%C_t	5,45d	5,01c	3,80a	4,29b
%E_t	6,43a	7,45b	8,77c	8,41c
%EG_t	3,74b	3,55b	3,16a	3,81b
%C_e	8,95b	8,91b	6,81a	6,51a
%E_e	64,87a	63,93a	67,22b	67,20b
%EG_e	10,55a	11,15a	10,23a	9,78a
%EGC_e	nd	nd	nd	nd

Letras diferentes en la misma fila y para cada año muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95\%$) $n=3$. Abreviaturas: CS: Cabernet Sauvignon; GMP: grado medio de polimerización; C_t: (+)-catequina terminal; E_t: (-)-epicatequina terminal; EG_t: (-)-epicatequina galato terminal; C_e: (+)-catequina de extensión; E_e: (-)-epicatequina de extensión; EG_e: (-)-epicatequina galato de extensión; EGC_e: (-)-epigalocatequina de extensión; nd: no detectado.

7.2.2 CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS DE LOS VINOS AL FINAL DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

En la **Tabla 7.6** se muestran los parámetros cromáticos de los vinos de Monastrell de las 4 zonas estudiadas, obtenidos mediante una elaboración tradicional y analizados al final de la fermentación alcohólica.

Las diferencias observadas entre las uvas de las diferentes zonas se vieron reflejadas también en los vinos. Los vinos de las zonas de la Cañada del Judío y Albatana presentaron mayor intensidad de color, mayor índice de polifenoles totales y mayor contenido de antocianos y taninos que los vinos de Montealegre y Chaparral. Los vinos de la Cañada del Judío fueron los que mostraron una mayor concentración de antocianos. La mayor concentración de taninos se encontró en los vinos de Albatana. Los vinos de Montealegre, pese a contener menos compuestos fenólicos y menor intensidad de color que los de la Cañada del Judío o Albatana, mostraron sin embargo un porcentaje de rojo y una fracción de antocianos copigmentados similar a los de estas zonas. Los vinos de la zona de Chaparral fueron los menos coloreados y los de menor contenido en antocianos y taninos. Estos vinos además presentaron una fracción de color debida a fenómenos de copigmentación menor que los de las otras zonas, y un color con tonalidades más amarillas.

Los resultados parecen indicar que las zonas donde, en las últimas etapas de la maduración, se habían registrado mayor número de horas de sol, mayores temperaturas y menor pluviosidad dieron lugar a vinos con mejores características cromáticas, probablemente por el hecho de que se vio más favorecida la síntesis de compuestos fenólicos. Muchos autores han indicado que factores climáticos como la exposición solar y la temperatura tienen un gran impacto sobre la acumulación de compuestos fenólicos (Downey et al., 2004; Cortell y Kennedy, 2006; Matus et al., 2009; Chorti et al., 2010). Cortell y Kennedy (2006) encontraron que la exposición solar tras el envero incrementaba los niveles de antocianos y proantocianidinas en las pieles de las uvas. Aunque otros autores también han indicado que un exceso de radiación o temperaturas muy elevadas también pueden interferir negativamente en la

síntesis de estos compuestos, disminuyendo su presencia en las uvas y, por consiguiente, en los vinos (Chorti et al., 2010; Lorrain et al., 2010). No obstante, otros factores como las características del viñedo y las prácticas culturales también deber ser tenidos en cuenta. El microclima del racimo puede depender del manejo específico que se haga de la vegetación (Pieri y Fermaud, 2005), y el aporte de nitrógeno juega un papel muy importante en el vigor y rendimiento de la viña, así como en su maduración y composición (Holzapfel y Treeby, 2007; Apolinar-Valiente, 2011).

Tabla 7.6. Parámetros cromáticos de vinos de Monastrell obtenidos mediante una elaboración tradicional, campaña 2008.

	C.Judío	Albatana	Montealegre	Chaparral
IC	16,62b	14,66b	10,02a	8,58a
T	0,41a	0,46a	0,47a	0,62b
L*	14,22a	15,04a	21,05b	21,60b
a*	46,96a	48,01a	53,56b	53,40b
b*	24,51	25,89	35,30	35,80
C*	52,97a	54,55a	64,14b	64,29b
H*	27,55a	28,34a	33,38b	33,84b
FCA	0,39ab	0,38ab	0,44b	0,28a
FFA	0,50ab	0,47ab	0,43a	0,53b
FPP	0,11a	0,15ab	0,13a	0,19b
% Rojo	65,69b	63,23b	63,05b	56,40a
% Amarillo	27,10a	29,01a	29,43a	35,06b
% Azul	7,20a	7,76a	7,52a	8,54b
IPT	56,92b	54,42b	36,40a	34,09a
AT	577,38d	451,54c	396,52b	309,50a
TT	499,65c	620,89d	289,41b	109,05a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 0,05$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T:tono; FAC: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L); TT: taninos totales (mg/L).

7.2.3 INFLUENCIA DE LAS TRATAMIENTOS DE FRÍO Y ENZIMÁTICOS SOBRE LOS VINOS DE LAS DISTINTAS ZONAS

Se estudió el efecto de los tratamientos de frío (adición de nieve carbónica y maceración prefermentativa en frío) y la adición de enzimas macerativos (preparado enzimático comercial y enzima natural con actividad β -galactosidasa) en la vinificación de las uvas de Monastrell de las diferentes zonas.

7.2.3.1 Cañada del Judío

Al estudiar los parámetros cromáticos de los vinos de la Cañada del Judío analizados al final de la fermentación alcohólica (**Tabla 7.7**), se observó que los vinos obtenidos mediante maceración prefermentativa en frío mostraron una intensidad de color significativamente mayor que el vino testigo y que el resto de tratamientos. Sin embargo, con la maceración prefermentativa en frío no se obtuvo una mayor concentración de antocianos y los vinos mostraron un mayor valor del tono debido a una mayor contribución de la componente amarilla. El tratamiento con nieve carbónica fue el único que dio lugar a una concentración de antocianos significativamente mayor que la del vino testigo. Aunque al analizar la composición de antocianos mediante HPLC (**Tabla 7.8**) no se observaron diferencias significativas entre tratamientos y testigo ni en el contenido total de antocianos ni en la proporciones de antocianos acilados. Malvidina-3-glucósido fue el antociano más abundante en todos los vinos. La concentración de antocianos no acilados fue mayor que la de acilados, característica frecuente en vinos de Monastrell debida al perfil antociánico de la uvas de esta variedad (Romero-Cascales, 2008).

Tampoco se encontraron diferencias en el contenido total de flavonoles entre los vinos tratados y el vino testigo al analizarlos al final de la fermentación alcohólica (**Tabla 7.9**). Únicamente se observó que con el tratamiento de nieve carbónica, la concentración total de estos compuestos fue significativamente mayor que con la adición de enzima β -galactosidasa. Quercetina-3-glucósido, seguida de miricetina-3-glucósido y de quercetina-3-glucurónido fueron los

flavonoles más abundantes en todos los vinos, coincidiendo con lo observado en la uva de Monastrell de esta zona al analizarla en el momento de la vendimia.

Respecto a la composición de proantocianidinas en los vinos analizados al final de la fermentación alcohólica (**Tabla 7.10**), en los tratamientos con nieve carbónica, maceración prefermentativa en frío y adición del preparado enzimático comercial se observó un contenido significativamente mayor de proantocianidinas totales que en el vino testigo. (-)-Epicatequina de extensión, seguida de (-)-epigallocatequina de extensión, fueron las unidades monoméricas más abundantes en todos los vinos. Respecto a las unidades terminales, fue (+)-catequina la que se encontró en mayor proporción. Álvarez et al. (2006) también encontraron un aumento en la concentración de proantocianidinas en vinos de Monastrell sometidos a una maceración prefermentativa en frío con y sin nieve carbónica. Aunque hay que destacar que, en nuestro estudio, con la maceración prefermentativa en frío se obtuvo un porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión significativamente menor que en el resto de los vinos. La (-)-epigallocatequina de extensión detectada en los vinos solo puede proceder de los hollejos. El hecho de que con la maceración prefermentativa en frío se observara una mayor presencia de taninos en el vino pero, sin embargo, no aumentase la concentración de (-)-epigallocatequina de extensión, pone de manifiesto que esta técnica favoreció la extracción de taninos de las semillas. Las uvas de la Cañada del Judío fueron las que presentaron menor madurez en las pepitas (mayor %IMP). Coincidiendo con lo observado en las campañas anteriores, la extracción de taninos de las semillas parece no depender únicamente de la presencia de alcohol. Así, cuando las semillas no se encuentran suficientemente maduras y las estructuras celulares de sus tejidos muestran rigidez, la maceración prefermentativa en frío (en ausencia de alcohol) es capaz de favorecer la extracción de proantocianidinas de las semillas. Busse-Valverde et al. (2010) también observaron este efecto sobre la extracción de taninos de las semillas en vinos de Monastrell, Syrah y Cabernet Sauvignon sometidos a una maceración prefermentativa en frío.

Tabla 7.7. Parámetros cromáticos de vinos de Monastrell de la Cañada del Judío a final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

	T	NC	MPF	EC	G
IC	16,62ab	17,02b	31,55c	17,08b	15,85a
T	0,41a	0,40a	0,94b	0,41a	0,42a
L*	14,22ab	13,84ab	15,72c	13,73a	14,98bc
a*	46,96a	46,43a	48,82b	46,43a	47,87ab
b*	24,51ab	23,85ab	27,07c	23,66a	25,79bc
C*	52,97a	52,20a	55,83b	52,11a	54,39ab
H*	27,55ab	27,18ab	29,00c	27,00a	28,29bc
FCA	0,39b	0,38ab	0,38ab	0,35a	0,36ab
FFA	0,50a	0,52ab	0,52ab	0,54b	0,53ab
FPP	0,11b	0,10a	0,10a	0,11b	0,11b
% Rojo	65,69b	66,25b	48,90a	65,70b	65,59b
% Amarillo	27,10a	26,61a	46,19b	27,01a	27,28a
% Azul	7,20b	7,14b	4,91a	7,28b	7,13b
IPT	56,92a	55,87a	54,57a	57,62a	55,10a
AT	577,38a	654,31b	550,12a	585,81a	543,17a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FAC: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L); TT: taninos totales (mg/L).

Tabla 7.8. Antocianos (mg/L) por HPLC para vinos de Monastrell de la Cañada del Judío a final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

Antociano	T	NC	MPF	EC	G
Delfinidina-3-glucósido	38,30a	45,56a	44,69a	37,55a	33,64a
Cianidina-3-glucósido	30,19a	27,77a	31,91a	27,54a	27,82a
Petunidina-3-glucósido	60,01a	68,85a	67,83a	58,87a	54,22a
Peonidina-3-glucósido	70,50ab	69,12ab	75,71b	61,42a	62,14a
Malvidina-3-glucósido	233,96a	256,82a	256,22a	231,25a	215,24a
Vitisina A	6,20a	7,28a	6,06a	6,42a	5,77a
Delfinidina Acetato	6,08a	7,85a	5,44a	5,89a	6,03a
Vitisina B	5,32a	4,66a	4,08a	4,42a	4,05a
Acetil vitisina A	8,03a	6,79a	5,76a	7,89a	7,00a
Cianinida acetato	7,94a	7,43a	6,98a	8,28a	6,81a
Petunidina acetato	4,04a	3,55a	8,38a	8,43a	2,98a
Peonidina acetato	11,27a	10,44a	9,61a	8,84a	9,52a
Malv.acet+Delf.cumarato	25,08a	26,76a	25,87a	25,01a	22,29a
Peonidina cafeato	10,23a	10,63a	11,51a	9,89a	9,45a
Cianidina caf+cum	4,95a	4,23a	3,67a	3,57a	4,30a
Petunidina cumarato	9,83a	11,00a	10,72a	9,68a	9,08a
Malvidina cumarato cis	4,78a	4,14a	3,86a	3,37a	3,79a
Peonidina cumarato	12,14a	11,73a	12,39a	10,42a	10,46a
Malv. Cumarato trans	35,17a	39,59a	38,61a	33,36a	32,10a
Totales	584,01a	624,19a	629,30a	562,13a	526,70a
No acilados	432,95a	468,11a	476,36a	416,65a	393,06a
Acilados	131,51a	137,35a	137,04a	126,75a	116,82a
Acetatos	54,40a	56,03a	56,28a	56,46a	47,63a
Cumaratos	66,88a	70,68a	69,25a	60,41a	59,74a
Vitisinas	19,55a	18,74a	15,90a	18,73a	16,82a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; acet: acetato; caf: cafeato; cum: cumarato;

Tabla 7.9. Flavonoles (mg/L) por HPLC para vinos de Monastrell de la Cañada del Judío al final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

Flavonol	T	NC	MPF	EC	G
Miricetina galactósido	2,07a	2,61a	2,09a	2,14a	2,06a
Miricetina glucósido	35,04a	40,16b	36,60ab	36,90ab	33,36a
Quercetina galactósido	7,84b	8,67c	8,10bc	7,97bc	6,90a
Quercetina glucurónido	22,02a	24,41a	23,59a	20,45a	21,64a
Quercetina glucósido	62,83a	64,55a	64,32a	64,08a	59,85a
Kampferol galactósido	2,04a	2,33b	2,19ab	2,10ab	1,99a
Kampferol glucósido	4,40a	6,11a	7,95a	5,87a	8,06a
Isorhamnina glucósido	3,08a	3,15a	3,35a	3,15a	3,07aa
Siringetina glucósido	1,81ab	1,80ab	1,92b	1,80ab	1,53a
Totales	141,13ab	153,80b	150,11ab	144,47ab	138,46a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa.

Tabla 7.10. Composición de proantocianidinas en vinos de Monastrell de la Cañada del Judío a final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

	T	NC	MPF	EC	G
GMP	6,23ab	5,84a	5,71a	6,67b	5,86a
%Galoilación	1,13a	1,12a	1,13a	1,11a	1,26a
%C_t	12,06ab	13,26b	13,39b	11,05a	13,25b
%E_t	3,92a	3,85a	4,06a	3,86a	3,79a
%EG_t	0,08a	0,07a	0,04a	0,09a	0,10a
%C_e	2,62ab	2,48a	2,66b	2,60ab	2,65b
%E_e	56,81ab	55,27a	57,76b	57,01ab	55,71ab
%EG_e	1,05a	1,05a	1,08a	1,02a	1,15a
%EGC_e	23,46b	24,01b	21,00a	24,38b	23,34b
PT	499,65a	606,16b	633,86b	588,03b	509,10a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; GMP: grado medio de polimerización; C_t: (+)-catequina terminal; E_t: (-)-epicatequina terminal; EG_t: (-)-epicatequina galato terminal; C_e: (+)-catequina de extensión; E_e: (-)-epicatequina de extensión; EG_e: (-)-epicatequina galato de extensión; EGC_e: (-)-epigalocatequina de extensión; PT: proantocianidinas totales (mg/L).

7.2.3.2 Albatana

La **Tabla 7.11** muestra las características cromáticas de los vinos de Monastrell de la zona de Albatana al final de la fermentación alcohólica. Solo con la maceración prefermentativa en frío se observó un aumento significativo en la intensidad de color de los vinos al compararlos con la elaboración tradicional. Este tratamiento también dio lugar a un mayor índice de polifenoles totales y a una mayor concentración de antocianos. Aunque no se observaron diferencias en la concentración ni en la composición de antocianos entre los tratamientos y el testigo cuando se realizó el análisis mediante cromatografía líquida (**Tabla 7.12**).

Solo con el tratamiento de la nieve carbónica se obtuvo un contenido total de flavonoles significativamente mayor que el del vino testigo (**Tabla 7.12**).

Tampoco se observó un efecto notable de las técnicas empleadas sobre el contenido de proantocianidinas en los vinos. De hecho, la concentración total de estos compuestos fue mayor en el vino testigo que en los vinos tratados (**Tabla 7.13**).

Tabla 7.11. Parámetros cromáticos de vinos de Monastrell de la zona de Albatana a final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

	T	NC	MPF	EC	G
IC	14,66ab	14,21a	16,18c	14,72ab	15,84bc
T	0,46ab	0,46ab	0,45a	0,48b	0,46ab
L*	15,04b	15,03b	13,55a	14,14ab	13,57a
a*	48,01b	47,93b	46,06a	46,76ab	46,09a
b*	25,89b	25,87b	23,34a	24,35ab	23,39a
C*	54,55b	54,47b	51,64a	52,73ab	51,69a
H*	28,34b	28,35b	26,87a	27,49ab	26,90a
FCA	0,38a	0,38a	0,39a	0,35a	0,39a
FFA	0,47a	0,47a	0,46a	0,48a	0,44a
FPP	0,15ab	0,15ab	0,14a	0,17c	0,16bc
% Rojo	63,23ab	62,87ab	63,66b	62,03a	62,94ab
% Amarillo	29,01ab	29,16ab	28,62a	29,78b	29,18ab
% Azul	7,76ab	7,97b	7,72a	8,20c	7,88ab
IPT	54,42ab	53,66a	59,07c	56,55bc	56,11ab
AT	451,54a	472,92ab	505,20b	449,65a	468,59ab

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FAC: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L); TT: taninos totales (mg/L).

Tabla 7.12. Antocianos (mg/L) por HPLC para vinos de Monastrell de la zona de Albatana a final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

Antociano	T	NC	MPF	EC	G
Delfinidina-3-glucósido	20,50a	24,22a	21,74a	19,75a	20,69a
Cianidina-3-glucósido	19,21ab	16,76a	22,40b	19,89ab	20,33ab
Petunidina-3-glucósido	37,93a	42,70a	38,73a	36,83a	37,99a
Peonidina-3-glucósido	55,08a	57,07a	65,92b	57,62a	57,68a
Malvidina-3-glucósido	170,68ab	197,83b	183,43ab	163,32a	173,45ab
Vitisina A	6,15a	5,45a	5,32a	6,09a	5,75a
Delfinidina Acetato	6,61a	4,01a	5,78a	6,49a	6,05a
Vitisina B	5,27ab	3,84a	5,64ab	6,01b	4,97ab
Acetil vitisina A	6,52b	5,58a	6,80ab	7,34b	5,21ab
Cianinida acetato	8,21a	6,30a	8,16a	8,98a	7,17a
Petunidina acetato	5,37a	2,95a	4,01a	5,35a	4,39a
Peonidina acetato	10,80a	9,28a	10,61a	10,71a	9,49a
Malv.acet+Delf.cumarato	21,92a	21,08a	21,31a	20,54a	21,39a
Peonidina cafeato	9,14a	8,55a	9,20a	9,26a	9,78a
Cianidina caf+cum	5,59a	5,06a	4,30a	4,51a	3,68a
Petunidina cumarato	7,29a	7,52a	7,61a	7,29a	8,77a
Malvidina cumarato cis	5,08a	4,28a	3,83a	4,49a	3,40a
Peonidina cumarato	10,99a	11,60a	10,73a	10,67a	10,36a
Malv. Cumarato trans	28,86a	31,36a	29,93a	26,38a	28,97a
Totales	441,19a	465,43a	465,45a	431,52a	439,50a
No acilados	303,39a	338,58a	332,22a	297,41a	310,13a
Acilados	119,86a	111,98a	115,46a	114,66a	113,44a
Acetatos	52,90a	43,61a	49,87a	52,07a	48,49a
Cumaratos	57,82a	59,82a	56,40a	53,33a	55,18a
Vitisinas	17,94a	14,87a	17,76a	19,45a	15,93a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; acet: acetato; caf: cafeato; cum: cumarato;

Tabla 7.13. Flavonoles (mg/L) por HPLC para vinos de Monastrell de la zona de Albatana al final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

Flavonol	T	NC	MPF	EC	G
Miricetina galactósido	1,62a	2,16b	1,66a	1,54a	1,81ab
Miricetina glucósido	20,18ab	22,98c	21,73bc	19,65a	21,37abc
Quercetina galactósido	4,54a	5,14b	4,43a	4,36a	4,31a
Quercetina glucurónido	18,18ab	20,63b	17,93ab	16,99a	19,32ab
Quercetina glucósido	16,38ab	16,31ab	18,52b	14,82a	16,67ab
Kampferol galactósido	1,05a	1,08a	0,92a	0,69a	0,88a
Kampferol glucósido	3,79a	6,44b	3,98a	4,47ab	5,08ab
Isorhamnina glucósido	1,87a	1,91a	1,80a	1,82a	1,77a
Siringetina glucósido	0,85a	1,82b	1,62b	1,27ab	1,64b
Totales	68,46a	78,47b	72,59ab	65,61a	72,85ab

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa.

Tabla 7.14. Composición de proantocianidinas en vinos de Monastrell de la zona de Albatana a final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

	T	NC	MPF	EC	G
GMP	5,50b	5,05a	5,64b	5,78b	5,41ab
%Galoilación	2,05a	1,75a	1,42a	1,22a	1,47a
%C_t	14,04cd	14,76d	13,06ab	12,66a	13,65bc
%E_t	3,97a	4,70a	4,64a	4,55a	4,71a
%EG_t	0,19a	0,38a	0,07a	0,08a	0,13a
%C_e	3,73a	3,37a	3,37a	3,18a	3,27a
%E_e	61,35a	62,04a	63,80a	63,22a	61,75a
%EG_e	1,86a	1,37a	1,35a	1,14a	1,34a
%EGC_e	14,86b	13,37a	13,72a	15,16b	15,15b
PT	620,89a	595,68a	585,67a	582,23a	513,87a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; GMP: grado medio de polimerización; C_t: (+)-catequina terminal; E_t: (-)-epicatequina terminal; EG_t: (-)-epicatequina galato terminal; C_e: (+)-catequina de extensión; E_e: (-)-epicatequina de extensión; EG_e: (-)-epicatequina galato de extensión; EGC_e: (-)-epigalocatequina de extensión; PT: proantocianidinas totales (mg/L).

7.2.3.3 Montealegre

Los resultados obtenidos al analizar los parámetros cromáticos de los vinos al final de la fermentación alcohólica se muestran en la **Tabla 7.15**. La maceración prefermentativa en frío dio lugar a vinos menos coloreados, con tonalidades más amarillas y con menor contenido de antocianos que el vino testigo y que los vinos obtenidos con las otras técnicas empleadas. No se observaron diferencias entre el resto de tratamientos y el vino testigo, acaso cabe señalar que el vino obtenido con la elaboración tradicional presentó menor tono, una mayor contribución de antocianos copigmentados y un mayor porcentaje de rojo.

Los vinos de Monastrell de la zona de Montealegre fueron, en general, vinos menos coloreados y con menor contenido polifenólico que los vinos de la Cañada del Judío y de Albatana. Estas diferencias pudieron deberse, tal y como se ha explicado anteriormente, a que las uvas de la zona de Montealegre se encontraban menos maduras en el momento de la vendimia, mostrando un elevado índice de madurez celular y un bajo contenido polifenólico.

Al analizar la concentración de antocianos individuales por HPLC (**Tabla 7.16**), se siguió observando que la maceración prefermentativa en frío dio lugar a vinos con menor contenido total de antocianos que el del resto de los vinos, mostrando además una menor concentración de antocianos acilados y de vitisinas. Los antocianos acilados tienen más estabilizadas las formas coloreadas (Bautista-Ortín, 2005) y las vitisinas son resistentes a las variaciones de pH y a la decoloración por acción del SO₂ (Sánchez-Iglesias, 2007; Romero-Cascales, 2008), por lo que los vinos obtenidos mediante maceración prefermentativa en frío mostraron mayor proporción de antocianos susceptibles a la decoloración.

El contenido de flavonoles en los vinos de esta zona (**Tabla 7.17**) también fue menor que el hallado en los vinos de la Cañada del Judío y Albatana, principalmente porque se encontraron menores concentraciones de quercetina-3-glucósido, miricetina-3-glucósido y quercetina-3-glucurónido. Estas diferencias también se habían observado en las uvas, ya que en las uvas de Montealegre se encontró un menor contenido de flavonoles que en las de la Cañada del Judío y las de Albatana. El tratamiento con el preparado enzimático comercial dio lugar a un contenido total de flavonoles significativamente mayor que el del vino testigo y que el del otro tratamiento enzimático, aunque sin diferencias significativas respecto a los tratamientos de frío.

También se observó que, igual que en las uvas, la concentración de proantocianidinas en los vinos de Montealegre (**Tabla 7.18**) fue menor que en los de la Cañada del Judío y Albatana. La maceración prefermentativa en frío dio lugar a un contenido total de proantocianidinas significativamente mayor que el del vino testigo. Además, con este tratamiento, también se observó un

aumento en el grado medio de polimerización y en el porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión, y un menor porcentaje de galoilación. Estos datos ponen de manifiesto que la maceración prefermentativa en frío favoreció la extracción de proantocianidinas procedentes de los hollejos. Este resultado requiere especial atención. Algunos autores (Llaudy et al., 2005; Alvares et al., 2006) han señalado que las técnicas de maceración en frío favorecen más la extracción de compuestos fenólicos cuando las uvas no se encuentran suficientemente maduras. En nuestro estudio también se observó que la extracción de compuestos fenólicos en las variedades Cabernet Sauvignon y Syrah se vio más favorecida por las técnicas de frío cuando las uvas presentaron menor madurez fenólica (campaña 2007). Sin embargo, en la campaña 2008, las uvas de Monastrell de la zona de Montealegre se vendimiaron con menor madurez (IMC del 62.16%) que las de las otras zonas y no se observó que las técnicas de frío favoreciesen más la extracción de antocianos o flavonoles, pero si favorecieron la extracción de taninos de los hollejos (al menos sí lo hizo la maceración prefermentativa en frío). Es decir, la maceración prefermentativa en frío, tal y como se ha venido comentando, parece favorecer la extracción de proantocianidinas de las semillas si estas no se encuentran suficientemente maduras y la extracción de proantocianidinas de los hollejos cuando estos no se encuentran suficientemente maduros. O lo que es lo mismo, favorece la ruptura de aquellos tejidos celulares que se encuentran más rígidos.

Ante estos resultados podrían plantearse algunas cuestiones. En primer lugar, ¿por qué el tratamiento de congelación del mosto con nieve carbónica no parece mostrar un efecto tan claro sobre la extracción de compuestos fenólicos en hollejos o semillas poco maduros? El tratamiento con nieve carbónica mostró unos efectos similares a los de la maceración prefermentativa en frío sobre los hollejos de Syrah en la campaña 2007 y sobre las semillas de Cabernet Sauvignon en la campaña 2009, aunque no se observó un efecto tan acusado en otros de los momentos analizados. La congelación con nieve carbónica es una técnica de frío más agresiva que la maceración prefermentativa en frío pero, en nuestro estudio, la maceración total del tratamiento prefermentativo en frío tuvo una duración de 17 días (7 días de

maceración en frío en ausencia de alcohol más 10 días de maceración tras arrancar la fermentación alcohólica) mientras que los vinos tratados con nieve carbónica tuvieron una maceración de 11 ó 12 días (1 ó 2 días de maceración con CO₂ hasta la descongelación del mosto más 10 días de maceración tras arrancar la fermentación alcohólica). Esto significa que, en aquellos casos en los que se detectaron diferencias entre las dos técnicas, el largo período de maceración empleado con el primer tratamiento pudo favorecer más la ruptura de los tejidos de los hollejos, facilitando más la extracción de compuestos fenólicos.

Otra cuestión que se puede plantear es ¿por qué la maceración prefermentativa en frío no favoreció la extracción de antocianos pero si la de proantocianidinas de los hollejos de Monastrell cuando estos presentaron un elevado índice de madurez celular? Las paredes celulares de los hollejos de Monastrell tienen mayor espesor y poseen mayor cantidad de material celular que las paredes celulares de los hollejos de otras variedades como Cabernet Sauvignon o Syrah (Ortega-Regules et al., 2008). Por otro lado hay que tener en cuenta que los antocianos se localizan dentro de las vacuolas de las células de la hipodermis, las células más próximas a la pulpa son más ricas en antocianos que las que están cerca de la epidermis. Los taninos de los hollejos que pueden ser fácilmente extraíbles están localizados en las vacuolas de las células próximas a la epidermis (Amrani-Joutei y Glories, 1995). Es decir, las capas más externas de los hollejos son más ricas en taninos que en antocianos. Todo esto podría explicar que con la maceración prefermentativa en frío no se consiguió favorecer la ruptura de las capas más internas de los hollejos en las uvas de Monastrell, aunque si se consiguió facilitar la ruptura de las capas más cercanas a la epidermis, incrementando así la difusión de taninos pero no la de antocianos.

Tabla 7.15. Parámetros cromáticos de vinos de Monastrell de la zona de Montealegre a final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

	T	NC	MPF	EC	G
IC	10,02b	9,26b	8,01a	9,32b	9,27b
T	0,47a	0,49b	0,54c	0,49b	0,49b
L*	21,05a	22,33a	22,68a	21,94a	21,72a
a*	53,56a	54,60a	53,49a	54,24a	54,02a
b*	35,30a	36,84a	36,52a	36,45a	35,90a
C*	64,14a	65,87a	64,76a	65,35a	64,87a
H*	33,38a	33,99b	34,31b	33,90ab	33,59ab
FCA	0,44b	0,38a	0,43b	0,38a	0,38a
FFA	0,43a	0,47b	0,40a	0,48b	0,47b
FPP	0,13a	0,15b	0,17c	0,14ab	0,15b
% Rojo	63,05c	62,08bc	59,54a	61,77b	61,63b
% Amarillo	29,43a	30,33b	31,92c	30,51b	30,50b
% Azul	7,52a	7,59ab	8,53c	7,72ab	7,88b
IPT	36,40a	37,53a	34,13a	36,54a	35,23a
AT	396,52b	413,99b	270,33a	395,12b	388,78b

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FAC: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L); TT: taninos totales (mg/L).

Tabla 7.16. Antocianos (mg/L) por HPLC para vinos de Monastrell de la zona de Motealegre a final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

Antociano	T	NC	MPF	EC	G
Delfinidina-3-glucósido	19,66a	19,53a	16,02	18,65a	17,52a
Cianidina-3-glucósido	8,07b	7,14ab	4,88a	8,04b	7,20ab
Petunidina-3-glucósido	33,32a	34,41a	27,57	31,97a	29,97a
Peonidina-3-glucósido	25,92a	24,18a	17,49	25,31a	24,43a
Malvidina-3-glucósido	200,30b	203,72b	177,47a	193,47ab	184,99ab
Vitisina A	5,99a	6,23a	5,85a	5,95a	6,75a
Delfinidina Acetato	4,57ab	4,51ab	3,81a	4,15a	5,60b
Vitisina B	3,18a	7,22b	2,00a	3,87a	3,78a
Acetil vitisina A	3,86a	5,16a	3,88a	4,93a	4,14a
Cianinida acetato	5,22a	6,37a	5,02a	5,26a	5,97a
Petunidina acetato	3,91a	3,97a	3,39a	3,22a	4,99a
Peonidina acetato	6,08a	7,89b	6,26a	5,93a	6,73ab
Malv.acet+Delf.cumarato	17,00b	16,52b	13,53a	15,84b	16,13b
Peonidina cafeato	3,09a	3,28a	2,94a	4,61a	3,73a
Cianidina caf+cum	6,19a	7,18a	5,89a	6,65a	6,01a
Petunidina cumarato	3,47a	3,61a	3,01a	2,64a	3,93a
Malvidina cumarato cis	6,51a	6,98a	6,09a	7,18a	6,81a
Peonidina cumarato	6,71a	6,98a	5,86a	6,41a	6,52a
Malv. Cumarato trans	20,79bc	21,59c	18,19a	18,80ab	18,64ab
Totales	383,84b	396,47b	219,43a	372,91b	363,83b
No acilados	287,26a	288,98a	162,29a	277,45a	264,10a
Acilados	83,55ab	88,87b	49,32a	80,71ab	85,07ab
Acetatos	36,79ab	39,25b	21,34a	34,40ab	39,43b
Cumaratos	43,68a	46,34a	26,02a	41,69a	41,92a
Vitisinas	13,03ab	18,61b	7,82a	14,75ab	14,67ab

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; acet: acetato; caf: cafeato; cum: cumarato;

Tabla 7.17. Flavonoles (mg/L) por HPLC para vinos de Monastrell de la zona de Montealegre al final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

Flavonol	T	NC	MPF	EC	G
Miricetina galactósido	0,89a	1,12ab	0,92a	1,54b	0,90a
Miricetina glucósido	2,40a	3,60a	6,56b	5,86b	2,20a
Quercetina galactósido	nd	nd	nd	nd	0,14
Quercetina glucurónido	0,69b	0,54ab	0,39a	0,55ab	0,51ab
Quercetina glucósido	7,96a	7,82a	6,74a	7,79a	7,89a
Kampferol galactósido	nd	nd	nd	nd	nd
Kampferol glucósido	2,05a	1,68a	1,37a	1,84a	2,24a
Isorhamnina glucósido	nd	nd	nd	nd	nd
Siringetina glucósido	1,56a	1,88a	1,59a	1,72a	1,26a
Totales	15,55a	16,64ab	17,58ab	19,29b	15,14a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; nd: no detectado.

Tabla 7.18. Composición de proantocianidinas en vinos de Monastrell de la zona de Montealegre a final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

	T	NC	MPF	EC	G
GMP	3,88a	4,34a	5,36b	3,89a	3,73a
%Galoilación	2,85ab	3,02bc	2,40a	2,70ab	3,57c
%C_t	16,74c	14,97ab	14,09a	15,83bc	15,54b
%E_t	8,70b	8,03b	4,24a	9,76b	10,93b
%EG_t	0,35a	0,39a	0,33a	0,18a	0,41a
%C_e	3,51b	3,25a	3,45ab	3,55b	3,23a
%E_e	54,23a	48,84b	47,26b	53,78a	48,82b
%EG_e	2,51ab	2,64b	2,07a	2,52ab	3,16c
%EGC_e	13,96a	21,88c	28,55d	14,39a	17,91b
PT	289,41a	353,13ab	371,27b	282,90a	274,33a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; GMP: grado medio de polimerización; C_t: (+)-catequina terminal; E_t: (-)-epicatequina terminal; EG_t: (-)-epicatequina galato terminal; C_e: (+)-catequina de extensión; E_e: (-)-epicatequina de extensión; EG_e: (-)-epicatequina galato de extensión; EGC_e: (-)-epigalocatequina de extensión; PT: proantocianidinas totales (mg/L).

7.2.3.4 Chaparral

Los resultados obtenidos al analizar los parámetros cromáticos al final de la fermentación alcohólica se muestran en la **Tabla 7.19**. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el vino testigo en la mayor parte de los parámetros analizados, aunque si se observó que el contenido total de antocianos en los vinos obtenidos con la nieve carbónica, por maceración prefermentativa en frío y por adición del enzima β -galactosidasa fue superior al contenido de antocianos en el vino testigo. Este resultado también se observó al analizar la composición de antocianos en los vinos

mediante HPLC (**Tabla 7.20**), aunque las diferencias respecto al testigo solo fueron estadísticamente significativas en el caso del tratamiento por maceración prefermentativa en frío debido, especialmente, al mayor contenido de antocianos monoglucósidos en los vinos de este tratamiento. El tratamiento con el preparado enzimático comercial fue el que dio lugar a un vino con una menor concentración de antocianos.

En los vinos de Chaparral, al igual que en los de Montealegre, el contenido de antocianos, flavonoles (**Tabla 7.21**) y proantocianidinas (**Tabla 7.22**) también fue mucho menor que el de los vinos de la Cañada del Judío y Albatana. Aunque las uvas de Chaparral no mostraron un índice de madurez celular tan elevado como las de Montealegre, hay que tener en cuenta que en el momento de la vendimia también contenían bajas cantidades de compuestos fenólicos y esto se vio reflejado en los vinos obtenidos.

Respecto al efecto de los distintos tratamientos sobre el contenido total de flavonoles, en todos los vinos tratados se halló un mayor contenido de estos compuestos que en el vino testigo, aunque con diferencias significativas solo en el caso del tratamiento con nieve carbónica.

Todos los tratamientos, excepto el del enzima β -galactosidasa, produjeron un aumento del contenido de proantocianidinas en los vinos. Con estos tratamientos no se observó un incremento de (-)-epigallocatequina de extensión, pero si se halló un aumento del grado medio de polimerización y un menor porcentaje de unidades galoiladas, por lo que se podría pensar que las dos técnicas de frío y el preparado enzimático comercial favorecieron la extracción de proantocianidinas procedentes de los hollejos.

Tabla 7.19. Parámetros cromáticos de vinos de Monastrell de la zona de Chaparral a final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

	T	NC	MPF	EC	G
IC	8,58a	9,14a	8,52a	8,76a	8,96a
T	0,62a	0,62a	0,56a	0,64a	0,64a
L*	21,60ab	19,72a	22,14b	20,45ab	19,99ab
a*	53,40ab	51,41a	54,23b	52,09a	51,36a
b*	35,80a	32,94a	35,90a	34,09a	33,19a
C*	64,29ab	61,06a	65,03b	62,25ab	61,15a
H*	33,84a	32,62a	33,50a	33,20a	32,84a
FCA	0,28a	0,27a	0,33a	0,24a	0,34a
FFA	0,53a	0,55a	0,51a	0,56a	0,50a
FPP	0,19ab	0,18ab	0,15a	0,21b	0,16a
% Rojo	56,40ab	56,20ab	58,61b	55,52a	55,55a
% Amarillo	35,06ab	34,94ab	33,06a	35,60b	35,50ab
% Azul	8,54a	8,86a	8,34a	8,88a	8,96a
IPT	34,09a	36,48a	36,72a	35,21a	34,95a
AT	309,50a	345,91bc	375,38c	312,46ab	345,57bc

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; IC: intensidad de color; T: tono; FAC: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L); TT: taninos totales (mg/L).

Tabla 7.20. Antocianos (mg/L) por HPLC para vinos de Monastrell de la zona de Chaparral a final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

Antociano	T	NC	MPF	EC	G
Delfinidina-3-glucósido	9,26a	11,14a	15,23b	8,89a	11,04a
Cianidina-3-glucósido	8,44a	9,32a	12,25b	7,13a	11,61b
Petunidina-3-glucósido	18,69a	21,75a	29,20b	18,03a	22,06a
Peonidina-3-glucósido	38,88ab	44,08bc	57,59d	34,47a	50,66cd
Malvidina-3-glucósido	132,46a	139,03a	177,27b	121,71a	143,88a
Vitisina A	4,18a	4,54a	4,53a	4,56a	4,25a
Delfinidina Acetato	5,61a	3,08a	2,86a	3,51a	2,82a
Vitisina B	5,60a	4,40a	3,61a	4,95a	4,56a
Acetil vitisina A	5,21a	3,62a	4,87a	3,79a	3,92a
Cianinida acetato	4,61a	4,07a	5,98a	4,45a	4,16a
Petunidina acetato	5,37a	4,39a	5,47a	3,09a	3,01a
Peonidina acetato	8,46ab	7,92a	9,85b	7,04a	8,06ab
Malv.acet+Delf.cumarato	16,00a	15,89a	20,82b	15,31a	17,05a
Peonidina cafeato	3,71a	3,18a	4,19a	3,32a	3,29a
Cianidina caf+cum	6,85a	7,24a	9,88b	6,40a	7,14a
Petunidina cumarato	2,83a	2,67a	2,85a	2,66a	2,82a
Malvidina cumarato cis	4,22a	4,79a	6,37a	5,27a	4,19a
Peonidina cumarato	8,05a	8,35a	12,41b	7,48a	8,21a
Malv. Cumarato trans	17,11ab	19,02b	26,03c	15,47a	18,02ab
Totales	305,54ab	318,48ab	411,26c	277,53a	330,74b
No acilados	207,73ab	225,32ab	291,54c	190,22a	239,24b
Acilados	82,83a	80,60a	106,71b	74,00a	78,78a
Acetatos	40,06bc	35,35ab	44,99c	33,39a	35,11ab
Cumaratos	39,06a	42,07a	57,54b	37,29a	40,38a
Vitisinas	14,99a	12,56a	13,01a	13,30a	12,73a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 0.05$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; acet: acetato; caf: cafeato; cum: cumarato;

Tabla 7.21. Flavonoles (mg/L) por HPLC para vinos de Monastrell de la zona de Chaparral al final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

Flavonol	T	NC	MPF	EC	G
Miricetina galactósido	0,54a	1,29b	0,75ab	0,70ab	0,79ab
Miricetina glucósido	6,53a	10,90b	8,16ab	7,60a	7,80a
Quercetina galactósido	1,14a	1,65a	1,50a	1,47a	1,31a
Quercetina glucurónido	8,82a	11,47b	9,12ab	8,92a	9,48ab
Quercetina glucósido	2,66a	5,52b	3,79a	4,40ab	3,78ab
Kampferol galactósido	0,01a	0,02a	nd	nd	nd
Kampferol glucósido	1,88a	5,69b	2,73a	1,49a	2,69a
Isorhamnina glucósido	0,62a	1,26b	1,08b	1,20b	0,87ab
Siringetina glucósido	1,64a	2,01b	1,56a	1,53a	1,91ab
Totales	23,83a	39,82b	28,68ab	27,29a	28,64ab

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa.

Tabla 7.22. Composición de proantocianidinas en vinos de Monastrell de la zona de Chaparral a final de la fermentación alcohólica, campaña 2008.

	T	NC	MPF	EC	G
GMP	2,71a	3,60b	3,41b	3,55b	3,52b
%Galoilación	6,72b	4,76a	4,66a	4,84a	6,44b
%C_t	28,14b	20,92a	22,11a	20,94a	21,22a
%E_t	9,94b	6,88a	7,26a	7,37a	7,23a
%EG_t	0,02	nd	nd	nd	nd
%C_e	5,76b	4,08a	4,34a	4,22a	4,29a
%E_e	37,27a	50,78b	49,43b	54,40b	51,91b
%EG_e	6,69b	4,76a	4,66a	4,84a	6,44b
%EGC_e	12,17b	12,58b	12,20b	8,22a	8,91a
PT	109,05a	132,57b	135,54b	133,42b	105,08a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; GMP: grado medio de polimerización; C_t: (+)-catequina terminal; E_t: (-)-epicatequina terminal; EG_t: (-)-epicatequina galato terminal; C_e: (+)-catequina de extensión; E_e: (-)-epicatequina de extensión; EG_e: (-)-epicatequina galato de extensión; EGC_e: (-)-epigalocatequina de extensión; PT: proantocianidinas totales (mg/L).

7.2.4 ANALISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIABLE

Se realizó un análisis discriminante para determinar si algunas de las variables medidas podrían distinguir entre grupos preestablecidos, tanto respecto a la zona vitícola de procedencia de la uva como respecto a los tratamientos enológicos empleados.

Respecto a la zona, se obtuvieron tres funciones discriminantes capaces de clasificar correctamente el 100% de las muestras estudiadas. La función discriminante 1 clasificó el 56,24% de las muestras y la función discriminante 2 clasificó el 28,10%. La función 1 discriminó los vinos de las cuatro zonas, pero principalmente los vinos de Montealegre frente a los de Albatana (**Figura 7.1**), siendo las variables de mayor poder discriminante los parámetros CIELab a^* , b^* y H^* (**Tabla 7.23**). La función 2 discriminó los vinos de Montealegre y Albatana frente a los de la Cañada del Judío y frente a los vinos de Chaparral. Las variables de mayor poder discriminante fueron los parámetros CIELab a^* y C^* .

Figura 7.1. Distribución de los vinos en un sistema de coordenadas definido por la función discriminante usada para diferenciar entre las distintas zonas.

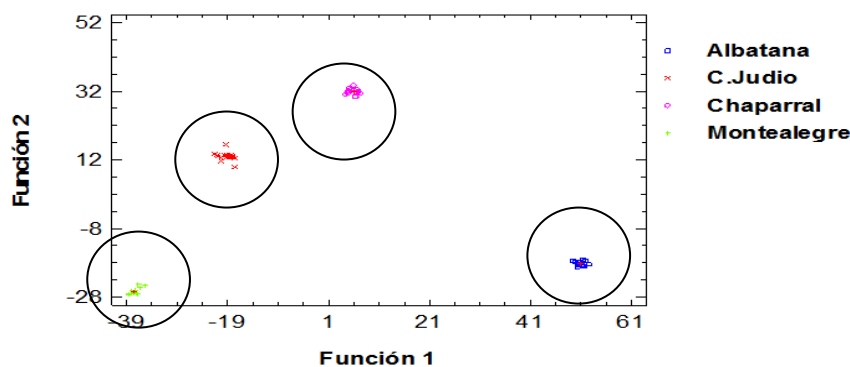


Tabla 7.23. Coeficientes de estandarización para las funciones discriminantes 1 y 2 en función de la zona.

Variables	Función 1	Función 2
IC	-1,86	1,47
T	0,08	1,35
L*	-2,30	3,31
a*	6,97	9,12
b*	-6,55	4,83
C*	-1,16	-10,84
H*	5,54	-1,63
FCA	-0,78	-1,35
FFA	-1,15	-0,27
FPP	4,06	2,37
%Rojo	2,41	0,66
%Amarillo	-0,27	1,20
%Azul	-4,05	1,85
IPT	-0,03	0,10
Antocianos	0,56	0,80

Abreviaturas: IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L);

Respecto al tratamiento enológico, se establecieron cuatro funciones discriminantes capaces de clasificar correctamente el 100% de las muestras estudiadas. La función 1 clasificó el 56,27% de las muestras y la función 2 clasificó el 24,58%. Ninguna de las dos funciones discriminó claramente entre tratamientos (**Figura 7.2**) aunque se observó una pequeña discriminación de la función 1 entre los vinos testigo y los vinos tratados, especialmente los obtenidos con maceración prefermentativa en frío y con nieve carbónica, siendo los parámetros CIELab b*, C* y H* las variables de mayor poder discriminante (**Tabla 7.24**). La función 2 también mostró una pequeña discriminación entre los tratamientos con β -galactosidasa y el resto de los vinos, siendo también los parámetros CIELab las variables de mayor poder discriminante.

Figura 7.2 Distribución de los vinos en un sistema de coordenadas definido por la función discriminante usada para diferenciar entre los distintos tratamientos

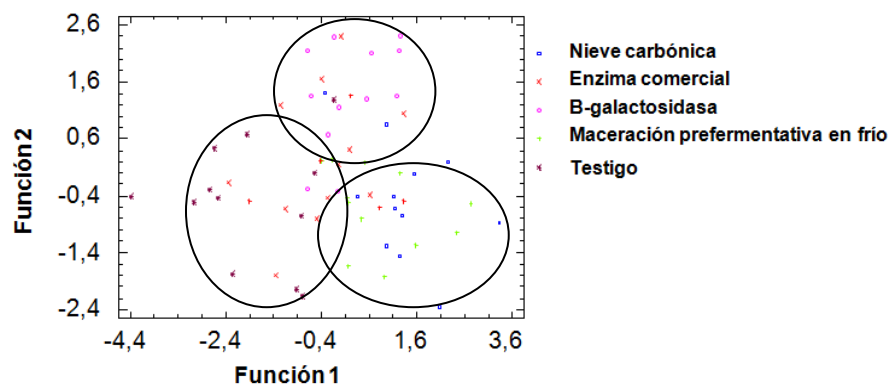


Tabla 7.24. Coeficientes de estandarización para las funciones discriminantes 1 y 2 en función del tratamiento.

Variables	Función 1	Función 2
IC	-14,51	2,10
T	3,25	-2,00
L*	0,73	-0,21
a*	7,13	-37,60
b*	42,35	-86,20
C*	-25,98	94,34
H*	-21,22	26,11
FCA	11,60	-6,87
FFA	5,92	-1,73
FPP	1,51	7,44
%Rojo	0,36	1,09
%Amarillo	-5,66	-1,12
%Azul	-0,39	-0,66
IPT	0,47	-2,81
Antocianos	-1,77	-0,50

Abreviaturas: IC: intensidad de color; T: tono; FCA: fracción de color debida a antocianos copigmentados; FFA: fracción de color debida a antocianos libres; FPP: fracción de color debida a pigmentos poliméricos; IPT: índice de polifenoles totales; AT: antocianos totales (mg/L);

8. CONCLUSIONES

1. Se observaron importantes diferencias entre las campañas 2007 y 2009 en la madurez y características fenólicas de las uvas de Syrah y Cabernet Sauvignon. En el 2007 las uvas presentaron un elevado índice de madurez celular, es decir, una gran dificultad para la extracción de compuestos fenólicos. En el 2009 presentaron mayor madurez en los hollejos pero menor madurez en las semillas. Las uvas de Monastrell mostraron mejor adaptación a la variabilidad entre estos años y sus características fenólicas no sufrieron tantas variaciones entre las dos campañas.
2. Cuando las uvas de Cabernet Sauvignon mostraron unos hollejos poco maduros (campaña 2007), las tres técnicas de frío y el preparado enzimático comercial dieron lugar a vinos con mejores características cromáticas y con mayor concentración de antocianos y flavonoles que los del vino testigo. La concentración de proantocianidinas procedentes de los hollejos también se vio favorecida con los tratamientos de frío. La suma de las actividades enzimáticas presentes en el preparado comercial facilitó más la degradación de las paredes celulares que el enzima con una única actividad β -galactosidasa. Al evolucionar el vino, los tratamientos con nieve carbónica, maceración prefermentativa en frío y adición del preparado enzimático siguieron manteniendo mejores características cromáticas que la vinificación tradicional. Cuando los hollejos de Cabernet Sauvignon se encontraron más maduros (campaña 2009), la maceración prefermentativa en frío y el preparado enzimático comercial aumentaron la concentración total de antocianos a final de la fermentación alcohólica, pero con la evolución de los vinos no se observaron diferencias entre los vinos tratados y el vino testigo. Las técnicas de frío provocaron un aumento de la presencia de taninos procedentes de las semillas cuando estas se encontraron menos maduras.
3. Todos los tratamientos mejoraron las características cromáticas de los vinos de Syrah en la campaña 2007, siendo los vinos obtenidos con las técnicas enzimáticas y, especialmente el enzima con actividad β -

galactosidasa, los que presentaron mejores características cromáticas. La extracción de antocianos se vio favorecida con la congelación de la uva, la adición de nieve carbónica y la adición del enzima con actividad β -galactosidasa. Con estas tres técnicas y con el preparado enzimático comercial también se observó un aumento en el contenido de flavonoles. La extracción de proantocianidinas procedentes de los hollejos se vio favorecida con la adición de nieve carbónica y del preparado enzimático comercial. Al evolucionar los vinos, los tratamientos siguieron mostrando mejores características cromáticas que el vino testigo. En la campaña 2009 las técnicas empleadas no mejoraron las características cromáticas de los vinos. Ese año el preparado enzimático facilitó la extracción de antocianos, pero ningún tratamiento mejoró la extracción de flavonoles. Las técnicas de frío también favorecieron la extracción de proantocianidinas procedentes de las semillas cuando éstas se encontraron menos maduras.

4. Las técnicas de frío y enzimáticas mejoraron la extractabilidad de compuestos fenólicos en las variedades Cabernet Sauvignon y Syrah cuando los hollejos de las uvas se encontraron menos maduros. El efecto de las técnicas de frío dependió en gran medida de la rigidez de las paredes celulares de la uva, aunque el efecto de las técnicas enzimáticas también pareció depender de el tipo de actividad enzimática y de la concentración inicial de los compuestos fenólicos en la uva, favoreciendo más la extracción cuando estos compuestos se encontraban en menor concentración.
5. En los vinos de Monastrell de las campañas 2007 y 2009 ninguno de los tratamientos mejoró notablemente las características cromáticas de los vinos ni facilitó significativamente la extracción de compuestos fenólicos de los hollejos. La maceración prefermentativa en frío favoreció la extracción de proantocianidinas procedentes de las semillas.

6. Las proantocianidinas procedentes de las semillas pueden comenzar a difundirse en la ausencia de alcohol. Las técnicas enológicas de maceración en frío provocaron un aumento de la extracción de proantocianidinas de las semillas cuando estas se encontraron poco maduras.
7. El efecto de las técnicas de frío y enzimáticas sobre la composición aromática de los vinos de Cabernet Sauvignon fue similar al observado en los parámetros cromáticos y fenólicos. En la campaña 2007 todos los tratamientos aumentaron la presencia de alcoholes C6, de ácidos carboxílicos y de acetatos en los vinos. Las técnicas de frío también favorecieron la presencia de ésteres etílicos. El enzima β -galactosidasa y la congelación de la uva aumentaron la presencia de alcoholes superiores. En la campaña 2009 las técnicas empleadas no tuvieron un efecto notable sobre la composición aromática de los vinos.
8. La concentración de todos los compuestos aromáticos estudiados incrementó en los vinos de Syrah tratados con nieve carbónica en la campaña 2007. La congelación de la uva también favoreció la presencia de ésteres etílicos y alcoholes C6. En la campaña 2009 no se observó un efecto significativo de los tratamientos.
9. Las técnicas enológicas estudiadas tuvieron más efecto sobre la composición aromática de los vinos de Monastrell que sobre su composición fenólica en las campañas 2007 y 2009. La presencia de alcoholes C6 se vio favorecida en ambas campañas por la congelación de la uva y por la maceración prefermentativa en frío. La congelación de la uva también dio lugar a vinos con mayor contenido de alcoholes superiores y ácidos. La adición de enzima β -galactosidasa favoreció la presencia de acetatos. Pero la composición aromática en los vinos embotellados dependió más de la evolución sufrida por los compuestos aromáticos que del tratamiento empleado.

10. El análisis sensorial de los vinos reflejó unos resultados en concordancia con los obtenidos en el estudio de la composición fenólica y aromática. Los vinos de Cabernet Sauvignon y Syrah sometidos a los tratamientos fueron mejor puntuados que el vino obtenido con una elaboración tradicional en la campaña 2007, pero no en la campaña 2009. En el análisis sensorial de los vinos de Monastrell los catadores fueron capaces de percibir algunas diferencias entre los tratamientos y el testigo, aunque no mostraron una clara preferencia hacia los vinos tratados.

11. Las condiciones edafoclimáticas de la zona vitícola de procedencia de la uva tuvieron mayor efecto sobre las características cromáticas de los vinos de Monastrell que las técnicas de frío y enzimáticas empleadas en la vinificación.

12. Los resultados mostraron que es imprescindible conocer la composición y madurez fenólica de la uva para realizar una correcta vinificación seleccionando la técnica enológica más adecuada para mejorar la extractabilidad.

9. ANEXOS

Tabla 9.1. Composición aromática (mg/L) a final de fermentación alcohólica. Vinos de Cabernet Sauvignon, campaña 2007.

	T	CU	NC	MPF	EC	G
Propanol	16,63b	7,32a	nd	0,06a	2,63a	1,57a
Isobutanol	38,64b	13,73a	43,08b	37,56b	50,38b	53,20b
Alcoholes amílicos	440,55b	403,46b	388,98ab	334,89a	413,30b	511,53c
2-fenil-etanol	95,17a	106,15a	97,26a	103,61a	137,73ab	199,72b
Alcoholes Superiores	590,99a	530,66a	529,31a	476,12a	604,05a	766,03b
Acetato Isoamilo	0,25a	1,84c	0,63ab	1,11b	0,27a	0,46a
Acetato Hexilo	0,04a	0,05a	nd	nd	0,01a	0,01a
2-fenil-etil-acetato	0,14a	0,27a	0,39a	0,26a	0,12a	0,17a
Acetatos	0,43a	2,16c	1,02ab	1,37b	0,40a	0,64a
Propionato de etilo	0,07a	0,04a	nd	nd	0,10a	0,08a
Etil-3-hidroxibutirato	0,45a	0,75b	0,47a	0,50a	0,42a	0,41a
Isobutirato de etilo	0,01a	0,03ab	nd	nd	0,09b	0,06ab
Hexanoato de etilo	0,13a	0,55b	0,07a	0,09a	0,10a	0,09a
Octanoato de etilo	0,12a	0,59b	nd	0,01a	0,04a	0,04a
Ésteres etílicos	0,78a	1,96b	0,55a	0,60a	0,75a	0,68a
Ac. Hexanoico	1,17a	2,86c	1,97b	2,07b	1,71b	1,71b
Ac. Octanoico	0,83a	5,11d	1,06a	1,99b	2,39bc	2,83c
Ac. Decanoico	0,15a	0,68ab	nd	nd	2,29b	0,23a
Ácidos	2,16a	8,65d	3,03b	4,06b	6,39c	4,78b
1-hexanol	0,90a	2,99c	2,04b	2,08b	2,27b	2,00b
Cis-3-hexenol	0,03a	0,19a	nd	nd	0,02a	0,01a
Alcoholes C6	0,93a	3,18c	2,04b	2,08b	2,29b	2,01b

Letras diferentes en la misma fila muestras diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; nd: no detectado.

Tabla 9.2. Composición aromática (mg/L) en el momento del embotellado. Vinos Cabernet de Sauvignon, campaña 2007.

	T	CU	NC	MPF	EC	G
Propanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Isobutanol	55,78bc	51,85bc	33,77a	44,51ab	61,91c	56,59bc
Alcoholes amílicos	518,40ab	469,74ab	444,23a	447,96a	540,88b	520,83ab
2-fenil-etanol	98,56a	120,43ab	124,17ab	102,18a	136,00ab	150,30b
Alcoholes Superiores	672,74a	642,02a	602,17a	594,65a	738,79a	727,72a
Acetato Isoamilo	0,51a	0,82ab	2,06c	1,00b	0,77ab	0,86b
Acetato Hexilo	0,01a	0,01a	0,02b	nd	0,01a	0,01a
2-fenil-etil-acetato	0,06ab	0,09bc	0,05ab	0,02a	0,13cd	0,15d
Acetatos	0,57a	0,92b	2,13c	1,02b	0,91b	1,02b
Propionato de etilo	0,12ab	0,15b	0,08a	0,09a	0,12ab	0,09a
Etil-3-hidroxi-butirato	0,35a	0,50c	0,53c	0,43b	0,40ab	0,41ab
Isobutirato de etilo	0,04ab	0,04ab	0,05b	0,03a	0,04ab	0,03a
Hexanoato de etilo	0,19a	0,20ab	0,28c	0,21ab	0,22b	0,21ab
Octanoato de etilo	0,10b	0,06a	0,08b	0,05a	0,07a	0,06a
Ésteres etílicos	0,80a	0,96bc	1,03c	0,80a	0,85ab	0,80a
Ac. Hexanoico	1,34a	2,23b	2,20b	1,85b	1,88b	1,85b
Ac. Octanoico	4,57ab	8,47c	6,31bc	3,67ab	3,21a	3,19a
Ac. Decanoico	0,68ab	0,86b	0,32ab	0,32ab	0,64ab	0,26a
Ácidos	6,59a	11,57b	8,84ab	5,84a	5,74a	5,29a
1-hexanol	1,02a	2,58d	2,04c	1,78b	2,38d	2,02c
Cis-3-hexenol	0,03a	0,04b	0,03a	0,03a	0,04b	0,03a
Alcoholes C6	1,05a	2,62d	2,07c	1,81b	2,42d	2,05c

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; nd: no detectado.

Tabla 9.3. Composición aromática (mg/L) 6 meses después del embotellado. Vinos de Cabernet Sauvignon, campaña 2007.

	T	CU	NC	MPF	EC	G
Propanol	21,47b	36,5b	5,97a	nd	nd	nd
Isobutanol	46,83a	64,73b	48,21a	58,64ab	56,72ab	54,58ab
Alcoholes amílicos	447,23ab	546,77c	423,43a	518,14bc	493,44abc	515,68bc
2-fenil-etanol	116,82a	171,97a	112,66a	118,62a	115,21a	145,97a
Alcoholes Superiores	632,35a	819,98b	590,27a	695,40ab	665,37a	716,24ab
Acetato Isoamilo	0,43a	0,75b	1,85d	1,30c	0,68b	0,80b
Acetato Hexilo	nd	nd	0,03a	0,02a	0,02a	0,02a
2-fenil-etil-acetato	0,39a	0,79b	0,21a	0,15a	0,09a	0,13a
Acetatos	0,83a	1,54b	2,09c	1,47b	0,79a	0,94a
Propionato de etilo	0,20a	0,32b	0,36b	0,36b	0,25a	0,23a
Etil-3-hidroxitirato	0,43b	0,69d	0,60c	0,57c	0,35a	0,36ab
Isobutirato de etilo	nd	0,09a	0,23b	0,16ab	0,18ab	0,16ab
Hexanoato de etilo	0,23a	0,45c	0,56d	0,52d	0,35b	0,36b
Octanoato de etilo	0,14a	0,16a	0,35b	0,29b	0,20ab	0,21ab
Esteres etílicos	0,99a	1,71bc	2,10c	1,89c	1,34ab	1,31ab
Ac. Hexanoico	1,63a	2,34a	2,37a	2,46a	1,56a	1,59a
Ac. Octanoico	1,93a	4,79c	5,57c	4,83c	3,06ab	3,28b
Ac. Decanoico	0,13a	0,43b	0,50b	0,38b	0,35b	0,35b
Ácidos	3,68a	7,56c	8,43c	7,68c	4,98ab	5,22b
1-hexanol	0,94a	2,74d	2,65cd	2,69cd	2,31bc	2,06b
Cis-3-hexenol	0,09b	0,05ab	0,04a	0,05ab	0,04a	0,03a
Alcoholes C6	1,03a	2,79d	2,69cd	2,73d	2,35bc	2,09b

Letras diferentes en la misma fila muestras diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; nd: no detectado

Tabla 9.4. Composición aromática (mg/L) a final de la fermentación alcohólica. Vinos de Cabernet Sauvignon, campaña 2009.

	T	NC	MPF	EC
Propanol	21,40a	19,84a	25,10b	21,02a
Isobutanol	53,14a	53,75a	51,10a	51,11a
Alcoholes amílicos	536,12a	557,35a	518,06a	440,62a
2-fenil-etanol	115,35a	125,76a	104,81a	100,96a
Alcoholes Superiores	726,00a	756,71a	699,07a	613,71a
Acetato Isoamilo	2,48a	3,65b	1,98a	2,34a
Acetato Hexilo	0,03a	0,07a	0,02a	0,05a
2-fenil-etil-acetato	0,18a	0,44a	0,08a	0,27a
Acetatos	2,68a	4,17b	2,09a	2,66a
Propionato de etilo	0,55b	nd	0,24b	0,01a
Etil-3-hidroxitirato	0,60a	0,80a	0,69a	0,62a
Isobutirato de etilo	0,64b	0,04a	0,20b	0,01a
Hexanoato de etilo	0,42a	0,61a	0,42a	0,42a
Octanoato de etilo	0,14a	0,35a	0,09a	0,27a
Esteres etílicos	2,34a	1,80a	1,63a	1,33a
Ac. Hexanoico	3,03a	3,90a	3,08a	2,93a
Ac. Octanoico	3,41b	4,20c	2,36a	3,79bc
Ac. Decanoico	0,49a	0,58a	0,36a	0,43a
Ácidos	6,92ab	8,68b	5,80a	7,15ab
1-hexanol	2,64a	2,88a	2,84a	2,56a
Cis-3-hexenol	0,01a	0,02a	0,02a	0,02a
Alcoholes C6	2,65a	2,90a	2,87a	2,58a

Letras diferentes en la misma fila muestras diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial.

Tabla 9.5. Composición aromática (mg/L) en el momento del embotellado. Vinos Cabernet de Sauvignon, campaña 2009.

	T	NC	MPF	EC
Propanol	33,34a	27,80a	35,36a	31,68a
Isobutanol	64,85a	60,09a	58,55a	60,25a
Alcoholes amílicos	650,41a	561,95a	602,70a	573,69a
2-fenil-etanol	119,77b	112,53b	56,19a	109,39b
Alcoholes Superiores	868,38b	762,37a	752,80a	775,02ab
Acetato Isoamilo	1,84aa	2,10a	1,56a	1,97a
Acetato Hexilo	0,03a	0,03a	0,03a	0,03a
2-fenil-etil-acetato	0,30a	0,28a	0,21a	0,27a
Acetatos	2,17a	2,42a	1,80a	2,27a
Propionato de etilo	0,12a	0,12a	0,10a	0,12a
Etil-3-hidroxibutirato	0,72a	0,68a	0,61a	0,70a
Isobutirato de etilo	0,03a	0,03a	0,01a	0,02a
Hexanoato de etilo	0,50a	0,42a	0,39a	0,47a
Octanoato de etilo	0,22ab	0,19ab	0,17a	0,28b
Esteres etílicos	1,59b	1,44ab	1,28a	1,58ab
Ac. Hexanoico	2,85a	3,20a	2,71a	2,68a
Ac. Octanoico	3,93ab	4,48b	3,26a	4,09b
Ac. Decanoico	0,48a	0,72a	0,74a	0,65a
Ácidos	7,26ab	8,40b	6,70a	7,42ab
1-hexanol	2,85a	2,52a	2,48a	2,62a
Cis-3-hexenol	0,06a	0,06a	0,07a	0,06a
Alcoholes C6	2,91a	2,58a	2,55a	2,68a

Letras diferentes en la misma fila muestras diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial.

Tabla 9.6. Composición aromática (mg/L) 6 meses después del embotellado. Vinos de Cabernet Sauvignon, campaña 2009.

	T	NC	MPF	EC
Propanol	34,80a	28,55a	35,53a	32,17a
Isobutanol	65,61b	57,07ab	53,94a	60,02ab
Alcoholes amílicos	694,52b	603,29a	602,83a	651,39ab
2-fenil-etanol	122,47b	116,58b	97,05a	115,66b
Alcoholes Superiores	917,40b	805,48a	789,36a	859,24ab
Acetato Isoamilo	1,16ab	1,30b	0,85a	1,08ab
Acetato Hexilo	0,01a	0,04b	0,04b	0,02ab
2-fenil-etil-acetato	0,16a	0,21a	0,17a	0,31a
Acetatos	1,33b	1,55b	1,07a	1,41b
Propionato de etilo	0,26a	0,23a	0,19a	0,16a
Etil-3-hidroxitirato	0,71a	0,72a	0,73a	0,63a
Isobutirato de etilo	0,09a	0,05a	0,07a	0,02a
Hexanoato de etilo	0,34b	0,36b	0,28a	0,38a
Octanoato de etilo	0,11ab	0,14bc	0,09a	0,15c
Esteres etílicos	1,51a	1,50a	1,36a	1,34a
Ac. Hexanoico	3,24b	3,33b	2,66a	3,35b
Ac. Octanoico	4,65ab	5,41bc	4,26a	5,68c
Ac. Decanoico	1,11a	0,80a	0,69a	1,09a
Ácidos	9,00ab	9,54b	7,61a	10,12b
1-hexanol	2,65a	2,71a	2,46a	2,55a
Cis-3-hexenol	0,03a	0,07ab	0,15b	0,05a
Alcoholes C6	2,68a	2,77a	2,61a	2,60a

Letras diferentes en la misma fila muestras diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial.

Tabla 9.7. Composición aromática (mg/L) a final de fermentación alcohólica. Vinos de Syrah, campaña 2007.

	T	CU	NC	MPF	EC	G
Propanol	nd	nd	7,94b	3,73a	nd	nd
Isobutanol	46,53a	42,66a	30,56a	29,04a	44,38a	36,21a
Alcoholes amílicos	305,92ab	338,92ab	346,95b	295,78ab	311,56ab	238,74a
2-fenil-etanol	46,65a	74,98ab	86,84b	69,48ab	74,68ab	55,17a
Alcoholes Superiores	399,09ab	456,55bc	472,29c	398,02a	430,62b	330,13a
Acetato Isoamilo	0,71a	0,90ab	1,45b	0,55a	0,27a	0,33a
Acetato Hexilo	0,03a	0,04a	0,02a	0,02a	0,03a	0,02a
2-fenil-etil-acetato	0,05a	0,03a	0,04a	0,02a	0,02a	0,02a
Acetatos	0,79bc	0,97c	1,51d	0,59b	0,32a	0,37a
Propionato de etilo	0,06c	0,04b	0,02a	0,01a	0,04b	0,03ab
Etil-3-hidroxi-butirato	0,20a	0,31a	0,20a	0,19a	0,17a	0,14a
Isobutirato de etilo	0,02a	0,01a	0,01a	0,01a	0,01a	0,01a
Hexanoato de etilo	0,09b	0,04a	0,03a	0,03a	0,04a	0,05a
Octanoato de etilo	0,05b	0,02ab	0,01b	0,01b	0,01b	0,01b
Esteres etílicos	0,42b	0,42b	0,27ab	0,25ab	0,27ab	0,24a
Ac. Hexanoico	1,02ab	1,25ab	1,51b	0,73a	1,09ab	0,99ab
Ac. Octanoico	2,05a	2,22a	2,04a	2,10a	2,41a	2,20a
Ac. Decanoico	0,34a	0,18a	0,39a	0,18a	0,25a	0,53a
Ácidos	3,41ab	3,65ab	3,94b	3,01a	3,75ab	3,72ab
1-hexanol	1,47a	2,17c	2,00bc	1,52ab	1,44a	1,28a
Cis-3-hexenol	0,09bc	0,11cd	0,14d	0,06ab	0,08abc	0,05a
Alcoholes C6	1,56a	2,28b	2,14b	1,58a	1,52a	1,33a

Letras diferentes en la misma fila muestras diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; nd: no detectado.

Tabla 9.8. Composición aromática (mg/L) en el momento del embotellado. Vinos de Syrah, campaña 2007.

	T	CU	NC	MPF	EC	G
Propanol	0,09a	0,11a	nd	0,51a	nd	nd
Isobutanol	50,99b	49,99b	37,33a	49,50b	47,77b	42,61ab
Alcoholes amílicos	393,83b	423,46bc	512,72c	329,64ab	345,18ab	287,80a
2-fenil-etanol	73,92ab	81,72ab	101,52b	55,42	61,95a	69,70ab
Alcoholes Superiores	518,83b	555,28bc	651,57c	435,07ab	454,90ab	400,11a
Acetato Isoamilo	0,64b	0,64b	1,84c	0,39ab	0,62b	0,29a
Acetato Hexilo	0,02a	0,02a	0,02a	0,02a	0,02a	0,03a
2-fenil-etil-acetato	0,44a	0,82b	0,33a	0,32a	0,17a	0,07a
Acetatos	1,10bc	1,49c	2,20d	0,73ab	0,82ab	0,40a
Propionato de etilo	0,26cd	0,34d	0,21bc	0,09ab	0,10ab	0,07a
Etil-3-hidroxi-butirato	0,31ab	0,41bc	0,50c	0,27ab	0,22a	0,17a
Isobutirato de etilo	0,07bc	0,09c	0,07bc	0,05ab	0,05ab	0,03a
Hexanoato de etilo	0,09ab	0,08a	0,13b	0,07a	0,09ab	0,07a
Octanoato de etilo	0,03a	0,03a	0,02a	0,03a	0,04a	0,03a
Esteres etílicos	0,76bc	0,95c	0,93c	0,51ab	0,50ab	0,37a
Ac. Hexanoico	1,12ab	1,34bc	1,48c	1,10ab	1,01ab	0,96a
Ac. Octanoico	2,86c	2,45bc	3,23d	1,63ab	1,67ab	1,46a
Ac. Decanoico	0,46a	0,24a	0,28a	0,42a	0,25a	0,23a
Ácidos	4,44c	4,03bc	4,99d	3,15ab	2,94ab	2,64a
1-hexanol	1,50ab	2,30c	2,30c	1,70b	1,32a	1,35ab
Cis-3-hexenol	0,10b	0,13c	0,15c	0,10b	0,08b	0,05a
Alcoholes C6	1,60ab	2,43c	2,45c	1,80b	1,40a	1,40a

Letras diferentes en la misma fila muestras diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; nd: no detectado.

Tabla 9.9. Composición aromática (mg/L) 6 meses después del embotellado. Vinos de Syrah, campaña 2007.

	T	CU	NC	MPF	EC	G
Propanol	0,05a	0,01a	nd	0,04a	nd	nd
Isobutanol	54,04bc	55,17bc	58,82c	51,43b	42,70a	44,46a
Alcoholes amílicos	369,16abc	431,32c	421,14bc	345,19ab	299,68a	324,38a
2-fenil-etanol	49,92a	85,35a	79,87a	62,28a	64,00a	116,74b
Alcoholes Superiores	473,16abc	571,85c	559,83bc	458,93ab	406,38a	485,58abc
Acetato Isoamilo	0,81b	0,65b	1,70c	0,46a	0,65b	0,45a
Acetato Hexilo	0,03ab	0,04ab	0,02a	0,01a	0,04ab	0,06b
2-fenil-etil-acetato	0,12b	0,10b	0,26d	0,07a	0,11b	0,16c
Acetatos	0,96c	0,79bc	1,98d	0,54a	0,79bc	0,67ab
Propionato de etilo	0,49a	0,88b	0,50a	0,42a	0,21a	0,22a
Etil-3-hidroxi-butirato	0,30ab	0,41bc	0,51c	0,28ab	0,19a	0,17a
Isobutirato de etilo	0,26bc	0,34d	0,29cd	0,22ab	0,17a	0,17a
Hexanoato de etilo	0,24ab	0,29bc	0,35c	0,23ab	0,18ab	0,13a
Octanoato de etilo	0,15a	0,15a	0,23b	0,13a	0,12a	0,11a
Esteres etílicos	1,44ab	2,08c	1,88bc	1,28ab	0,87a	0,80a
Ac. Hexanoico	1,01ab	1,26bc	1,54c	1,02ab	0,87a	0,87a
Ac. Octanoico	2,08b	2,35bc	2,87c	1,48a	1,36a	1,20a
Ac. Decanoico	0,29b	0,29b	0,27ab	0,19a	0,26ab	0,21a
Ácidos	3,38bc	3,91cd	4,68d	2,69ab	2,48ab	2,27a
1-hexanol	1,63ab	2,51c	2,72c	1,98b	1,28a	1,38a
Cis-3-hexenol	0,11b	0,14b	0,18c	0,12b	0,07a	0,05a
Alcoholes C6	1,73ab	2,65c	2,90c	2,10b	1,35a	1,43a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; nd: no detectado.

Tabla 9.10. Composición aromática (mg/L) a final de fermentación alcohólica. Vinos de Syrah, campaña 2009.

	T	NC	MPF	EC
Propanol	26,70a	27,90a	34,47b	26,20a
Isobutanol	77,96a	71,40a	63,15a	83,76a
Alcoholes amílicos	515,88a	472,76a	469,43a	548,09a
2-fenil-etanol	66,28a	45,71a	46,27a	58,03a
Alcoholes Superiores	686,82a	617,77a	613,32a	716,08a
Acetato Isoamilo	4,00a	4,46a	3,83a	4,33a
Acetato Hexilo	nd	nd	nd	nd
2-fenil-etil-acetato	nd	0,05	0,02	nd
Acetatos	4,00a	4,51a	3,85a	4,33a
Propionato de etilo	nd	nd	nd	nd
Etil-3-hidroxitirato	0,28	nd	nd	nd
Isobutirato de etilo	2,35a	2,19a	2,71a	2,61a
Hexanoato de etilo	0,05a	nd	nd	0,07a
Octanoato de etilo	nd	nd	nd	nd
Esteres etílicos	2,68a	2,19a	2,71a	2,68a
Ac. Hexanoico	3,52b	3,21b	2,57a	2,70ab
Ac. Octanoico	2,21a	2,46a	1,99a	2,21a
Ac. Decanoico	0,16a	0,19a	0,40a	0,38a
Ácidos	5,89a	5,86a	4,96a	5,44a
1-hexanol	2,05a	2,90a	1,29a	1,47a
Cis-3-hexenol	0,14	0,13	0,14	0,09
Alcoholes C6	2,19ab	3,03b	1,43a	1,56a

Letras diferentes en la misma fila muestras diferencias significativas según Test de Duncan ($p>95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; nd: no detectado.

Tabla 9.11. Composición aromática (mg/L) en el momento del embotellado. Vinos de Syrah, campaña 2009.

	T	NC	MPF	EC
Propanol	24,35a	23,68a	37,24b	25,91a
Isobutanol	63,15ab	60,43a	73,32c	72,20bc
Alcoholes amílicos	412,38a	395,28a	435,34a	466,73a
2-fenil-etanol	41,64a	42,78a	36,01a	42,93a
Alcoholes Superiores	541,51a	522,17a	581,91a	607,77a
Acetato Isoamilo	2,25a	2,78ab	3,50b	3,20b
Acetato Hexilo	0,91b	0,02a	nd	0,05a
2-fenil-etil-acetato	0,06a	0,16b	0,13b	0,05a
Acetatos	3,22a	2,96a	3,53a	3,30a
Propionato de etilo	0,13a	nd	nd	0,10a
Etil-3-hidroxitirato	0,66a	0,54a	2,00b	0,52a
Isobutirato de etilo	0,03a	1,30b	0,91b	0,92b
Hexanoato de etilo	0,22b	0,04a	nd	0,21b
Octanoato de etilo	0,23a	0,13a	0,14a	0,18a
Esteres etílicos	1,27a	2,01ab	3,05b	1,93ab
Ac. Hexanoico	1,86a	1,78a	1,94a	1,70a
Ac. Octanoico	1,96a	1,60a	2,07a	2,14a
Ac. Decanoico	0,24a	0,33a	0,37a	0,22a
Ácidos	4,06a	3,72a	4,38a	4,06a
1-hexanol	2,64a	1,67a	1,71a	2,53a
Cis-3-hexenol	0,20b	0,28b	nd	0,04a
Alcoholes C6	2,84b	1,95a	1,71a	2,57b

Letras diferentes en la misma fila muestras diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; nd: no detectado.

Tabla 9.12. Composición aromática (mg/L) 6 meses después del embotellado. Vinos de Syrah, campaña 2009.

	T	NC	MPF	EC
Propanol	36,58a	29,53a	39,91a	29,80a
Isobutanol	80,22b	60,62a	82,38b	77,36b
Alcoholes amílicos	523,08a	458,24a	489,10a	506,64a
2-fenil-etanol	46,82a	41,15a	35,66a	41,15a
Alcoholes Superiores	686,70a	589,54a	611,39a	654,95a
Acetato Isoamilo	2,76bc	1,59a	2,01ab	3,32c
Acetato Hexilo	0,07a	0,07a	0,04a	0,06a
2-fenil-etil-acetato	0,12a	0,09a	0,12a	0,13a
Acetatos	2,95bc	1,75a	2,17ab	3,51c
Propionato de etilo	0,24	0,13	0,13	0,22
Etil-3-hidroxi-butirato	0,72b	0,62b	0,67b	0,43a
Isobutirato de etilo	0,41a	0,21a	0,19a	0,45a
Hexanoato de etilo	0,29a	0,21a	0,31a	0,35a
Octanoato de etilo	0,33a	0,11a	0,16a	0,39a
Esteres etílicos	1,99b	1,28a	1,46ab	1,84b
Ac. Hexanoico	2,07a	1,80a	2,72a	2,36a
Ac. Octanoico	3,85a	3,33a	3,50a	3,53a
Ac. Decanoico	0,94a	0,51a	0,36a	0,47a
Ácidos	6,86a	5,64a	6,58a	6,36a
1-hexanol	2,42a	1,82a	2,24a	2,13a
Cis-3-hexenol	0,09a	0,14a	0,24a	0,24a
Alcoholes C6	2,51a	1,96a	2,48a	2,37a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; nd: no detectado.

Tabla 9.13. Composición aromática (mg/L) a final de fermentación alcohólica. Vinos de Monastrell, campaña 2007.

	T	CU	NC	MPF	EC	G
Propanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Isobutanol	58,52ab	51,89a	49,66a	66,46b	57,39ab	52,70a
Alcoholes amílicos	403,66b	338,21ab	281,89a	395,09b	335,84ab	365,12b
2-fenil-etanol	89,20b	65,82a	65,44a	82,95ab	65,65a	85,10ab
Alcoholes Superiores	551,37b	455,92ab	396,98a	544,50b	458,89ab	502,92b
Acetato Isoamilo	0,27ab	0,27ab	0,12a	0,52c	0,37bc	0,21ab
Acetato Hexilo	0,06a	0,06a	0,07a	0,09b	0,06a	0,06a
2-fenil-etil-acetato	0,32b	0,12ab	0,10ab	0,02a	0,08ab	0,21ab
Acetatos	0,65b	0,45ab	0,28a	0,63ab	0,51ab	0,47ab
Propionato de etilo	0,03a	0,05ab	0,05ab	0,08b	0,06ab	0,03a
Etil-3-hidroxi-butirato	0,37a	0,27a	0,42a	0,33a	0,44a	0,35a
Isobutirato de etilo	nd	nd	nd	nd	0,01a	0,01a
Hexanoato de etilo	0,02a	0,04a	0,02a	0,06a	0,03a	0,04a
Octanoato de etilo	nd	nd	nd	0,01a	nd	0,01a
Esteres etílicos	0,42a	0,36a	0,49a	0,48a	0,54a	0,44a
Ac. Hexanoico	1,46ab	1,34a	1,74b	1,79b	1,73b	1,38ab
Ac. Octanoico	1,75a	1,53a	2,05a	2,13a	1,96	1,68
Ac. Decanoico	0,21b	0,09a	0,17ab	0,15ab	0,14ab	0,15ab
Ácidos	3,42ab	2,96a	3,96b	4,07b	3,83b	3,21ab
1-hexanol	1,96a	1,88a	1,65a	1,92a	1,87a	1,60a
Cis-3-hexenol	0,01a	0,01a	0,01a	0,02a	0,01a	0,01a
Alcoholes C6	1,97a	1,89a	1,66a	1,93a	1,88a	1,61a

Letras diferentes en la misma fila muestras diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; nd: no detectado.

Tabla 9.14. Composición aromática (mg/L) en el momento del embotellado. Vinos de Monastrell, campaña 2007.

	T	CU	NC	MPF	EC	G
Propanol	nd	nd	0,02	nd	nd	nd
Isobutanol	61,60a	69,06a	67,45a	58,34a	52,47a	53,71a
Alcoholes amílicos	280,25a	321,91a	335,00a	325,95a	289,68a	313,31a
2-fenil-etanol	69,78b	66,55ab	66,40ab	59,82ab	51,62a	58,15ab
Alcoholes Superiores	411,63a	457,52a	468,88a	444,11a	393,77a	425,17a
Acetato Isoamilo	0,06a	0,33ab	0,43b	0,35ab	0,43b	0,48b
Acetato Hexilo	0,01a	0,01a	0,02b	0,01a	0,01a	0,01a
2-fenil-etil-acetato	0,12a	0,20a	0,14a	0,12a	0,08a	0,12a
Acetatos	0,19a	0,54ab	0,59b	0,48ab	0,52ab	0,61b
Propionato de etilo	0,07a	0,17a	0,13a	0,12a	0,10a	0,12a
Etil-3-hidroxi-butirato	0,32a	0,36a	0,45a	0,34a	0,36a	0,42a
Isobutirato de etilo	nd	0,02a	0,02a	0,02a	0,02a	0,02a
Hexanoato de etilo	0,01a	0,06b	0,07b	0,08b	0,08b	0,08b
Octanoato de etilo	0,01a	0,02a	0,01a	0,01a	0,02a	0,02a
Esteres etílicos	0,41a	0,63ab	0,68b	0,57ab	0,58ab	0,66b
Ac. Hexanoico	1,49a	1,42a	1,67a	1,53a	1,39a	1,51a
Ac. Octanoico	2,50a	2,52a	2,51a	2,28a	2,03a	2,39a
Ac. Decanoico	0,65b	0,56ab	0,26a	0,38ab	0,35ab	0,31ab
Ácidos	4,64a	4,50a	4,44a	4,19a	3,77a	4,21a
1-hexanol	1,48a	1,73ab	1,98b	2,02b	1,64ab	1,65ab
Cis-3-hexenol	0,01a	0,01a	0,01a	0,01a	0,01a	0,01a
Alcoholes C6	1,49a	1,74ab	1,99b	2,03b	1,65ab	1,66ab

Letras diferentes en la misma fila muestras diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; nd: no detectado.

Tabla 9.15. Composición aromática (mg/L) 6 meses después del embotellado. Vinos de Monastrell, campaña 2007.

	T	CU	NC	MPF	EC	G
Propanol	34,96ab	35,30ab	63,58b	54,59ab	23,71a	21,84a
Isobutanol	62,18a	70,98ab	88,84b	60,71a	64,22a	51,95a
Alcoholes amílicos	383,81a	401,51a	372,55a	357,50a	376,82a	382,23a
2-fenil-etanol	105,54b	145,07b	59,74a	48,48a	66,61a	67,39a
Alcoholes Superiores	586,49ab	652,86b	586,51ab	521,28a	531,36a	523,41a
Acetato Isoamilo	0,59a	0,44a	0,80a	0,33a	0,58a	0,69a
Acetato Hexilo	0,05a	0,05a	0,02a	0,06a	0,04a	0,07a
2-fenil-etil-acetato	0,23a	0,21a	0,16a	0,08a	0,13a	0,40a
Acetatos	0,87ab	0,70ab	0,98ab	0,47a	0,75ab	1,16b
Propionato de etilo	0,38a	0,26a	0,71a	0,52a	0,36a	0,49a
Etil-3-hidroxi-butirato	0,32a	0,49a	0,46a	0,35a	0,39a	0,45a
Isobutirato de etilo	0,18a	0,23a	0,20a	0,22a	0,14a	0,17a
Hexanoato de etilo	0,26a	0,31a	0,29a	0,26a	0,23a	0,26a
Octanoato de etilo	0,18a	0,21a	0,19a	0,14a	0,16a	0,16a
Esteres etílicos	1,32a	1,50a	1,85a	1,49a	1,28a	1,53a
Ac. Hexanoico	1,74a	1,79a	1,58a	1,25a	1,31a	1,47a
Ac. Octanoico	1,83a	2,43ab	2,70b	2,00a	2,58ab	2,11ab
Ac. Decanoico	0,26a	0,34a	0,21a	0,18a	0,22a	0,22a
Ácidos	3,83ab	4,56b	4,49b	3,43a	4,11ab	3,80ab
1-hexanol	1,58a	2,48b	2,27ab	2,27ab	1,81ab	1,80ab
Cis-3-hexenol	0,16a	0,07a	0,05a	0,12a	0,07a	0,26a
Alcoholes C6	1,74a	2,55b	2,32ab	2,39ab	1,88ab	2,06ab

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; CU: congelación de la uva; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; G: galactosidasa; nd: no detectado.

Tabla 9.16. Composición aromática (mg/L) a final de la fermentación alcohólica. Vinos de Monastrell, campaña 2009.

	T	NC	MPF	EC
Propanol	17,79a	16,82a	22,43b	18,55a
Isobutanol	56,22ab	53,16a	64,35c	62,13bc
Alcoholes amílicos	354,43a	477,76b	359,74a	512,73c
2-fenil-etanol	76,85ab	85,46b	71,93a	71,35a
Alcoholes Superiores	505,29a	633,21b	518,46a	664,76b
Acetato Isoamilo	0,89a	1,73ab	1,08a	2,24b
Acetato Hexilo	0,06b	0,07c	0,03a	0,07c
2-fenil-etil-acetato	0,16ab	0,29c	0,10a	0,19b
Acetatos	1,11a	2,09b	1,21a	2,50b
Propionato de etilo	0,04ab	0,03a	0,08b	0,04ab
Etil-3-hidroxi-butirato	0,53ab	0,55bc	0,44a	0,63c
Isobutirato de etilo	nd	0,02a	nd	0,02a
Hexanoato de etilo	0,19a	0,22a	0,16a	0,55b
Octanoato de etilo	0,09a	0,10a	0,06a	0,25b
Esteres etílicos	0,85a	0,92a	0,74a	1,49b
Ac. Hexanoico	1,88c	1,67b	1,50a	2,02c
Ac. Octanoico	2,33b	2,58b	1,73a	2,38b
Ac. Decanoico	0,07a	0,63b	0,17a	0,51b
Ácidos	4,28b	4,88c	3,40a	4,91c
1-hexanol	2,00a	2,42b	2,52b	2,51b
Cis-3-hexenol	0,01a	0,01a	0,03b	0,01a
Alcoholes C6	2,01a	2,43b	2,55b	2,52b

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; nd: no detectado.

Tabla 9.17. Composición aromática (mg/L) en el momento del embotellado. Vinos de Monastrell, campaña 2009.

	T	NC	MPF	EC
Propanol	21,47a	21,72a	24,85a	21,15a
Isobutanol	60,72b	50,56a	55,71ab	55,00ab
Alcoholes amílicos	491,80a	474,88a	506,49a	465,84a
2-fenil-etanol	76,15b	91,30c	65,67a	66,27a
Alcoholes Superiores	650,14a	638,46a	652,72a	608,26a
Acetato Isoamilo	0,86a	0,65a	0,85a	0,75a
Acetato Hexilo	0,03a	0,08b	0,04ab	0,03a
2-fenil-etil-acetato	0,19a	0,32b	0,14a	0,17a
Acetatos	1,08a	1,05a	1,03a	0,95a
Propionato de etilo	0,09a	0,09a	0,12a	0,10a
Etil-3-hidroxitirato	0,68b	0,60ab	0,53a	0,64b
Isobutirato de etilo	0,02a	0,11b	0,10b	0,06ab
Hexanoato de etilo	0,15a	0,18a	0,16a	0,11a
Octanoato de etilo	0,06a	0,02a	0,04a	0,02a
Esteres etílicos	1,00a	1,00a	0,95a	0,93a
Ac. Hexanoico	2,70c	1,92a	1,75a	2,20b
Ac. Octanoico	3,73b	3,12b	1,96a	2,38b
Ac. Decanoico	0,80a	0,82a	0,46a	0,45a
Ácidos	7,23b	5,86ab	4,17a	5,03ab
1-hexanol	2,49a	2,34a	2,79b	2,25b
Cis-3-hexenol	0,05a	0,04a	0,07a	0,05a
Alcoholes C6	2,54a	2,38a	2,86a	2,30a

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas según Test de Duncan ($p > 95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; nd: no detectad

Tabla 9.18. Composición aromática (mg/L) 6 meses después del embotellado. Vinos de Monastrell, campaña 2009.

	T	NC	MPF	EC
Propanol	28,23ab	28,61ab	30,67b	25,10a
Isobutanol	60,74ab	57,11a	61,86b	60,27ab
Alcoholes amílicos	515,88b	496,37ab	483,53a	505,43ab
2-fenil-etanol	77,72a	98,21b	76,29a	85,12a
Alcoholes Superiores	682,58b	680,29b	652,35a	675,92b
Acetato Isoamilo	0,75b	0,61ab	0,48a	0,65ab
Acetato Hexilo	0,05a	0,08b	0,04a	0,05a
2-fenil-etil-acetato	0,12a	0,16a	0,41a	0,21a
Acetatos	0,92a	0,85a	0,93a	0,91a
Propionato de etilo	0,24a	0,26a	0,26a	0,28a
Etil-3-hidroxitirato	0,61bc	0,56ab	0,51a	0,66c
Isobutirato de etilo	0,39a	0,47a	0,50a	0,29a
Hexanoato de etilo	0,28b	0,20a	0,19a	0,26b
Octanoato de etilo	0,04a	0,05a	0,05a	0,08a
Esteres etílicos	1,56a	1,54a	1,51a	1,57a
Ac. Hexanoico	2,58b	2,05a	1,82a	2,59b
Ac. Octanoico	3,18ab	3,36ab	3,02a	4,59b
Ac. Decanoico	1,13a	1,02a	1,00a	0,99a
Ácidos	6,89ab	6,43a	5,84a	8,17b
1-hexanol	2,16a	2,12a	2,51b	2,18a
Cis-3-hexenol	0,05a	0,04a	0,06a	0,05a
Alcoholes C6	2,21a	2,16a	2,57b	2,23a

Letras diferentes en la misma fila muestras diferencias significativas según Test de Duncan ($p>95$) $n=3$. Abreviaturas: T: testigo; NC: nieve carbónica; MPF: maceración prefermentativa en frío; EC: enzima comercial; nd: no detectado.

10. BIBLIOGRAFÍA

Albanese, D.; Attanasio, G. y Cinquanta, L. (2012). Volatile Compounds in Red Wines Processed on an Industrial Scale by Short Pre-fermentative Cold Maceration. *Food Bioprocess Tech.*, 10.1007/s11947-012-0798-5.

Álvarez, I.; Aleixandre, J.L.; García, M.J. y Lizama, V. (2006). Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Anal. Chim. Acta*, **563**, (1-2 SPEC. ISS.), 109-115.

Andrades-Rodríguez, M.S. y González-San José, M.L. (1995). Influencia climática en la maduración de la uva: estudio de cultivares de La Rioja y Madrid. *ZUBÍA Monográfico*, Logroño, **7**, 79-102.

Amrani Joutei, K. y Glories, Y. (1995). Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Rev. Fr. Oenol.*, **153**, 28-31.

Amrani-Joutei, A.; Ouazzani Chandi, F.; Bouya, D.; Saucier, C. y Glories, Y. (2003). Examen en microscopie électronique de l'influence d'activités enzymatiques purifiées sur les parois cellulaires des pellicules des raisins. *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, **37**, 23-30.

Anocibar Beloqui, A. y Bertrand, A. (1995). Study on sulfur compounds in wine: preliminary results. *Ital. J. Food Sci.*, **3**, 279-289.

Anzaldúa- Morales, A. (1994). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. *Ed. Acribia, S.A*, Zaragoza, España.

Apolinar-Valiente, R. (2011). Pared celular de uva y polisacáridos de vinos de distinta procedencia, elaborados mediante tecnologías de frío y enzimáticas. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

Atenza Juárez, J. F.; Erena Arrabal, M. y Martínez Cutillas, A. (2008). Zonificación Vitícola de la variedad Monastrell en la denominación de origen Jumilla. *Servicio de Publicaciones y Difusión Científica de la ULPGC: Tecnologías de la Información Geográfica para el Desarrollo Territorial*, 1-10.

Bakker, J. y Timberlake, C.F. (1985). The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.*, **36**, 1315-1324.

Bibliografía

Bakker, J.; Picinelli, A. y Bridle, P. (1993). Model wine solutions: Colour and composition changes during ageing. *Vitis*, **32**, 111-118.

Barnavon, L.; Doco, T.; Terrier, N.; Ageorges, A.; Romieu, C. y Pellerin, P. (2000). Analysis of cell wall neutral sugar composition, α -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis Vinífera* grape berries. *Plant Physiol. Bioch.*, **38**, 289-300.

Bautista Ortín, B. (2005). Técnicas enológicas para la obtención de vinos de Monastrell de alto contenido polifenólico. *Tesis Doctoral*. Universidad de Murcia.

Bayonove, C.; Baumes, R.; Cruzet, J. y Günata, Z. (2000). Capítulo 5: Aromas. En *“Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos”*. AMV Ediciones, Madrid, España.

Bergqvist, J.; Dokoozlian, N. y Ebisuda, N. (2001). Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *Am. J. Enol. Vitic.*, **52**, 1-7.

Bertrand, A. (1981). Formation des substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualité du vin. *Colloque de la Société Française de Microbiologie*. Reims, 251-267.

Bogs, J.; Downey, M.; Harvey, J.; Ashton, A.; Tanner, G. y Robinson, S. (2005). Proanthocyanin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiol.*, **139**, 652-663.

Boido, E.; Lloret, A.; Medina, K.; Fariña, L.; Carrau, F.; Verdini, G. y Dellacasa E. (2003). Aroma composition of *Vitis Vinífera* cv Tannat: the typical red wine from Uruguay. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5408-5413.

Boulton, R. (1995). Red wines. En: *Fermented Beverage Production*, Lea, A. y Piggott, J. (Eds.), Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall, London, pp. 121-158.

Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **52**, 67-87.

Bureau, S.M.; Baumes, R.L. y Razungles, A.J. (2000a). Effects of vine or bunch shading on the glycosylated flavor precursors in grapes of *Vitis Vinífera* L.Cv Syrah. *J.Agric. Food Chem.*, **48**, 1290-1297.

Bureau, S.M.; Razungles, A.J. y Baumes, R.L. (2000b). The aroma of Muscat of Frontignan grapes: effect of the light environment of vine or bunch on volatiles and glycoconjugates. *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 2012.

Burin, V.M; Freitas-Costa, L.L.; Rosier, J.P y Bordignon-Luiz, M.T. (2011). Cabernet Sauvignon wines from two different clones, characterization and evolution during bottle ageing. *Food Sci. Technol.*, **44**, 1931-1938.

Busse-Valverde, N.; Gómez-Plaza, E.; López-Roca, J.M; Gil-Muñoz, R.; Fernández-Fernández, J.I. y Bautista-Ortín, A.B. (2010). Effect of different enological practices on skin and seed proanthocyanidins in three varietal wines. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 11333-11339.

Busse-Valverde, N. (2010). Efecto de la variedad y el método de elaboración en el contenido de proantocianidinas en vinos tintos de la D.O. Jumilla. Tesis de Licenciatura. Universidad de Murcia.

Busse-Valverde N.; Gómez-Plaza, E.; López-Roca, J.M., Gil-Muñoz, R. y Bautista-Ortín, A. (2011). The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique. *J. Agric. Food Chem.*, **59(10)**, 5450-5455.

Busse-Valverde, N. (2013). Proantocianidinas de las uvas y vinos de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

Cabaroghi, T. y Canbas, A. (2002). The effect of skin contact on the aromatic composition of the White wine of *Vitis Vinífera L.* cv Muscat of Alexandria grown in southern Anatolia. *Act. Al.*, **31**, I, 45-55.

Cacho, J.F. (2006). La percepción de notas aromáticas en el vino y el efecto de ciertas moléculas volátiles. *ACE, Revista de Enología*. 28.02.06.

Cacho, J.F.; Ferreira, V. y López, R. (2001). Moléculas de importancia sensorial. *www.percepnet.com*. **Nº0**, 16/07/01.

Capdebosq, V.; Leske, P. y Bruer, N. (1994). An evaluation of some winemaking characteristics of commercial pectic enzyme preparations. *Aus. N.Z. Grapegrow. Winemak.*, **366 A**, 146-150.

Cano-López, M.; Pardo-Mínguez, F.; López-Roca, J.M. y Gómez-Plaza, E. (2006). The effect of micro-oxygenation on the anthocyanins and derived pigments content and chromatic characteristics of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **57(3)**, 325-331.

Bibliografía

Cantos, E.; García-Viguera, C.; De Pascual-Teresa, S. y Tomás-Barberán, F.A. (2000). Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4606–4612.

Carnonneau, A.; Champagnol, F.; Deloire, A. y Sevilla, F. (2000). Capítulo 16: Vendimia y calidad de la uva. En *“Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos”*. AMV Ediciones, Madrid, España.

Casassa, F.; Avagnina, S.; Jofré, V.; Fanzone, M. y Catania, C. (2006). Influencia de dos técnicas de maceración sobre la composición polifenólica, aromática y las características organolépticas de vinos cv. Merlot. *X Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. Revista de Enología N° 12*, 308.

Casassa, F. y Sari, S. (2007). Aplicación del sistema Cie-Lab a los vinos tintos. Correlación con algunos parámetros tradicionales. *Revista Enología N° 5*, Mayo-Junio 2007, 1-15.

Casavecchia, C.; Magnisi, R.; LaPera, L.; Maisano, R. y Dugo, G. (2007). Classification of sicilian red wines from autochthonous and allochthonous cultivars according to anthocyanin pattern. *Am. J. Enol. Vitic.*, **58** (2), 286-290.

Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E. y Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol profile of *Vitis Vinífera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 992-1002.

Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; Garcia-Romero, E.; Gómez, M.V.; Velders, A.H. y Hermosín-Gutierrez, I. (2009). Flavonol-3-O-Glycosides series of *Vitis Vinífera* Cv. Petit Verdot red wines grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 209-219.

Castro-Vázquez, L.; Pérez-Coello, M.S. y Cabezudo, M.D. (2005). Effects of enzyme treatment and skin extraction on varietal volatiles in Spanish wines made from Chardonay, Muscat, Airén and Macabeo grapes. *Anal. Chim. Acta*, **458**, (1), 39-44.

Catania, S. y Avagnina, S. (2007). Implicaciones organolépticas de la fermentación maloláctica. Curso superior de degustación de vinos. EEA Mendoza. INTA

Cavalcanti, R. N.; Santos, D. T. y Meireles, M. A. A. (2011). Non thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems. An overview. *Food Res. Int.*, **44**, 499–509.

Cedrón-Fernández, M.T. (2004). Estudio analítico de compuestos volátiles en vino. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja.

Celotti, E. y Michelet, E. (2004). Récentes applications de la neige carbonique dans le traitement du raisin. *Rev. Oenol.*, **113**, 34-36.

Chatonnet, P.; Dubourdiou, D. ; Boidron, J.N. y Lavigne, V. (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agri.*, **62**, 191-202

Chatonnet, P.; Dubourdiou, D. y Boidron, J.N. (1995). The influence of *Brettanomyces dekkera* sp. Yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 463-468.

Chauvét, S.; Sudraud, P. y Jouan, J. (1986). La cryoextraction selective des moûts. Premières observations, perspectives. *Bull l'OIV*, **667-668**, 27-29.

Cheyrier, V.; Dueñas, M.; Salas, E.; Maury, C.; Souquet, J.; Sarni-Manchado, P. y Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.*, **57**, 298-305.

Chira, K.; Schmauch, G.; Saucier, C.; Fabre, S. y Teissedre, P.L. (2009). Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 545-553.

Chisholm, M.G.; Guiher, L.A. y Zaczekiewicz, S.M. (1995). Aroma characteristics of aged Vidal blanc wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 56-62.

Cholet, C. y Darné, G. (2004). Evolution of the contents in soluble phenolic compounds, in proanthocyanic tanins and in anthocyanins of shot grape berries of *Vitis Vinífera* L. during their development. *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, **38**, 171–180.

Chorti, E.; Guidoni, S.; Ferrandino, A. y Novello, V. (2010). Effect of different cluster sunlight exposure levels on ripening anthocyanin accumulation in Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **61**, 23–30.

Clare, S.; Skurray, G. y Theaud, L. (2002). Effect of a pectolytic enzyme on the colour of red wine. *Aus. N.Z. Grapetrow. Winemak.*, **456**, 29-35.

Cordonnier, R. (1977). L'arome des vins. *Rev. Fr. D'Oenol.*, **53**, 15-26.

Bibliografía

Cordonnier, R. y Bayonove, C. (1979). Composants variétales et prefermentaries de l'arome des vins. *R.F. OE.*, **74**, 79-90.

Cordonnier, R. y Bayonove, C. (1981). Etude de la phase préfermentaire de la vinification. Extraction et formation des certains composés de l'arome: cas des terpénoles, des aldehydes et des alcools en C6. *Conn. Vigne Vin.*, **15(4)**, 269-286.

Cortell, J.M. y Kennedy, J.A. (2006). Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis Vinifera* L.) Pinot Noir fruit and extraction in a model system. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8510-8520.

Cosme, F. ; Ricardo-da-Silva, J.M. y Laureano, O. (2009). Tannin profiles of *Vitis Vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chem.*, **112**, 197-204.

Couasnon, M.; (1999). Une nouvelle technique; la maceration prefermentaire à froid – extraction à la niege carbonique. Part I. *Rev Oenol Tech Vitic Oenol*, **92**, 26-30.

Cresy, A. (2001). El agua y la viña. *Viticultura y Enología Profesional*, **74**, 17-22.

Crouzet. J.; Flanzky, c.; Günata, Z.; Pellerin, P. y Sapis, J.C. (2000). Capítulo 10: Las enzimas en enología. En “*Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*”. AMV Ediciones, Madrid, España.

Cuénat, Ph.; Lorenzini, F.; Brégy, Ch. y Zufferey, E. (1996). La macération préfermentative a froid du Pinot Noir. Aspects technologiques et microbiologiques. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **28** (4), 259-265.

Darné, G. (1988). Evolution of different anthocyanins in the skins of Cabernet Sauvignon grapes during the development of berries. *Connaissance Vigne Vin*, **22**, 225-231.

Darné, G. y Glories, Y. (1998). Les anthocyanes des feuilles de différentes variétés de *Vitis Vinifera* L. entre la véraison des raisins et la chute des feuilles. *Vitis*, **27**, 71-78.

Darias-Martín, J.; Carrillo-López, M.; Echavarri-Granado. J.F. y Díaz-Romero, C. (2007). The magnitude of copigmentation in the colour of aged red wines made in the Canary Islands. *Eur. Food Res. Technol.*, **224**, 643–648.

De Freitas, V. y Mateus, N. (2011). Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new diverse class of anthocyanin derivates. *Anal. Bioanal. Chem.*, **401**, 1496-1473.

De la Roza, C.; Laca, A.; García, L.A.; Díaz, M. (2003). Ethanol and ethyl acetate production during cider fermentation from laboratory to industrial scale. *Pr. Biochem.*, **38**, 1451-1456.

Defranoux, C.; Geneys, D. y Joseph, P. (1989). Le potentiel aromatique du Chardonnay. Essai d'utilisation des techniques de cryoextraction et de supraextraction (procédé kreyer). *Rev. Oenol.*, **55**, 27-29.

Delteil, D. (2000). Effet d'une préparation enzymatique sur l'évolution du profil polyphénolique et sensoriel d'un vin rouge de Mourvèdre. 25ème Congrès Mondial de la Vigne et du Vin, OIV, Paris, France.

Delteil, D. (2004). La macération préfermentaire (MPF) des raisins méditerranéens et rhodaniens. *Rev. Oenol.*, **112**, 29-32.

Dey, P. M.; Brownleader, M. D.; Pantelides, A. T.; Trevan, M.; Smith, J. J. y Sandler, G. (1997). Extensin from suspension-cultured potato cells: a hydroxyproline-rich glycoprotein, devoid of agglutinin activity. *Plant Physiol.*, **202**, 179-187.

Di Profio, F.; Reynolds, A.G. y Kasimos, a. (2011). Canopy management and enzyme impacts on Merlot, Cabernet Franc and Cabernet Sauvignon. II. Wine composition and quality. *Am. J. Enol. Vitic.*, **62:2**, 152-168.

Downey, M. A.; Harvey, J. S. y Robinson, S. P. (2004). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **10**, 55-73.

Downey, M. A.; Harvey, J. S. y Robinson, S. (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **9**, 15-27.

Ducasse, M.A.; Canal-Llauberes, R.M.; De-Lumleyc, M.; Williams, P.; Souqueta, J.M.; Fulcranda, H.; Docoa, T. y Cheynier, V. (2010). Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chem*, **118**, 369-376.

Du Plessis, C.S. (1983). Influence de la température d'élaboration et de conservation sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des vins. *Bull. OIV*, n° **624**, 105-115.

Edwards, C.G.; Beelman, R.B.; Bartley, C. y McConnel, A. (1990). Production of decanoic acid and other volatile compound ant the growth of yeast and malolatic bacteria during winemaking. *J. Agric. Food Chem*, **41**. 2092-2096.

Bibliografía

Escudero, A.; Campo, E.; Fariña, L.; Cacho, J. y Ferreira, V. (2007). Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wine. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 4501-4510.

Esteban, M. A.; Villanueva, M. J. y Lissarrague, J. R. (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*Vitis Vinífera* L.) grape berries during ripening. *J. Sci. Food Agric.*, **81**, 409-42

Esti, M. y Tamborra, P. (2006). Influence of winemaking techniques on aroma precursors. *Anal. Chim. Acta*, **563**, (1-2 SPEC. ISS), 173-179.

Etiévant, P.X.; Isanchou, S.N.; Marie, S.; Ducruet, V. y Flanzy, C- (1989), Sensory impact of volatile phenols on red wine aroma. Influence of carbonic maceration and time storage". *Sci. Aliments*, **9**, 19-33.

Etiévant, P.X. (1991). Volatile compounds in foods and beverages. Ed. H. Maarse, Marcel Dekker, Nueva York.

Enzel, C. (1985). Degradation of carotenoids-an important route to aroma compounds. *Pure Appl. Chem.*, **57(5)**, 693-700.

Fang, F.; Li, J.M; Zhang, P.; Tang, K. ; Wang, W. ; Pan, Q.H. y Huang, W.D. (2008). Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines. *Food Res. Inter.*, **4**, 53-60.

Fanzone, M.; Zamora, F.; Jofré, V.; Assof, M.; Gómez-Cordovés, C. y Peña-Neira, A. (2012). Phenolic characterisation of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). *J. Sci. Food Agric.*, **92**, 704-718.

Fenoll, J.; Manso, A.; Hellín, P.; Ruiz, L. y Flores, P. (2009). Changes in the aromatic composition of the *Vitis Vinífera* grape Muscat Hamburg during ripening. *Food Chem.*, **114**, 420-428.

Fernández-López, J. A.; Almela, L.; Lopez-Roca, J. M. (1995). Studies on the anthocyanins makeup in the Monastrell grape variety. *An. Quim. Int.* Edition **91**, 380-387.

Fernández-López, J. A.; Almela, L.; Muñoz, J. A.; Hidalgo, V.; Carreño, J. (1998). Dependence between colour and individual anthocyanin content in ripening grapes. *Food Res. Int.*, **31**, 667-672.

Ferreira, V. (2007). La base química del aroma del vino: un viaje analítico desde las moléculas hasta las sensaciones olfato-gustativas. *Rev. Real Academia de Ciencias. Zaragoza*, **62**, 7-36.

Ferreira, V.; Fernández, P.; Gracia, J.P y Cacho, J.P. (1995). Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *J. Sci. Food Agric.*, **67**, 381-392.

Ferreira, V.; López, R. y Cacho, J. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1659-1667.

Figuereido-González, M.; Simal-Gándara, J.; Boso, S.; Martínez, M.C.; Santiago, J.L. y Cancho-Grande, B. (2012). Anthocyanins and flavonols berries from *Vitis Vinífera* L. cv. Brancellao separately collected from two different positions within the cluster. *Food Chem.*, **135**, 47-56.

Flint, S.D.; Jordan, P.W. y Caldewell, M.M. (1985). Plant protective response to enhanced UV-B radiation under field conditions: leaf optical properties and photosynthesis. *Photochem. Photobiol.*, **41**, 95-99.

Fournand, D.; Vicens, A.; Sihoum, L.; Souquet, J. ; Moutounetn M. y Cheynier, V. (2006). Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological states. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 7331-7338.

Francis, I.L. y Newton, J.L. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **11**, 114-116.

Fregoni, M. (1977). Effects of the soil and water on the harvest. *1º Int. Symp. On quality of the vintage*. Ciudad del Cabo.

Fregoni, M. (1998). La zonazione viticola della Collina cesenate. *Vignevini*, **1/2**, 39-57

Fry, S.C. (1995). Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **46**, 497-520.

Fulcrand, H.; Benabdeljalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V. Y Moutounet, M. (1998). A new class of wine pigments generated by reaction between piruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochem.*, **47**, 1401-1407.

Fulcrand, H.; Dueñas, M.; Salas, E. y Cheynier, V. (2006). Phenolics reactions during winemaking and aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, **57 (3)**, 289-297.

Bibliografía

García-Beneytez, E.; Revilla, E. y Cabello, F. (2002). Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *Eu. Food Res. Technol.*, **215**, 32-37.

Garde-Cerdán, T.; Torrea-Goñi, D. y Ancín-Azpilicueta, C. (2004). Accumulation of volatile compounds during ageing of two red wines with different composition. *J. Food Eng.*, **65**, 349-356.

Garijo-Alonso, J. (2001). Influencia de las condiciones y tratamientos en la maceración a baja temperatura sobre la calidad de vinos rosados de Monastrell. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha.

Genovesse, A.; Dimaggio, R.; Lisanti, M.T.; Piombino, P. y Moio, L. (2005). Aroma composition of red wines by different extraction methods and gas chromatography-SIM/MASS spectrometry analysis. *Ann Chim.*, **95**(6), 383-394.

Gerbaux, V.; Vincent, B. y Bertrand, A. (2002). Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot Noir wines. *Am. J. Enol. Viticult.*, **53**, 131-137.

Gil-Muñoz, R.; Gómez-Plaza, E.; Martínez, A. y López-Roca, J.M. (1999). Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and postfermentation: influence of grape temperature. *J. Food Comp. Anal.*, **12**, 259-272.

Gil-Muñoz, R.; Hernández-Jiménez, A.; López-Roca, J.M.; Martínez-Cutillas, A. y Gómez-Plaza, E. (2007). Efecto de diferentes enzimas de maceración sobre el color de vinos de Syrah, Monastrell y Cabernet Sauvignon. *XXX Congreso de la OIV*, Budapest.

Gil-Muñoz, R.; Moreno-Pérez, A.; Vila-López, R.; Fernández-Fernández, J.I.; Martínez-Cutillas, A. y Gómez-Plaza, E. (2008). Influence of low temperature techniques on chromatic and phenolic characteristics of Syrah and Cabernet Sauvignon wines. *Eur. Food Res. Technol.*, **228**, 777-788.

Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2ème partie. Mesure, origine et interpretation. *Connaissance Vigne Vin*, **18**, 253-271.

Glories, Y. (1999). La maturità fenólica delle uve: primo parámetro da controlare per una corretta vinificazione in rosso. *Vignevini*, **3**, 46-50.

Glories, Y. y Saucier, C. (2000). Tannin evolution from grape to wine. Effects on wine taste. *The ASEV 50th Anniversary Annual Meeting*, Rautz, J. (Ed.), ASEV, Davis, CA, pp. 353-355.

Gómez, E.; Laencina, J. y Martínez, A. (1994). Vinification effects on changes in volatile compounds of wine. *J. Food Sci.*, 59, 406-409.

Gómez, M.; Heredia, F. (2004). Effect of the maceration technique on the relationships between anthocyanin composition and objective color Syrah wines. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5117-5123.

Gómez-Gallego, M.A.; Gómez-García Carpenter, E.; Sánchez-Palomo, E.; González-Viñas, M.A. y Hermosín-Gutierrez, I. (2012a). Effect of co-winemaking in phenolic composition, color and antioxidant capacity of young red wines from Castilla-La Mancha region. *Eur Food Res Technol.*, **235**, 155-167.

Gómez-Gallego, M.A.; Gómez-García Carpintero, E.; Sánchez-Palomo, E.; González-Viñas, M.A. y Hermosín-Gutiérrez, I. (2012b). Oenological potential, phenolic composition, chromatic characteristics and antioxidant activity of red singular-cultivar wines from Castilla-La Mancha. *Food Res. Int.*, **48**, 7-15.

Gómez-Miguel, V.D. (2003). Zonificación del Terroir en la D.O. Ribera del Duero. *Seminario: "Zonificación del cultivo de la vid, terroir-terruño y potencial de cosecha"*, Montevideo.

Gómez-Mínguez, M.; González-Miret, M.L. y Heredia, F.J: (2006). Evolution of color and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *J. Food Eng.*, **79(1)**, 271-278.

Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; Carreño-Espín, J.; Fernández-López, J.A.; y Martínez-Cutillas, A. (1999). Investigation on the aroma of wines from seven clones of Monastrell grapes. *Eur. Food Research Technol.*, **209**, 257-260.

Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J.M.; Martínez-Cutillas, A. y Fernández-Fernández, J.I. (2001). Phenolic Compounds and Color Stability of Red Wines: Effect of Skin Maceration Time. *Am. J. Enol. Vitic.*, **52:3**, 266-270.

González-Neves. G.; Gómez-Cordovés, C. y Barreiro, L. (2001). Anthocyanin composition of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot young red wines from Uruguay. *J. Wines Res.*, **12**,125-133.

González-Neves, G.; Gil, G.; Ferrer, M. (2002). Effect of different vineyard treatments on the phenolic contents in Tannat (*Vitis Vinífera L.*) grapes and their respective wines. *Food Sci. Technol. Int.* **8**, 315-321.

Bibliografía

González-Neves, G.; Ferrer, M.; Carbonneau, A y Moutounet, M. (2003). Adaptación de la vinificación en tinto en función del potencial fenólico de los vinos. *Agrociencia*, Vol. II, **1**, 59-67.

González-Neves, G.; Gil, G.; Ferrer, M.; Charamelo, D.; Balado, J.; Bochicchio, R.; Gatto, G. y Tessore, A. (2010a). Prediction of the color and polyphenolic composition of the young red wines from the phenolic potential of the grapes. *Int.J. Food Sci, Tech.*, **(45)9**, 1843-1851.

González-Neves, G.; Ferrer, M.; Gil, G.; Charamelo, D.; Balado, J.; Bochicchio, R.; Gatto, G. y Tessore, A. (2010b). Estudio plurianual del potencial polifenólico de uvas Tannat en el sur de Uruguay. *Agrociencia*, **14(2)**, 10-21.

González-Neves, G.; Gil, G.; Favre, G. y Ferrer, M. (2011). Phenolic potential of grapes: proposal indexes and utilities. *Comunicata Scientiae*, **2(2)**, 57-69.

González, J. L.; Hernández, M. A.; Díaz, E. y Darias, J. (2001). Evolución de los caracteres madurativos de las variedades tintas Listán Negro y Negramole. *Viticultura y Enología Profesional*, **76**, 27-37.

Gordillo, B.; López-Infante, M.I.; Ramírez-Pérez, P.; González-Miret, M.L. y Heredia, F.J. (2010). Influence of prefermentative cold maceration on the colour and anthocyanic copigmentation of organic Tempranillo wines elaborated in a warm climate. *J. Agric. Food Chem.*, **58 (11)**, 6797-6803.

Guidoni, S.; Allara, P. y Schubert, A. (2002). Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis Vinifera* cv Nebbiolo. *Am. J. Enol. Vitic.*, **53**, 224-226.

Guilloux, M. (1981). Evolution des composés phénoliques de la grappe pendant la maturation du raisin. Influence des facteurs naturels. Tesis Doctoral. Universidad de Burdeos.

Günata, Z.; Bitteur, S.; Brillouet, J.M.; Bayonove, C. y Cordonnier, R. (1988). Sequential enzymatic hydrolysis of potential aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.*, **184**, 139-149.

Gürbüz, O.; Rousself, J.M. y Rousself, R.L. (2006). Comparison of aroma volatiles in commercial Merlot and Cabernet Sauvignon wines using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **54(2)**, 3990-3996.

Gutiérrez, I.H.; Lorenzo, E.S.P. y Espinosa, A.V. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars Cabernet Sauvignon, Cencibel and Syrah. *Food Chem.*, **92**,269-283.

Hadley, K.; Orlandi, R. Y Fong, K. (2004). Basic anatomy and physiology of olfaction and taste. *Otolaryngol. Clin. N. Am.*, **37**, 1115-1126.

Hancock, J. M. (2005). Geology of wine. En: The Encyclopaedia of Geology Volume III. Selley, R. C. Cocks, L. R. M.; Plimer, I. R. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 85-90.

Hanlin, R.L.; Downey, M.O. (2009). Condensed tannin accumulation and composition in skin of Shiraz and Cabernet Sauvignon grapes during berry development. *Am. J. Enol. Vitic.*, **60**, 13-23.

Harbetson, J.K.; Hodgins, R.E.; Thurson, L.N.; Schaffer, L.J.; Reid, M.S.; Landon, J.S.; Ross, C.F. y Adams, D.O. (2008). Variability of tannin concentration in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **59**, 210-214.

Harbetson, J.K.; Parpinello, G.P.; Heymann, H. y Downey, M.O. (2012). Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. *Food Chem.*, **131**, 999–1008.

Heatherbell, D.; Dicey, M.; Goldsworthy, S. y Vanhaben, L. (1997). Effect of the prefermentation cold maceration on the composition, colour and flavour of Pinot Noir Wine. En: *Proceedings of the IV International Symposium on cool climate enology and viticulture, Genova. Communication Services*, **VI**, 10-17.

Heredia, F.J.; Escudero-Gilete, M.L.; Hernanz, D.; Gordillo, B.; Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M. y González-Miret, M.L. (2009). Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of Syrah red wines obtained by prefermentative cold maceration. *Food Chem.*, **118(2)**, 377-383.

Herjavec, S.; Jeromel, A.; Prusina, T. y Maslov, L. (2008). Effect of cold maceration time on Āzilavka wines composition. *J. of Central Eur. Agric.*, **9(3)**, 505-510.

Hermosín-Gutiérrez, I. y García-Romero, E. (2004) Antocianos de variedades tintas cultivadas en la Mancha: perfiles varietales característicos de la uva y de los vinos monovarietales y evolución durante la maduración de la baya. *Alimentaria*, **352**, 127–139

Bibliografía

Hermosín-Gutiérrez, I.; García-Romero, E.; Gómez-Alonso, S. y Quintanar-Lara, A. (2005). Flavonols from La Mancha varietal red wines: Content, evolution during ageing, and usefulness as varietal differentiation tool. *Presented at Euro Food Chem XIII*, pp 21-23.

Hermosín Gutiérrez, I.; Sánchez-Palomo Lorenzo, E. y Vicario Espinosa, A. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivar Cabernet Sauvignon, Cencibel and Syrah. *Food Chem.*, **92**, 269-283.

Hernández-Jiménez, A.; Gómez-Plaza, E.; López-Roca, J.M. y Bautista-Ortín, A.B. (2009). Determinación de antocianos y flavonoles en uvas por HPLC utilizando una nueva columna de fase reversa con grupos básicos de intercambio iónico. Nuevos horizontes en la Viticultura y Enología, *X Congreso Nacional de Investigación Enológica*, Ourense

Hernández-Jiménez, A.; Gómez-Plaza, E.; Martínez-Cutillas, A. y Kennedy, J.A. (2009). Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell x Syrah grape. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 10798-10803.

Hernández-Jiménez, A.; Kennedy, J.A.; Bautista-Ortín, A. y Gómez-Plaza, E. (2011). Effect of ethanol on grape seed proanthocyanidin extraction. *Am. J. Enol. Vitic.*, **63**, 57-61.

Hernández-Orte, P.; Cersosimo, M.; Loscos, N.; Cacho, J.; García-Moruno, E. y Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chem.* **107**, 1064-1077.

Hernández-Orte, P.; Ibarz, M.J.; Cacho, J. y Ferreira, V. (2005). Effect of the addition of ammonium and amino acids to most of Airén variety on aromatic composition and sensorial properties of the obtained wine. *Food Chem.* **89**, 163-174.

Hidalgo, L. (1980). Caracterización microfísica del ecosistema medio-planta en los viñedos españoles. *Comun. INIA Ser. Producción Vegetal*, **29**, 255.

Hiratsuka, S.; Onodera, H.; Kawai, Y.; Kubo, T.; Itoh, H. y Wada, R. (2001). Enzyme activity changes during anthocyanins synthesis in 'Olympia' grape berries. *Scientia Horticulturae*, **90**, 255-264.

Holzapfel, B. P. y Treeby, M. T. (2007). Effects of timing and rate of N supply on leaf nitrogen status, grape yield and juice composition from Shiraz grapevines grafted to one of the three different rootstocks. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **13**, 14-22.

Huglin, P. (1978): Nouveau mode d'évaluation des possibilités héliothermiques d'un milieu viticole. *C.R. Acad. Agric. France*, 1116-1127.

Iriti, M. y Faoro, F. (2006). Grape phytochemicals: a bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Med Hypoth.*, **67**, 833-838.

Ishimaru, M. y Kobayashi, S. (2002). Expression of a xyloglucan endotransglycosylase gene is closely related to grape berry softening. *Plant Science*, **162**, 621-628.

Jackson, D.I. y Lombard, P.B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality- a review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 409-430.

Jiang, B. y Zhang, Z. (2010). Volatile Compounds of Young Wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischt and Chardonnay Varieties Grown in the Loess Plateau Region of China. *Molecules*, **15**, 9184-9196;

Kalua, C.M. y Boss, P.K. (2010). Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis Vinífera* L.) from fruitset to harvest. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **16**, 337-348.

Kassara, S. y Kennedy, J.A. (2011). Relationship between Red Wine Grade and Phenolics. 2. Tannin Composition and Size. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 8409–8412.

Kechagia, D.; Paraskevopoulos, Y.; Symeou, E.; Galiotou-Panayotou, M. y Kotseridis, Y. (2008). Influence of prefermentative treatments to the mayor volatile compounds of Assyrtiko wines. *J. Agric. Food Chem*, **56**, 4555-4563.

Kennedy, J. A.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E. J. y Jones, G. P. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5348-5.

Kennedy, J.A. y Taylor, A.W. (2003). Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. *J. Chrom A.*, **995**, 99-107.

Kliewer, W. M. y Torres, R. E. (1972). Effect of controlled day and night temperatures on grape coloration. *Am. J. Enol. Vitic.*, **23**, 71-77.

Kountoundakis, N.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J. y Zamora, F. (2010). Comparison of methods for estimating phenolic maturity in grapes: correlation between predicted and obtained parameters. *Anal. Chim. Acta*, **660**, 127-133.

Bibliografía

Kountoundakis, N.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J.M. ; De Freitas, V. y Zamora, F. (2011). Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chem.*, **124**, 767-774.

Kountoundakis, N. (2010). Grape phenolic maturity; Determination methods and consequences on wine phenolic composition. Tesis Doctoral. Universitat Rovira I Virgili.

Kountoundakis, N.; Canals, R.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canal, J.M. y Zamora, F. (2009). Maceración prefermentativa en frío. Aspectos tecnológicos en la elaboración de vinos de crianza. *ACE Revista de enología*. www.acenologia.com.

Koundouras, S.; Van.Leeuwen, C.; Seguin, C. y Glories, Y. (1999). Influence de l'alimentation en eau sur la croissance de la vigne, la maturation des raisins et les caractéristiques des vins en zone méditerranéenne. *J. Internat. Vigne Vin*, **33**, 149-160.

Koyama, K.; Goto-Yamamoto, N. y Hashizume, K. (2007). Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from Berry skins and seeds of grape (*Vitis Vinifera*). *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 363-367.

Koyama, K.; Ikeda, H.; Puodel, P.R. y Goto-Yamamoto, N. (2012). Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape. *Phytochem.*, **78**, 54-64.

Labarbe, B.; Cheynier, V.; Brossand, F.; Souquet, J. y Moutounet, M. (1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2719-2723.

Lamadon, F. (1995). Protocole pour l'évaluation de la richesse polyphénolique des raisins. *Rev. Oenol.*, **76**, 37-38.

Lambrecht, M.G. y Pretorius, I.S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma-A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **21**, 97-129.

Lasanta-Melero, C. (2009). Estudio y aplicación de nuevos procesos para la mejora de la elaboración de vinos tintos en zonas de clima cálido. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.

Lau, J. M.; McNeil, M.; Darvill, A. G. y Albersheim, P. (1985). Structure of the backbone of rhamnogalacturonano I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydr. Res.*, **137**, 111-125.

- Lazan, H.; Kasim, S. y Mhod Ali, Z. (1995). Galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. *Physiol. Plantarum*, **95**,106-112.
- Le Berre, E.; Atanasova, B.; Langlois, D.; Etievant, P. y Thomas-Danguin, T. (2007). Impact of ethanol on the perception of wine odorant mixtures. *Food Qual. Prefer.*, **18**, 901-908.
- Lee, S.J.; Rathbone, D.; Asimont, S.; Adden, R. y Ebeler, S.E. (2004). Dynamic changes in ester formation during Chardonay juice fermentations with different yeast inoculation and initial brix conditions. *Am. J. Enol. Vitic.*, **55**, 346-354.
- Levengood, J. y Boulton, R. (2004). The variation in the color due to copigmentation in young Cabernet Sauvignon wines. In: *Red wine color. Revealing the mysteries*. Waterhouse, A.; Kennedy, J. (Eds), American Chemical Society, Washington DC, pp. 35-52.
- Liu, S. Q. y Pilone, G. J. (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Int. J. Food Sci, Tech.*, **35**, 49-61.
- Llaudy, M.C.; Canals, R.; Cabanillas, P.; Canals, J.; Zamora, F. (2005). La maceración prefermentativa en frío. Efectos en la extracción de color y los compuestos fenólicos e influencia del nivel de maduración de la uva. *ACE Revista de Enología*, www.acenologia.com/ciencia72_2htm.
- Llaudy, M.C.; Canals, R.; Canals, M.J. y Zamora, F. (2008). Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds, and stems to phenolic composition and astringency in wine simulated macerations. *Eur. Food Res. Technol.*, **226**, 337-344.
- López, R. (1999). El aroma del vino tinto joven. Caracterización química y métodos de análisis de sus principales odorantes. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Lorrain; B.; Chira, C. y Teissedre, P.L. (2011). Phenolic composition of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009 vintages: Comparison to 2006, 2007 and vintages. *Food Chem.*, **126**, 1991-1999.
- Lubbers, S.; Verret, C. y Volley, A. (2001). The effect of glycerol on the perceived aroma of a model wine and a white wine. *Lebensm Wiss Technol.*, **34**, 262-265.
- Makris, D.P.; Kallithraka, S. y Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *J. Food Comp. Anal.*, **19**, 396-404.

Bibliografía

- Mallet, C.P. (1994). Tecnología de los alimentos congelados. AMV Ediciones, Madrid.
- Mallouchos, A.; Skandamis, P.; Loukatos, M.; Koutinas, A. y Kanellaki, M. (2003). Volatile compounds of wine produced by cells immobilized on grape skins. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3060-3066.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. y Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **79**(5), 727-747.
- Martínez, J.; Bilbao, A.; Suberviola, J. y Aznárez, J. (1998). Evolución de la composición aromática de los vinos de Tempranillo durante el proceso de envejecimiento. *IV Congreso Nacional de Enólogos*, 141-148.
- Martínez, J.A.; Melgosa, M.; Pérez, M.; Hita, E. y Negeruela, A. (2001). Note: Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Sci. Technol Int.*, **7**(5), 439-444.
- Martínez-Pinilla, O.; Martínez-Lapuente, L.; Guadalupe, Z. y Avestarán, B. (2012). Sensory profiling and changes in color and phenolic composition produced by malolactic fermentation in red minority varieties. *Food Res. Int.*, **46**, 286–293.
- Mateus, N.; Proença, S.; Ribeiro, P.; Machado, J. M. y De Freitas, V. (2001). Grape and wine polyphenolic composition of red Vitis Vinífera varieties concerning vineyard altitude. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, **3**, 102-110.
- Mateus, N.; Oliveira, J.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C. y De Freitas, V. (2005). Screening in Portisins (vinylpyranoanthocyanin pigments) in Port wine by LC/DAD-MS. *Food Sci. Tech. Int.*, **11**, 353-358.
- Mattivi, F. (2006). Gli indici di maturazione delle uve e la loro importanza. *Quaderni di Viticoltura ed Enologia della Università di Torino*, **28**, 27-40.
- Mattivi, F.; Guzzon, R.; Vrhovsek, U.; Stefanini, M. y Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 7692–7702.
- Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Masuero, D. y Trainotti, D. (2009). Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **15**, 27-35.

- Matsuda, Y.; Saito, T.; Yamaguchi, T. t Kawase, H. (1985). Cell wall lytic enzyme released by mating gametes of *Chlamydomonas reinhardtii* is a metalloprotease and digests the sodium perchlorate-insoluble component of cell wall. *J. Biol. Chem.*, **260**, 6373-6377.
- Matus, J. T.; Loyola, R.; Vega, A.; Pena-Neira, A.; Bordeu, E.; Arce-Johnson, P., et al. (2009). Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis Vinífera*. *J. Exp. Bot.*, **60**, 853–867.
- Maze, G.; Fukumoto, L.; Delaquis, P.; Girard, B. y Evert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics and color of Cabernet Franc, Merlot and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4009-4017.
- Meriaux, S. (1982). La vigne et l'eau dans le Midi Méditerranée. *Vignes et vins*, 23-26.
- Mesías, J.L. (1981). Contribución al estudio de la composición aromática de uvas y mostos de fermentación de Tierra de Barros. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. España.
- Mingxia, Z.; Wenjun, Q.U.; Hao, Z.; Fuliang, H. y Changqing, D. (2007). Effect of maceration enzymes on the formation of aroma compounds during Cabernet Sauvignon alcohol fermentation. *Agro. Food Ind. Hi-Tech.*, **18(3)**, 5-7.
- Mohd Ali, Z.; Armugam, S. y Lazan, H. (1995). *Galactosidase and its significance in ripening mang fruit*. *Phytochem.*, **38**, 1109-1114.
- Moio, L.; Chambellant, E.; Lesschaeue, I.; Issanchau, S.; Schilch, P. y Etiévant, P.X. (1995). Aroma composition of wine. *Ital. Food Sci.*, **3**, 265-270.
- Monagas, M. Bartolomé, B. (2009). Anthocyanins and anthocyanin-derived compounds. En M. V. Moreno-Arribas, & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York, NY: Springer Science and Business Media. pp. **529–570**.
- Monagas, M.; Nuñez, V.; Bartolomé, B. y Gómez-Cordovés, M.C. (2003). Anthocyanin derived pigments in Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon wines produced in Spain. *Am. J. Enol. Vitic.*, **54**, 163-169.
- Morata, A.; Calderón, F.; González, M. C.; Colomo, B. y Suárez, J. A. (2004). Influencia de las levaduras en el color de los vinos. *X Congreso Nacional de Enólogos*, Valencia.

Bibliografía

Moreno-Pérez, A.; Fernández-Fernández, J.I.; Martínez-Cutillas, A., Vila-López, R. y Gil-Muñoz, R. (2010). Effect of selected enzymes over chromatic parameters during maceration period in Syrah and Cabernet Sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* , Special issue Macrowine, June 2010, 41-50.

Moreno-Pérez, A.; Vila-López, R.; Fernández-Fernández, J.I.; Martínez-Cutillas, A. y Gil-Muñoz, R. (2013). Influence of cold pre-fermentation treatments on the mayor volatile compounds of three wine varieties. *Food Chem.*, **139(1-4)**, 770-776.

Morro-Urda, V. (2009). Estudio comparativo de los compuestos volátiles de vinos de tempranillo sometidos a maceración prefermentativa en frío. Tesis de Máster. Universidad de Valencia. Esparza, MJ.Dir.17p.

Mulero, J.; Zafrilla, P.; Cayuela, J.M.; Martínez-Cachá, A. y Pardo, F. (2011). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Organic Red Wine Using Different Winemaking Techniques. *J. Food Sci.*, **76(3)**, C436-C440.

Murrey, K.E. y Whitfield, F.B. (1975). The occurrence of 3-alkyl-2-metoxypyrazines in new vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, 26, 973-986.

Nagel, C.W. y Wulf, L.W. (1979). Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**,111-116.

Nel. A.P. (2010). The influence of different winemaking techniques on the extraction of grape tannins. Thesis of Master of Agriculture Science. Stellenbosch University.

Noble, A.C.; Arnol, R.A.; Buechsenstein, J.; Leach, E.J.; Schmidt, J.O. y Stern, P.M. (1987). Modification of a Standardized System of Wine Aroma Terminology. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 2, 143-146.

Nuñez, V.; Monagas, M; Gómez-Cordovés, M.C y Bartolome, B. (2004). *Vitis Vinífera* L. c.v. graciosos grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biol. Technol.*, **31**, 69-79.

Nykänen, L. (1986). Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, 84-96.

Ojeda, H. (2007). Los compuestos fenólicos de la uva. *Revista Enológica*, **Año IV**, Septiembre-Octubre. Argentina.

Okubo, K.; Goto-Yamamoto, N. and Okazaki, N. (2003). Effect of prefermentation cold soak on extraction of anthocyanin during red wine making. *J. Brew. Soc. Japan*. **98**,193-200.

Oliva, J.; Azorín, P.; Cámara, M. A. y Barba, A. (2001). Incidencia de la adición de distintos taninos enológicos en el color de vinos tintos de Monastrell. *Alimentación, equipos y tecnología.*, **156**, 87-92.

Oliva, J.; Zalacaín, A.; Payá, P.; Salinas, M.R y Barba, A. (2008). Effect of the use of recent commercial fungicides (under good and critical agricultural practices) on the aroma composition of Monastrell red wines. *Anal. Chim. Acta*, **617**, 107-118.

Oliveira, C.; Ferreira, A.C.; Costa, P. y Guerra, J. (2004). Effect of some viticultural parameters on the grape carotenoid profile. *J. Agric. Food Chem.*, **52 (13)**, 4178-4184

Ordoñez, J.A. (1998).Tecnología de los alimentos Vol. I. Componentes de los alimentos y procesos. Ed. Síntesis S.A., Madrid.

Ortega, C.; López, R.; Cacho y J.; Ferriera, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionization detection analysis of dichloromethane microextracts. *J. Chromat A.*, **923**, 205-214.

Ortega-Heras, M.; González-San José, M.L. y Beltrán, S. (2002). Aroma composition on wine studied by different extraction methods. *Anal. Chim. Acta*, **458**, 85-93.

Ortega-Heras, M.; González-San José, M.L y González-Huerta, C. (2007). Consideration of the influence of ageing process, type of wine and oenological classic parameters on the level of Wood volatile compounds present in red wines. *Food Chem.*, **103**, 1434-1448.

Ortega-Heras, M.; Pérez-Magariño, S.; Mihnea, M.; Rivero-Pérez, M.D. y González-San José M.L. (2009). Técnicas de maceración pre-fermentativa y perfil aromático de vinos tintos. En: "Nuevos Horizontes en la Viticultura y Enología". Servicio de Publicaciones de la Universidad de Vigo. Colección Congresos 63, **TE-20**, 379-382.

Ortega-Regules, A.E. (2006). Antocianos, taninos y composición de la pared celular en distintas variedades de uva. Evolución durante la maduración e implicaciones tecnológicas. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.

Bibliografía

- Ortega-Regules, A. E.; Romero-Cascales, I.; López-Roca, J. M.; Ros-García, J. M.; Gómez-Plaza, E. (2006). Anthocyanin fingerprint of grapes: environmental and genetic variations. *J. Sci. Food Agric.*, **86**, 1460-1467.
- Ortega-Regules, A.; Ros-García, J.M.; Bautista-Ortín, B.; López-Roca, J.M. y Gómez-Plaza, E. (2008). Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis Vinífera* L.): technological implications. *Eur. Food Res. Technol.*, **227**, 223-231.
- Palacios, A.; Santiago, L. y Guerrand, D. (2003). Utilización de enzimas de maceración en vinificación en tinto. *Wine Internet Technical Journal*.
<http://www.haro.org/ingles/pdf/cursoharoantonio.pdf>.
- Pardo, F.; Salinas, R.; Alonso, G.; Navarro, G. y Huerta, M. D. (1999). Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. *Food Chem.*, **67**, 135-142.
- Parenti, A.; Spugnoli, P.; Calamai, L.; Ferrari, S. y Gori, C. (2004). Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *Eur. Food Res. Technol.*, **218 (4)**, 360-366.
- Pastor del Río, J.L. and Kennedy, J.A. (2006). Development of proanthocyanidins in *Vitis Vinífera* L. cv. Pinot Noir grapes and extraction into wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **57**, 125-132.
- Pellerin, P. y Brillouet, J. M. (1994). Purification and properties of an exo- β -(1 \rightarrow 3)-D-galactanase from *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.*, **264**, 281-291.
- Pérez-Magariño, S. y González-San José, M. L. (2004). Evolution of flavanols, anthocyanins and their derivatives during the aging of red wines, elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1181-1189.
- Petrozziello, M.; Guaita, S.M.; Panero, L. y Bosso, A. (2011). Analytical and sensory characterization of the aroma of “Langhe D.O.C. Nebbiolo” wines: influence of the prefermentative cold maceration with dry ice. *J. Food Sci.* **76 (4)**, 525-534.
- Pieri, P. y Fermaud, M. (2005). Effects of defoliation on temperature and wetness of grapevine berries. *Acta Horticulturae*, **689**, 109-116.
- Piñeiro, Z.; Natera, R.; Castro, R.; Palma, M.; Puertas, B. y Barroso, C.G. (2006) Characterization of volatile fraction of monovarietal wines: influence of winemaking practices. *Anal. Chim. Acta*, **563**, 165-172.

Plata, C.; Mauricio, J.C.; Milla, C. y Ortega, J.M. (2005). Influence of glucose and oxygen on the production of ethyl acetate and isoamil acetate by a *Saccharomyces cerevisiae* strain during alcoholic fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 115-121.

Pogorzelski, E. y Wilkowska, A. (2007). Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: A review. *Flavour Fra. J.*, **22**, 251-254.

Pomar, F.; Novo, M. y Masa, A. (2005). Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *J. Chromat A.*, **1094**, 34–41.

Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V. y Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochem.*, **36**, 781-784.

Razungles, A.: Bayanove, C. (2000). Les carotenoides du raisin et leur potentialité aromatique. *J. Inter. Vigne Vin.* 85-88

Rentzsch, M.; Schwarz, M.; Winterhalter, P. y Hermosin-Gutierrez, I. (2007). Formation of hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Grenache wines: precursor levels and evolution during aging. *J Agric Food Chem*, **55**,4883–4888.

Revilla, I.y González- San José, M. L. (2002). Efecto de la aplicación de enzimas pectinolíticas sobre la calidad del vino tinto. *Tecnología del Vino*, **6**, 71-78.

Reyero, J. R.; Garijo, J.; Pardo, F. y Salinas, M. R. (1999). Influencia del riego excesivo en la producción y en el contenido polifenólico de diferentes variedades viníferas. *Enólogos*, **3**, 17-21.

Reynolds, A., Cliff, M.; Girard, B. y Kopp, T.G. (2001). Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **52**, 235-240.

Ribéreau-Gayon, P. (1974). The chemistry of red wine color. In *The Chemistry of Winemaking*. A.D. Webb (Ed.). *Am. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser.*, **137**, 50-87.

Ribéreau-Gayon, P. (1982). The anthocyanins of grapes and wines. En *Anthocyanins as food colors*. P. Markakis (Ed), Academic Press, NY, 209-244.

Bibliografía

Ribéreau-Gayon, J.; Peynaud, E.; Sudraud, P. y Ribéreau-Gayon, P. (1980). Ciencias y tecnologías del vino. Tomo I: Análisis y control de los vinos. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina.

Ribéreau Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A. y Dubourdieu, D. (1998). *Traité d'Oenologie 2. Chimie du vin. Stabilisation et traitements*. Dunod, Paris.

Ribéreau-Gayón, P.; Dubordieu, D.; Doneche, B. y Louvand, A. (2003). *Tratado de Enología I. Microbiología del vino. Vinificaciones*. Ed. Hemisferio Sur y Mundi-Prensa.

Ribereau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujeau, A y Dubordieu, P. (2006). *Handbook of Enology (2nd Ed.)*. The chemistry of wine stabilization and treatments. (Vol. 2) Chichester, England, John Wiley and Sons, LTD.

Rio-Segade, S.; Rolle, L.; Gerbi, V. y Orriols, I. (2008). Phenolic ripeness assessment of grapes skin by texture analysis. *J. Food Comp. Anal.*, **21**, 644-649.

Rodríguez, F. (2002). *Ingeniería de la Industria Alimentaria. Vol. III. Operaciones de conservación de alimentos*. Ed. Síntesis S.A., Madrid.

Rodríguez-Bencomo, J.J.; Méndez-Siverio, J.J.; Pérez-Trujillo, J.P. y Cacho, J. (2008). Effect of skin contact on bound aroma and free volatiles of Listán blanco wine. *Food Chem.*, **110**, 214-225.

Rodríguez-Montealegre, R.; Romero-Peces, R.; Chacón-Vozmediano, J. L.; Martínez-Gascueña, J. y García-Romero, E. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis Vinífera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Comp.. Anal.*, **19**, 687–693.

Rodríguez-Rodríguez, P. (2011). *Composición química y perfil sensorial de vinos de crianza de la D.O. Jumilla*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

Rojas, V. (2002). *Actividades esterásicas en levaduras vínicas*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

Roldán-Gómez, A.M. (2008). *Estudio y aplicación de nuevas alternativas tecnológicas para la mejora de la producción y calidad de los vinos*. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.

Romano, P. y Suzzi, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 309-315.

Romero-Cascales, I.; Ortega-Regules, A.; López-Roca, J.M.; Fernández-Fernández, J.I. and Gómez-Plaza, E. (2005). Extractability from grapes to wines according to variety. *Am. J. Enol. Vitic.*, **56(3)**, 212-219.

Romero-Cascales, I. (2008). Extracción de los compuestos fenólicos de la uva al vino. Papel de los enzimas de maceración. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.

Roubelakis-Angelakis, K. y Kliewer, W. (1986). Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grapes berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, 275.

Rustione, L.; Bedgood, D.R.Jr.; Failla, O.; Prenzler, P.D y Robards, K. (2012). Copigmentation and anti-copigmentation in grape extracts studied by spectrophotometry and post-column-reaction HPLC. *Food Chem.*, **132**, 2194-2201.

Ryan, J.M. y Revilla, E. (2003). Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3372–3378.

Sacchi, K.L.; Bisson, L.F. y Adams, D.O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **56(3)**, 197-206.

Saerens, S. Delvaux, F.; Verstrepen; K.; Van Dijck, P.; Thevelein, J. y Delvaux, F. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 454-461.

Saint-Cricq, N.; Vivas, N. y Glories, Y. (1998). Maturité phénolique: définition et contrôle. *Rev. Fr. Oenol.*, **173**, 22-25.

Salinas, M.R.; Garijo, J.; Pardo, F.; Zalacaín, A. y Alonso, G.L. (2003). Color, polyphenol and aroma compounds in rosé wines after prefermentative maceration and enzymatic treatments. *Am. J. Enol. Vitic.* **54**, 195-202.

Salinas, M.R. (2005). Los aromas varietales del vino. VI Seminario “*Mejoras Técnicas de la Calidad Final del Vino*”. Asociación Murciana de Enólogos.

Sampaio, T.; Kennedy, J. A. y Carmo-Vasconcelos, M. (2007) Use of microscale of fermentations in grape in wine research. *Am. J. Enol. Vitic.*, **58**, 534-539.

Bibliografía

Sánchez-Iglesias, M. (2007). Incidencia del tratamiento de microoxigenación sobre la composición fenólica y el color de vinos tintos jóvenes y de crianza de Castilla-León. Tesis Doctoral. Universidad de Burgos.

Sánchez-Palomo, E.; Alonso-Villegas, R.; Gómez García-Carpintero, E. y González-Viñas, M.A. (2009). Influencia de la maceración pre-fermentativa y el tratamiento enzimático en el aroma de los vinos Verdejo de Castilla-La Mancha. *Nuevos Horizontes en la Viticultura y Enología. Universidad de Vigo, Colección Congresos*, 63. **TE-15**, 359-362.

Sarni Manchado, P.; Deleris, A.; Avallone, S.; Cheynier, V. y Moutounet, M. (1999). Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by protein used as fining agent in enology. *Am. J. Enol. Vitic.*, **50**, 81-86.

Schmidt, J.O. y Noble, A.C. (1983). Investigation of the effect of skin contact time on wine flavour. *Am. J. Enol. Vitic.*, **34**, 135-138.

Selli, S.; Canbas, A.; Cabaroglu, T.; Erten, H. y Günata, Z. (2006). Aroma components of cv. Muscat of Bornova wines and influence of skin contact treatment. *Food Chem.*, **94**, 319-326.

Selli, S.; Canbas, A.; Cabaroglu, T.; Erten, H.; Lepoutre, J.P. y Günata, Z. (2006). Effect of skin contact on the free and bound aroma compounds of the white wine of *Vitis Vinifera* L. cv Narince. *Food Control*, **17**, 75-82.

Shinohara, T. (1985). Gas chromatographic analysis of volatile fatty acids in wines. *Agric. Bio. Chem.*, **49**, 2211-2212.

Shirley, B.W. (1998). Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Sci. Res.*, **8**, 415-422.

Siebert, T.; Wood, C.; Elsey, G. y Pollnitz, A. (2008). Determination of Rotundone, the pepper aroma impact compound, in grapes and wine. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 3745-3748.

Simonato, B.; Mainente, F.; Spinelli, P.; Battista, G. y Ferrarini, R. (2005). Effect of cryoextraction on phenols fractions of must derived from White grape varieties. ASEV 56th Annual Meeting, 36-37.

Simpson, R.F. (1979). Some important aroma components of white wine. *Food Technol. Aust.*, **31**, 516-522.

- Soto-Vazquez, E.; Rio-Segades, S. y Orriols-Fernández, E. (2010). Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. *Eur. Food Res. Technol.*, **231**, 789-802.
- Spayd, S. E.; Tarara, J. M.; Mee, D. L. y Ferguson, J. C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis Vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, **53**, 171-182.
- Strauss, C.R., Dimitriadis, E.; Gooley, P.R. y Williams, P. (1986). Role of the monoterpenes in grape and wine flavour. En "Biodegradation of Aromas". ACS symposium. Series 317. American Chemical Society, Washington.
- Styger, G.; Prior, B. y Bauer, F.F. (2011). Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 1145-1159.
- Suarez-Lepe, J.A. (2003). Perfil sensorial del vino tras la fermentación maloláctica. ACE, *Revista de Enología*. www.acenología.com.
- Swiegers, J. ; Pretorius, I.S. (2007). Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeasts. *App. Environ Microbiol.*, **74**, 954-960.
- Tarara, J. ; Lee, J. ; Spayd, S.E. y Scagel, C.F. (2008). Berry temperature and solar radiation alter acylation proportion, and concentration of anthocyanins in Merlot grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **59**, 235-247.
- Tominaga, T.; Masneuf, I. y Dobourdie, D. (1995). Mise en évidence d'un S-conjugué de la cystéine, précurseur d'arôme du Sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, **29(4)**, 227-232.
- Thiessen, A.H. (1911). Precipitation for large areas. *Monthly Weather Rev.*, **39**, 1082-1084.
- Threlfall, R.; Main, G. y Morris, J. (2006). Effect of freezing grape barriers and heating must samples on extraction of components and composition parameters of red wine grape varieties. *Aus. J. Grape Wine Res.*, **12**, 161-169.
- Tredoux, A.; De Villiers, A.; Májek, P. ; Lynen, F. Crouch, A. y Sandra, P. (2008). Stir Bar Sorptive Extraction Combined with GC-MS analysis and chemometric methods for the classification of South African Wines according to the volatile composition. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 4286-4296

Bibliografía

Van Balen, J. (1984). Recovery of anthocyanins and other phenols from converting grapes into wine. M.S. Thesis, University of California.

Vidrich, R. y Hribar, J. (1999). Synthesis of higher alcohols during cider processing. *Food Chem.*, **67**, 287-294.

Vila, H. (2002). Efecto del tiempo de maceración sobre el color, la composición tánica y la astringencia de vinos Cabernet Sauvignon y Malbec. Tesis de Master, EEA Mendoza INTA, Argentina.

Vivar-Quintana, A.M.; Santos-Buelga, C. y Rivas-Gonzalo, C. (2002). Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Anal. Chim. Acta*, **458**, 147-155.

Watson, B. (2003). Evaluation of winegrape maturity. En: *Oregon Viticulture*, Hellman, E. (Ed.), Oregon State University Press, Corvallis, pp. 235-245.

Williams, P.I.; Strauss, C.R. y Wilson, B. (1988). Developments in flavour research on premium varieties. *Proceeding of the 2d International Cool Climat Viticulture Enology Symposium*, Auckland, New Zealand.

Wilson, B.; Strauss, C.R. y Williams, P.I. (1984). Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 919-924.

Winkler, A.J. (1978). *Viticultura*. Compañía Ed. Continental, S.A., México.

Winterhalter, P.; Sefton, M.A. y Williams, P.I. (1990). Volatile C13 norisoprenoid compounds in Riesling wine are generated from multiple precursors. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41(4)**, 277-283.

Zafrilla, P.; Morillas, J.; Mulero, J.; Cayuela, J. M.; Martínez-Cacha, A.; Pardo, F. y López Nicolás, J. M. (2003). Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4694-4700.

Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. AMV Ediciones, Madrid, España.

Zamora, F. (2004). La maceración prefermentativa en frío de la uva tinta. *Enólogos*, **32**, 36-39.

Zamuz, S.; Blanco, M.; Masa, A. y Vilanova, M. (2009). Efecto de clima sobre la componente varietal del cultivar Albariño en la Denominación de Origen Rías Baixas. *Nuevos Horizontes en la Viticultura y Enología*, **VI-6**, 23-26.

Zinnai, A.; Venturi, F. y Andrich, G. (2006). In cold maceration in production of high quality wine. *1st International Symposium on Environment Identities and Mediterranean Area*, ISEIM, Corte-Ajaccio.

Zoecklein, B.W.; Wolf, T.K.; Dunca, S.E. y Marcy, J.E. (1998). Effect of fruit zone leaf removal on total glucoconjugates and conjugate fraction concentration of Riesling and Chardonnay (*Vitis Vinifera* L.) grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **49**, 259

