

# **EFFECTO DEL USO DE ENZIMAS PECTOLITICAS SOBRE EL COLOR DEL VINO**

**Gisella Lorena Agostini**

Tesis presentada para acceder al grado académico de **Licenciatura en Bromatología**.

Sede Mendoza: Facultad de Ciencias Agrarias - UNCuyo

Lugar de realización: Bodega SOLANDES S.A. Calle Iriarte S/N, Villa Atuel, San Rafael <http://www.solandes.net/03bodega.htm>



**Gral. Alvear, Mza., 2018**

## **EFECTO DEL USO DE ENZIMAS PECTOLITICAS SOBRE EL COLOR DEL VINO**

Gisella Lorena Agostini

**Ricardo Piérola 835, Gral. Alvear, Mza. CP 5620**

**gisella\_agostini@inv.gov.ar**

**Tel. 02625 15515189**

**Director :** Ing. Agr. Néstor Alonso

**CoDirectora:** M Sc Ing. Silvia Paladino

Esta Comisión, de conformidad a lo establecido en la Ordenanza 560/14-CD, sugiere la formación del siguiente Tribunal Evaluador:

**Presidente:** Ing Agr. Carolina Pereira

**Vocales:** Lic. Brom. Alicia Stocco

Ing. Agr. Javier Genovart

**Suplente:** Ing. Ignacio Galarraga

## **RESUMEN**

El empleo de enzimas de vinificación constituye en la actualidad un punto de investigación de gran interés, especialmente la relación entre actividades enzimáticas presentes en la preparación empleada, estructura y composición de la pared celular de las pieles de las uvas como sustrato de las enzimas y las características cromáticas de los vinos obtenidos.

Un conocimiento de la estructura de las paredes celulares y las enzimas responsables de la degradación durante la maduración puede ayudar a seleccionar enzimas para la vinificación que posean una actuación específica.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del agregado de enzimas pectolíticas comerciales durante el proceso de vinificación, sobre índice de color del vino obtenido. Para ello se diseñó un ensayo, con cuatro tratamientos y tres repeticiones: patrón y en concentraciones de 1, 2 y 3 gramos por cada 100 Kg de uva. Los resultados mostraron que las vinificaciones tratadas con enzimas con una concentración de 1 y 2 g/ 100 Kg uva, obtuvieron unas características cromáticas superiores a las de los vinos testigo.

## **PALABRAS CLAVE**

Enzima pectolítica-Color-Uva Malbec- Vino tinto

## SOMMARIO

L'uso di enzimi di vinificazione è oggi un punto di ricerca di grande interesse, in particolare la relazione tra le attività enzimatiche presenti nel preparato utilizzato, struttura e composizione della parete cellulare delle bucce delle uve, come substrato di enzimi e le caratteristiche cromatiche dei vini ottenuti.

La conoscenza della struttura delle pareti cellulari e dei enzimi responsabili della degradazione durante la maturazione può aiutare selezionare enzimi per vinificazione con un'azione specifica.

L'obiettivo di questo studio è valutare l'effetto dell'aggiunta di enzimi pectolitici commerciali durante il processo di vinificazione sul colore del vino ottenuto.

Per esso è stato progettato una prova, con quattro trattamenti e tre repliche: un modello ed a concentrazioni di 1, 2 e 3 grammi per 100 Kg di uva. I risultati hanno mostrato che la vinificazione trattata con enzimi in una concentrazione di 1 e 2 g / 100 kg uva, hanno ottenuto caratteristiche di colore superiori del vino di controllo o modello.

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis nace a razón de innumerables ocasiones de mi vida donde escuche la palabra "COLOR" como primer atributo cuando se bebe una copa de vino.

Quiero agradecer al **Ing.Agr. Néstor Alonso y Ing. Agr. Silvia Paladino**, MARAVILLOSAS personas, que sin haberlos conocido previamente a la formulación de esta tesis, me escucharon y prestaron su apoyo incondicional para el desarrollo de una idea, la investigación y la dedicación de horas.

A la bodega SOLANDES S.A. y al Sr. Antonio Ramón Martínez por permitirme utilizar sus instalaciones y materia prima como objeto de estudio.

Al Instituto Nacional de Vitivinicultura, Enól. Daniel Farina (Jefe Deleg. San Rafael) y Ing. Mónica Sanchez de Campi (Jefa Laboratorio Deleg. San Rafael), que me facilitaron mi trabajo, brindándome los datos analíticos de los ensayos practicados sobre los vinos.

A mi familia y amigos que me apoyaron durante la formación de la licenciatura y la preparación de la tesis, cuando mil veces suspendí vivencias con ellos, por lograr mis objetivos.

## INDICE

Presentación	i
Resumen	ii
Palabras Clave	ii
Sommario	iii
Agradecimientos	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Historia de la Enología	1
1.2. Consideraciones Generales	4
1.3. Estructura, Composición y Extractibilidad de la baya	7
1.4. Polifenoles	9
1.4.1. Clasificación de Polifenoles	10
1.4.1.1. Fenoles No Flavonoides	11
A) Ácidos Benzoicos	12
B) Ácidos Cinámicos	13
C) Estilbenos	14
1.4.1.2. Fenoles Flavonoides	15
A) Antocianos	15
B) Taninos	21
C) Flavonoles	26
1.5. Contenido Poli fenólico y Actividad Antioxidante	27
1.6. Utilización de enzimas en la elaboración de vino	27
1.6.1. Acción de enzimas	27
1.6.2. Preparados enzimáticos comerciales	29
1.6.3. Extracción de los compuestos fenólicos y estabilidad del color del vino	31
1.6.3.1. Maceración	33
1.6.3.2. Condiciones del medio	33
1.6.3.3. Presencia de Dióxido de Azufre	35
1.6.3.4. Fenómeno de copigmentación	35

1.7. Hipótesis	36
1.8. Objetivos	36
1.8.1. Objetivos Generales	36
1.8.2. Objetivos Particulares	36
2. MATERIALES Y METODOS	37
2.1. Variables en estudio	38
2.2. Análisis Estadístico	39
3. RESULTADO Y DISCUSIÓN	40
4. CONCLUSIONES	46
5. INVESTIGACIONES FUTURAS	46
6. BIBLIOGRAFIA	47
7. ANEXOS	52
Anexo I Tabla N° 1 y bis: Resultados de datos obtenidos	52
Anexo II Tabla N° 2: Resultados Analíticos Obtenidos (Excel)	53
Anexo III Tabla N° 3 –Índice de color	53
Anexo IV Tabla N° 4 – Masa Volumica a 20°C	54
Anexo V Tabla N°5- Alcohol % v/v a 20 ° C	55
Anexo VI Tabla N°6- Extracto seco g/l	55
Anexo VII Tabla N° 7- Azúcares reductores g/l	56
Anexo VIII Tabla N°8- Acidez total, en tartárico g/l	57
Anexo IX Tabla N° 9- Acidez Volátil, expresada en ácido acético g/l	57
Anexo X Tabla N° 10- Dióxido de Azufre total mg/l	58
Anexo XI Tabla N°11 – pH	59
Anexo XII Tabla N°12 – Índice de Polifenoles Totales	59
Anexo XIII Tabla N°13- DO a 420 nm	60
Anexo XIV Tabla N°14- DO a 520 nm	61
Anexo XV Tabla N°15- Intensidad	61
Anexo XVI Tabla N°16- Tinte	62
Anexo XVII Catálogo enzimas Lallyme	63

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Historia de la Enología

El cultivo de la vid y la elaboración del vino son conocidos en la región Mediterránea desde tiempo inmemorial. Según la tradición judeocristiana, Noé fue el primer hombre que cultivo la vid y que elaboró vino: “Noé *agricultor*” *comenzó a labrar la tierra y planto una viña. Bebió de su vino, y se embriagó y quedó desnudo en medio de su tienda.*” (Génesis,9,20-21).

Los griegos poseían un dios “viticultor y enólogo” Dionisos; los romanos y también los fenicios elaboraban vino que incorporaban a sus celebraciones y por tanto a su cultura.

La aparición del cultivo de la vid y de la elaboración de vino en la Península Ibérica parece estar ligada a las actividades comerciales de los pueblos griegos. M. Diez (1977) cita, en apoyo de esta hipótesis, el descubrimiento en las islas Baleares de restos arqueológicos de una nave griega que transportaba plantones de vid, que presumiblemente eran importados por las colonias griegas de la Península Ibérica desde la metrópoli.

Los romanos extendieron el cultivo de la vid en su imperio.

En tiempos de Estrabón (Geógrafo e historiador Griego, 63 a. C. al 19 d. C ), la vid se extendía por todas las costas mediterráneas y atlánticas de la Península Ibérica, pero no por las riberas del Cantábrico, hecho que el autor atribuye fundamentalmente a la inclemencia del tiempo.(Estrabón - Traducción de Juan López (1787) *Libro Tercero de la Geografía de Estrabón*)

En la Edad Media, la viticultura, como otras muchas actividades humanas, decayó profundamente, y solo fue salvaguardada en los dominios de las órdenes religiosas, muchas de ellas asentadas en terrenos altos y aislados, lo cual hizo necesaria la selección de nuevas variedades capaces de resistir las bajas temperaturas

La tradición indica que como consecuencia de las peregrinaciones a Santiago de Compostela algunas cepas alemanas fueron traídas a España dando origen a la variedad Albariño.

A partir del siglo XV el cultivo de la vid se propagó desde el viejo continente a las tierras colonizadas por los españoles, portugueses, ingleses y holandeses.

Las primeras cepas llegaron al Caribe en 1493 expandiéndose luego por toda América. Los colonos holandeses las llevaron a África del Sur en el siglo XVII y los ingleses las aclimataron en Australia en la segunda mitad del siglo XVIII.

Actualmente España es el país que mayor extensión dedica a la viña y el tercer productor de vino. (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 1988 — 1989).

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.

El Malbec es el vino tinto varietal dominante en Cahors, en el suroeste de Francia donde las regulaciones de la Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) para Cahors requieren un contenido mínimo de Malbec del 70%.( Malbec, Jim La Mar, 2011)

El Malbec fue introducido en Argentina por el ingeniero agrónomo francés Michel Pouget en 1868. El Malbec es plantado ampliamente en Argentina, donde produce un vino varietal más suave y menos tánico que el de Cahors. Hay unas 38.486 hectáreas de Malbec en Argentina, de las cuales 33.307 hectáreas (87%) están en Mendoza ( «Registro de



Viñedos y Superficies INV 2014»), aunque también son productoras las regiones de La Rioja, Salta, San Juan, Catamarca, Jujuy, La Pampa, Neuquén, Río Negro y Buenos Aires.

Chile tiene unas 6 000 hectáreas plantadas, Francia 5 300 y en las regiones más frías de California solo hay 45 hectáreas. En California, la uva se usa para hacer **Meritage**. El Malbec crece también en el Estado de Washington, en las regiones de Rogue y Umpqua de Oregón, en Australia, en Nueva Zelanda, en Sudáfrica, en la Columbia Británica, en la American Viticultural Area (AVA) Long Island del Estado de Nueva York, en el sur de Bolivia, en el noreste de Italia, en Virginia, en la Baja California mexicana y, recientemente, en Texas y en el sur de Ontario. Aunque no es habitual en España, existen 22 hectáreas de Malbec en la zona de la Denominación de Origen (DO) Ribera del Duero que se usan, a menudo, para vinos de mezcla hechos sobre todo de Tempranillo. A pesar de esto, en 2011 se comercializaban 6 vinos varietales (también llamados monovarietales) de Malbec españoles (Mariano Zalazar, 2011)

Chile también ha demostrado ser capaz de producir Malbec de alta calidad, sobre todo en las regiones de Colchagua y San Antonio. Algunos productores chilenos destacados de Malbec son Viu Manent (considerado en Chile una suerte de especialista en la variedad), Quebrada de Macul, de Martino, y Loma Larga (Mariano Zalazar, 2011)

Mientras que las hectáreas de Malbec van en declive en Francia, en Argentina se está convirtiendo en una "variedad nacional", hasta el punto en que por sí misma es identificada con el vino argentino. La uva fue introducida por primera vez en la región a mediados del siglo XIX, cuando el gobernador provincial Domingo Faustino Sarmiento instó al ingeniero agrónomo francés Miguel Pouget (Michel Aimeé Puget) a traer esquejes de vides francesas desde la Quinta Normal en Chile a la Argentina. Faustino Sarmiento conoció a Pouget en Chile, durante su exilio, y lo convenció de replicar la iniciativa de contar con un predio experimental en Mendoza, similar a la Quinta Normal chilena,- inspirada su vez en la Escuela Normal de París,- con el objeto de potenciar la agricultura en la región. Entre las vides que trajo Pouget en 1852 estaba la primera planta de Malbec que se plantó en el país.

Tuvo una gran difusión, llegando a ocupar 57.690 hectáreas en 1966 y 38.486 hectáreas en 2014, es la variedad más cultivada en Argentina, siendo este el primer productor mundial de Malbec, seguido por Francia (5.300 hectáreas), Italia, España, Sudáfrica, Nueva Zelanda y Estados Unidos.

Durante la crisis económica del siglo XX, algunas plantaciones de Malbec fueron arrancadas para hacer sitio a las variedades Criolla Grande y Cereza, con las que se producía vino de garrafa. No obstante, la uva fue re-descubierta a finales del siglo XX y la industria vinícola argentina puso el foco en la producción de vinos Premium para la exportación. Como la industria vinícola argentina descubrió la calidad única del vino que se podía hacer con la uva, el Malbec alcanzó gran preeminencia y actualmente es la uva tinta más plantada del país. En 2003 había unas 20.000 hectáreas de Malbec en Argentina.

Actualmente los racimos de las uvas argentinas Malbec son diferentes de los franceses.

**1 Meritage** es una palabra usada para distinguir vinos que se hacen al estilo del tinto de Burdeos pero sin infringir la denominación de origen protegida del lugar. Los vinicultores deben obtener licencia para el derecho a usar la marca "Meritage" para sus vinos en The Meritage Association, con sede en California. La designación Meritage es ante todo usada en los Estados Unidos, pero en años recientes han comenzado a usarla también bodegas de otros países.

Tienen frutos más pequeños en racimos más pequeños y apretados. Esto sugiere que los esquejes traídos por Pouget y por los inmigrantes franceses posteriores eran un clon singular que podría haberse extinguido en Francia debido a la helada y a la epidemia de filoxera. El vino de Malbec argentino se caracteriza por su color oscuro y por sus sabores intensos y afrutados como la ciruela, con una textura aterciopelada. Aunque no tiene la estructura tánica de un Malbec francés y que posee una textura más suave. Los vinos de Malbec argentinos han demostrado un potencial para el envejecimiento similar a los franceses (Pablo Lacoste, 2009)

La provincia de Mendoza es el productor líder de Malbec en Argentina, que también tiene viñedos de esta variedad en La Rioja argentina, Salta, San Juan, Catamarca y la provincia de Buenos Aires.

El 86% del Malbec argentino se encuentra en Mendoza,(Figura N°1), donde está la primera DOC (Denominación de Origen Controlada) de América, Malbec Luján de Cuyo (Pablo Lacoste, 2009).

En el consumo per cápita de vino en Argentina, hay descenso progresivo debido fundamentalmente a una disminución del consumo de vinos de mesa. Datos del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) indican que mientras en 1974 se consumían 77,2 litros per cápita, en 2014 esa cifra descendió a 23,68 litros, eso significa que el consumo se desplomó 69% en cuatro décadas. Aunque, por otro lado, se ha observado un aumento en el consumo de vinos de calidad. La explosión del Malbec y la sofisticación del consumo de vino han contribuido a que cada vez se consuma más en los rangos de precios más altos pero en menos ocasiones. En 2014, según CCR (consultora), en la venta de vinos en supermercado, los únicos vinos que no cayeron fueron los correspondientes al segmento “alto” (\$ 59,83) y “Premium”(\$ 153,43), es más, crecieron 10% y 17%, respectivamente. El sector vitivinícola argentino 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.



Figura N° 1: Mapa de Argentina. INV- Parcelario Vitivinícola Nacional

## 1.2. Consideraciones Generales

Las sustancias fenólicas se encuentran entre los constituyentes fundamentales de los vinos. En ellos determinan importantes características organolépticas, relacionadas con el color y el gusto. Dentro de los fenoles, los antocianos son los responsables esenciales del color rojo, mientras los taninos se asocian con sensaciones táctiles en boca, unas veces agradables- estructura, concentración- y otras desagradables- amargo, aspereza, sequedad, astringencia.

Las sustancias fenólicas provienen de la uva y son extraídas durante la fase de vinificación conocida como maceración, que involucra los fenómenos de difusión y de disolución. La extracción y manejo de los antocianos y taninos en los vinos, es vital para determinar la calidad y el estilo del vino tinto.

Buscando obtener vinos con más color, concentración y complejidad, los enólogos recurren a un conjunto de técnicas de maceración. Su objetivo es obtener la mayor extracción posible de principios deseables, evitando la cesión de otros indeseables. Lamentablemente, los factores que favorecen la difusión y disolución, como un mayor contacto entre las fases líquida y sólida o un aumento del tiempo de maceración, incrementan la cesión de todo tipo de compuestos. El control del tiempo de maceración implicaría, desde esta perspectiva, encontrar la duración que permitiera obtener la mayor cantidad de compuestos deseables sin que aumenten en forma apreciable aquellos que no los son.

Esto no es fácil de lograr pues el contenido en el vino de las sustancias cedidas en la maceración, no sigue un modelo simple donde se pueda asociar en forma directa la concentración en el vino con los contenidos en la uva y la intensidad de difusión. Esto se debe a que las sustancias extraídas durante la maceración sufren una serie de fenómenos colaterales tales como la saturación y la precipitación, la adsorción sobre las partes sólidas, la condensación molecular, la oxidación, la copigmentación y los fenómenos coloidales. Además, muchos de estos fenómenos continúan durante el periodo de conservación del vino.

Ribéreau Gayon (1982) investigó el efecto del tiempo de maceración sobre el grado de extracción de sustancias fenólicas en los vinos y puso en evidencia que, el contenido de antocianos alcanzaba un máximo en los primeros 5 o 6 días de maceración, pero luego caía paulatinamente.

Si bien actualmente se conocen los patrones que sigue la extracción, no es posible asegurar cómo afectará el grado de extracción logrando, con distintos tiempos de maceración, al color y la astringencia del vino durante su crianza. Esto se debe a que muchos fenómenos como la copigmentación de los antocianos y la combinación entre los taninos y los polisacáridos por citar algunos, han sido esclarecidos recién en los últimos años.

Muchas de las reacciones a que están sujetos los fenoles en los vinos dependen de su composición, variedades químicas y concentraciones, y están fuertemente determinadas por la variedad de uva. Así se sabe que los vinos de Pinot Noir tienen problemas para expresar altos niveles de color debido a la estructura química de los antocianos. Otras variedades, como Cabernet Sauvignon y Malbec, se comportan de manera opuesta.

Si bien estas dos últimas variedades están consideradas como productoras de vinos con mucho color y cuerpo, no se comportan de manera similar. (En la actualidad no se

conoce, en las condiciones de Argentina, cuáles son los tiempos óptimos de maceración para su vinificación.)

Durante el estrujado y prensado de los frutos se liberan cantidades importantes de pectinas que pasan a los zumos. Las pectinas están presentes en las células vegetales, principalmente en la lamela media y en la pared primaria, y son un grupo heterogéneo de polisacáridos de grados de polimerización y ramificación variable. Son hidrocoloides negativos estables, con tendencia a mantenerse en suspensión por largos periodos de tiempo. Además, son capaces de estabilizar en suspensión a otros componentes coloidales de los zumos y mostos, y presentan gran capacidad de retención de agua. Por todo ello, contribuyen a la turbidez y viscosidad de los mostos y zumos (Grassin, 1992), e impiden la adecuada clarificación y filtración de estos productos, provocando la colmatación rápida de los filtros. Además, las pectinas originan importantes problemas en el procesado del zumo y del mosto debido a que estas sustancias retienen jugo durante el prensado de la fruta, disminuyendo el rendimiento de la extracción (Bosso, 1992).

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. Las técnicas enológicas destinadas a mejorar la extracción están centradas en facilitar la ruptura de las paredes celulares.

Todos estos problemas provocan importantes pérdidas económicas en las industrias de elaboración de zumos y mostos, que pueden reducirse con el uso de enzimas pectolíticas. Estas pueden incluso mejorar la calidad sensorial y la estabilidad de los productos acabados (Castino et al, 1990; Berta, 1991); que en el caso del sector enológico se refieren tanto a mostos de consumo directo como a los vinos obtenidos por transformación de los mostos.

La uva contiene enzimas pectolíticas endógenas capaces de degradar las pectinas, pero éstas actúan muy lentamente (Lecas, 1994), y algo similar ocurre con las actividades pectolíticas de ciertas levaduras y bacterias de interés enológico.

Es por ello, que el uso de enzimas pectolíticas exógenas se ha convertido en una práctica habitual en muchas bodegas. Su uso persigue mejorar los rendimientos, facilitar el procesado y mejorar la calidad de los productos finales.

La obtención de vinos de calidad implica la utilización de una serie de técnicas de elaboración que aseguren la obtención de un producto final cuyas características incluyan, entre otras, un buen aspecto visual, gran limpidez, transparencia, color, que además deben ser estables durante la vida del vino.

En este sentido, el empleo de enzimas pectolíticas presenta efectos beneficiosos, ya que mejora el brillo y la luminosidad del producto final (Brillouetet al, 1990), al eliminar las causas de la turbidez. Las pectinas pueden llegar a suponer el 50% de la sustancia coloidal en el mosto, y su destrucción facilita la precipitación de proteínas, polímeros fenólicos y en menor medida de ácidos urónicos.

Se ha detectado que las tendencias del mercado en los últimos años se inclinan hacia vinos tintos con marcadas tonalidades púrpuras. En respuesta a esta demanda, se han desarrollado diferentes prácticas enológicas para favorecer la extracción de la materia colorante y mejorar el color, entre ellas se encuentra el uso de enzimas pectolíticas. Dentro de éstas existen dos grandes grupos de preparados comerciales, los denominados clarificantes y los extractores de color. Aunque los primeros se usan con la intención de

disminuir la turbidez y facilitar su clarificación, se ha comprobado que también producen un aumento de la extracción de compuestos fenólicos, mejorando el color tanto de vinos rosados como tintos (Izcará, et al, 2001 y Revilla, 1999).

Una revisión de los trabajos publicados acerca del efecto de la aplicación de enzimas sobre la extracción de compuestos fenólicos muestra resultados diversos, unos señalan que la favorece (Gliotti and Bucelli, 1993, Zent and Inama, 1992, Serviliet al, 1992) mientras que otros muestran que no siempre ocurre así (Valdés-Sánchez y Regodón-Mateos, 1994, Nicolini et al, 1994). Por otro lado no siempre un aumento de los contenidos fenólicos se traduce en un aumento de la intensidad colorante y la tonalidad roja (Serviliet al, 1992; Valdés-Sánchez y Regodón Mateos, 1994). Estos resultados se deben esencialmente a la disparidad de actividades enzimáticas de cada producto comercial, influyendo además la variedad de uva sobre las que se aplican, que condiciona la carga y tipo de sustancia péctica presente en mostos y vinos (Castino and Ubigli, 1979; Castino et al, 1990; Bosso, 1992); así como las condiciones de aplicación. Por ello, se recomienda que antes de aplicar cualquier preparado enzimático en vinificación se hagan pruebas previas para determinar efectos, dosis, y demás parámetros de interés.

Es bien sabido, que, durante el envejecimiento del vino, tanto en botella como en barrica, el color brillante, rojo azulado del vino pierde viveza y tiende progresivamente hacia tonalidades teja e incluso marrones (Bakker y Timberlake, 1986 y Singleton y Trousdale, 1992), debido a la pérdida progresiva de antocianos libres que evolucionan rápidamente para dar polímeros de alto peso molecular con otros flavonoides (Sommers y Evans, 1986, Di Stefano y González- San José, 1991; Mazza, 1995). Estos cambios dependen, entre otros factores, de la composición fenólica del vino y por tanto también pueden ser modificados por la aplicación de los enzimas pectolíticos. Por ejemplo, la eliminación de polisacáridos, impide o reduce la posibilidad de combinación de estos con antocianos y taninos, reduciéndose los riesgos de aparición de turbidez en botella y los cambios de color asociados a estos fenómenos.

En el caso de vinos blancos, el tiempo de almacenamiento suele traducirse en un pardeamiento directamente relacionado con la dotación fenólica, por tanto el efecto del enzima sobre la composición del vino joven tendrá gran repercusión en la evolución de estos vinos. El principal inconveniente de la utilización de enzimas pectolíticas es que puede producir un aumento del contenido en metanol, especialmente en el caso de vinos tintos (Castino et al, 1990; Bosso, 1992; Revilla y González-San José, 1998). Ello es debido a que los preparados pueden contener cantidades variables de pectín-metil-esterasa, enzima que libera grupos metoxi de las pectinas.

El metanol es un alcohol tóxico debido a que interfiere en el metabolismo hepático y en altas concentraciones puede incluso provocar la muerte, de ahí el interés en controlar su contenido en el vino y que sus cantidades máximas se hallen legisladas (Revilla y González-San José, 1998). En la Argentina se encuentra reglamentado por la Resolución C 8/2014 del Instituto Nacional de Vitivinicultura, la cual fija los límites máximos: tenencia en bodega 0.80 ml/L en tintos y 0.60 ml/L en rosados y blancos; y los vinos destinados al consumo 0.51 ml/L en tintos y 0.32 ml/L rosado y blancos.

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.

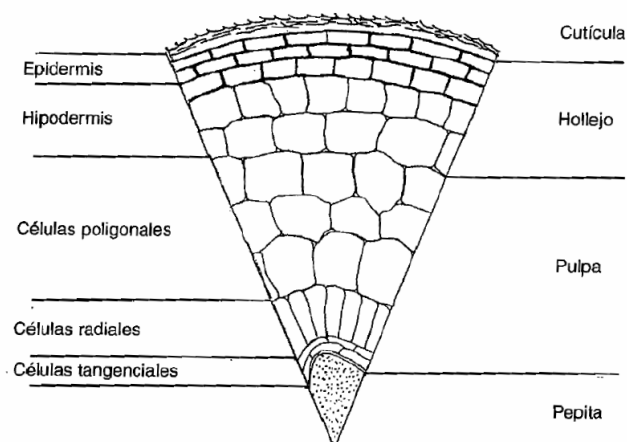
### 1.3. Estructura, composición y extractabilidad de la baya

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 N° 2) (Lasanta-Melero, 2009).

Figura N° 2- Estructura de la baya



(Lasanta- Melero, 2009)



Figura N°3 Corte esquemático de un grano de uva

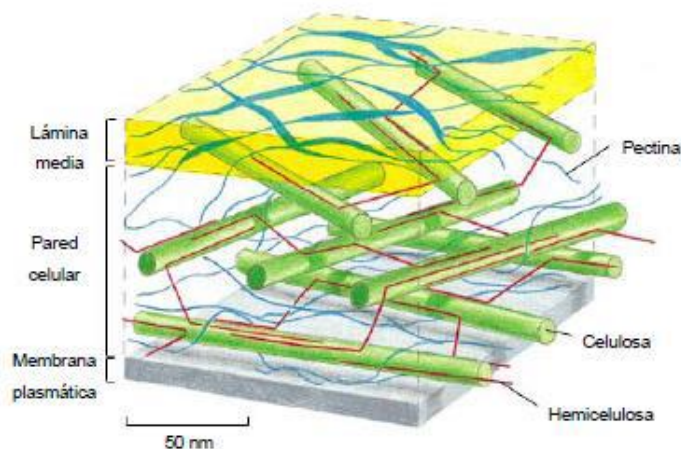
Las paredes celulares están formadas por polisacáridos complejos (pectinas, celulosa y hemicelulosa) y son las encargadas de proteger a la célula, dándole consistencia y rigidez. Se puede distinguir varias partes en su estructura (Figura N° 4):

**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 arabino galactanos 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 N° 4 Estructura de la pared celular



(Lau et al., 1985)

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 delestaje o el flash-détente son utilizadas para facilitar la extracción de dichos compuestos (Sachi et al., 2005).

#### **1.4. Polifenoles**

Los compuestos polifenólicos agrupan un conjunto de sustancias que durante mucho tiempo fueron denominadas genéricamente “*Materias tánoides o Taninos*”.

Son compuestos que se encuentran muy difundidos en la naturaleza y juegan un papel muy importante en los caracteres organolépticos o sensoriales de los alimentos. Sufren modificaciones con mucha facilidad, como las oxidaciones que contribuyen al envejecimiento y madurez del vino, desarrollándose así su buen sabor a la vez que evitan la oxidación de otros componentes del mismo, que darían compuestos contrarios a la buena calidad. Sufren también combinaciones con metales y cambios debidos a modificaciones del pH, por lo que participan en procesos que dan lugar a cambios organolépticos en muchos alimentos.

Su importancia en enología es muy significativa, ya que entre estas sustancias se encuentran las responsables en mayor medida del color de las uvas (particularmente de las tintas o negras), jugando un importante papel en la evolución de los vinos con el envejecimiento.

En el caso del vino también son los responsables de la sensación de astringencia en la lengua y de la sensación que se nota en la boca (impresión táctil de los vinos). Además contribuyen al sabor, especialmente a los sabores amargos y a la apreciación organoléptica.

Otras propiedades que tienen los polifenoles son: [1]

- Propiedades bactericidas o bacteriostáticas, frente a microorganismos patógenos que produciendo alteraciones fisiológicas se desarrollan, ocasionalmente, en el aparato digestivo y, de manera particular, en el intestino.
- Propiedades antitóxicas, de manera concreta frente a la toxicidad de los alcoholes, demostrada experimentalmente en ensayos con animales de laboratorio.
- Valor vitamínico P, frente a la fragilidad de los vasos sanguíneos capilares, que pueden ocasionar hemorragias en estos conductos.



Parece ser que, en buena parte, las propiedades fisiológicas apuntadas residen en el carácter de tanino que presentan, por polimerización, una parte de estas sustancias, siendo los efectos más apreciables a mayores contenidos, es decir, en los vinos tintos.

Los polifenoles del vino varían desde compuestos relativamente sencillos producidos por las vides, hasta sustancias sumamente complejas formadas durante el envejecimiento, así como otras extraídas por el vino de la madera de los barriles. Proviene básicamente de las partes sólidas de la uva, y en menor medida de la pulpa, siendo su aportación diferente según procedan de hollejos, pepitas o raspones, ya que la composición polifenólica del vino varía según el tiempo de contacto de cada una de estas partes con el mosto. [2]

Así la composición polifenólica final, no es únicamente un reflejo de los polifenoles encontrados en la variedad de uva de la cual proceda el vino, ya que es en último término la técnica de elaboración (tratamiento mecánico aplicado para obtener el mosto, tipo de vinificación y envejecimiento) lo que condiciona la amplia variación en el contenido de polifenoles de un vino.

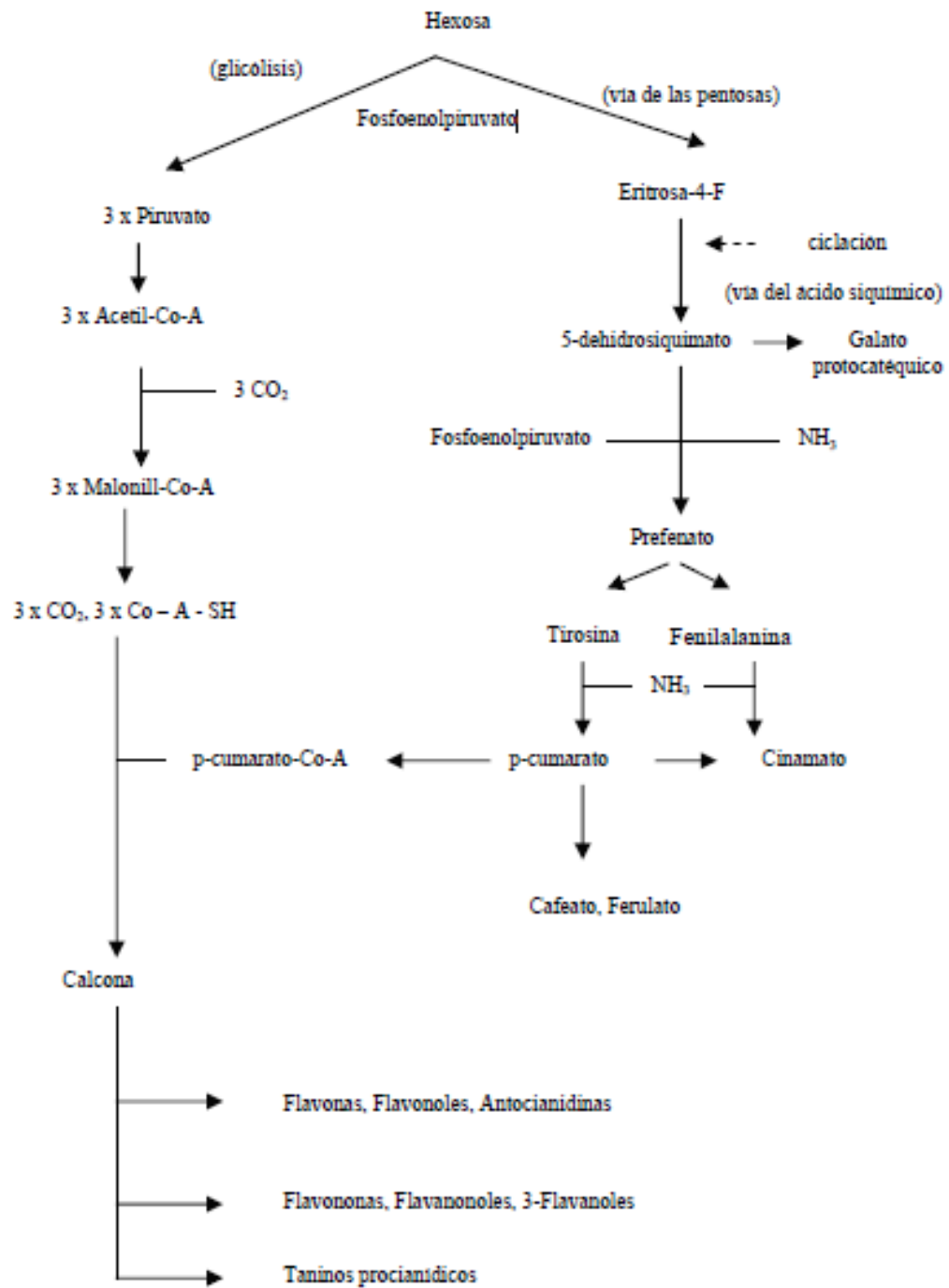
Resulta por tanto lógico relacionar composición polifenólica con caracterización de vinos, ya que vinos procedentes de distintas zonas, con distinto tipo de cepa y sometidos a procesos de elaboración y conservación distintos según las costumbres vinícolas, tendrán diferente composición polifenólica.

#### **1.4.1. Clasificación de los Polifenoles**

Como puede observarse en la Fig. 5, la biosíntesis de compuestos fenólicos es consecuencia de la formación y acumulación de azúcares en el grano de uva. A partir de las hexosas y por el ciclo de las pentosas-fosfato, se forma eritrosa-4- fosfato como compuesto intermedio, del cual por la vía del ácido siquímico se forman los ácidos benzoicos y aminados, terminando en la formación de otros polifenoles (flavonas, antocianos, flavonoles, taninos, etc.). Por otra parte en la glicólisis, a partir de tres moléculas de ácido pirúvico, se puede formar una molécula de ciclo bencénico, dando lugar posteriormente a los mismos compuestos anteriormente citados. [5]

Cada etapa metabólica necesita la presencia de una enzima específica, por lo que una determinada variedad de uva, por ejemplo, se podría identificar por su capacidad de sintetizar compuestos polifenólicos en función de su patrimonio enzimático [6]. Además de la variedad del fruto, el clima puede ejercer una influencia importante. Los flavonoides parecen variar más que los no flavonoides con respecto al lugar, la cosecha y las variaciones climáticas.

El estudio de los compuestos fenólicos preocupa desde hace mucho tiempo a los investigadores. Se deben a Ribéreau-Gayon y col. [7,8] los primeros avances determinantes sobre este tema. Estos compuestos se agrupan según su estructura química en dos grandes grupos: **FENOLES FLAVONOIDES y NO FLAVONOIDES.**



**Fig. 5 Biosíntesis de los polifenoles**

(Conn, 1986)

### 1.4.1.1.Fenoles NO Flavonoides

Esta denominación abarca a los ácidos fenólicos, divididos en ácidos benzoicos (C6-C1) y ácidos cinámicos, portadores de una cadena lateral insaturada (C6-C3), pero también a otros derivados fenólicos como los estilbenos.

## Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son incoloros, inodoros e insípidos, aunque con el tiempo y la oxidación puede tornarse de color amarillo, así como también, bajo la acción de algunos microorganismos, pueden transformarse en fenoles volátiles, que presentan olores muy característicos.

Los vinos tintos contienen mayor cantidad de ácidos fenólicos que los blancos encontrándose en concentraciones de 10 a 20 mg/L en los blancos y de 100 a 200 mg/L en los tintos se clasifican en tres grupos:

### A) Ácidos benzoicos

Se consideran derivados del ácido p-hidroxibenzoico y son los siguientes:

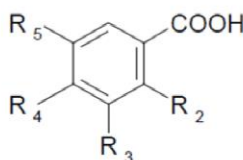


Fig. 6 Estructura química de los ácidos benzoicos de mayor importancia enológica

Tabla 1. Ácidos benzoicos más importantes

Nombre del ácido benzoico	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
p-hidroxibenzoico	H	H	OH	H
protocatéquico	H	OH	OH	H
vanílico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
gálico	H	OH	OH	OH
siríngico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
salicílico	OH	H	H	H
gentísico	OH	H	H	OH

(Ribéreau-Gayon, 1976)

Entre los distintos autores existe una cierta discusión acerca de si estos ácidos se hallan libres en la uva o si son liberados en el curso de la vinificación. Parece demostrado que existen en forma esterificada y que son liberados por hidrólisis alcalina en el curso de la elaboración y conservación del vino [9].

Otros autores sugieren que su presencia en uvas y vinos, se debe en parte a una degradación de los ácidos cinámicos por hidrólisis durante la manipulación de la uva [10].

Las formas libres de estos compuestos son más comunes sobre todo en el vino tinto, debido a la hidrólisis de esas combinaciones y a las reacciones de degradación de las moléculas más complejas, en particular las antocianinas, bajo la acción del calor [11].

## B) Ácidos cinámicos

Se caracterizan por poseer una estructura C6-C3. Los ácidos cinámicos de mayor importancia enológica son:

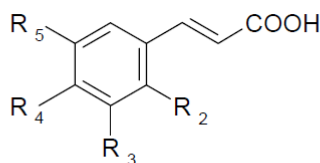


Fig. 7 Estructura química de los ácidos cinámicos de mayor importancia enológica

Tabla 2. Ácidos cinámicos más importantes

Nombre del ácido cinámico	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
p-cumárico	H	H	OH	H
cafeico	H	OH	OH	H
ferúlico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
sinápico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

(Singleton, 1978)

Debido a la presencia del doble enlace existen dos formas isoméricas. La más frecuente en la naturaleza es la forma trans, ya que es termodinámicamente la más estable, pero se isomeriza fácilmente por acción de la luz. Los isómeros cis, largo tiempo confundidos con los derivados glucosilados, también existen aunque en débil cantidad [12].

Varios ácidos cinámicos están presentes en la uva y en el vino. Se los identifica en pequeña cantidad bajo forma libre, pero están sobre todo esterificados (Fig. 8), en su mayor parte con ácido tartárico [8]. Estos son los ácidos cafeoil tartárico o caftárico, p-cumaroil tartárico o cutárico y feruloil tartárico o fertárico.

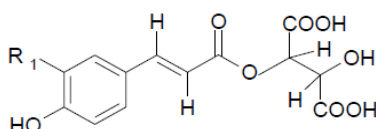


Fig. 8 Ésteres hidroxicinámicos de la uva

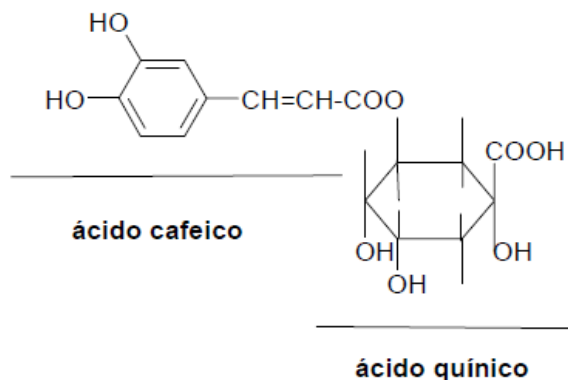
Tabla 3. Ésteres hidroxicinámicos

Ésteres hidroxicinámicos	R <sub>1</sub>
ácido cafeoil tartárico	OH
ácido p-cumaroil tartárico	H
ácido feruloil tartárico	OCH <sub>3</sub>

(Ribéreau-Gayon, 1964)

Los ésteres con el ácido tartárico son constituyentes del jugo de uva y son particularmente oxidables siendo la causa del ennegrecimiento del mosto blanco [13,14], en particular el ácido caftárico.

Las combinaciones del ácido cafeico con el ácido quínico se conocen desde hace bastante tiempo y se encuentran ampliamente difundidas en todo el reino vegetal. De estas combinaciones, el compuesto más conocido es el ácido clorogénico o 3-cafeato del ácido quínico (Fig. 9).



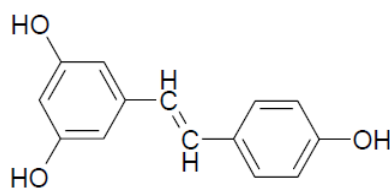
**Fig. 9 Ácido clorogénico**

(Ribéreau-Gayon, 1965)

La presencia de los ésteres tartáricos y la ausencia de ésteres quínicos (como el ácido clorogénico) son una de las especificidades del género *Vitis* si se compara con la mayor parte de las demás frutas. Sus contenidos varían en el hollejo de 0.06 a 0.78 mg/g para el ácido caftárico, de 0 a 0.3 mg/g para el ácido cutárico y menos de 0.06 mg/g para el ácido fertárico. La concentración de los ésteres hidroxicinámicos disminuye durante el desarrollo de la baya y se estabiliza en la madurez enológica [15]. Además, el porcentaje de estos compuestos puede servir de criterio taxonómico [16].

### C)- Estilbenos

Se caracterizan por poseer dos ciclos bencénicos unidos generalmente por una cadena etanol o eventualmente etileno. Entre estos compuestos, el isómero trans del resveratrol o 3, 5,4'-trihidroxiestilbeno (Fig. 10) sería producido por la vid en respuesta a un ataque fúngico. También se ha encontrado en la uva el derivado glucosilado del resveratrol.



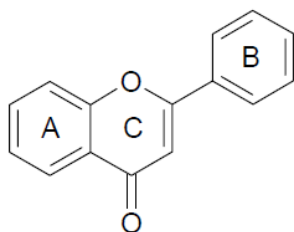
**Fig. 10 Resveratrol**

(Ribéreau- Gayón, 1965)

Las concentraciones de resveratrol encontradas oscilan para vinos tintos entre 0.001 y 10 mg/L, en vinos rosados entre 0.05 y 1.2 mg/L y en vinos blancos desde trazas a 0.190 mg/L.

#### 1.4.1.2.Fenoles Flavonoides

Todos ellos están caracterizados por un esqueleto base de 15 átomos de carbono (C6-C3-C6) de tipo 2-fenil-benzopirona (Fig. 11), es decir, están formados por dos anillos bencénicos unidos por una cadena de 3 carbonos, que se cierra en heterociclo oxigenado compuesto de 6 eslabones



**Fig. 11 2-fenil-benzopirona**

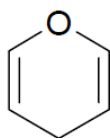
(Ribéreau- Gayón, 1965)

Estos compuestos están divididos en varias subclases que se distinguen por el grado de oxidación de su núcleo pirano. Entre ellos se encuentran los polifenoles más interesantes de la composición de los vinos, por concentración y por propiedades específicas. Se clasifican en: antocianos, taninos y flavonoles.

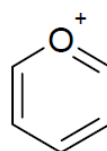
#### A) Antocianos

Son pigmentos solubles en agua responsables de los colores anaranjados, rojos y púrpuras de flores, frutas y hojas [19-23]. Reciben su nombre del griego <<antos>> (flor) y <<kyanos>> (azul). En la uva están localizados en el hollejo, especialmente dentro de las vacuolas de las 3 o 4 primeras capas celulares de la hipodermis, mientras la pulpa es incolora de forma que se pueden obtener mediante suave presión, vinos blancos de uvas tintas. Sólo la variedad de uvas *tintoreras* presenta la pulpa coloreada. Su estructura comprende dos anillos bencénicos unidos por medio de un anillo heterocíclico y presentan, según el antociano de que se trate, variantes en algunos carbonos de los citados anillos bencénicos o del mencionado anillo heterocíclico.

Este último anillo puede ser del tipo pirano o del tipo pirilio:



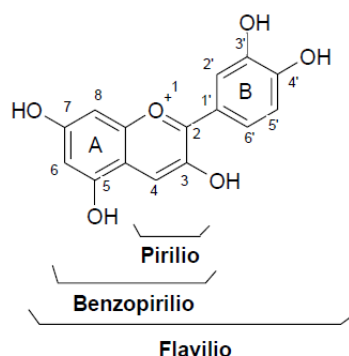
**Fig. 12 Estructura pirano**



**Fig. 13 Estructura pirilio**

(Hong, V. and Wrolstad, E., 1990)

En dicho grupo pirilio se observa el oxígeno tetravalente con una valencia libre que confiere carácter iónico a la molécula entera del antociano. El grupo constituido por el primer anillo bencénico (A) ligado con el grupo pirilio recibe el nombre de grupo benzopirílico. Este grupo unido a su vez con el segundo anillo bencénico (B), se llama conjuntamente catión flavilio (Fig. 14).



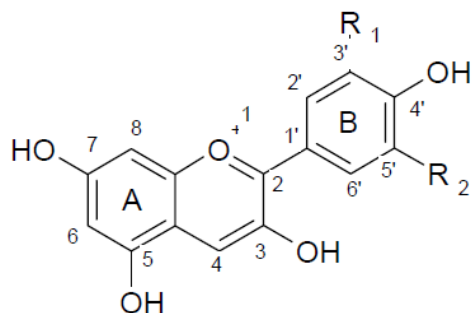
**Fig. 14 Cati3n flavilio**

(Renault, J.H., Th3penier, P., Z3ches-Hanrot, M., Foucault, A.P., 1995)

Estos compuestos no existen en la naturaleza bajo forma antocianidina, pero s3 bajo forma antocianina, dado que las antocianidinas est3n siempre esterificadas con una o m3s mol3culas de un az3car que les confiere estabilidad.

Este complejo esterificado es el que toma el nombre de antocianina o antociano. Es decir, qu3micamente los antocianos son los glic3sidos de las antocianidinas, y 3stas son, por tanto, las agliconas de los antocianos.

Las agliconas (antocianidinas) de los antocianos presentan en varios carbonos grupos hidroxilo (OH) y a veces grupos metoxilo (OCH3). En la Fig. 15 se muestra la estructura qu3mica de algunas antocianidinas conocidas.



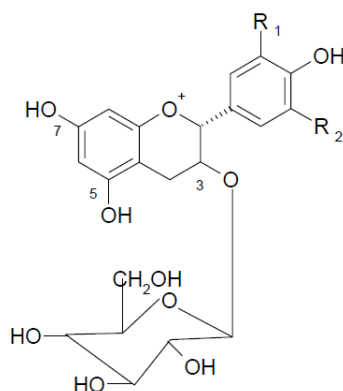
**Fig. 15** Fórmula estructural de las antocianidinas comunes

(Pirie et al., 1977)

**Tabla 4.** Antocianidinas más importantes en enología

Nombre	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Como se dijo anteriormente, en la naturaleza las antocianidinas se encuentran siempre como glicósidos. La glicosilación puede ocurrir en las posiciones 3, 5 y 7. El azúcar que participa con mayor frecuencia es la glucosa, aunque existen además, otros azúcares que participan en estos enlaces como ramnosa, galactosa y arabinosa. Según que la esterificación afecte a uno, dos o tres carbonos, los antocianos se llaman monoglicósidos, diglicósidos o triglicósidos. En la Fig. 16 puede observarse la estructura de las antocianidinas glicosiladas con una molécula de glucosa.

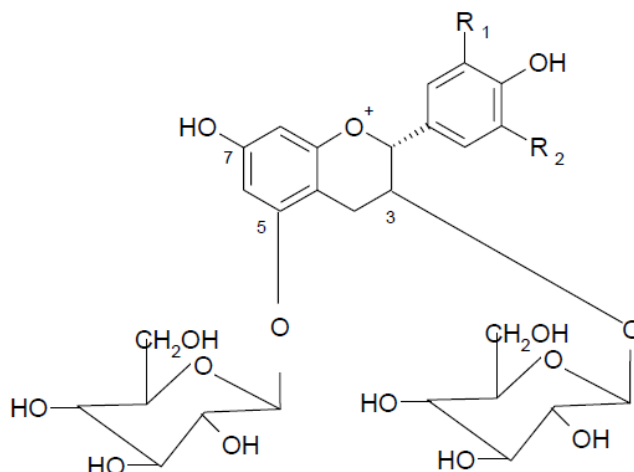


**Fig. 16** Estructura de las antocianinas 3-monoglucosiladas

(Pirie et al., 1977)



Los antocianos monoglucósidos están presentes en todas las especies conocidas del género *Vitis vinífera*, siendo ésta la especie de vid clásica en Europa. En Estados Unidos y en otros países no europeos se cultivan especies como *V. riparia* y *V. rupestris* y sus híbridos con la *V. vinífera*. Todas estas especies, pero no la *V. vinífera*, contienen tanto antocianos monoglucósidos como diglucósidos (Fig. 17) en cantidad importante [24]. Sin embargo, se han señalado de antocianos diglucósidos en ciertos frutos de *V. vinífera* [25], admitiéndose en los vinos derivados de estos últimos diglucósidos hasta 2 mg/L. De aquí se puede obtener una clave analítica para diferenciar vinos tintos obtenidos de variedades de *V. vinífera* de los vinos tintos obtenidos de variedades híbridas (la mayor parte proceden de *V. riparia* o de *V. rupestris*) y para identificar mezclas de vinos de las dos procedencias.

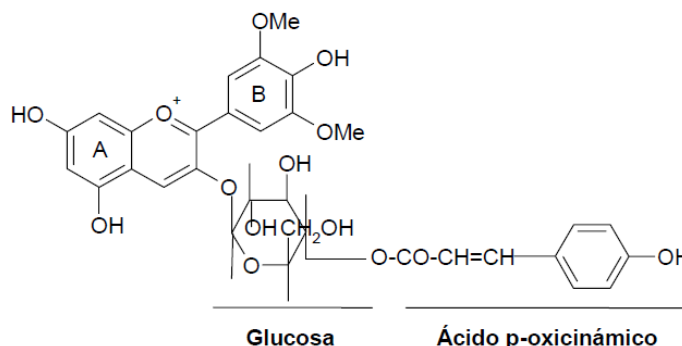


**Fig. 17** Estructura de las antocianinas 3,5-diglucosiladas

Ribéreau-Gayon, 1959)

Existe otra categoría de antocianos naturales que son los antocianos acilados y se caracterizan porque en ellos la misma molécula de azúcar que esterifica a la aglicona es a su vez esterificada por un ácido orgánico, frecuentemente fenólico, como el ácido p-cumárico y a veces el ácido cafeico o el ácido clorogénico.

Un ejemplo de una de estas moléculas es la que puede observarse en la figura siguiente:



**Fig. 18** Formación del p-cumarato-3-monoglucósido de malvidina

Ribéreau-Gayon, 1959)

Si consideramos las seis antocianidinas de partida y tenemos en cuenta su esterificación con los posibles azúcares, que a su vez pueden estar acilados con varios ácidos, resulta evidente el elevado número de antocianos susceptibles de ser identificados en los vinos tintos.

Como puede observarse en la Fig. 19, las antocianinas existen en diferentes formas estructurales dependiendo del pH del medio. Cuando el pH del medio es bajo, la molécula de antociano presenta en el C1 un oxígeno con carga positiva, llamado *catión flavilio* (A+) de color rojo vivo, y con una cierta decoloración, que es máxima a valores de pH de 3.2 a 3.5. A medida que el pH se eleva, las antocianinas se transforman en la *base quinona* (AO) de color azulado, variando desde el malva hasta el azul con valores de pH superiores a 4.0, e incluso llegando a tomar un color amarillo con pH superiores a 7.0, siendo todas estas reacciones reversibles.

Por otra parte, el nivel de oxidación del vino hace que las antocianinas permanezcan en forma de *catión flavilio* (A+), cuando el potencial redox es elevado, pudiendo transformarse de manera reversible en la forma *base carbinol* (AOH) incolora, produciéndose una disminución del color del vino tinto en las condiciones de reducción. Este fenómeno se manifiesta en los vinos recién fermentados, donde su color se ve atenuado, apareciendo una mayor intensidad en la fase de crianza oxidativa. A partir de la base carbinol incolora (AOH) y por una reacción de tautomería, se pueden transformar las antocianinas en *calconas* (C) en sus formas cis y trans, de coloración amarilla, también de forma reversible, e inducidas por las temperaturas elevadas; razón por la cual en la crianza de los vinos conviene que la temperatura sea constante y reducida entre valores de 12° y 15°C. Cuando sobre las calconas se induce una oxidación, éstas pasan de manera irreversible hacia ácidos fenólicos incoloros, produciéndose entonces una destrucción del color.

Brouillard y col.[26,27] han mostrado que esos colores son el reflejo de los equilibrios entre cuatro grupos de estructuras. Fig. N°19.

La importancia de las antocianinas se ve reflejada en sus propiedades ya que se utilizan como colorantes en comidas y bebidas cuyo pH esté por debajo de 4 [28].

La relación entre los diferentes antocianos presentes en un vino tinto varía con la variedad de uva. Además, la cantidad global de antocianos varía notablemente de un año a otro, pero representan siempre aproximadamente la mitad del contenido total fenólico presente en las células de la piel. A todo ello hay que añadir que los niveles relativos de antocianos pueden variar en función del terreno, de la temperatura y de las condiciones climáticas [29,30].

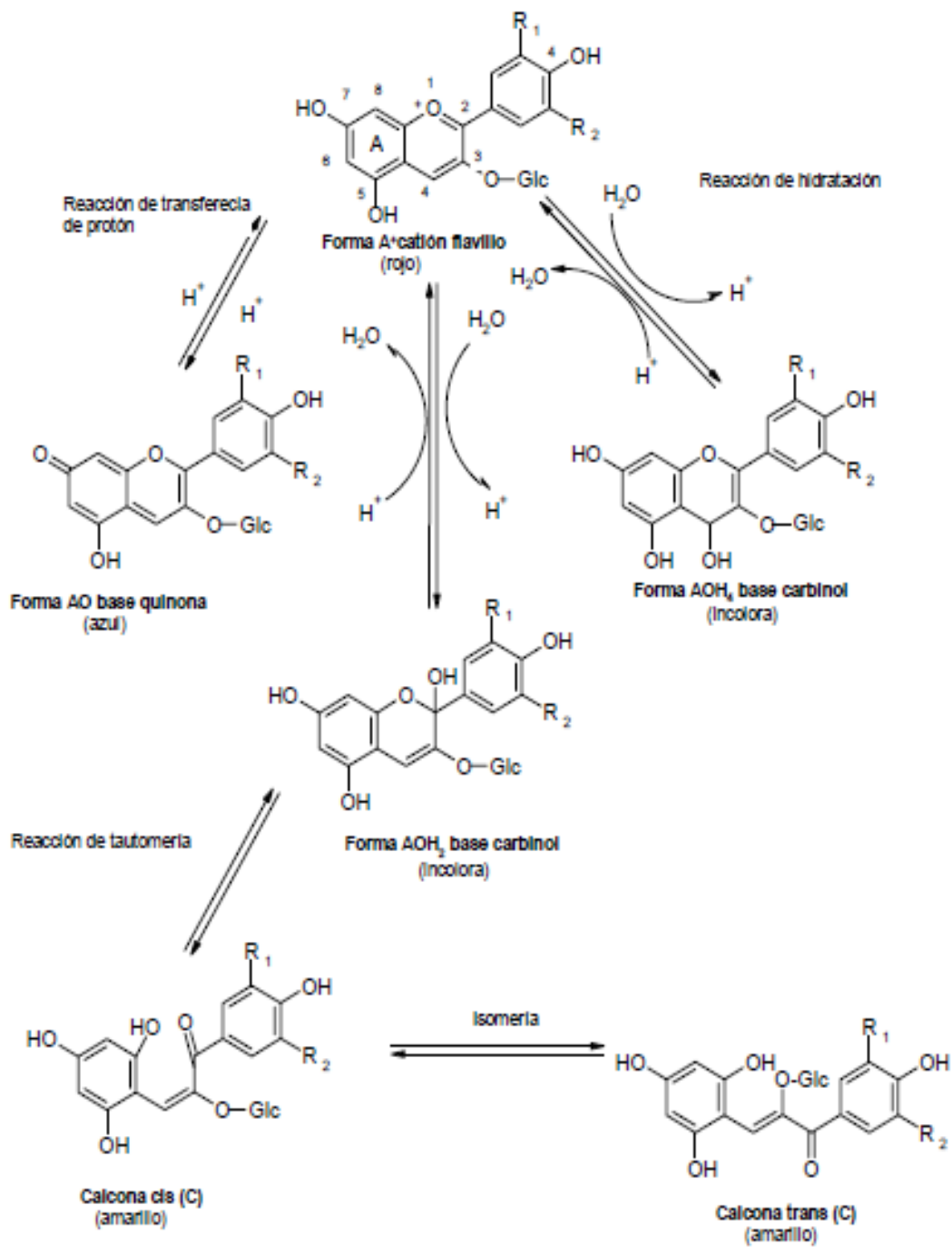


Fig. 19 Diferentes formas de las antocianinas

(Brouillard et al., 1978)

## B) TANINOS

El grupo de los taninos comprende compuestos fenólicos muy diferentes entre ellos, pero se caracterizan por ser sustancias capaces de dar combinaciones estables con las proteínas y con otros polímeros vegetales como los polisacáridos.

Este modo de actuar afecta, además de a las proteínas de los vinos, a su carga enzimática dado que los taninos se combinan con el apoenzima pudiendo inhibir la actividad enzimática. Esta es una explicación parcial de la mayor resistencia frente a la oxidación presentada por los vinos tintos con respecto a los blancos, precisamente también por una parcial inhibición de las enzimas oxidantes desarrollada por los taninos en los cuales los vinos tintos son particularmente ricos.

Desde el punto de vista químico, son moléculas fenólicas relativamente voluminosas, pudiendo por tanto formar complejos estables con las proteínas al establecer un número suficiente de enlaces; pero si la molécula de tanino se hace demasiado grande corre el riesgo de no poder acercarse suficientemente a los sitios activos de las proteínas para reaccionar, resultando un enlace mucho menos sólido.

Se puede decir que los enlaces más estables entre proteínas y taninos se obtienen para pesos moleculares de estos últimos comprendidos entre 600 y 3500.

Según la naturaleza de las moléculas elementales, se pueden clasificar en dos grandes grupos: los taninos hidrolizables (o gálicos) y los taninos condensados.

Los taninos contenidos naturalmente en la uva y en los vinos pertenecen sobre todo al segundo grupo, mientras que los utilizados como aditivos en el vino con fines tecnológicos o los presentes en el corcho de los tapones son del primer grupo.

a) *TANINOS HIDROLIZABLES* (o gálicos): comprenden a los galotaninos y a los elagitaninos, liberando por hidrólisis ácida respectivamente ácido gálico (Fig. 20) y ácido elágico (Fig. 21), y ambos contienen una molécula de glucosa. Los más abundantes pertenecen a los elagitaninos, donde destacan la vescalagina (Fig. 24) y la castalagina (Fig. 25), que al hidrolizarse se transforman respectivamente en vescalina (Fig. 22) y castalina (Fig. 23).

Estas sustancias son muy solubles en medios hidroalcohólicos como es el vino o las aguardientes [31]. Su oxidabilidad [32,33] y sus propiedades gustativas [34] les confieren un sabor característico a los vinos tintos y blancos criados en barricas de roble.

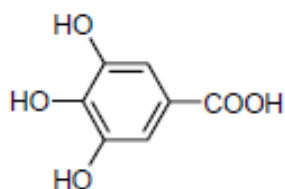


Fig. 20 Estructura del ácido gálico

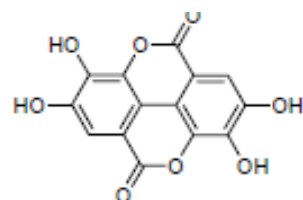


Fig. 21 Estructura del ácido elágico

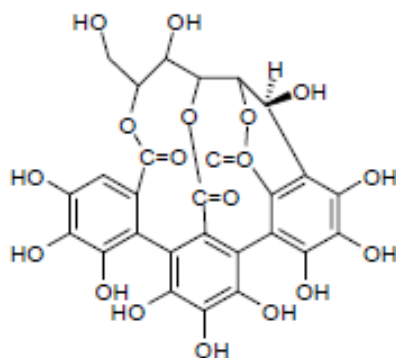


Fig. 22 Estructura de la vescalina

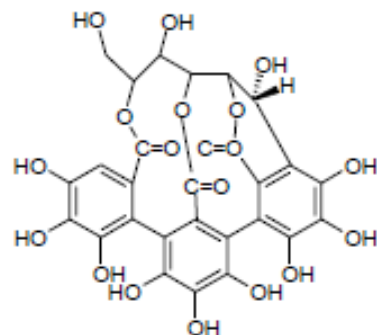


Fig. 23 Estructura de la castalina

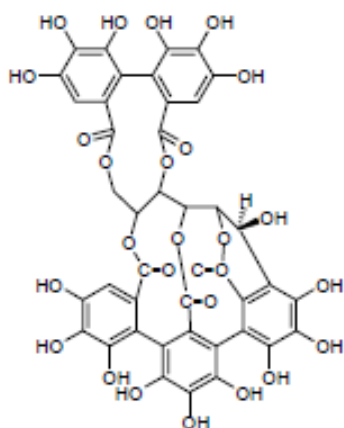


Fig. 24 Estructura de la vescalagina

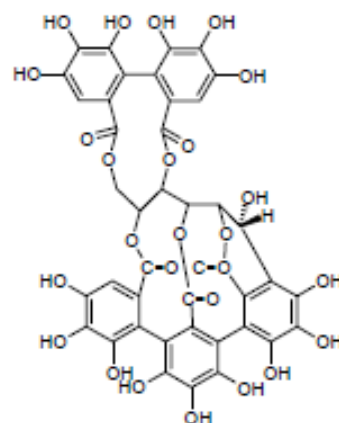
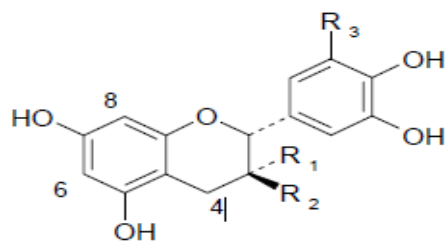


Fig. 25 Estructura de la castalagina

(Vivas, N., Glories, Y., 1993)

b) **TANINOS CONDENSADOS**: son polímeros más o menos complejos de flavan-3-oles o 3-flavanoles, también llamados catequinas. Estas sustancias se localizan principalmente en las semillas, aunque se han detectado también trazas de monómeros y dímeros en la pulpa [35,36].

Los principales 3-flavanoles monómeros de la uva cuya estructura puede observarse en la Fig. 26 son la (+)-catequina y su isómero la (-)-epicatequina, pudiendo encontrarse este último bajo forma de éster gálico (3-galato de epicatequina). La galocatequina [37], el 3-galato de catequina y el 3-galato de galocatequina [38] han sido igualmente puestos de manifiesto, pero parecen específicos de ciertas variedades del género *Vitis*.



**Fig. 26 Estructura de los flavanoles monómeros de la uva**

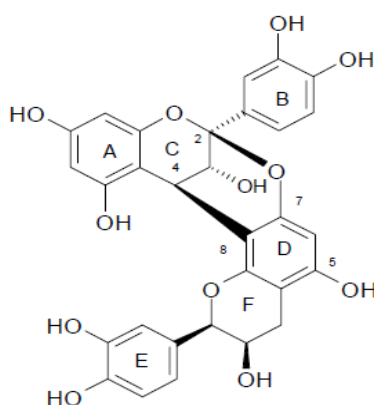
**Tabla 5. Catequinas más importantes en enología**

Nombre	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Catequina	H	OH	H
Galocatequina	H	OH	OH
Epicatequina	OH	H	H
Epigalocatequina	OH	H	OH

(Bourzeix, M., Weyland, D., Heredia, N., 1986)

Otros taninos más complejos derivados de los anteriores son las procianidinas dimeras, que se agrupan en dos categorías, designadas por una letra del alfabeto y por un número [39,40]: procianidinas tipo A (C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>12</sub>) y las procianidinas tipo B (C<sub>30</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>), siendo las primeras las más abundantes en la uva:

- Las procianidinas tipo A (Fig. 27) son dímeros que poseen además de la unión interflavano C4-C8 o C4-C6, un enlace éter entre los carbonos C5 o C7 de la unidad terminal y el carbono C2 de la unidad superior.



**Fig. 27 Estructura de la procianidina dímica A<sub>2</sub> (Vivas y col. [70])**

(Vivas, N., Glories, Y., 1996)

Las procianidinas tipo B (Fig. 28) son dímeros resultantes de la condensación de dos unidades de flavan-3-oles unidas entre ellas por intermedio de un enlace C4-C8 (B1 a B4) o C4-C6 (B5 a B8).

En la Tabla 6 se encuentran reflejadas algunas de las procianidinas tipo B.

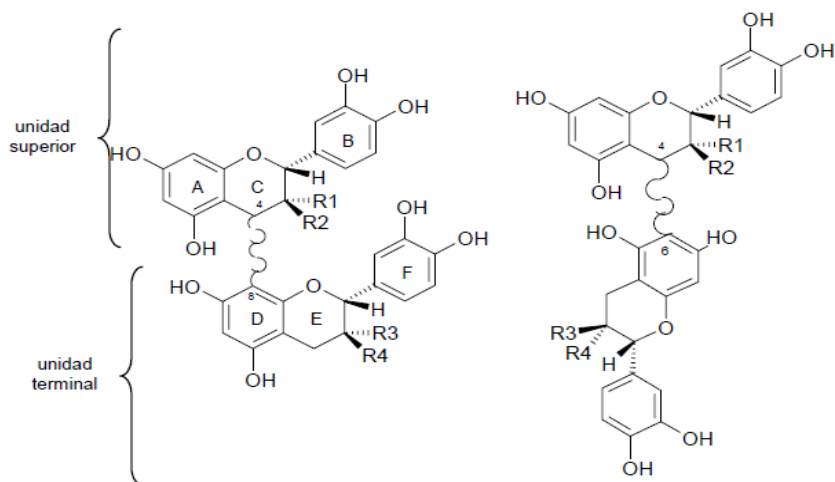


Fig. 28 Estructura de las procianidinas dímeros de tipo B (de Freitas [78])

(de Freitas, V., 1995)

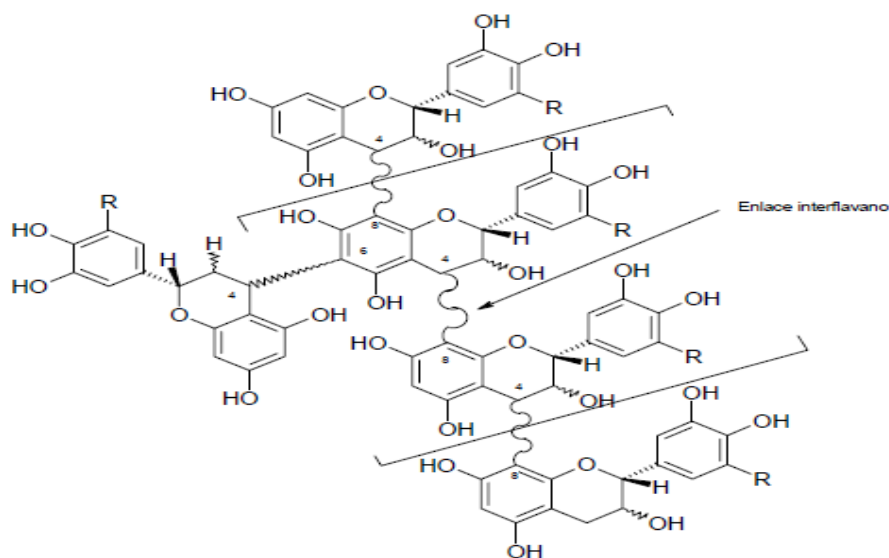
Tabla 6. Procianidinas dímeros tipo B

Nombre	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<b>B1</b> :2,3-cis-3,4-trans-2'',3''- trans[2R,3R,4R,2''R,3''S]epicatequina-(4β→8)-catequina	OH	H	H	OH
<b>B2</b> :2,3-cis-3,4-trans-2'',3''- cis[2R,3R,4R,2''R,3''R]epicatequina-(4β→8)-epicatequina	OH	H	OH	H
<b>B3</b> :2,3-trans-3,4-trans-2'',3''- trans[2R,3S,4S,2''R,3''S]epicatequina-(4β→8)-catequina	H	OH	H	OH
<b>B4</b> :2,3-trans-3,4-trans-2'',3''- cis[2R,3S,4S,2''R,3''R]catequina-(4α→8)-epicatequina	H	OH	OH	H
<b>B5</b> :2,3-cis-3,4-trans-2'',3''- cis[2R,3R,4R,2''R,3''R]epicatequina-(4β→6)-epicatequina	OH	H	OH	H
<b>B6</b> :2,3-trans-3,4-trans-2'',3''- trans[2R,3S,4S,2''R,3''S]catequina-(4α→6)-catequina	H	OH	H	OH
<b>B7</b> :2,3-cis-3,4-trans-2'',3''- trans[2R,3R,4R,2''R,3''R]epicatequina-(4β→6)-catequina	OH	H	H	OH
<b>B8</b> :2,3-trans-3,4-trans-2'',3''- cis[2R,3S,4S,2''R,3''R]catequina-(4α→6)-epicatequina	H	OH	OH	H

Existen también procianidinas trómeras que se clasifican en dos categorías:

- Las procianidinas de tipo C son trímeros cuyas dos uniones interflavanas corresponden al tipo B de los dímeros.
- Las procianidinas de tipo D son trímeros en los cuales un enlace interflavano es de tipo B y el otro de tipo A.

Las procianidinas oligómeros (Fig. 29) son polímeros mucho más complejos, formados por 3 a 10 unidades de flavanoles relacionadas por uniones C4-C8 ó C4-C6, así como las procianidinas condensadas, formadas por más de 10 unidades flavanoles, alcanzando un peso molecular superior a 3000.



**Fig. 29 Estructura de las procianidinas condensadas**

(Bate-Smith, 1954)

Estas moléculas en medio ácido y caliente presentan la propiedad de liberar carbocationes, fuertemente inestables, por ruptura de las uniones intermonoméricas [42] transformándose en productos de condensación pardos y sobre todo en cianidina roja, de ahí el nombre de "procianidina" (proantocianidina o proantocianidol). Antiguamente estas sustancias eran conocidas erróneamente como leucoantocianos o leucocianidoles.

En las pepitas los taninos se encuentran menos condensados, con un grado de polimerización cercano a 10, mientras que los hollejos son más complejos y con un grado de polimerización cercano a 30 [43,44], encontrándose casi siempre una mayor cantidad de taninos en las pepitas. Los taninos de los hollejos se diferencian de los de las pepitas por la



presencia de epigalocatequina, por tener un mayor grado de polimerización y por poseer una menor proporción de unidades de ácido gálico.

En los vinos el contenido en taninos es muy variable, en el vino tinto depende del cepaje y de las condiciones de vinificación, oscilando de 1 a 4 g/L. En el caso del vino blanco va desde 0.1 a 0.3 g/L.

### C) FLAVONOLES

Están únicamente presentes en los hollejos, bajo forma de glucósidos en posición 3. [7, 45,46]

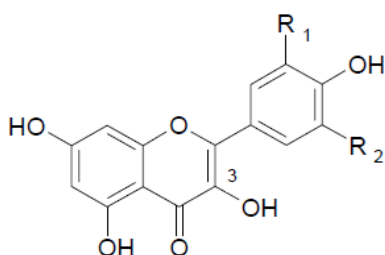


Fig. 30 Estructura de los flavonoles de mayor importancia enológica

Tabla 7. Flavonoles más importantes en enología

Nombre	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Kempferol	H	H
Quercetina	OH	H
Miricetina	OH	OH

(Ribéreau- Gayón, 1964)

Son pigmentos de color amarillo que se encuentran tanto en los vinos blancos como en los tintos. Las cantidades de flavonoles en los vinos blancos son tan pequeñas que no influyen en el color. Por el contrario, en los vinos tintos la proporción de flavonoles es notablemente más alta (hasta unos 15-20 mg/L).

Las agliconas de los flavonoles están presentes en los vinos tintos después de algunos meses de la vinificación, mientras que en la uva están presentes sus glicósidos, los cuales después se hidrolizan en el vino. En la uva se han caracterizado ocho flavonoles monoglicósidos y tres diglicósidos. Las formas glucosiladas son las más abundantes, pero también se encuentran galactosa, xilosa y arabinosa (sobre todo en los diglicósidos).

#### 1.5. Contenido polifenólico y actividad antioxidante

La composición del vino es compleja. La comparación de la composición fenólica de la uva y del vino muestra que junto a las moléculas directamente procedentes de la baya, aparecen en el vino otros fenoles. Estos constituyentes específicos del vino comprenden en particular los compuestos procedentes de las etapas fermentativas, pero también comprenden numerosos productos resultantes de la evolución de los polifenoles nativos de la baya de uva.

Los compuestos polifenólicos de la uva se encuentran en la piel, especialmente en las células epidérmicas, y en las pepitas. Su concentración es baja en la pulpa. La cantidad y calidad de polifenoles en la uva depende principalmente de la variedad de la vid, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo [80, 47, 48], aunque el envejecimiento en madera también aporta pequeñas cantidades de polifenoles al producto final [79].

El color del vino tinto se debe a la presencia de las antocianinas, en forma libre y combinadas a las procianidinas, que contribuyen a los componentes rojo, amarillo y azul del color del vino, en función del pH del medio [26, 49, 50] y también a las procianidinas y flavonoles que contribuyen al componente amarillo [51].

Durante el almacenamiento y envejecimiento de los vinos tintos tienen lugar cambios progresivos de los compuestos polifenólicos extraídos inicialmente de las uvas. En sistemas de disoluciones modelo, se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de estos fenómenos complejos así como de los mecanismos implicados en esas transformaciones y de las estructuras químicas de los compuestos resultantes [52- 61]. Los cambios producidos en el color de los vinos tintos en estas etapas, se atribuyen a la formación progresiva de pigmentos condensados resultantes de la interacción entre antocianinas y otros compuestos fenólicos, especialmente flavanoles tales como catequinas y procianidinas (taninos condensados). En la formación de esos nuevos pigmentos se ha sugerido que intervienen diferentes mecanismos: fenómenos de copigmentación [62-66], condensación directa entre antocianinas y flavanoles [52, 67-70] y reacciones entre ellos mediadas por acetaldehído [53, 71-78].

La polimerización de las procianidinas da lugar a una disminución del gusto amargo [81,82] y de la astringencia, y también a un incremento del componente amarillo del color [83].

## **1.6. 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 SO<sub>2</sub>, 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.

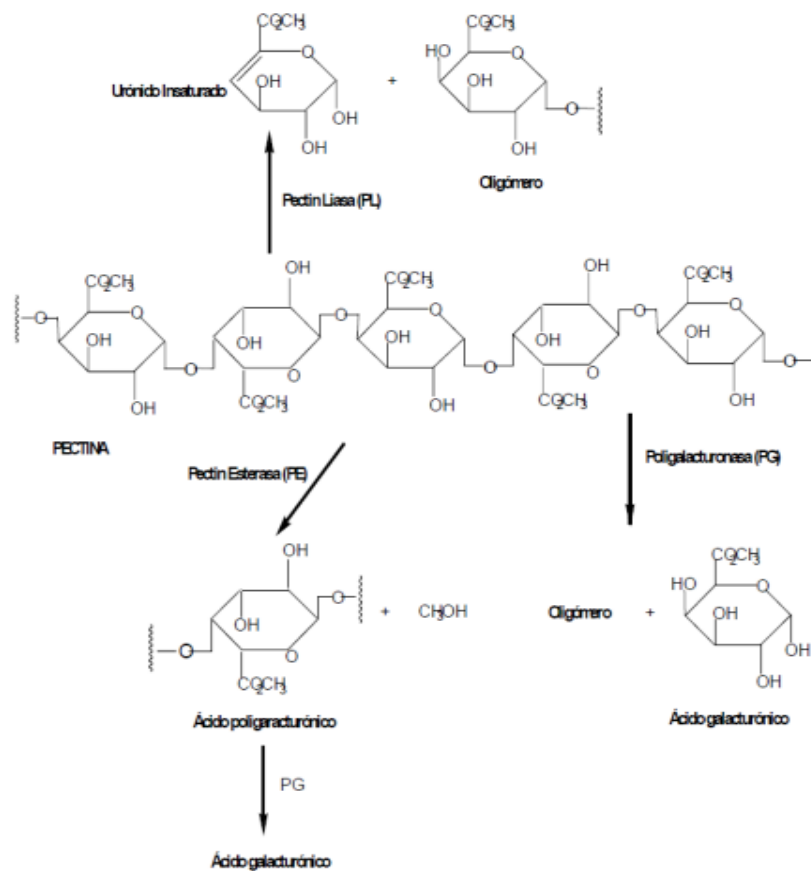
### **1.6.1. Acción de los enzimas**

Las 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 pécticas, que pueden diferenciarse según su acción sobre los diferentes sustratos (Figura N° 31).

Fig. N° 31 Acción de las pectinasas



(Amrani-Joutei et al., 2003)

La pectinesterasa (PE) rompe los enlaces del grupo metilo de pectinas altamente metoxiladas. La poligalacturonasa (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 pectinliasa (PL) actúa al azar en la cadena para despolimerizar a los poligalacturanos rompiendo los enlaces entre moléculas metiladas. La pectatoliasa (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  $\alpha$ -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  $\beta$ -1,4 o  $\beta$ -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 endoarabinasa 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  $\beta$ -1,4 y  $\beta$ -1,6 de la cadena de galactano. (Pellerín y Brollouet, 1994). La endo-glucanasa rompe los enlaces  $\beta$ -1,3-D-glucosilo y  $\beta$ -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  $\beta$ -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 endoglucanasa, exo-glucanasa y celobiasa. La endo-glucanasa escinde las cadenas de celulosa amorfa, hidrolizando al azar los enlaces de glucosa  $\beta$ -1,4. La exo-glucanasa libera celobiosa y glucosa a partir del extremo terminal de las cadenas de glucosa, rompiendo los enlaces  $\beta$ -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  $\alpha$ -galactosidasa tiene acción exo-, actuando sobre los enlaces  $\alpha$ -1,4 de las cadenas laterales de los ramnogalacturonanos tipo II, los galactoglucomanos 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  $\beta$ -galactosidasa actúa sobre los enlaces  $\beta$ -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).

### 1.6.2. 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 exógenas, también conocidas 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 exógenas 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  $\beta$ -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 pectolíticas 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

### **1.6.3. Extracción de los compuestos fenólicos y estabilidad del color del vino**

El color del vino tinto y su posterior estabilidad se deben principalmente a la presencia de antocianos y taninos. Estos compuestos se extraen de la uva durante el proceso de elaboración del vino y se irán modificando a lo largo del tiempo. Todas las modificaciones que se dan en el color del vino, y en otras características asociadas a los compuestos fenólicos, dependen de numerosos factores. La estabilidad del color será función, entre otros, del grado de extracción de antocianos y taninos, de las condiciones del medio y de las posteriores modificaciones de estas moléculas durante el envejecimiento. El vino tinto es un vino de maceración, dándose una extracción fraccionada de la uva (Peynaud, 1984). Los compuestos fenólicos se encuentran localizados en diferentes partes de la uva y presentan distinta solubilidad y capacidad de difusión, en función de la fase acuosa o alcohólica presente en el medio, así como de la mayor o menor disgregación de las paredes celulares del hollejo. En función de las condiciones del medio como pH, presencia de dióxido de azufre o de cofactores, y de las condiciones de vinificación como tiempo de maceración, remontado y temperatura, el color del vino y su estabilidad cambiarán. Las modificaciones que se dan durante el envejecimiento como la evolución del color hacia tonos más teja y la pérdida de astringencia, se deben a transformaciones de degradación y estabilización de los compuestos fenólicos. Las reacciones de estabilización tienen su origen, la mayoría de las veces, en la formación de combinaciones entre antocianos y taninos. Así, el color de los vinos tintos es debido a la presencia, además de los antocianos libres, de combinaciones polifenolantocianos, más concretamente de tipo tanino-antocianos y de taninos condensados y de fenómenos de copigmentación.

La calidad de un vino está condicionada por la calidad de la uva. Ésta marca un potencial, y a partir de él, lo único que se puede hacer es trasladarlo al vino. La calidad en la uva viene marcada por factores intrínsecos, como son la variedad y el suelo, y por otros culturales que van a condicionar su producción, composición, estado sanitario e integridad (García-Escudero y Zaballa, 1997; Sella et al, 1998; Yáñez et al., 1998; Mateus et al., 2002).

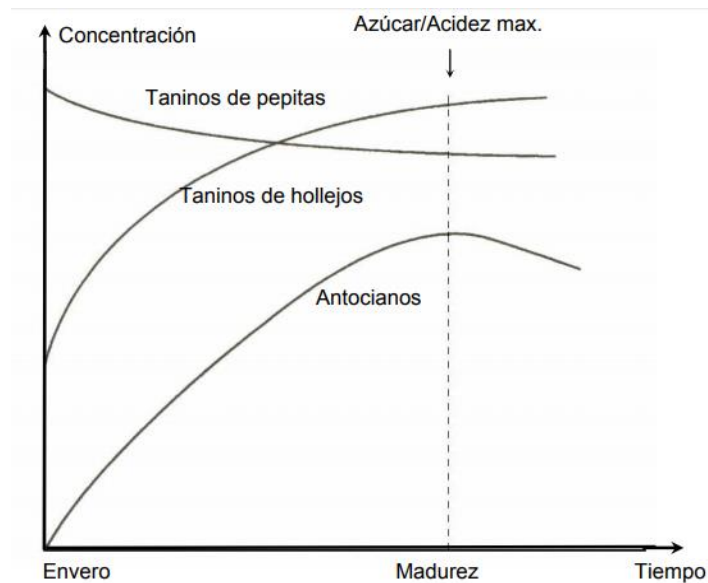


Fig. N° 32 Evolución del contenido en antocianos y taninos durante la maduración (Glories, 1999)

El estado de madurez de la uva va a condicionar el vino que se obtendrá y sus características. La concentración de polifenoles tiende a aumentar durante toda la maduración, aunque no linealmente (Figura N° 32). Los antocianos aparecen durante el envero y se acumulan durante la maduración (Glories, 1999), 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 (Fernández-López et al., 1992; Sella et al., 1998; Mazza et al., 1999). Así mismo, se ha constatado que la extracción de los compuestos fenólicos no depende únicamente de la cantidad en la que éstos se encuentren en la uva. Las paredes celulares van a formar una barrera a la difusión de antocianos, taninos y otros polifenoles de la uva al vino (Lecas y Brillouet, 1994; Kennedy et al., 2001). El proceso de maduración implica una solubilización de los polisacáridos de la pared celular del hollejo. La degradación de la pared celular durante la maduración facilitará, de esta manera, la extracción de la materia colorante durante la vinificación (Amrani Joutei y Glories, 1994). Los análisis clásicos de maduración (peso de 100 granos, grado Baumé, acidez total, pH, ácido tartárico y ácido málico) proporcionan información de la madurez de la pulpa, pero no sobre la de la piel ni de la pepita (Fernández et al., 2003). Para cubrir este vacío surge el concepto de madurez fenólica (Glories y Augustin, 1993; Amrani Joutei y Glories, 1994; Izcarra y González-San José, 2001), que va a tener en cuenta el contenido total de compuestos polifenólicos (Lamadon, 1995) y su facilidad de extracción del hollejo y de la pepita de la uva (Saint-Cricq et al., 1998).

Teniendo en cuenta tanto el contenido como la capacidad de difusión de los compuestos fenólicos, se podría adaptar la estrategia de vinificación, en función de los vinos que se pretendan elaborar (Glories, 1999 y 2001). Además, el estudio del potencial fenólico podría permitir anticipar problemas potenciales en la estabilidad y pardeamiento del vino (Mayen et al., 1995).

### 1.6.3.1. Maceración

Es en el periodo de maceración de los hollejos con el mosto-vino cuando los compuestos fenólicos de la uva van a difundir al vino. Sólo una parte del total de los fenoles de la uva serán extraídos de las diversas fuentes como las pieles, las semillas y la pulpa (Singleton y Draper, 1964; Kantz y Singleton, 1991; Boulton, 1995; Klenar et al., 2004). La extracción de los compuestos fenólicos durante la maceración sigue una curva exponencial simple. Los antocianos difunden siguiendo modelo 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, aunque el proceso total es más complejo. Los antocianos monómeros, cuya disolución no necesita la presencia de etanol, son extraídos en primer lugar, alcanzando un máximo en los primeros días de la fermentación para después decrecer (Bautista-Ortín, 2005). Esta disminución puede ser debida a una degradación de las moléculas, a una adsorción en las paredes de las levaduras (Morata et al., 2003) y partes sólidas de la uva (Bourzteix, 1970) y a una inclusión en cristales de bitartrato potásico. Así mismo, los antocianos pueden polimerizarse con la procianidinas de la uva y/o reaccionar con otros compuestos del vino como el ácido pirúvico, el acetaldehído, etc. Estas polimerizaciones y reacciones van a ser importantes para la estabilidad del vino, puesto que protegerá a los antocianos de degradaciones (Sims y Bates, 1994; Cheynier, 2003; Fulcrand et al., 2006).

La disolución de los taninos de los hollejos empieza conjuntamente a la de antocianos, aunque se desarrolla más lentamente y se va a ver favorecida en el momento de la aparición del etanol (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. Al pH del vino hay una formación y ruptura de enlaces entre flavanoles continua (Cheynier et al., 2000). Teniendo en cuenta esta variabilidad, se podrá cambiar el tiempo de maceración en función del tipo de vino que se desee obtener. Se emplearán maceraciones cortas para la obtención de vinos jóvenes, con color suficiente y poco tánicos (Gil-Muñoz et al., 1999; Gómez-Plaza et al., 2000a y 2001; Zamora, 2003). El tiempo de maceración se alargará, en la elaboración de vinos con envejecimiento, para obtener la estructura necesaria y poder garantizar la estabilidad del color (Auw et al., 1996). Estos vinos suelen pasar un tiempo de afinamiento en botella, por lo que con el aumento del tiempo de maceración la astringencia no tiene por qué volverse excesiva e incluso puede disminuir después de este periodo (Scudamore-Smith et al., 1990; Sims y Bates, 1994).

### 1.6.3.2. Condiciones del medio

pH. El color de los antocianos en disolución es dependiente del medio en el que se encuentren. Estos equilibrios están regulados por el pH de la solución (Figura N ° 33). Cuando el pH del medio es bajo, la molécula se encuentra en forma de catión flavilium de color rojo vivo. A medida que el pH se eleva, los antocianos se transforman en una base quinónica (AO) de color azulado, variando el color desde el malva al azul, e incluso amarillo, a valores de pH superiores a 7. Todas estas reacciones son reversibles (Ribéreau Gayon et al., 1998a).

Entre los factores de extracción de los polifenoles pueden citarse la fuerza con que está retenida la sustancia, la afinidad entre soluto y solvente, el tiempo de extracción, la temperatura, la presencia de coadyuvantes, como SO<sub>2</sub> o enzimas pectolíticas y la manipulación de las partes sólidas.

Una forma clásica de expresar la extracción de una sustancia ha sido mostrar cómo varía su concentración en el mosto-vino durante la maceración y tratar de establecer un patrón. Debe tenerse en cuenta que, la variación de la concentración no sólo depende del



grado de extracción o ganancia, sino también del ritmo de pérdida. Esta pérdida puede producirse por destrucción oxidativa, por precipitación o por adsorción, y ser más o menos intensa.

En medio acuoso, y al pH del vino (3-4), los cationes flavilium están también en equilibrio, a través de fenómenos de transferencia de protones y de reacciones de hidratación, con compuestos de adición incoloros (hemiacetal). El hemiacetal, en equilibrio con su isómero abierto (cischalcona), es en realidad la forma más abundante de la malvidina-3-glucósido en un medio acuoso a pH entre 2 y 7. Finalmente, cuando las chalconas sufren oxidación, pasan de manera irreversible hacia ácidos fenólicos incoloros, produciéndose una destrucción del color. En vinos con un pH elevado el color tenderá a ser menos vivo, más apagado, mientras que a pH más ácidos las tonalidades lo harán hacia otras más rojizas.

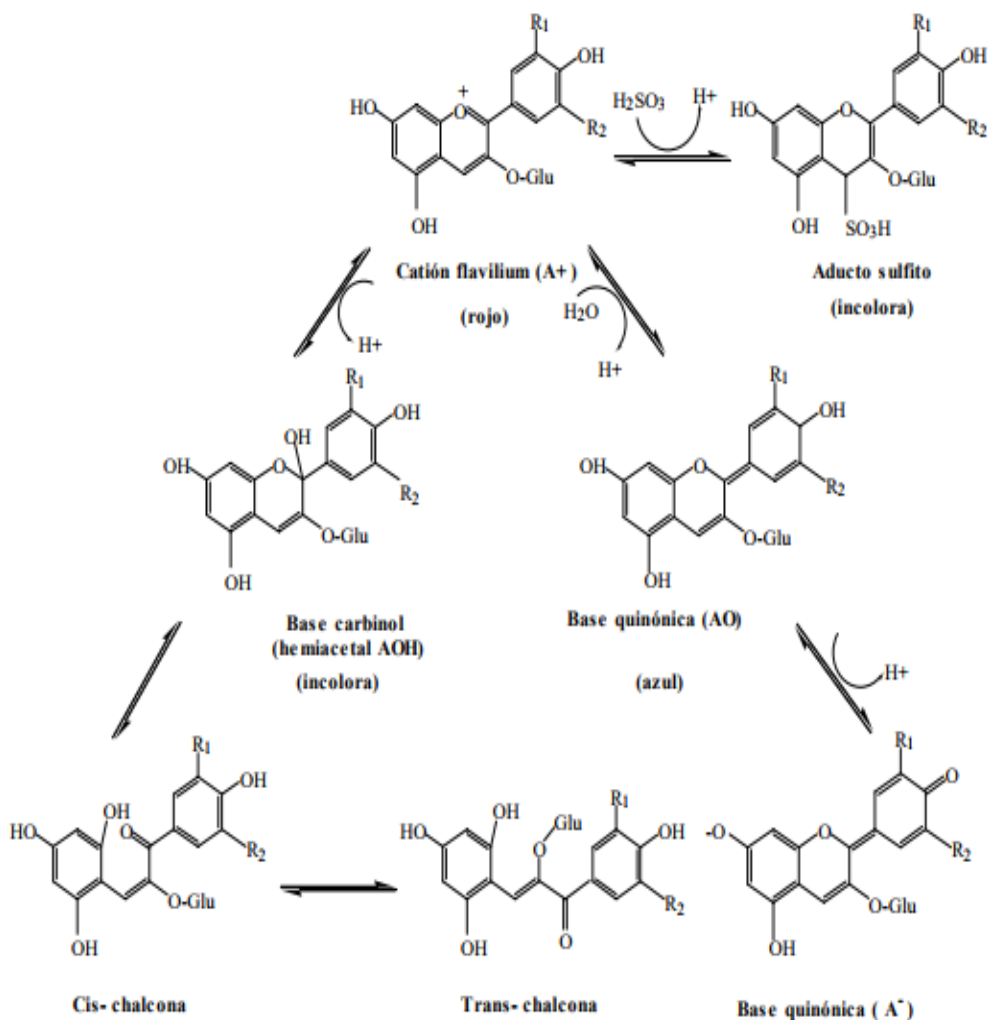


Fig. N° 33 Cambios en la estructura de los antocianos en un medio acuoso y en función pH. (Brouillard, R., Delaporte, B., Dubois, J.E., 1978)

### 1.6.3.3. Presencia de dióxido de azufre

La habilidad del  $\text{SO}_2$  para extraer antocianos, debido a que ayuda a la degradación de las estructuras de la piel, es conocida desde hace tiempo, y muchos métodos de obtención de antocianos de los orujos utilizan grandes cantidades de éste (Mazza, 1995). Este efecto es más importante en vinos procedentes de vendimias afectadas por podredumbre, puesto que, además de permitir una mayor solubilización de los compuestos fenólicos, el dióxido de azufre evitará su oxidación debida al enzima lacasa presente en este tipo de vendimias (Ribéreau-Gayon et al., 1998b). La presencia de dióxido de azufre en los vinos tintos produce también una decoloración de los antocianos. Al pH del vino, la mayor parte del dióxido de azufre libre se encuentra bajo la forma de anión  $\text{HSO}_3^-$ , que se combina con los antocianos bajo la forma de catión flavilium, produciéndose un complejo incoloro. Transcurrido un cierto tiempo se produce una ruptura de este compuesto, por lo que la pérdida de intensidad de color será temporal.

### 1.6.3.4. Fenómeno de copigmentación

La copigmentación es un fenómeno debido a asociaciones moleculares entre pigmentos y otras moléculas orgánicas (normalmente no coloreadas) en solución (Boulton, 2001). En general, esto resulta en un aumento de la absorbancia (efecto hipercrómico) y, en ciertos casos, en un cambio en la longitud de onda del máximo de absorbancia del pigmento (efecto batocrómico). Los antocianos pueden unirse de forma no covalente con otros compuestos fenólicos presentes en el medio, los cuales pueden ser otra molécula de antociano (autoasociación o copigmentación intramolecular), u otra molécula diferente (Asen et al., 1972; Haslam, 1980; Chen y Hrazdina, 1981; Liao et al., 1992; Mailen-Aubert et al., 2001; Gómez Mínguez et al., 2006; Gris et al., 2007) como los ácidos cinámicos, flavanoles y flavonoles y sus glicósidos (copigmentación intermolecular).

Estos compuestos reciben el nombre de cofactores o copigmentos. El resultado que se produce es, como ya se ha comentado, un aumento de la cantidad de color, así como un cambio de tonalidad hacia el color púrpura y azul (Vivar-Quintana et al., 2002). El incremento en la intensidad y estabilidad del color, resultante de la copigmentación, es debido a un cambio en el equilibrio de la hidratación hacia formas flavilium, que luego son atrapadas por los cofactores, o hacia bases quinónicas en los complejos antociano-copigmento (Figura N° 34). Entre los antocianos y los cofactores se forma una estructura en capas, en número variable de dos a diez. Esto es importante en el rango del pH del vino donde predominan las formas hidratadas de los antocianos, pues la inclusión de los cationes flavilium en los complejos de copigmentación desplaza el equilibrio hacia la formación de más cationes flavilium.

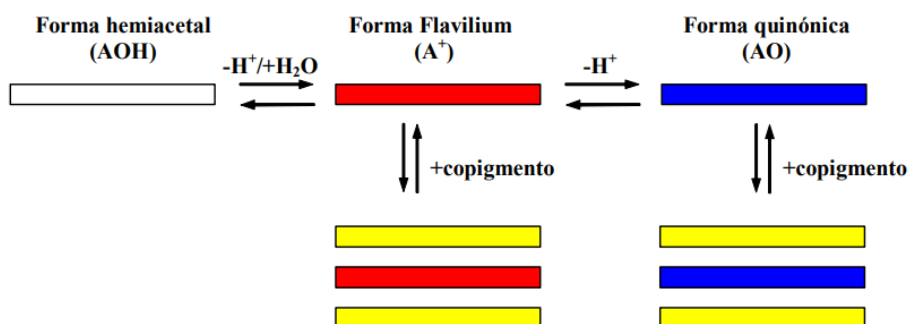


Fig. N° 34 Principio del proceso de copigmentación (Vivar-Quintana et al., 2002)

La copigmentación suele ser un efecto marcado en vinos jóvenes (Hermosín-Gutiérrez et al., 2005; Darías-Martín et al., 2007). Además, influye sobre las reacciones de oxidación, condensación y polimerización de sustancias fenólicas, ya que disminuye la cinética de las reacciones que se producen durante el envejecimiento de los vinos (Boulton, 2001). La cinética de las reacciones de oxidación depende de la concentración de sustancias fenólicas en forma libre, no de su concentración en valor absoluto. Determinados flavonoides son fuertes copigmentos y rápidamente participan en reacciones de copigmentación, lo que hace que la concentración en forma libre de tales compuestos disminuya y, de este modo, no estén disponibles para reacciones de oxidación y polimerización (Darias-Martín et al., 2001).

## **1.7. HIPOTESIS**

Es factible obtener un índice de color mayor con el agregado de enzimas pectolíticas comerciales.

## **1.8. Objetivos**

### **1.8.1. Objetivo General:**

- Evaluar el efecto de la adición de enzimas pectolíticas comerciales, sobre el color del vino elaborado con el cultivar Malbec.

### **1.8.2. Objetivos Particulares:**

- Medir el índice de color de los vinos elaborados

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

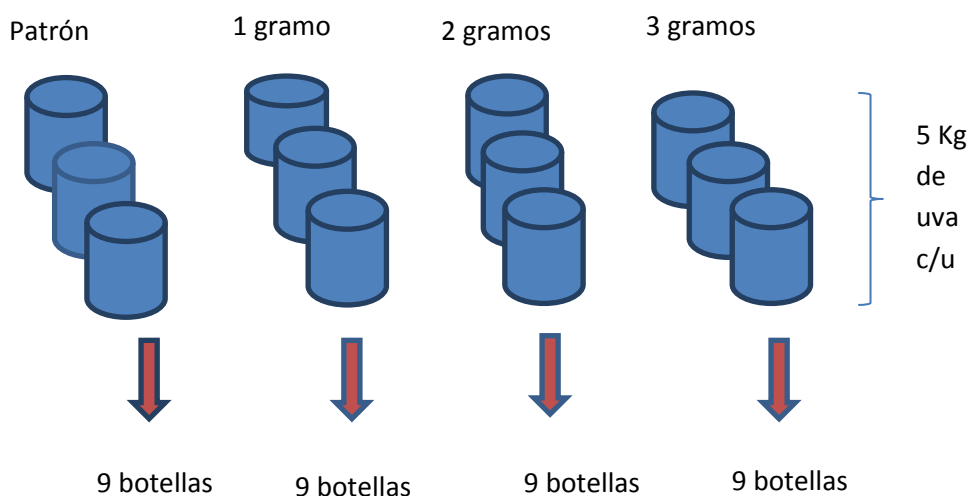
La elaboración de vinos tinto se llevó a cabo en el año 2015, con uvas tintas *Vitis vinífera* de variedad Malbec, provenientes de viñedos de la zona de Villa Atuel, San Rafael, Mza. Las plantas fueron sometidas a idénticos manejos culturales, poda, frecuencia de riego.

El rendimiento de la variedad fue de 9000 Kg/ ha, se encuentra conducida mediante espaldera alta. El sistema de poda utilizado es Guyot doble. Las hileras se encuentran emplazadas con orientación Norte-Sur.

Cuando se alcanzó una madurez entre 24-25° Brix en las uvas y una adecuada madurez fenólica de la fruta, la uva se recolectó a mano y fue transportada en cajas de 20 kg hasta la Bodega Experimental.

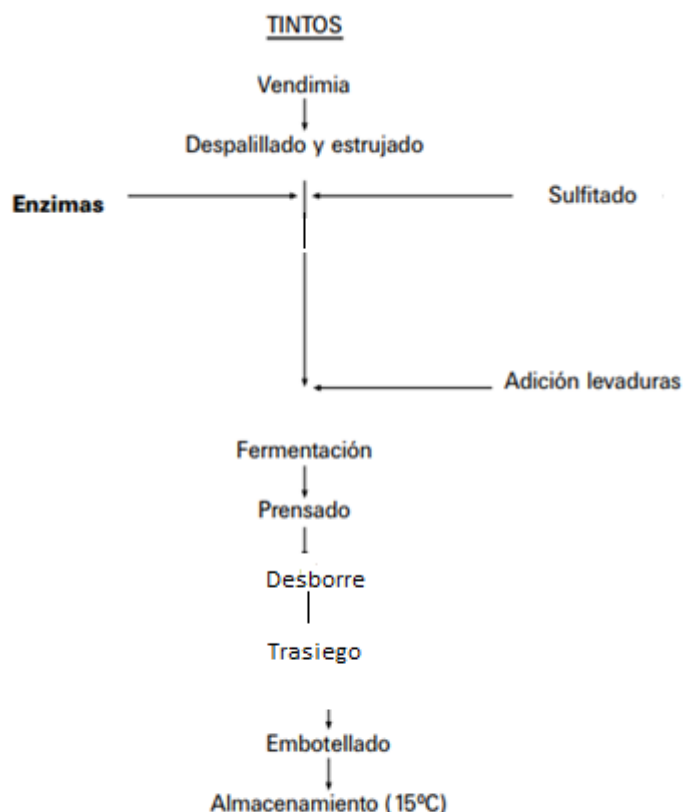
El lugar físico utilizado fue en Bodega Solandes SA, situado en calle Iriarte s/n, distrito de Villa Atuel, San Rafael, Mza.

Se realizaron cuatro (4) tratamientos con tres (3) repeticiones. Los tratamientos fueron: patrón o testigo y con el agregado de enzimas pectolíticas LALLYME EXV, con una concentración 1,2 y 3 g/ 100 kg de uva respectivamente, en el momento de la molienda.



La uva fue introducida en los tanques (5 kg/tanque), despalillada, estrujada y sulfitada a razón de 10 g/kg de  $\text{SO}_2$  (forma de bisulfito de Na). Se procedió a una corrección de acidez con ácido tartárico por 1g/Kg de uva ya que el pH del mosto era de 3.8; y también se adicionó de pie de cuba 15 g/hl de levadura seca (LALVIN EC 1118). La temperatura de fermentación se controló entre 23 y 27°C, realizándose medidas de temperatura y densidad del mosto diariamente hasta que llegó a 1 °Baumé. Se llevaron a cabo dos removidos diarios para favorecer la maceración que tuvo una duración de 8 días. Al finalizar de este período se procedió al descube de los orujos prensándose en una prensa mecánica, proporcionándole presión hasta el corte de gota por 10 minutos. Luego se colocó el vino en recipientes durante 30 días en oscuridad y a temperatura de 15°C, para que sedimenten las borras. Se realizó un solo trasiego. Tras este proceso, los vinos fueron embotellados y conservados en la Bodega Experimental a una temperatura constante de 15°C.

Una vez estabilizados los vinos se sometió al análisis físico- químicos, realizados en INV- Delegación San Rafael.



Esquema de elaboración de vinos estudiados

## 2.1. Variables en estudio

El valor de interés es el índice de color (IC), fue determinado con un espectrofotómetro VIS, con celdas de paso óptico de 1 mm y absorbancias a 420 nm y 520 nm. La IC, se calculó como la suma de la DO 420 más DO 520, dividido por la razón entre DO 420 y la DO520 por 1000.

Se realizaron las siguientes determinaciones:

1. Grado alcohólico, %  $v/v$ , mediante destilación y aerometría.
2. Masa Volumica a 20° C, mediante aerometría.
3. pH. Mediante potenciometría.
4. Acidez total, mediante titulación con Hidróxido de Sodio, expresado como Ac. Tartárico g/l
5. Acidez volátil, expresado en ácido acético g/l
6. Dióxido de azufre, mediante método Rippert
7. Índice de color con absorbancia a 420 nm y 520nm.

8. IPT, Índice de Polifenoles totales, absorbancia 280 nm en cubeta de cuarzo de 1mm, dilución 1:100 (Ribereau - Gayon)
9. Extracto seco g/l, densimétrico Resol. C45/2013, INV
10. Azucares reductores g/l, mediante método Fehling Causse Bonnans

## 2.2. Análisis estadístico

Los datos procesados se sometieron al análisis de la varianza, empleando la prueba múltiple de medias de Tukey. Las diferencias se expresaron con un nivel de confianza > 95 %.(alfa 0,05)

Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.

El análisis de la varianza compara las medias de los tratamientos, y establece si hay diferencias entre las medias. Si no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los distintos tratamientos, los tratamientos no son diferentes en cuanto a sus resultados.

El análisis de la varianza sólo puede ser utilizado si se cumplen ciertos supuestos básicos:

1) los datos provienen de una distribución normal

2) existe homogeneidad de varianzas entre los distintos tratamientos. El análisis de la varianza es un análisis paramétrico, ya que se calculan los parámetros de la población: media y varianza.

Al efectuar el análisis de la varianza, debe verificarse que los datos provengan de una distribución normal. Para ello se analizaron los coeficientes de asimetría y curtosis, así como la prueba de F para verificar la homogeneidad de varianzas. La asimetría es una medida del sesgo de la curva en relación a la curva normal, mientras que la curtosis indica el aplastamiento o esbeltez de la curva. La curva normal es simétrica y mesocúrtica (con una curtosis media).

Cuando los valores de asimetría y curtosis son menores de -2 ó mayores de +2, los datos no provienen de una distribución normal; F es un estadígrafo que surge de la distribución F de Fischer, y es un cociente de varianzas, si este cociente es mayor de 4, las varianzas no son iguales, por lo tanto, los datos no provienen de una distribución normal; en consecuencia, no es correcto emplear el análisis de la varianza. Deben aplicarse pruebas no paramétricas, que comparan las medianas en lugar de las medias, como lo hacen las pruebas estadísticas paramétricas.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los vinos obtenidos empleando distintas dosis de enzimas presentan diferente índice de color. En la tabla N° 1 se muestran los datos correspondientes.

**Tabla N° 1- Índice de color de los vinos obtenidos**

Tratamiento	Índice de Color
Testigo	1634,80 <sub>a</sub>
Enzimas Pect. 1g/HL	1755,47 <sub>b</sub>
Enzimas Pect. 2g/HL	1886,61 <sub>c</sub>
Enzimas Pect. 3g/HL	1603,58 <sub>a</sub>

Representa la media de cuatro tratamientos de seis repeticiones cada una, en vinos Malbec. Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de Tukey para una  $p \leq 0,05$ .

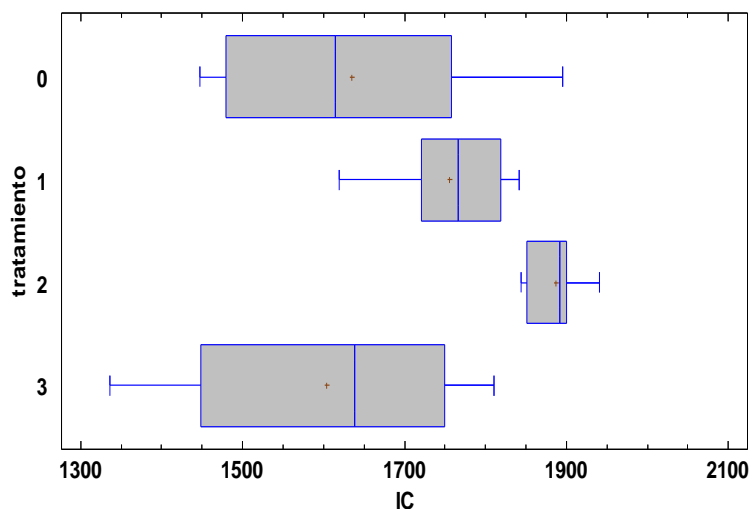


Figura N° 1: Índice de color de los vinos obtenidos. Diagrama de caja y bigotes

Se aprecia un aumento en el índice de color del vino obtenido con una concentración utilizada de enzima pectolítica 2 g/100 kg uva, con respecto al patrón. También se puede decir, que el índice de color aumenta respecto al patrón cuando se utiliza 1g de enzima pectolítica por 100 kg uva, pero no sucede lo mismo cuando se utiliza 3 g de enzima pectolítica comercial. Tal como lo indica en las especificaciones del fabricante de enzima; utilizar entre 1 g a 2 g/ 100 kg uva. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por (Ough y Berg, 1974; Ough y Crowell, 1979; Felix y Villettaz, 1983; Zent e Inama, 1992). Sacchi et al. (2005), que también han mostrado que los enzimas de maceración promueven

la extracción del color y mejora la calidad del vino tinto con un aumento en la extracción de antocianos, taninos poliméricos y aromas varietales. Haight y Gump (1994) observaron un incremento en el color de los vinos tratados con enzimas, pero sin mostrar diferencias significativas respecto el vino control. Los resultados obtenidos se contraponen con los obtenidos por otros investigadores, tales como Pardo et al., 1999; Watson et al., 1999; Delteil, 2000b; Canal-Llaubères y Pouns, 2002; Revilla y González-San José, 2002a y b, Wightman y Wrolstad, 1995 y Wightman et al., 1997. Estas contradicciones pueden deberse a la diferente naturaleza y actividades de los preparados comerciales enzimáticos, así como a la presencia de algunas actividades secundarias (como la  $\beta$ -glucosidasa o la fenol esterasa) en dichos preparados. Así, Álvarez et al. (2005) observaron que el uso de enzimas comerciales de extracción durante la maceración solamente generaba pequeños incrementos en el color y en la concentración de compuestos fenólicos, afectando adversamente a ciertas características sensoriales, como la astringencia y el amargor, que aumentaban. Zimman et al. (2002) encontraron que la aplicación de enzimas pectolíticas incrementaba la cantidad de proantocianidinas en el vino, pero no la intensidad de color. Bautista-Ortín et al. (2005 y 2006) también estudiaron la aplicación de enzimas en la vinificación de uvas obteniendo resultados contradictorios.

Los diferentes tratamientos enzimáticos generaron en los vinos diferencias en las variables Densidad óptica a 520 nm, y en consecuencia en la intensidad colorante y el tinte. En la tabla N°2 se presentan los datos correspondientes.

**Tabla N°2 - DO a 420 nm y 520 nm, Intensidad colorante y Tinte de vinos obtenidos**

<b>Tratamiento</b>	<b>DO a 420 nm</b>	<b>DO a 520 nm</b>	<b>Intensidad</b>	<b>Tinte/Tono</b>
<b>Testigo</b>	0,31 <sub>a</sub>	0,57 <sub>a</sub>	0,88 <sub>a</sub>	0,54 <sub>a</sub>
<b>Enzimas Pect. 1g/HL</b>	0,34 <sub>a</sub>	0,62 <sub>b</sub>	0,95 <sub>b</sub>	0,54 <sub>a</sub>
<b>Enzimas Pect. 2g/HL</b>	0,33 <sub>a</sub>	0,64 <sub>b</sub>	0,97 <sub>b</sub>	0,52 <sub>a</sub>
<b>Enzimas Pect. 3g/HL</b>	0,29 <sub>a</sub>	0,55 <sub>c</sub>	0,84 <sub>c</sub>	0,52 <sub>a</sub>

Representa la media de cuatro tratamientos de seis repeticiones cada una, en vinos Malbec. Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de Tukey para una  $p \leq 0,05$ .



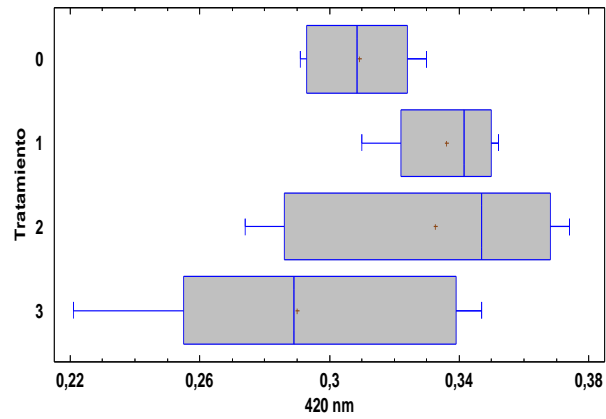


Figura N° 2: DO a 420 nm obtenidos. Diagrama de caja y bigotes

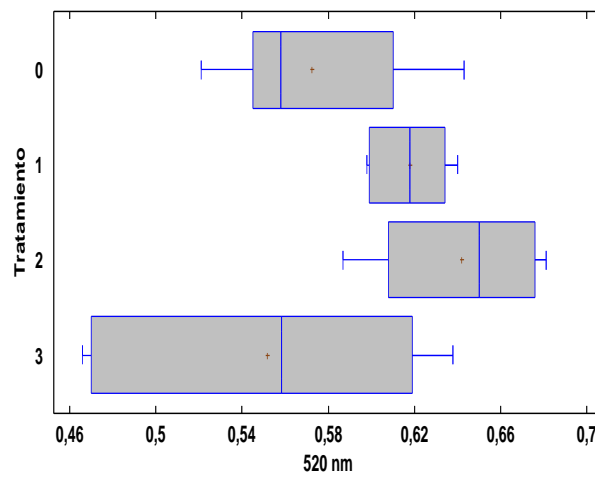


Figura N° 3: DO a 520 nm obtenidos. Diagrama de caja y bigotes

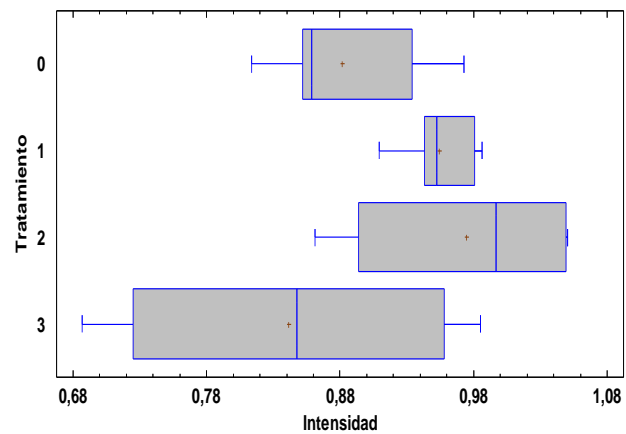


Figura N° 4: Intensidad obtenida. Diagrama de caja y bigotes

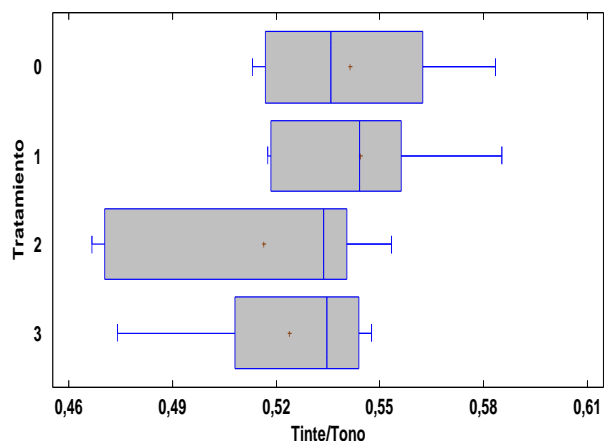


Figura N° 5: Tinte/ Tono obtenidos. Diagrama de caja y bigotes

En los valores de DO a 420 nm, que indican las características cromáticas del color amarillo, no se obtuvieron resultados con diferencias significativas. En cambio en los valores de DO a 520 nm, colores rojo, se aprecian diferencias significativas en aumento, para los tratamientos en que se utiliza enzima pectolítica comercial por 1g/100 kg y 2g/ 100 kg de uva. Este cambio se observa en la Intensidad y en consecuencia, mientras más grande es el valor de intensidad, más grande es el Índice de Color.

Por lo tanto, desde el punto de vista del color final del vino, la adición de enzimas pectolíticas aumenta la intensidad del color.

Los tratamientos enzimáticos aplicados generaron una diferencia en el Índice de polifenoles totales, tal como se indica en la tabla N°3

**Tabla N° 3- Índice de polifenoles totales de los vinos obtenidos**

Tratamiento	Índice de polifenoles totales
Testigo	43,12 <sub>a</sub>
Enzimas Pect. 1g/HL	47,33 <sub>b</sub>
Enzimas Pect. 2g/HL	44,17 <sub>a</sub>
Enzimas Pect. 3g/HL	43,00 <sub>a</sub>

Representa la media de cuatro tratamientos de seis repeticiones cada una, en vinos Malbec. Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de Tukey para una  $p \leq 0,05$ .

En el análisis gráfico de Caja y Bigotes se observa que las medias de todos los componentes son muy similares- pero se aprecia la diferencia de media entre cada tratamiento- y que no existen valores extremos, por lo que podemos decir que la distribución de estas variables es simétrica y por lo tanto se asumió normalidad, ya que los valores de sesgo estandarizado y curtosis estandarizada, de los 4 tratamientos en las distintas variables, se encuentra en el rango -2 a +2.

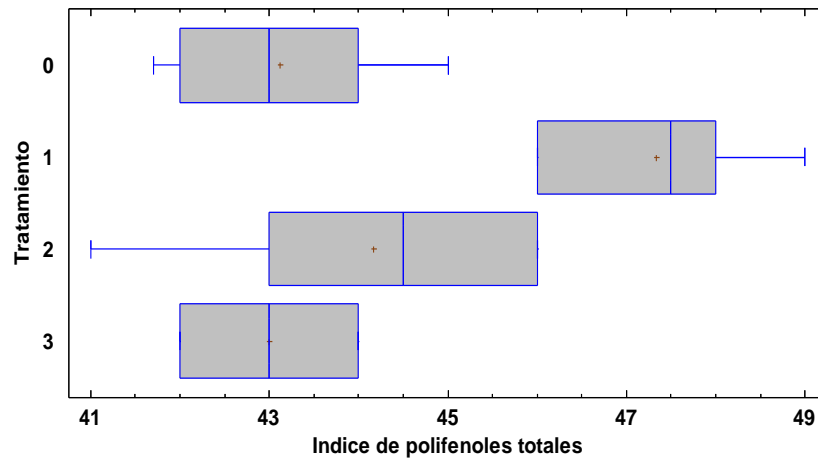


Figura N° 6: Índice de polifenoles obtenidos. Diagrama de caja y bigotes

La aplicación de distintas dosis de enzimas no generó cambios en los siguientes parámetros físico-químicos del vino: masa volúmica, alcohol etílico, extracto seco, acidez total, dióxido de azufre total y pH. Se registraron diferencias en los azúcares reductores y en la acidez volátil para los distintos tratamientos. Estos valores se presentan en la tabla N° 4.

**Tabla N° 4 - Datos analíticos complementarios de los vinos obtenidos**

<b>Tratamiento</b>	<b>Masa Volumica a 20°C</b>	<b>Alcohol % v/v, a 20°C</b>	<b>Extracto seco g/l</b>	<b>Azucares reductores g/l</b>	<b>Acidez total en tartárico g/l</b>	<b>Acidez volátil en acético g/l</b>	<b>Dióxido de Azufre total mg/l</b>	<b>pH</b>
<b>Testigo</b>	0,9929 <b>a</b>	14,07 <b>a</b>	33,20 <b>a</b>	2,03 <b>a</b>	4,89 <b>a</b>	0,27 <b>c</b>	97,00 <b>a</b>	4,01 <b>a</b>
<b>Enzimas Pect. 1g/HL</b>	0,9930 <b>a</b>	14,28 <b>a</b>	33,95 <b>a</b>	2,29 <b>b</b>	4,93 <b>a</b>	0,25 <b>b</b>	98,83 <b>a</b>	4,01 <b>a</b>
<b>Enzimas Pect. 2g/HL</b>	0,9922 <b>a</b>	14,22 <b>a</b>	31,73 <b>a</b>	2,31 <b>b</b>	4,88 <b>a</b>	0,16 <b>a</b>	85,33 <b>a</b>	4,12 <b>a</b>
<b>Enzimas Pect. 3g/HL</b>	0,9925 <b>a</b>	14,33 <b>a</b>	26,96 <b>a</b>	2,47 <b>b</b>	4,82 <b>a</b>	0,25 <b>b</b>	91,00 <b>a</b>	4,00 <b>a</b>

Representa la media de cuatro tratamientos de seis repeticiones cada una, en vinos Malbec  
 Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de Tukey para una  $p \leq 0,05$ .

Las diferencias en valores de Azucares reductores y Acidez Volátil, en los distintos tratamientos, pueden deberse a errores experimentales del método.

#### **4. CONCLUSIONES**

Se concluye que la adición de enzimas pectolíticas marca Lallzyme EX – V en la elaboración de vinos a partir de uvas cultivar Malbec aumenta el Índice de color, cuando las dosis empleadas son de 1 y 2 g/ 100 kg de uvas. La dosis de 3 g/100 kg de uvas no produjo mayor índice de color.

#### **5. INVESTIGACIONES FUTURAS**

Dado que el uso de una dosis de enzimas de 3 g/100 kg no generó el resultado esperado, debería investigarse el comportamiento de estas enzimas en dosis superiores a las propuestas por el fabricante.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mareca, I. Origen, composición y evolución del vino. *Ed. Alambra*. Madrid (1981).
- [2] De Miguel, M. *Anales de Bromatología*, 31, 131 (1996).
- [3] Dumarzert, G. *Ind. Aliment. Agric.* 91(1), 3 (1974).
- [4] García Torroso, C., Cela Torrijos, R., Perez Bustamante, J.A. Alimentación, equipos y tecnología. 99 Sep.-Oct. (1985).
- [5] Hidalgo, J. Tratado de Enología. *Ediciones Mundi Prensa*. Madrid, Barcelona, México (2003).
- [6] Cela Torrijos, R. Compuestos polifenólicos en los vinos: su importancia, su problemática analítica y su utilidad en el control y caracterización de los vinos. 1ª *Xornadas Técnicas sobre aspectos Sanitarios e Hixiénicos nas bebidas alcohólicas*. Xunta de Galicia (1990).
- [7] Ribéreau-Gayon, P. *Ann. Physiol. Vég.* 6, 211 (1964).
- [8] Ribéreau-Gayon, P. *Vinífera CR Acad. Sci.* 260, 341 (1965).
- [9] Ribéreau-Gayon, *Traite d'oenologic. Sciences et techniques du vin*, Ed. Dunod. Paris (1976).
- [10] Ibrahim, R. K., Towers, G. H. *Arch. Biochem. Biophys.* 87,125 (1960).
- [11] Galvin, C. *Thèse de Doctorat Enologie-Ampélogie*, Université de Bordeaux II (1993).
- [12] Singleton, V.L., Timberlake, C.F., Lea, A.G.H. *J. Sci. Food Agric.* 29, 403(1978).
- [13] Cheynier, V., Basire, N., Rigaud, J. *J.Agric. Food. Chem.* 37, 1069 (1989).
- [14] Cheynier, Rigaud, J., Moutounet, M. *J. Chromatography* 472, 428 (1989).
- [15] Romeyer, F.M., Macheix, J.J., Goiffon, J.J., Reminiac, C.C., Sapis, J.C. *J.Agric. Food Chem.* 31, 346 (1983).
- [16] Boursiquot, J.M., Sapis, J.M., Macheix, J.J. *CR Acad. Sci., Paris.* 302: Série III, nº 6, 117 (1986).
- [17] Langcake, P. *Physiol. Plant Pathol.* 18 (2), 213 (1981).
- [18] Waterhouse, A.L., Lamuela-Raventos, R.M. *Phytochem.* 37, 571 (1994).
- [19] Hong, V. and Wrolstad, E. *J. Agric. Food Chem.* 38 (3), 708 (1990).
- [20] Lee, S. and Hong, V. *J. Chromatogr.* 624, 221 (1992).

- [21] Renault, J.H., Thépenier, P., Zéches-Hanrot, M., Foucault, A.P. *J. Liq. Chromatogra.* 18(8), 1663 (1995).
- [22] Renault, J.H., Thépenier, P., Zéches-Hanrot, M., Le Men-Olivier, L., Durand, A., Foucault, A., Margraff, R. *J. Chromatogr. A*, 763, 345 (1997).
- [23] Da Costa, C.T., Nelson, B.C., Margolis, S.A., Horton, D. *J. Chromatogr. A*, 799, 321 (1998).
- [24] Ribéreau-Gayon, P. Recherches sur les anthocynes des végétaux. Libr.Générale de l'Enseignement, Paris (1959).
- [25] Roggero, J.P, Rogonnet, B., Coen, S. *Bull. Liaison Groupe Polyphénols*, 12,594 (1984).
- [26] Brouillard, R., Delaporte, B., Dubois, J.E. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 6202 (1978).
- [27] Brouillard, R., El Hage Chahine, J.M. *C.R. de l'Assemblée générale du Groupe Polyphénols*, 9, Narbonne (1979).
- [28] Amic, D., Davidovic-Amic, D. *J. Chromatogr. A*. 65(3), 115 (1993).
- [29] Larice, J.L., Archier, P., Rocheville-Divorne, C., Coen, S., Roggero, J.P. *Rev. Fr. OEnol.* 121, 7 (1989).
- [30] Rigaud, J., Cheynier, V., Asselin, C., Brossaud, F., Moutonet, M. Caractérisation des flavonoïdes de la baie de raisin. Application à une étude terroir. *In: OEnologie 95*, Lavoisier, Londres, Paris, New York, 137 (1996).
- [31] Moutonet, M., Rabier, Ph., Puech, J.L., Verette, E., Barlière, J.M. *Sci.Aliments.* 9(1), 35 (1989).
- [32] Vivas, N., Glories, Y. *Rev. Fr. OEnol.* 142, 33 (1993).
- [33] Vivas, N., Glories, Y. *Am. J. Enol Vitic.* 47, 103 (1996).
- [34] Pocock, K.F., Seftln, M.A., Williams, P.J. *Am. J. Enol. Vitic.* 45(4), 429 (1994).
- [35] Bourzeix, M., Weyland, D., Heredia, N. *Bull OIV*, 669670, 1171 (1986).
- [36] Ricardo Da Silva, J.M., Cheyner, V., Cheminat, A., Moutonet, M. *Phytochem*, 30(4), 1259 (1991).
- [37] Piretti, M.V., Ghedini, M., Serrazanetti, G. *Annali di Chimica* 66, 429 (1976).
- [38] Lee, C.Y., Jaworski, A.W. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(1), 87 (1990).

- [39] Weinges, K., Kaltenhauser, W., Marx, H.D., Nader, E., Nader, F., Perner, J., Seler, D. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 711,184 (1968).
- [40] Thompson, R.S., Jacques, D., Haslam, E., Tanner, R.J.N. *J.Chem. Soc.Perkins Trans. Part 1-1*, 1387 (1972).
- [41] de Freitas, V. *Thèse de Doctorat OEnologie-Ampélogie*, Université de Bordeaux II (1995).
- [42] Bate-Smith, E.C. *Food*, 23, 124 (1954).
- [43] Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M. *Phytochem.* 36(3), 781 (1994).
- [44] Souquet, I.M., Cheynier, V., Brossaud, F., Moutounet, M. *Phytochem.* 43(2), 509 (1996).
- [45] Wulf, L.W., Nagel, C.W. *J. Food Sci.* 45, 479 (1980).
- [46] Cheynier, Rigaud, J. *Am. J. Enol. Vitic.* 37(4), 248 (1986).
- [47] González-SanJosé, M.L., Barron, L., Díez, C. *J. Sci. Food Agric.* 51, 337(1990).
- [48] Nadal, M., Arola, L. *Vitis* 34(3), 151 (1995).
- [49] Glories, Y. *Conn. Vigne Vin.* 18, 195 (1984).
- [50] Glories, Y. *Conn. Vigne Vin.* 18, 253 (1984).
- [51] Glories, Y. Recherches sur la matire colorante des vins rouges. *Tesis. Université de Bordeaux II* (1978).
- [52] Somers, T.C. *Phytochemistry* 10(9), 2175 (1971).
- [53] Timberlake, C.F., Bridle, P. *Am. J. Enol. Vitic.* 27(3), 97 (1976).
- [54] Haslam, E. *Phytochemistry* 19, 2577 (1980).
- [55] Baranowski, E.S., Nagel, C.W. *Vitis*, 31, 111 (1983).
- [56] Ribéreau-Gayon, P., Pontallier, P., Glories, Y. *J. Sci. Food Agric.* 34, 505 (1983).
- [57] Bishop, P.D., Nagel, C.W. *J. Agric. Food Chem.* 32, 1022 (1984).
- [58] Singleton, V.L., Trousdale, E.K. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 63 (1992).
- [59] Liao, H., Cai, Y., Haslam, E. *J. Sci. Food Agric.* 59, 299 (1992).



- [60] Bakker, J., Picinelli, A., Bridle, P. *Vitis* 32, 111 (1993).
- [61] Picinelli, A., Bakker, J., Bridle, P. *Vitis* 33, 33 (1994).
- [62] Brouillard, R., Wigand, M.C. *Phytochemistry* 29, 3457-3460 (1990).
- [63] Mistry, T.V., Cai, Y., Lilley, T.H., Haslam, E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1287 (1991).
- [64] Dangles, O, Wigand, M.C., Brouillard, R. *Bull. Liaison Groupe Polyphénols* 16, 209 (1992).
- [65] Brouillard, R., Dangles, O. *Food Chem.* 51, 365 (1994).
- [66] Figueiredo, P., Elhabiri, M., Toki, K., Saito, N., Dangles, O., Brouillard, R. *Phytochemistry* 41, 301 (1996).
- [67] Jurd, L. *Tetrahedron* 23, 1057 (1967).
- [68] Jurd, L., Somers, T.C. *Phytochemistry* 9, 419 (1970).
- [69] Somers, T.C. *Phytochemistry* 10, 2175 (1971).
- [70] Santos-Buelga, C., Bravo-Haro, S., Rivas-Gonzalo, J.C. *Z. Lebensm. Unters.Forsch.* 201, 269 (1995).
- [71] Baranowski, E.S., Nagel, C.W.J. *Food Sci.* 48, 419 (1983).
- [72] Roggero, J.P., Archier, P., Coens, S., Rocheville-Divorne, C. *Connaiss. Vigne Vin* 21, 163 (1987).
- [73] Rivas-Gonzalo, J.C., Bravo-Haro, S., Santos-Buelga, C. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1444 (1995).
- [74] Escribano-Bailón, T., Dangles, O., Brouillard, R. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1583 (1996).
- [75] Dallas, C., Ricardo da Silva, J.M., Laureano, O. *J. Sci. Food Agric.* 44, 2402 (1996).
- [76] Dallas, C., Ricardo da Silva, J.M., Laureano, O. *J. Sci. Food Agric.* 70, 493 (1996).
- [77] Fulcrand, H., Docco, T., Es-Safi, N., Cheynier, V., Moutounet, M. *J. Chromatogr. A* 752, 85 (1996).
- [78] Francia-Aricha, E.M., Guerra, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2262 (1997).

- [79]Estruch, R. Efectos beneficiosos del vino sobre el sistema cardiovascular: nivel de evidencia científica. *Servicio de Medicina Interna, Hospital Clinic, Barcelona*. [www.rub.es/ace/dossier55b.htm](http://www.rub.es/ace/dossier55b.htm).
- [80] Leighton, F., Urquiaga, I. Polifenoles del vino y salud humana. *Dpto de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile*. [www.antioxidantes.com.ar](http://www.antioxidantes.com.ar).
- [81] ea, A.G.H. Bitterness and astringency, the procyanidins and fermented Apple ciders. *En: Rousell. L. Rouseff (De.), Bitterness in Food and Beverages. Amsterdam: Elsevier, pp. 123-144 (1990)*.
- [82] Noble, A.C. Bitterness/Astringency in Wine. *En: Rousell. L. Rouseff (De.), Bitterness in Food and Beverages. Amsterdam: Elsevier, pp. 145 (1990)*.
- [83] Glories, Y., Dournel, J.M. Role de l'ethanal dans la complexation des tanins et des anthocyanes. *Rapport des Activités de Recherches, Institut d'Enologie de Bordeaux, 86 (1984-86)*.

## 7. ANEXOS

### Anexo I

**Tabla N° 1-** Datos analíticos de los vinos obtenidos

Tratamiento	DO a 420 nm	DO a 520 nm	Intensidad	Tinte/Tono	Índice de Color	Índice de polifenoles totales
T	0,31 <sub>a</sub>	0,57 <sub>a</sub>	0,88 <sub>a</sub> )	0,54 <sub>a</sub>	1634,80 <sub>a</sub>	43,12 <sub>a</sub>
Enzimas Pect. 1g/HL	0,34 <sub>a</sub>	0,62 <sub>b</sub>	0,95 <sub>b</sub>	0,54 <sub>a</sub>	1755,47 <sub>b</sub>	47,33 <sub>b</sub>
Enzimas Pect. 2g/HL	0,33 <sub>a</sub>	0,64 <sub>b</sub>	0,97 <sub>b</sub>	0,52 <sub>a</sub>	1886,61 <sub>c</sub>	44,17 <sub>a</sub>
Enzimas Pect. 3g/HL	0,29 <sub>a</sub>	0,55 <sub>c</sub>	0,84 <sub>c</sub>	0,52 <sub>a</sub>	1603,58 <sub>a</sub>	43,00 <sub>a</sub>

Representa la media de cuatro tratamientos de seis repeticiones cada una, en vinos Malbec  
Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de Tukey para una  $p \leq 0,05$ .

**Tabla N° 1 bis-** Datos analíticos de los vinos obtenidos

Tratamiento	Masa Volumica a 20°C	Alcohol % v/v A 20°C	Extracto seco g/l	Azucares reductores g/l	Acidez total en tartárico g/l	Acidez volátil en acético g/l	Dióxido de Azufre total mg/l	pH
T	0,9929 <sub>a</sub>	14,07 <sub>a</sub>	33,20 <sub>a</sub>	2,03 <sub>a</sub>	4,89 <sub>a</sub>	0,27 <sub>c</sub>	97,00 <sub>a</sub>	4,01 <sub>a</sub>
Enzimas Pect. 1g/HL	0,9930 <sub>a</sub>	14,28 <sub>a</sub>	33,95 <sub>a</sub>	2,29 <sub>b</sub>	4,93 <sub>a</sub>	0,25 <sub>b</sub>	98,83 <sub>a</sub>	4,01 <sub>a</sub>
Enzimas Pect. 2g/HL	0,9922 <sub>a</sub>	14,22 <sub>a</sub>	31,73 <sub>a</sub>	2,31 <sub>b</sub>	4,88 <sub>a</sub>	0,16 <sub>a</sub>	85,33 <sub>a</sub>	4,12 <sub>a</sub>
Enzimas Pect. 3g/HL	0,9925 <sub>a</sub>	14,33 <sub>a</sub>	26,96 <sub>a</sub>	2,47 <sub>b</sub>	4,82 <sub>a</sub>	0,25 <sub>b</sub>	91,00 <sub>a</sub>	4,00 <sub>a</sub>

Representa la media de cuatro tratamientos de seis repeticiones cada una, en vinos Malbec  
Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de Tukey para una  $p \leq 0,05$ .

## Anexo II

Tabla N° 2: Resultados Analíticos Obtenidos (Excel)

				Masa volumica a 20°C	Alcohol % vol. A 20°C	Extracto seco g/l	Azucares reductores g/l	Acidez total en tartarico g/l	Acidez volatil en aetico g/l	Anh. Sulfuroso total mg/l	Anh. Sulfuroso libre mg/l	pH	Indice de polifenoles totales	420 nm	520 nm	620 nm	INTENSIDAD	NTE/ TON	INDICE DE COLOR		
PATRON	A	5 KG	3 litros	bot. X 0,75 l																	
				bot. X 0,75	0,9939	14,6	37,2	2,09	4,69	0,26	90	33	4,17	41,7	0,293	0,521	0,147	0,814	0,56238	1447,42	
				bot. X 0,75	0,9935	14,3	35,4	2,00	4,86	0,30	100	31	4,10	42	0,299	0,553	0,151	0,852	0,540687	1575,773	
	B	5 KG	3 litros	bot. X 0,75 l																	
				bot. X 0,75	0,9933	13,8	33,3	1,99	5,06	0,32	102	31	3,97	44	0,330	0,643	0,167	0,973	0,513219	1895,876	
				bot. X 0,75	0,9930	14,00	33,1	2,01	4,91	0,31	95	35	4,00	43	0,324	0,610	0,155	0,934	0,531148	1758,457	
	C	5 KG	3 litros	bot. X 0,75 l																	
				bot. X 0,75	0,9917	13,7	28,9	2,03	4,8	0,18	108	41	3,86	45	0,291	0,563	0,148	0,854	0,516874	1652,241	
				bot. X 0,75	0,9922	14	31,3	2,08	4,99	0,25	87	37	3,96	43	0,318	0,545	0,155	0,863	0,583486	1479,041	
[1]	A	5 KG	3 litros	bot. X 0,75 l																	
				bot. X 0,75	0,9921	14,1	31	2,28	4,76	0,16	82	33	3,99	46	0,352	0,634	0,135	0,986	0,555205	1775,92	
				bot. X 0,75	0,9928	14,3	33,9	2,1	4,88	0,22	107	38	4,10	48	0,341	0,64	1,125	0,981	0,532813	1841,173	
	B	5 KG	3 litros	bot. X 0,75 l																	
				bot. X 0,75	0,9921	14	30,7	2,34	4,95	0,21	102	41	3,90	48	0,31	0,599	0,156	0,909	0,517529	1756,423	
				bot. X 0,75	0,9922	14,4	32,3	2,22	4,91	0,26	115	38	3,95	47	0,322	0,621	0,114	0,943	0,518519	1818,643	
C	5 KG	3 litros	bot. X 0,75 l																		
			bot. X 0,75	0,9945	14,6	39,1	2,48	4,91	0,3	102	38	4,14	49	0,342	0,615	0,18	0,957	0,556098	1720,921		
			bot. X 0,75	0,9940	14,3	36,7	2,33	5,14	0,33	85	37	3,99	46	0,35	0,598	0,159	0,948	0,585284	1619,726		
[2]	A	5 KG	3 litros	bot. X 0,75 l																	
				bot. X 0,75	0,9917	15,1	33,1	2,16	5,03	0,1	97	36	4,05	41	0,286	0,608	0,114	0,894	0,470395	1900,531	
				bot. X 0,75	0,9919	14,7	32,3	2,28	4,96	0,16	84	37	4,1	43	0,274	0,587	0,142	0,861	0,46678	1844,551	
	B	5 KG	3 litros	bot. X 0,75 l																	
				bot. X 0,75	0,9921	13,9	30,7	2,47	4,84	0,13	82	36	3,84	46	0,374	0,676	0,133	1,05	0,553254	1897,861	
				bot. X 0,75	0,9925	13,9	31,5	2,25	4,75	0,18	89	32	4,95	44	0,368	0,681	0,148	1,049	0,540382	1941,22	
C	5 KG	3 litros	bot. X 0,75 l																		
			bot. X 0,75	0,9923	13,9	31	2,5	4,8	0,16	77	36	3,85	46	0,357	0,661	0,135	1,018	0,540091	1884,868		
			bot. X 0,75	0,9927	13,8	31,8	2,22	4,92	0,21	83	35	3,94	45	0,337	0,639	0,141	0,976	0,527387	1850,635		
[3]	A	5 KG	3 litros	bot. X 0,75 l																	
				bot. X 0,75	0,9917	14,2	30,2	2,71	5,03	0,21	90	36	3,88	44	0,281	0,553	0,149	0,834	0,508137	1641,288	
				bot. X 0,75	0,9919	14,3	31,3	2,45	4,96	0,28	105	34	3,92	43	0,297	0,564	0,151	0,861	0,526596	1635,03	
	B	5 KG	3 litros	bot. X 0,75 l																	
				bot. X 0,75	0,9944	14,6	38,5	2,51	4,72	0,34	64	26	4,15	42	0,347	0,638	0,179	0,985	0,543887	1811,037	
				bot. X 0,75	0,9937	14,4	0,33	2,38	4,88	0,33	78	32	4	44	0,339	0,619	0,187	0,958	0,547658	1749,268	
C	5 KG	3 litros	bot. X 0,75 l																		
			bot. X 0,75	0,9915	14,4	30,7	2,34	4,58	0,12	113	38	4,11	43	0,255	0,47	0,136	0,725	0,542553	1336,275		
			bot. X 0,75	0,992	14,1	30,7	2,45	4,77	0,22	96	36	3,94	42	0,221	0,466	0,137	0,687	0,474249	1448,606		

## Anexo III

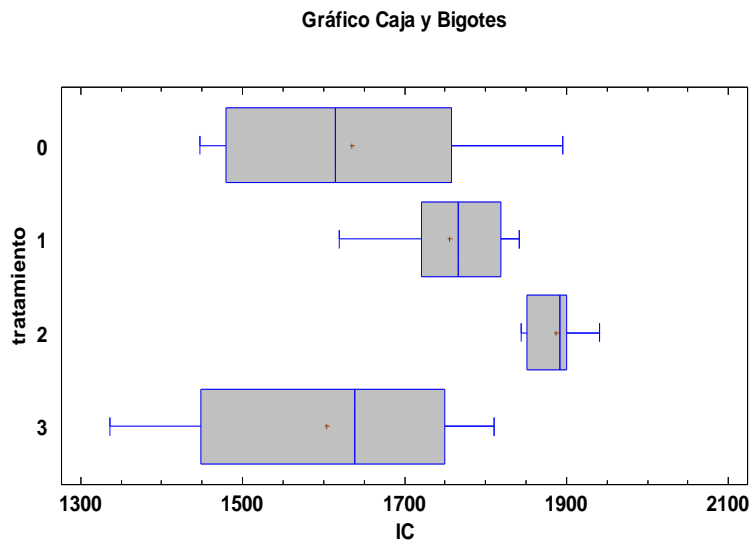
Tabla N° 3 –Índice de color

### Resumen Estadístico para IC

tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	6	1634,8	171,238	10,4745%	1447,42	1895,88	448,456
1	6	1755,47	79,215	4,51247%	1619,73	1841,17	221,447
2	6	1886,61	35,6899	1,89175%	1844,55	1941,22	96,669
3	6	1603,58	180,08	11,2298%	1336,27	1811,04	474,763
Total	24	1720,12	167,523	9,73906%	1336,27	1941,22	604,946

tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	0,54532	-0,392239
1	-0,997124	0,528219
2	0,303543	-0,158564
3	-0,550601	-0,466368
Total	-1,53674	-0,297933

Índice de Color obtenidos. Diagrama de caja y bigotes



**Anexo IV**

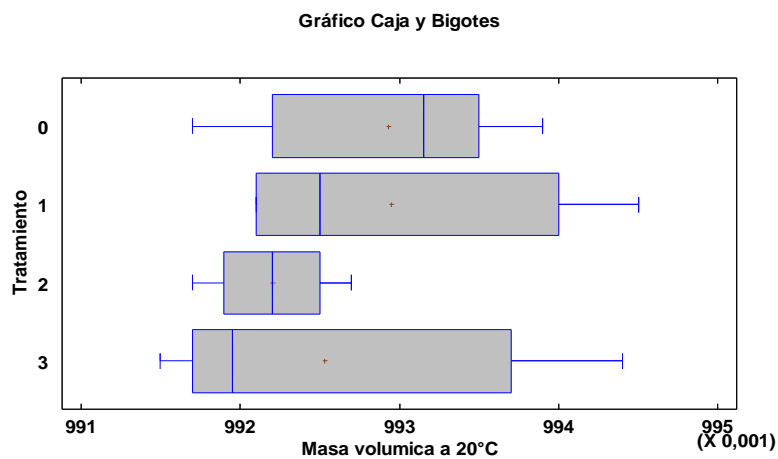
Tabla N° 4 – Masa Volúmica a 20°C

**Resumen Estadístico para Masa Volumica a 20°C**

Tratamiento	Recuento	Promedio	Varianza	Desviación Estándar	Coficiente de Variación
0	6	0,992933	6,90667E-7	0,000831064	0,0836978%
1	6	0,99295	0,000001107	0,00105214	0,105961%
2	6	0,9922	1,4E-7	0,000374166	0,0377107%
3	6	0,992533	0,00000145867	0,00120775	0,121684%
Total	24	0,992654	8,39112E-7	0,000916031	0,092281%

Tratamiento	Rango	Sesgo	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	0,0022	-0,593508	-0,593508	-0,485528
1	0,0024	0,831445	0,831445	-0,740606
2	0,001	0	0	-0,6
3	0,0029	1,02249	1,02249	-0,51639
Total	0,003	0,741527	1,48305	-0,711644

Masa Volumica a 20 °C obtenidos. Diagrama de caja y bigotes



## Anexo V

Tabla N°5- Alcohol %  $v/v$  a 20 ° C

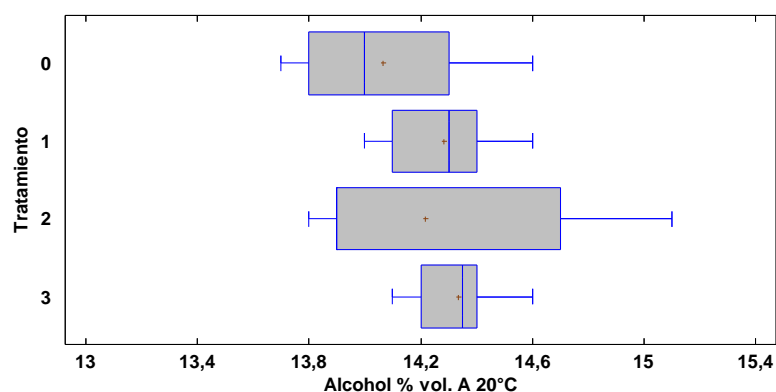
**Resumen Estadístico para Alcohol %  $v/v$  A 20°C**

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	6	14,0667	0,332666	2,36492%	13,7	14,6	0,9
1	6	14,2833	0,213698	1,49613%	14,0	14,6	0,6
2	6	14,2167	0,545588	3,83767%	13,8	15,1	1,3
3	6	14,3333	0,175119	1,22176%	14,1	14,6	0,5
Total	24	14,225	0,340396	2,39294%	13,7	15,1	1,4

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	0,778667	-0,0658659
1	0,136628	-0,135063
2	1,17218	-0,266255
3	0,248278	-0,00708885
Total	1,23563	0,275333

Alcohol %  $v/v$  a 20 ° C obtenidos. Diagrama de caja y bigotes

Gráfico Caja y Bigotes



## Anexo VI

Tabla N°6- Extracto seco g/l

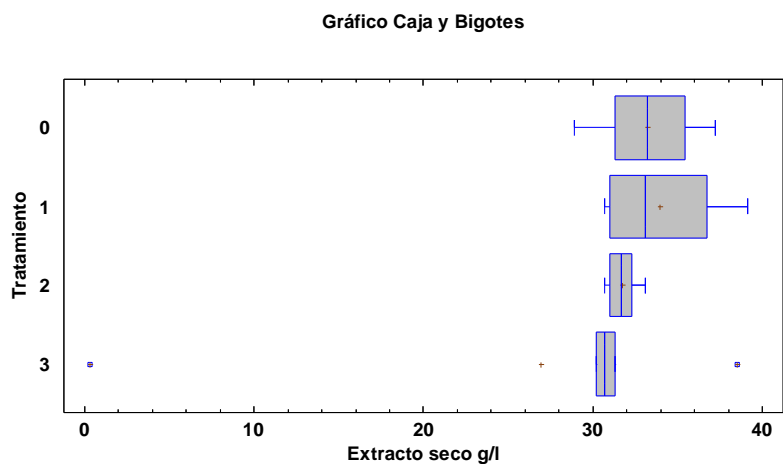
**Resumen Estadístico para Extracto seco g/l**

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	6	33,2	2,93121	8,82895%	28,9	37,2	8,3
1	6	33,95	3,34888	9,86415%	30,7	39,1	8,4
2	6	31,7333	0,877876	2,76642%	30,7	33,1	2,4
3	6	26,955	13,4137	49,7633%	0,33	38,5	38,17
Total	24	31,4596	7,16304	22,769%	0,33	39,1	38,77

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	-0,139583	-0,117537
1	0,742018	-0,466539
2	0,542951	-0,164341

3	-2,12731	2,50928
Total	-7,47652	16,8789

Extracto Seco g/l obtenidos. Diagrama de caja y bigotes



## Anexo VII

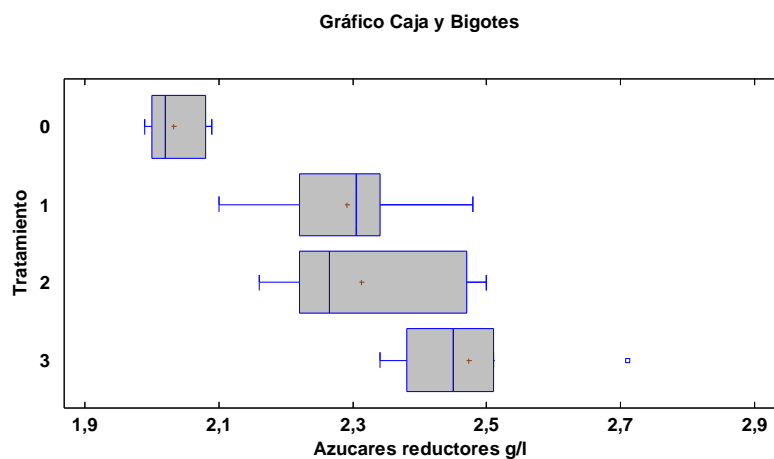
Tabla N° 7- Azucares reductores g/l

### Resumen Estadístico para Azucares reductores g/l

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	6	2,03333	0,042269	2,0788%	1,99	2,09	0,1
1	6	2,29167	0,127502	5,56371%	2,1	2,48	0,38
2	6	2,31333	0,139092	6,01264%	2,16	2,5	0,34
3	6	2,47333	0,130333	5,26952%	2,34	2,71	0,37
Total	24	2,27792	0,194332	8,53114%	1,99	2,71	0,72

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	0,605574	-0,919957
1	-0,0812607	0,373472
2	0,628819	-0,822287
3	1,36813	1,15871
Total	0,380869	-0,628632

Azucres reductores g/l obtenidos. Diagrama de caja y bigotes



## **Anexo VIII**

Tabla N°8- Acidez total, en tartárico g/l

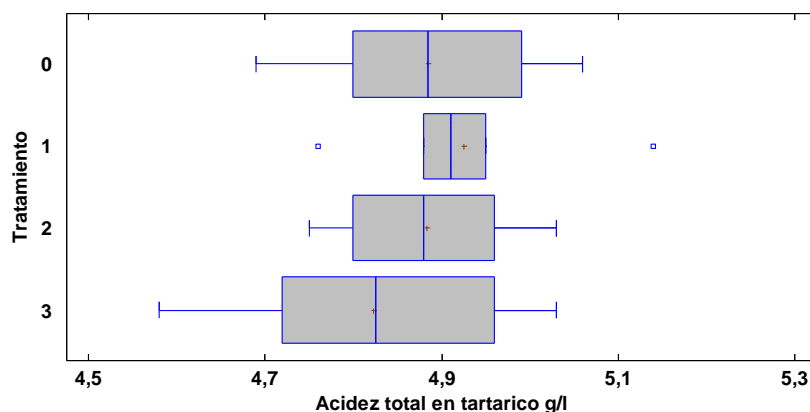
### **Resumen Estadístico para Acidez total en tartárico g/l**

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	6	4,885	0,132778	2,71808%	4,69	5,06	0,37
1	6	4,925	0,123734	2,51236%	4,76	5,14	0,38
2	6	4,88333	0,105198	2,15423%	4,75	5,03	0,28
3	6	4,82333	0,165731	3,43602%	4,58	5,03	0,45
Total	24	4,87917	0,130047	2,66536%	4,58	5,14	0,56

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	-0,193774	-0,244161
1	0,849468	1,17921
2	0,160913	-0,647603
3	-0,270309	-0,428861
Total	-0,445692	0,0464809

Acidez total en tartárico g/l obtenidos. Diagrama de caja y bigotes

**Gráfico Caja y Bigotes**



## **Anexo IX**

Tabla N° 9- Acidez Volátil, expresada en ácido acético g/l

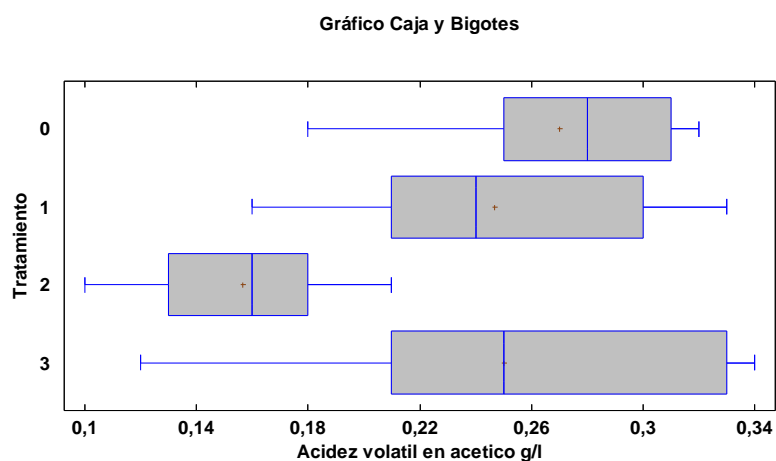
### **Resumen Estadístico para Acidez volatil en acetico g/l**

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	6	0,27	0,0521536	19,3162%	0,18	0,32	0,14
1	6	0,246667	0,0625033	25,3392%	0,16	0,33	0,17
2	6	0,156667	0,0382971	24,4449%	0,1	0,21	0,11
3	6	0,25	0,0834266	33,3706%	0,12	0,34	0,22
Total	24	0,230833	0,0725868	31,4455%	0,1	0,34	0,24

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	-1,10392	0,441987
1	0,0166544	-0,485955
2	-0,19465	-0,000309917
3	-0,526996	-0,261222
Total	-0,171387	-1,14096



Acidez volátil en acético g/l obtenidos. Diagrama de caja y bigotes



## Anexo X

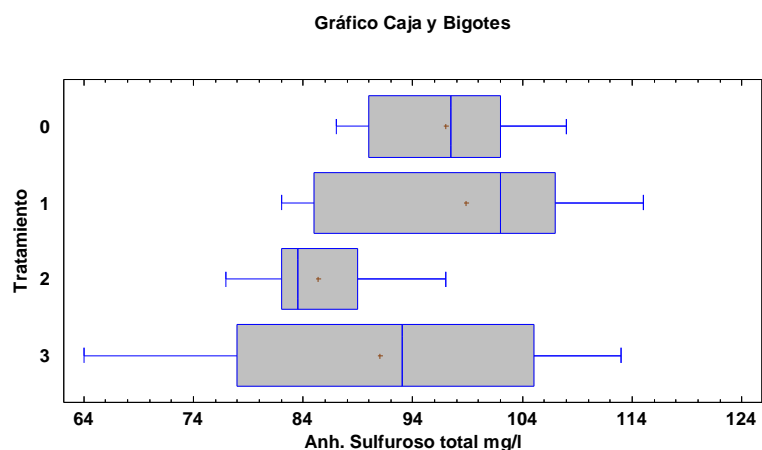
Tabla N° 10- Dióxido de Azufre total mg/l

**Resumen Estadístico para Dióxido de Azufre total mg/l**

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	6	97,0	7,84857	8,09131%	87,0	108,0	21,0
1	6	98,8333	12,8284	12,9798%	82,0	115,0	33,0
2	6	85,3333	6,88961	8,07376%	77,0	97,0	20,0
3	6	91,0	17,9109	19,6823%	64,0	113,0	49,0
Total	24	93,0417	12,5956	13,5376%	64,0	115,0	51,0

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	0,0819076	-0,564123
1	-0,367135	-0,671172
2	0,923268	0,55441
3	-0,436701	-0,290994
Total	-0,40014	-0,287781

Anh. Sulfuroso total mg/l obtenidos. Diagrama de caja y bigotes



## **Anexo XI**

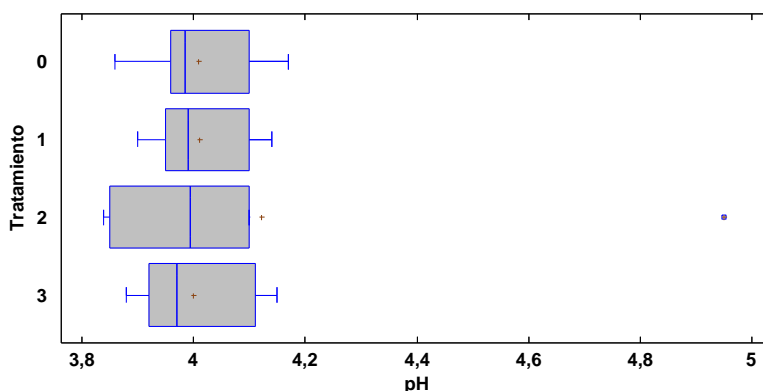
Tabla N°11 – pH

### **Resumen Estadístico para pH**

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	6	4,01	0,109909	2,74087%	3,86	4,17	0,31
1	6	4,01167	0,091086	2,27053%	3,9	4,14	0,24
2	6	4,12167	0,419019	10,1662%	3,84	4,95	1,11
3	6	4,0	0,108628	2,7157%	3,88	4,15	0,27
Total	24	4,03583	0,218511	5,41427%	3,84	4,95	1,11

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	0,284703	-0,160396
1	0,458729	-0,56989
2	2,11872	2,36606
3	0,5266	-0,827679
Total	6,7246	14,0041

pHobtenidos. Diagrama de caja y bigotes



## **Anexo XII**

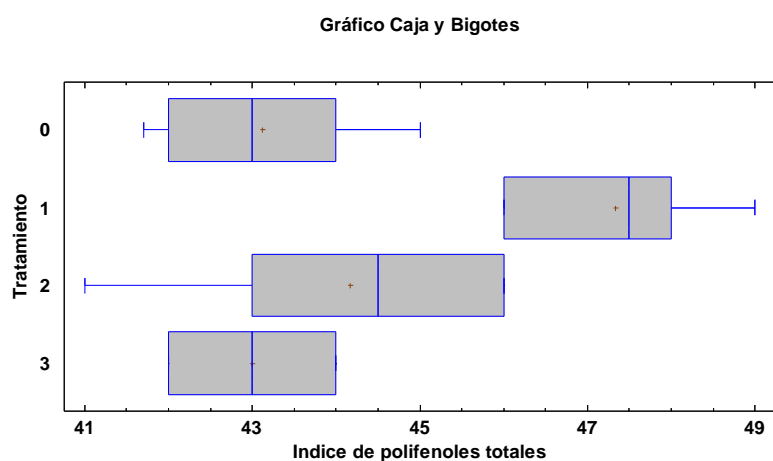
Tabla N°12 – Índice de Polifenoles Totales

### **Resumen Estadístico para Índice de polifenoles totales**

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	6	43,1167	1,23356	2,86098%	41,7	45,0	3,3
1	6	47,3333	1,21106	2,55858%	46,0	49,0	3,0
2	6	44,1667	1,94079	4,39424%	41,0	46,0	5,0
3	6	43,0	0,894427	2,08006%	42,0	44,0	2,0
Total	24	44,4042	2,20049	4,95559%	41,0	49,0	8,0

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	0,500338	-0,287368
1	0,0750657	-0,774793
2	-0,838998	-0,029368
3	0	-0,9375
Total	0,972314	-0,642373

Indice de polifenoles totales obtenidos. Diagrama de caja y bigotes



### Anexo XIII

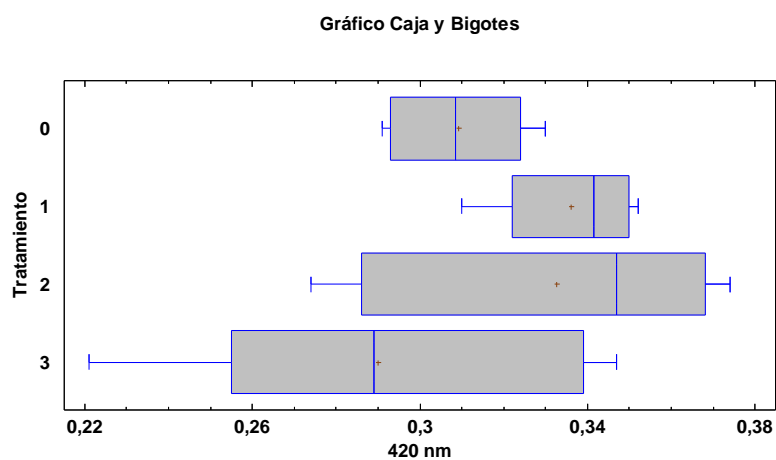
Tabla N°13 – DO a 420 nm

#### Resumen Estadístico para 420 nm

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	6	0,309167	0,0168928	5,46398%	0,291	0,33	0,039
1	6	0,336167	0,0166423	4,95061%	0,31	0,352	0,042
2	6	0,332667	0,0428657	12,8855%	0,274	0,374	0,1
3	6	0,29	0,0485098	16,7275%	0,221	0,347	0,126
Total	24	0,317	0,0374073	11,8004%	0,221	0,374	0,153

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	0,107261	-1,27348
1	-0,900218	-0,340646
2	-0,663996	-0,904833
3	-0,181146	-0,565361
Total	-1,42476	0,351728

DO a 420 nmobtenidos. Diagrama de caja y bigotes



## **Anexo XIV**

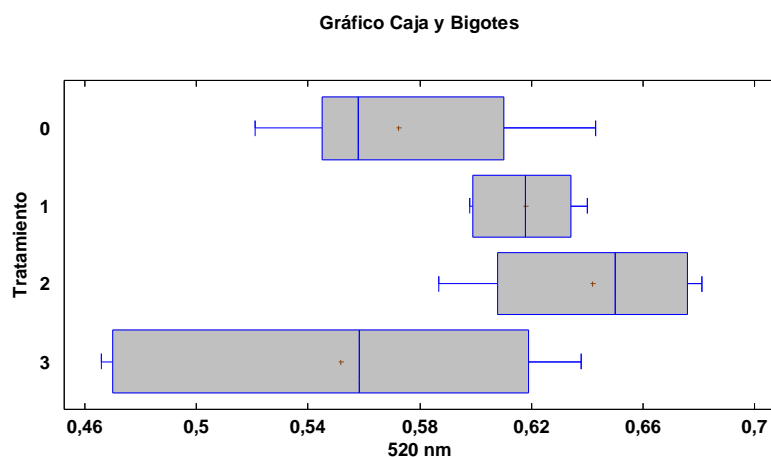
**Tabla N° 14- DOa 520 nm**

### **Resumen Estadístico para 520 nm**

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
0	6	0,5725	0,0452891	7,91075%	0,521	0,643	0,122
1	6	0,617833	0,0174289	2,82097%	0,598	0,64	0,042
2	6	0,642	0,038021	5,92228%	0,587	0,681	0,094
3	6	0,551667	0,0723178	13,109%	0,466	0,638	0,172
Total	24	0,596	0,0574131	9,63307%	0,466	0,681	0,215

<i>Tratamiento</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
0	0,766942	-0,259783
1	0,0365171	-0,885392
2	-0,547042	-0,735491
3	-0,176668	-0,892401
Total	-1,57543	0,276803

DO a 520 nm obtenidos. Diagrama de caja y bigotes



## **Anexo XV**

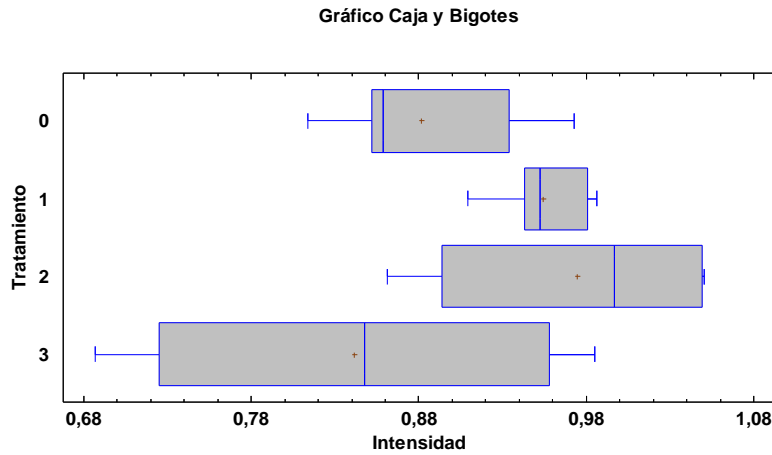
**Tabla- Intensidad**

### **Resumen Estadístico para Intensidad**

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
0	6	0,881667	0,0594194	6,73944%	0,814	0,973	0,159
1	6	0,954	0,0280856	2,94398%	0,909	0,986	0,077
2	6	0,974667	0,0806317	8,27274%	0,861	1,05	0,189
3	6	0,841667	0,120036	14,2617%	0,687	0,985	0,298
Total	24	0,913	0,0921888	10,0974%	0,687	1,05	0,363

<i>Tratamiento</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
0	0,774473	-0,330379
1	-0,544292	0,0794577
2	-0,614548	-0,843489
3	-0,132171	-0,827372
Total	-1,50788	0,45147

Intensidad obtenida. Diagrama de caja y bigotes



**Anexo XVI**

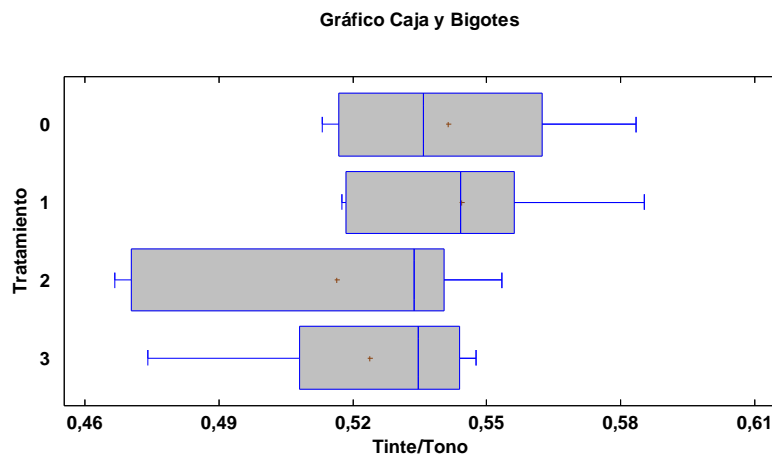
Tabla N° 16- Tinte/tono

**Resumen Estadístico para Tinte/Tono**

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	6	0,541299	0,0272494	5,03408%	0,513219	0,583486	0,070267
1	6	0,544241	0,0262721	4,82729%	0,517529	0,585284	0,0677551
2	6	0,516381	0,0379313	7,34561%	0,46678	0,553254	0,0864742
3	6	0,523847	0,0283999	5,42142%	0,474249	0,547658	0,0734086
Total	24	0,531442	0,0306902	5,77489%	0,46678	0,585284	0,118504

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	0,692319	-0,361532
1	0,571609	-0,306942
2	-0,77324	-0,920917
3	-1,28047	0,489109
Total	-1,10466	0,40202

Tinte/tono obtenidos. Diagrama de caja y bigotes



## **Anexo XVII**

### Catálogo enzimas Lallyme

#### **Declaración Para productos de la marca LALLZYME para Enología**

27 Mayo 2014

*Este documento es valido por 3 años a partir de la fecha de emisión. Cambios en producción o legislación resultará en actualizaciones del documento.*

#### **Modificación genética**

Los microorganismos no son modificados genéticamente.

Al mejor de nuestro conocimiento, los materiales utilizados para hacer el producto final no son modificados genéticamente.

#### **Nanotecnología**

Nanotecnología ni nano-ingredientes se han utilizado en la producción de estos productos.

#### **Información de ingredientes no-orgánicos**

Este producto y los ingredientes utilizados para hacerlo no han sido irradiados.

Lodo de aguas residuales no se ha utilizado en la producción de este producto o en los ingredientes utilizados en este producto.

Crecimiento en petroquímica licor sustrato o sulfato de residuos se aplica solamente a la levadura.

#### **Ausencia de alérgenos**

Los productos vendidos son libres de los alimentos que representan la mayoría de las reacciones alérgicas alimentos indicados en la referencia a la Directiva 2003/89/CE, anexo IIIa y Directiva 2007/68/CE:

<b>Ingredient</b>	<b>Present</b>	<b>Absent</b>
Cereals containing gluten and products thereof		X
Crustaceans and products thereof		X
Eggs and products thereof		X
Fish and products thereof		X
Peanuts and products thereof		X
Soy and products thereof		X
Milk and products thereof (including lactose)		X
Nuts and products thereof		X
Celery and products thereof		X
Mustard and products thereof		X
Sesame seeds and products thereof		X
Sulphur dioxide and sulphites at concentrations > 10 mg/kg		X
Lupin and products thereof		X
Molluscs and products thereof		X

Pg. 1 of 2 – Declaración para enología

**SECCIÓN 1 - IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA / PREPARADO Y DE LA SOCIEDAD**

- 1.1 Identificador del producto: Lallzyme EXV  
 Otro nombre: Pectinase
- 1.2 Uso identificado: Ingrediente para la enología
- 1.3 Datos del proveedor: Danstar Ferment A.G.  
 Vejlevej 10  
 Fredericia  
 DK-7000  
 Denmark  
 Phone: +45 76 22 32 85  
 Email: [fb.france@lallemand.com](mailto:fb.france@lallemand.com)
- 1.4 Teléfono de emergencia: Póngase en contacto con su médico de cabecera o al hospital.

**SECCION 2 - IDENTIFICACION DE RIESGOS**

- 2.1 La clasificación de la mezcla de producto:  
 Clasificación según Directiva 1999/45/CE: R42- Puede causar sensibilización por inhalación.  
 Clasificación según Reg. (EC) No. 1272/2008: Sensibilizador respiratorio Cat. 1

## 2.2 Elementos de la etiqueta:

Etiquetado según Directiva 1999/45/CE

Símbolo de peligro: Perjudiciales (Xn)

Frases de riesgo(s): R42- Puede causar sensibilización por inhalación.  
 S Frase(s): S22- No respire el polvo.  
 S24- Evite el contacto con la piel.  
 S36/37- Utilizar guantes y ropa protectora adecuada.



Etiquetado según Reg. (EC) No. 1272/2008

Pictograma de riesgo del SAG:

Palabra de alerta: Peligro

Declaración de riesgo: H334: Puede causar síntomas de alergia o asma o dificultad respiratoria si se inhala.

Declaración cautelar: P261: Evite respirar el polvo/humo/gas/niebla/vapores/aerosoles.  
 P285: En caso de ventilación insuficiente, usar protección respiratoria.  
 P304 + P341: SI SE INHALA: Si la respiración es difícil, saque a la persona al aire fresco y mantener en reposo en una posición confortable respiración.  
 P342+ P311: Si se presentan síntomas respiratorios, llame a un CENTRO DE ENVENENAMIENTO de médico.  
 P501: Dispone de contenidos/envase según las normas locales.

	<b>LALLZYME®</b>	<b>EX-V</b>	
<b>APLICACIÓN</b>	Maceración de uvas tintas para la elaboración de vinos tintos estructurados.		
<b>DESCRIPCIÓN</b>	Pectinasa granulada de alta concentración con un alto contenido de actividades secundarias. Libre de cinamil esterasa. Origen: <i>Aspergillus niger</i>		

### ACTIVIDAD Y MODO DE ACCIÓN

LALLZYME EXV ha sido formulada para permitir una rápida liberación de los contenidos intracelulares debido al efecto sinérgico de pectinasa concentrada y de actividades secundarias específicas (celulasas, hemicelulasas) para la lisis de las estructuras parietales y de membrana de la célula vegetal.

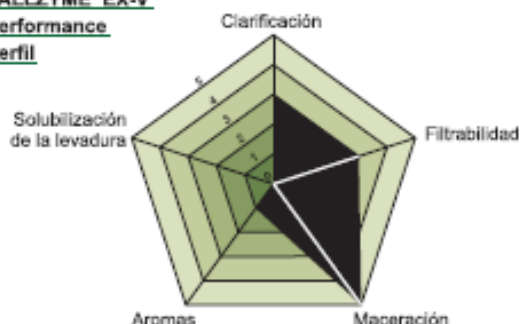
**LALLZYME EXV:**

- Permite una completa y rápida liberación de los antocianos.
- Permite una liberación más eficiente de taninos y su posterior unión con los antocianos logrando una buena estabilidad del vino.
- Incrementa la liberación de sustancias aromáticas respetando las características varietales de la uva.

**LALLZYME EX-V**

**Performance**

**Perfil**



### DOSIS

Aplicación	Parámetros (Temperatura/tiempo)	Dosis recomendada (g/hl)
Maceración de los hollejos	18-28°C / 2-8 días	1 - 2 g
Maceración de los hollejos + maceración post fermentación	18-28°C / >8 días	2 g Posible de agregar en dos tiempos: • 50% al comienzo de la maceración • 50% a la mitad de la maceración

Disolver la enzima en una cantidad de agua o mosto suficiente para permitir una distribución homogénea en todo el volumen de mosto o vino a tratar (aproximadamente en proporción de 1 en 10).

LALLZYME EXV debería ser agregada antes del llenado del tanque de maceración.

### PRESENTACIÓN, ALMACENAJE Y MANIPULACIÓN

<ul style="list-style-type: none"> <li>• LALLZYME EXV se encuentra disponible en envases plásticos sellados de 100g, en cajas de 10 Kg (10 x (10 x 100g)).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los envases sellados pueden almacenarse en un lugar seco a temperatura ambiente. Referirse a la parte superior del envase para el control de la fecha de vencimiento.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evitar el contacto directo con la piel y la formación de polvo. Las enzimas pueden ocasionar irritabilidad por inhalación y reacciones de tipo alérgica en personas sensibles. Para más detalles, referirse a la Ficha de Seguridad (MSDS) de LALLZYME EXV.</li> </ul>
---	---	---

**LALLZYME®**  
**EX-V**