



INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO

Mariona Gil Cortiella

Dipòsit Legal: T.183-2014

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO

Mariona Gil Cortiella

Dipòsit Legal: T.183-2014

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Mariona Gil Cortiella

**Influencia de la madurez de la uva y de ciertas prácticas
vitivinícolas sobre el color, los compuestos fenólicos y
los polisacáridos del vino tinto.**

Tesis Doctoral

Dirigida por: Dr. Fernando Zamora Marín y Dr. Joan Miquel
Canals Bosch

Departament de Bioquímica i Biotecnologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona, 2013

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

Mariona Gil i Cortiella

**Influencia de la madurez de la uva y de ciertas prácticas
vitivinícolas sobre el color, los compuestos fenólicos y los
polisacáridos del vino tinto.**

Tesis Doctoral

Dirigida por: Dr. Fernando Zamora Marín y Dr. Joan Miquel Canals Bosch

Departament de Bioquímica i Biotecnologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2013

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014



Departament de Bioquímica i Biotecnologia

C/ Marcel·lí Domingo s/n
43007 Tarragona
Telf: 977 558043
Fax: 977 558232

Fernando Zamora Marín i Joan Miquel Canals Bosch, professors titulars del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFIQUEN:

Que aquest treball, titulat **"Influencia de la madurez de la uva y de ciertas prácticas vitivinícolas sobre el color, los compuestos fenólicos y los polisacáridos del vino tinto"**, que presenta **Mariona Gil i Cortiella** per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Bioquímica i Biotecnologia d'aquesta Universitat.

Tarragona, 19 de Juliol del 2013

Dr Fernando Zamora Marín

Dr Joan Miquel Canals Bosch

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

Esta tesis doctoral ha sido financiada por:

CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial), proyecto **CENIT-Deméter** (Consortios Estratégicos Nacionales de Investigación Tecnológica – Desarrollo de estrategias y métodos vitícolas y enológicos frente al cambio climático. Aplicación de nuevas tecnologías que mejoren la eficiencia de los procesos resultantes).

CICYT (Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología), proyectos AGL2011-29708-C02-01.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

A la memòria de mon pare.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

Agraïments i disculpes.

INTRO.

*"La liturgia de las despedidas, la bala perdida que viene a por mí,
la nostalgia que amarga la huída, la banda sonora de lo que viví"*

La canción de los (buenos) borrachos. Joaquín Sabina y Fito Páez. ENEMIGOS ÍNTIMOS. 1998.

TRACK 01.

*"Nadie te habrá contado que a veces vivo inundado en decisiones tan vivas que
beben del ver venir, si a veces me disconformo y parezco vuestro invitado:
nadie os habrá contado nada bueno de mí"*

A los que. La Pegatina. VÍA MANDARINA. 2009.

Suposo que esta és l'única escletxa on quedarà alguna cosa de la persona, i, per tant, deixeu-me ser correcta i començar pel començament: Gràcies a esta societat meua que, malgrat els temps tèrbols que corren, continua esforçant-se cada dia per sostindre beques com la que he tingut el privilegi de fruir. Des del principi vaig ser conscient de la responsabilitat que suposava gaudir d'una beca com esta en una Universitat Pública. Tot i que no sé si m'ho mereixia, podeu estar segurs que he fet tot el que he pogut per tal de resultar una mica útil i que, pel camí, he après tantes coses que, d'una manera o altra, algun dia tindrè l'oportunitat de saldar el deute que vaig adquirir amb tots vosaltres quan vaig acceptar este repte.

TRACK 02.

*"And now the end is near and so I face the final curtain.
My friend, I'll say it clear: I'll state my case of which I'm certain.
I've lived a life that's full; I've traveled each and every highway,
But more, much more than this, I did it my way."*

My way. Frank Sinatra. MY WAY. 1969.

Gràcies a la Universitat Rovira i Virgili, no només pel fet d'haver-me permès fer de la ciència el meu sostre i el meu plat a taula durant els últims quatre anys assignant-me una beca predoctoral, sinó per haver estat la nau del meu viatge a Ítaca per les mars de la ignorància durant més d'una dècada. Aquí he après a fer les coses a la meua manera, i esta etapa comprèn tota la meua època universitària, comprèn tot el que he après en esta casa i tot el que he crescut com a persona emprant els seus passadissos com a escenari i els seus docents com a mestres; emmarca els dies interminables de classes i els llibres que hi he llegit entre hores; inclou les cares familiars, les salutacions tímides i els somriures de complicitat... Per este motiu, a més a més de donar les gràcies al Departament de Bioquímica i Biotecnologia, on s'ha cuinat esta tesi a foc lent, em veig en la necessitat de donar les gràcies a les Facultats de Química i d'Enologia per la formació que m'han donat, sense la qual hauria sigut impossible arribar fins aquí i ser la persona que sóc.

TRACK 03.

"Sorry to disappoint you but I'm real!"

Real. William Shatner. HAS BEEN. 2004.

A Fernando, perquè em vas dir que ens ho passaríem bé. M'ho vaig creure i tenies tota la raó: crec que mai oblidaré aquell "No vull que estiguis trista" que em vas regalar la primera verema abans de posar-te al meu costat a fer el *kit* de glucosa i fructosa que no sé per què no em sortia bé. I a JoanMi per ser tan resolutiu (tant de bo al diccionari de l'IEC hi hagués un superlatiu que em permetés ser més explícita), pel *nick* del Twitter i per l'esperit de MacGyver. A tots dos: gràcies per l'oportunitat. Gràcies per la confiança. Gràcies per obrir una porta que no formava part del meu imaginari particular. Si al fet que sóc conscient que no he sigut mai molt bona en res (no us ho prengueu com a falsa modèstia; també reconec que, a canvi, em defenso en bastantes coses) li sumem la idea que sempre havia pensat que això era un privilegi reservat a una elit intel·lectual de la qual no formo part, resulta evident que



esta aventura no hauria tingut lloc sense vosaltres. Només lamentaria no haver estat a l'alçada de les vostres expectatives, i malgrat que mai he trobat el coratge per preguntar-vos per què em vau escollir, espero que a l'hora de fer balanç no acabeu pensant que us vau equivocar.

TRACK 04.

"Ses fulles més seques es tiren dels arbres per ordre de veterania. I alegria!"

...Alegria. Antonia Font. ALEGRIA. 2008.

A tots els companys de viatge: gràcies per les converses a l'hora del cafè i per aguantar-me les cabòries als *ratets* del cigarro. Pels esmorzars, els sopars, les paelles, les aventures de congrés i per totes les vegades que m'heu fet plorar de riure. Als que ja heu passat, perquè vaig fer una mica meua la vostra experiència, i als que encara us quedeu, perquè sé que continuareu sent –malgrat que hi ha dies per a tot– l'alegria d'estos passadissos.

TRACK 05.

"No vine aquí para hacer amigos pero sabes que siempre puedes contar conmigo, dicen de mí que soy un tanto animal, pero en el fondo soy un sentimental"

Feo, fuerte y formal. Loquillo y los Trogloditas. FEO, FUERTE Y FORMAL. 2001.

A tota la gent encantadora que habita el tercer pis, mil gràcies per no haver tingut mai un no per resposta ni haver defugit les meues cabòries. A los castellano-manchegos con quien he tenido el placer de colaborar codo con codo los últimos años: ha sido genial contar con vuestro criterio analítico y la visita fue estupenda (gracias a l@s tomelloser@s por la alegría, por los cubos de los jueves y los almuerzos de los viernes). A la gente del ICSV de Logroño, porque a pesar de mi visita fugaz aprendí un montón de cosas que creo que serán extremadamente útiles.

TRACK 06.

"I una miscel·lània de gent sense fred"

Mitocondris i citoplasmes. Estanislau Verdet. L'ALL HO ÉS TOT PER ALS ANGELOSOS. 2008.

A la gent de la finca: gràcies per la practicitat, per les ganes d'ajudar i per aquells esmorzars dels d'arreglar el món. Als tècnics, tant de docència com de recerca, per la saviesa humil esta que teniu que tot ho soluciona. Al personal de la secretaria del departament per vestir sempre un somriure, per la paciència i les ganes d'ajudar. A la gent de Juvé i Camps per les experiències de verema i les converses dels tastos. Als conserges, a les senyores de la neteja, al personal de la biblioteca, als tècnics d'informàtica i a la gent de seguretat i de manteniment per la salutació afable, i per la tasca diària que ens facilita la vida a tots plegats.

TRACK 07.

"Supongo que nadie se va del todo, espero que exista algún lugar donde los chicos escuchen mis canciones, aunque no los escuche opinar"

Los chicos. Andrés Calamaro. LA LENGUA POPULAR. 2007.

Als (deixeu-me dir) alumnes de la llicenciatura i del grau pels *ratets* d'experiència docent que m'heu regalat al laboratori. Jo, que sóc alumna des que tinc ús de raó, us diré que he gaudit de l'experiència d'intentar transmetre allò que prèviament i amb una paciència infinita m'havien ensenyat a mi. I als estudiants de màster: només espero haver estat a l'alçada i que hàgiu après coses pel camí.



TRACK 08.

*“Diu que des del porxo es veu un cel que no te l'acabes, que a les nits
sempre surt a fumar i pensa en nosaltres, i que per més lluny que
estigui no hem de tenir por; quan s'hi hagi de ser hi serà
(diu que un dia hi hem d'anar, que l'avisem amb temps però que té
Uits de sobres)”*

Louisiana o els camps de cotó. Els Amics de les Arts. ESPÈCIES PER CATALOGAR. 2011.

Als *putos kimix*, a les *okupes*, a la *família cristiana* i a les *senyores i respectius* per totes les hores de convivència i per haver sigut la meua família durant tot este temps a Tarragona: quan me n'adono de com us he vist créixer entenc quant he degut créixer jo durant estos anys d'abocar cabòries al Mediterrani des del balcó estant. I a la colla del poble: gràcies per les *perletes*, pel *pregó*, i per ser d'esta manera que sou que m'encanta.

TRACK 09.

*“Al país de les rialles hi ha raïm a les porxades, ametlers i olives negres i
un arròs fet amb costelles, al país de les costeres, hi ha llaguts i guitarrons
i la veu de les rondalles pessigant les emocions”*

Al país de l'olivera. Obrint Pas. CORATGE. 2011.

Crec que és de Rilke la reflexió que l'única pàtria verdadera és la infantesa... Potser el que m'ha dut fins aquí ha estat el record de la coa de tractors caramullats de raïm des de la bàscula fins a la era o del delit de mirar pel refractòmetre com si d'un calidoscopi es tractés. Vist amb perspectiva, fins i tot podria ser la cara de pau que feia mon pare tancat al laboratori, fent graus i volàtils quan ma mare m'enviava a preguntar-li si trigaria molt a pujar a sopar... El que sí que és clar és que no seria qui sóc sense tot el que m'ha aportat el meu poble i la seua gent. Gràcies a tots els amics i familiars d'Orta per la vostra paciència i espero saber fer-me perdonar totes les absències dels darrers anys.

TRACK 10.

“A menudo los hijos se nos parecen y así nos dan la primera satisfacción”

Esos locos bajitos. Joan Manuel Serrat. EN TRÁNSITO. 1981.

A ma mare, espero que em perdoni per no escollir mai feines on s'ha d'anar ben vestit, per esta mania meua de comprar-me els pantalons grans i les samarretes de *propaganda* i per esta aparent falta d'interès a traspasar els mitocondris de la iaia Dolores. A mon pare, gràcies per educar-me en la cultura de l'esforç i per haver fet mans i mànigues per donar-nos estudis; crec que estaries content de veure que ens en anem sortint i que he arribat fins aquí. No puc deixar de pensar –sabent com t'agradava fantasiejar a sumar la teua experiència i la meua formació– com hauríem xalat fent vi... però també m'agrada pensar que, si em poguessis veure per un foradet des d'una altra dimensió assegut al costat del iaio Rodrigo, riuríeu per sota del nas en veure com parlem de com ha anat la campanya amb el tio Elias fent un quintet a la plaça.

TRACK 11.

*“Sigo creyendo en ti, por eso cada mañana justo antes de
salir, me pongo la buena cara y las ganas de reír para que no
me vean llorar, aunque no será por ganas”*

La buena cara. Transfer. JENTES. 2004.

Als meus germans, gràcies per la paciència i per aguantar-me, perquè ningú coneix tan bé els meus defectes... A Rodrigo, perquè tots dos sabem que sense el teu esforç mai hauria pogut jugar esta partida, i a l'Ignasi, perquè pensar que de vegades em pots prendre com a referent m'obliga a fer bé les coses per no esdevindre un mal exemple.



TRACK 12.

*“Com un peix carregat d’espines,
em perdo entre corrents marines
i m’oblido de nedar.”*

Una mandra per llevar. El fill del mestre. AQUELLA ESTRANYA MANIA DE CREURE EN LA VIDA. 2007.

A tota la gent que s’ha anat quedant pel camí... lamento haver deixat que anés passant massa temps sense fer una cerveseta, i que es perdés el costum de fer (com a mínim) un *soparillo* a l’any per evitar que la distància ens fes desconeguts... Suposo que fer-se gran és això; tot i que no perdo l’esperança que, algun dia, el destí torni a creuar les nostres vides i puguem retrobar temps per compartir.

TRACK 13.

*“Sempre venies darrere que t’ensenyara cançons,
i ara que en saps de boniques t’amagues pels carrerons”*

De la flor de la farina. Quico el Cèlio, el Noi i el Mut de Ferreries i Pep Jimeno “Botifarra”. LA BARRACA. 2011.

A tots els professors que he tingut i he admirat des de preescolar fins a l’actualitat en tots els àmbits imaginables del coneixement: si este document té algun mèrit us en podeu atribuir una part important, perquè no hauria arribat enlloc sense vosaltres.

BONUS TRACK.

*“Benvolgut ho deixo aquí que sé que ets un home ocupat.
Suposo que és moment d’acomiar-me esperant
no haver-te empenyat massa, no haver semblat un boig,
que la força ens acompanyi, adéu! fins sempre! sort!”*

Benvolgut. Manel. 10 MILLES PER VEURE UNA BONA ARMADURA. 2011.



Obro els ulls, veig l'espectacle del món i, és clar, me'n meravello. Llavors, per pensar la meravella, considero les dues opcions que se'm presenten. Una: el món és un món de preguntes i la meva tasca és buscar les respostes. L'altra: el món és un món de respostes i a mi em toca descobrir de quines preguntes. Les dues actituds són acceptables, però molt diferents.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. La vid.	7
1.1.1. El ciclo vegetativo y sus órganos.	8
1.1.2. El ciclo reproductor y sus órganos.	12
1.2. La uva.	15
1.2.1. Morfología de la baya de uva.	15
Piel.	16
Pulpa.	20
Semillas.	21
1.2.2. Compuestos fenólicos de la uva.	23
Taninos.	24
Antocianos.	25
Ácidos hidroxicinámicos.	26
Flavan-3-oles monoméricos.	26
Flavonoles.	27
Estilbenos.	27
1.3. El proceso de desarrollo y maduración de la uva.	28
1.3.1. Evolución de los componentes de la pulpa durante el desarrollo de la baya.	29
Azúcares.	29
Ácidos orgánicos.	31
Sustancias minerales.	33
1.3.2. Evolución de los componentes de la piel durante el desarrollo de la baya.	34
Evolución de las paredes celulares.	35
Evolución de las proantocianidinas.	37
Evolución de los antocianos.	38
Evolución de los hidroxicinamatos.	39
Evolución de los flavan-3-oles monoméricos.	39
Evolución de los flavonoles.	39
1.3.3. Evolución de los componentes de las semillas durante el desarrollo de la baya.	40
1.3.4. Factores que influyen en el proceso de maduración de la uva.	40
Factores permanentes.	41
Factores variables.	42
El impacto del cambio climático.	43
1.4. La vinificación en tinto.	44
1.4.1. El proceso de vinificación en tinto.	44
1.4.2. Extracción de los compuestos fenólicos durante la maceración.	46
Extracción de proantocianidinas.	46
Extracción de los antocianos.	47
Extracción de los ácidos hidroxicinámicos.	48
Extracción de flavan-3-oles monoméricos.	48
Extracción de los flavonoles.	48
1.4.3. Factores que influyen en la extracción de compuestos fenólicos.	49
Nivel de madurez de la uva.	49
Temperatura.	51
Tiempo de maceración.	52
Técnicas para mejorar la extracción durante la maceración prefermentativa.	53
Técnicas para mejorar la extracción a partir de la maceración fermentativa.	54

1.4.4.	Extracción de los polisacáridos.....	55
	Polisacáridos de origen vegetal.....	56
	Polisacáridos de origen microbiológico.....	57
1.5.	Composición y evolución del vino tinto: implicaciones sensoriales.....	59
1.5.1.	Composición química del vino tinto.....	59
1.5.2.	El color del vino tinto: Los antocianos y su evolución.....	61
	Copigmentación.....	65
	Formación de pigmentos derivados de los antocianos.....	66
1.5.3.	Flavan-3-oles y Proantocianidinas: Amargor y astringencia del vino tinto.....	70
	El amargor.....	70
	La astringencia.....	70
	La evolución de las proantocianidinas.....	72
1.5.4.	Los polisacáridos del vino: Implicaciones tecnológicas y sensoriales.....	74
	Referencias	75
2.	<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</i>	87
3.	<i>RESULTADOS.....</i>	91
	Capítulo I. Impacto de la madurez de la uva y del tiempo de maceración sobre la composición química del vino tinto.....	93
	Capítulo II. Influencia del aclareo de racimos y el aclareo de bayas sobre la composición química del vino tinto.....	117
	Capítulo III. La desalcoholización parcial de vinos tintos de elevada graduación mediante ósmosis inversa: impacto sobre la composición química del vino.....	137
	Capítulo IV. Influencia del tamaño de baya sobre la composición química del vino tinto	151
4.	<i>DISCUSIÓN GENERAL</i>	175
5.	<i>CONCLUSIONES GENERALES.....</i>	183

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

1. INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

1.1. LA VID.

La vid es el nombre común que se le da a diversas plantas de la familia de las vitáceas cuyo fruto es la uva. Esta familia de las vitáceas está integrada por doce géneros y alrededor de setecientas especies. La única especie autóctona europea es *Vitis vinifera*, la especie principal de cultivo para la elaboración del vino. Esta especie, a pesar de ser la especie europea por antonomasia, llegó a estar en verdadero peligro de extinción debido a la irrupción en Europa de la filoxera a finales del siglo XIX. La filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) es un homóptero procedente del continente americano que arrasó los viñedos europeos de *Vitis vinifera*, muy sensibles a su ataque por no estar adaptadas. A partir de ese momento, se generalizó el empleo de especies americanas (resistentes al ataque de la filoxera) como portainjertos para la vid europea.¹

Como ser vivo, la vid debe cumplir básicamente dos funciones fundamentales: La primera formar brotes y hojas cada año que aseguren el desarrollo de la cepa, el sistema radicular así como el crecimiento en diámetro del tallo. La segunda comprende la formación y desarrollo de las inflorescencias, su fecundación y el crecimiento de bayas y semillas. De algún modo podríamos decir que la primera función es la que se ocupa del desarrollo de la cepa como individuo (y está relacionada con el metabolismo primario de la cepa, y con el que llamaremos ciclo vegetativo de la vid), mientras que la segunda función es la que asegura la perpetuación de la especie (relacionada con el metabolismo secundario de la cepa y con el que llamaremos ciclo reproductor de la vid). Como en nuestras latitudes la vid es una planta caducifolia (sucumbe a un reposo invernal durante los meses más fríos del año), todavía debe cumplir una tercera función para permitir una nueva brotación el año siguiente: debe tener obligatoriamente una fase de almacenamiento de reservas (principalmente en forma de almidón) en el interior de los tejidos de raíces, tronco, brazos y sarmientos (fenómeno conocido como *agostamiento*) que le permitan brotar al año siguiente, después del reposo invernal.

Uno de los hitos de la viticultura reside en la búsqueda del equilibrio a mantener entre el depósito de sustancias de reserva hacia el aparato vegetativo (ciclo vegetativo) y las emigraciones destinadas a las bayas (ciclo reproductor); puesto que ambos procesos se realizan simultáneamente (tal y como veremos más adelante). Si la vid invierte demasiados esfuerzos energéticos en madurar la uva, puede que la energía acumulada en sus partes leñosas sea insuficiente, debilitando ciclo tras ciclo la cepa, pudiendo comprometer la

supervivencia de la misma. En cambio, si la vid invierte muchos recursos en forma de reservas

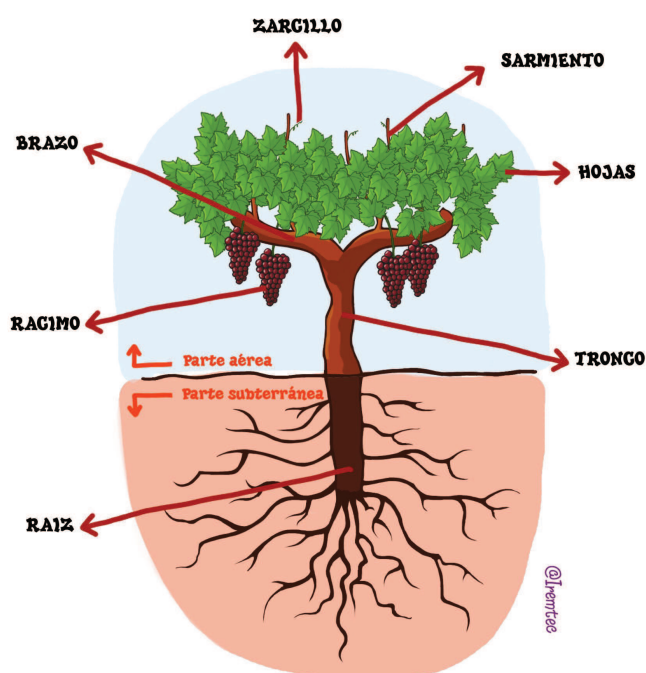


Figura 1. Organografía de la vid, mostrando su parte subterránea y su parte aérea.

para su futuro desarrollo, crece el vigor de la planta y el fruto no madura correctamente, obteniendo uvas de baja calidad. En la Figura 1 se muestran los órganos de la vid, pudiendo distinguir los órganos vegetativos: raíces (ubicadas en la parte subterránea, que habitualmente corresponden al portainjerto), tronco, brazos, pámpanos o sarmientos, hojas y zarcillos, así como los órganos reproductores: inflorescencias o racimos (dependiendo del momento del ciclo en que nos encontremos).

En los siguientes apartados se va a analizar cómo funcionan los ciclos vegetativo y reproductor de la vid, así como las funciones que los distintos órganos de la cepa realizan para el correcto desarrollo del ciclo anual

1.1.1. El ciclo vegetativo y sus órganos.¹

El ciclo vegetativo se repite anualmente en climas fríos y templados. En el hemisferio norte, dicho ciclo se desarrolla a lo largo de los meses del año tal y como se muestra en la Figura 2. Empezaremos a explicarnos el ciclo vegetativo desde su etapa de REPOSO INVERNAL, cuando la vid resta profundamente dormida y solo conserva tejidos leñosos en la parte aérea (tronco, brazos y varas o pulgares). Al final del período de reposo invernal, es la parte subterránea de la vid, llamada portainjerto o pié, la primera que se activa. El **portainjerto**, que conforma el sistema subterráneo y radicular de la vid, realiza básicamente cuatro funciones: La fijación de la vid en el suelo y la estabilización de su estructura aérea; la absorción de agua y materias minerales contenidas en el suelo (que envía en forma de savia bruta al resto de la

¹ Las fuentes bibliográficas consultadas para el desarrollo de esta sección corresponden a las referencias 2-6.

planta mediante un sistema bascular llamado xilema); la formación de hormonas de crecimiento (como giberilinas y citoquininas) y; finalmente, actúa como órgano de reserva en donde se acumulan nutrientes (fundamentalmente granos de almidón y cristales de oxalato cálcico). A finales del período de reposo invernal, cuando el suelo o las raíces adquieren temperaturas alrededor de los 10°C, el portainjerto moviliza sus reservas y va recuperando la función de absorción de agua y de elementos minerales del suelo.

Llegados a este punto, el portainjerto empieza a enviar todos esos recursos nutritivos hacia la parte aérea, que en ese momento todavía consta únicamente de sus partes leñosas: el **tronco**, los **brazos** (madera vieja) y las varas o pulgares (madera formada durante la campaña anterior). Entre las funciones del tronco y los brazos constan la de dar soporte estructural a la planta, realizar la respiración; actuar como órgano para almacenar nutrientes; conducir la savia bruta a los órganos verdes y, una vez transformada en savia elaborada, nutrir toda la planta.

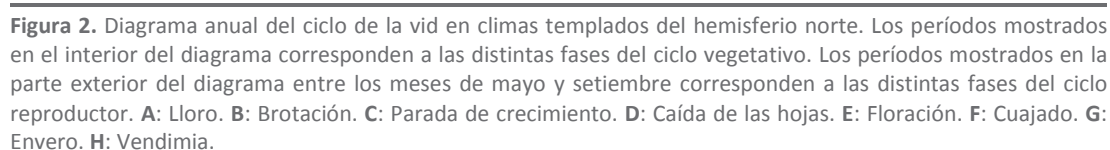
La primera manifestación externa de actividad en la vid después de su reposo invernal es un fenómeno conocido como el *lloro*, que consiste en la exudación de un fluido (los recursos nutritivos enviados por el sistema radicular) por las heridas y cortes de poda de la parte aérea que, en climas templados y en el hemisferio norte, suele ocurrir a principios de marzo. A partir del momento del lloro, la planta entra en un proceso de MOVILIZACIÓN DE RESERVAS que envía desde los órganos de almacenamiento hacia las **yemas** formadas durante la campaña anterior (que se encuentran encastadas en los pulgares o varas), que guardan en su interior los conos vegetativos que se desarrollaran formando tejidos y órganos nuevos. Para que las yemas inicien su desarrollo, originando el fenómeno conocido como *brotación*, la vid dispone exclusivamente de sus reservas, ya que sus órganos vegetativos no están aún en condiciones de elaboración y transformación de nuevos alimentos. A partir del fenómeno de brotación (o inicio del desarrollo de las yemas), la vid entra en un proceso de CRECIMIENTO. Durante esa fase de crecimiento se irán desarrollando los **pámpanos o sarmientos** que soportan el resto de órganos o tejidos que se formarán durante esta etapa: las hojas, los zarcillos y las yemas, así como las inflorescencias (que serán discutidas durante la sección siguiente, ya que conciernen al ciclo reproductor). Todos estos órganos se desarrollan simultáneamente. Los pámpanos son las ramas nuevas formadas durante la campaña vigente, inicialmente verdes que, a medida que envejecen, se van suberificando y lignificando, convirtiéndose en un tejido leñoso y marrón; momento en el que pasamos a llamarlos sarmientos. Los pámpanos o sarmientos están organizados en distintas secciones longitudinales (entrenudos) separadas por unos

pequeños abultamientos llamados nudos. Es justamente en los nudos donde se insertan el resto de órganos vegetativos de la vid: las hojas, los zarcillos y las yemas.

Las **hojas** realizan tareas de una gran complejidad, ya que es en ellas donde los elementos minerales absorbidos por el sistema radicular en forma de savia bruta (que asciende mediante el xilema) se transforman en savia elaborada que nutrirá el resto de órganos de la planta (mediante un sistema de vasos conductores llamado floema). Las tres funciones principales de las hojas son: la fotosíntesis, la transpiración y la respiración. Mediante la fotosíntesis, se elaboran carbohidratos a partir de elementos inorgánicos simples (dióxido de carbono y agua) utilizando para ello la energía procedente de la radiación solar y produciendo oxígeno molecular como residuo. El agua para realizar la fotosíntesis procede de la savia bruta que las hojas reciben del sistema radicular, y la hoja elimina en forma de vapor el exceso de agua absorbida por las raíces mediante la transpiración, a través de los estomas (una especie de poros que regulan el intercambio de gases y agua entre la planta y el medio). También a través de los estomas se intercambian los gases con el aire: asimilando el dióxido de carbono necesario para realizar la fotosíntesis y expulsando el oxígeno molecular que esta genera. Finalmente las hojas también realizan la respiración, proceso mediante el cual se transforman los alimentos complejos sintetizados durante la fotosíntesis en sustancias simples para liberar energía que alimente el metabolismo de la cepa, en un proceso inverso a la fotosíntesis en el que se consume oxígeno del aire y se expulsa dióxido de carbono a través de los estomas.

Durante la etapa de CRECIMIENTO, a partir del brote, la vid desarrolla los pámpanos y las hojas. En su primera edad y hasta fecha bien avanzada, ese desarrollo se realiza a expensas de las reservas. Más tarde se sustentará con la savia elaborada: cuando entran en funcionamiento las hojas adultas situadas en la base de los pámpanos. Las hojas comienzan a exportar glúcidos cuando alcanzan un tamaño del orden del treinta por ciento e importan al mismo tiempo estas sustancias procedentes de las hojas más grandes. En cuanto las hojas del pámpano alcanzan el cincuenta por ciento de su superficie, la importación cesa y solamente exportan glúcidos.

De manera simultánea al crecimiento y el desarrollo de pámpanos y hojas, se forman los zarcillos y las yemas que quedaran latentes hasta la campaña siguiente. Los **zarcillos** se pueden considerar inflorescencias estériles, y su extremidad se curva formando una especie de espiral que, cuando encuentra un soporte, se enrosca sobre este antes de lignificarse intensamente, dando sujeción al pámpano. Las **yemas** son en esencia pequeños brotes en miniatura recubiertos por órganos protectores, y tienen por misión el asegurar la perennidad de la vid de



11

nuestras latitudes suele suceder en el mes de agosto (de ahí el nombre *agostamiento*). Como ya se ha comentado anteriormente, el agostamiento es necesario para asegurar la perennidad de la planta de un año a otro, ya que el crecimiento inicial se lleva a cabo a merced de las reservas. Los tejidos vivos perfeccionan su estructura y se enriquecen en materias de reserva (fundamentalmente almidón), especialmente en las raíces y las partes leñosas, en donde no solo servirán para la brotación del próximo año, sino que además ayudan a proteger a la planta de las heladas invernales y primaverales mediante la disminución del punto de congelación de los tejidos en los que se acumulan. El agostamiento se observa exteriormente mediante un cambio de color y estructura en los pámpanos (generalmente avanza desde la base hasta la extremidad del brote), que, como consecuencia del enriquecimiento en reservas, pierden la clorofila, modifican su color de verde a marrón, adquieren consistencia y se convierten en sarmientos. Durante el comienzo del invierno hay un transporte de materias hidrocarbonadas, nitrogenadas y también de fósforo y potasio hacia las raíces. A principios de primavera, esas reservas se volverán a movilizar hacia los sarmientos.

Este período de agostamiento se prolonga hasta la *caída de la hoja*; momento en que la vid empieza su período de REPOSO INVERNAL, cerrando el ciclo vegetativo. El fenómeno de la caída de la hoja, entendido como la caída natural de las hojas al finalizar el ciclo vegetativo, se produce después de haberse vaciado la hoja de los productos de fotosíntesis. Desaparece la clorofila y la hoja pierde la coloración verde, la respiración se reduce y la transpiración se detiene. Finalmente la hoja cae y la vid entra de nuevo en período de reposo invernal, para volver a iniciar el mismo ciclo anual la primavera siguiente.

1.1.2. El ciclo reproductor y sus órganos.²

El ciclo reproductor se desarrolla simultáneamente al ciclo vegetativo y, al igual que este, necesita dos ciclos consecutivos para desarrollarse completamente (tal y como se muestra en el diagrama de la Figura 2). Durante la primera campaña, y mientras la cepa se encuentra en la fase de CRECIMIENTO del ciclo vegetativo, los pámpanos se desarrollan y crecen, dando lugar a las hojas y a las yemas que quedarán latentes hasta pasado el reposo invernal. En el interior de dichas yemas en formación es en donde se empieza a desarrollar el ciclo reproductor, mediante unas pocas células que pasan del estado vegetativo al estado reproductor, lo que permitirá la diferenciación y la formación de los llamados esbozos florales

² Las fuentes bibliográficas consultadas para la elaboración de esta sección corresponden a las referencias **2,4,7-11**.

en el interior de la yema. Este complejo proceso es conocido con el nombre de *inducción floral*. No será hasta después del invierno, con la llegada de la *brotación* que los esbozos florales estarán completos y listos para su desarrollo.

Simultáneamente a la fase de CRECIMIENTO vegetativo de la cepa que sigue al desborre, con el desarrollo de todos los tejidos formados durante el ciclo anterior en el interior de las yemas, se desarrollan las inflorescencias. Estas inflorescencias pasan por una etapa de CRECIMIENTO HERBÁCEO (durante esta etapa la inflorescencia es verde y, por lo tanto, un órgano activo fotosintéticamente hablando) dónde se van desarrollando las flores hasta la llegada de la *floración*. Durante la *floración*, las flores completamente desarrolladas se abren, liberando el polen que permite la fecundación de los óvulos florales. Las flores correctamente fecundadas, empezarán a desarrollar los óvulos (que se convertirán en semillas) así como los ovarios (que se convertirán en las uvas), en un proceso conocido como *cuajado*. A partir del momento del *cuajado*, empieza el proceso de DESARROLLO del fruto. Este proceso de DESARROLLO o crecimiento de la baya de uva (al igual que en muchas otras bayas) sigue un patrón típico, presentando una curva doble sigmoidea como la que se muestra en la Figura 3. Gracias a este patrón característico de crecimiento, el proceso de desarrollo de la baya de uva se suele dividir en tres etapas; una fase inicial de crecimiento rápido (fase I), una fase de latencia, sin crecimiento o con un crecimiento muy lento (fase II), y finalmente una fase final de crecimiento que finaliza con la completa maduración de la uva (fase III).

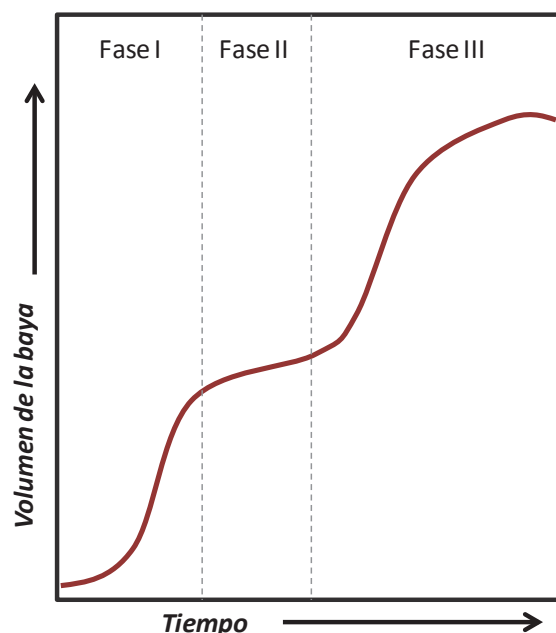


Figura 3. Diagrama del crecimiento de la baya de uva. Ilustración adaptada de 9.

La fase I, de entre 45 y 60 días de duración, se caracteriza por un crecimiento herbáceo rápido de la baya, que en este período tiene una actividad metabólica frenética, caracterizada por una elevada intensidad respiratoria y una rapidísima acumulación de solutos (especialmente ácidos tartárico y málico) que contribuyen a la expansión de la baya. Al inicio de esta etapa se forman los embriones de las semillas, y de estas dependerá en gran medida la intensidad de la multiplicación celular, ya que la concentración de hormonas de crecimiento es directamente proporcional al número de semillas. El crecimiento rápido de esta fase,

inicialmente se debe a la división celular, y posteriormente a la elongación o expansión de las mismas. Durante esta primera fase de crecimiento, las semillas son verdes, al igual que sucede con las bayas, que son verdes y duras. Esta primera fase de crecimiento herbáceo termina cuando las células de la piel de la baya dejan de dividirse; en ese momento, la baya ha alcanzado al menos la mitad de su volumen y su peso fresco final.

La fase II corresponde al final del período herbáceo de la baya. La duración de esta fase que se caracteriza por la ausencia de crecimiento es específica para cada variedad y depende de las condiciones de cultivo. Durante esta misma fase II las semillas completan su madurez y alcanzan su tamaño final entre 10 y 15 días antes del *envero*. A su vez, empieza la lignificación de la superficie de las semillas, y la formación de una cutícula en su superficie exterior. El fenómeno conocido como *envero*, que se sucede dentro de esta segunda fase del crecimiento de la baya, es un fenómeno abrupto en el que la piel de las uvas tintas empieza a colorearse (o se vuelve translúcida en el caso de uvas blancas), indicando cambios a nivel hormonal que afectan a la química de la pared celular que, a su vez, provocan un ablandamiento y pérdida de turgencia de la baya. Aunque el *envero* es un proceso abrupto, crítico y rápido a nivel de baya, no todas las bayas del mismo racimo enveran simultáneamente, por lo que el *envero* de una parcela entera puede extenderse durante días o incluso semanas. El final de esta etapa caracterizada por la parada de crecimiento, indica el inicio del proceso de maduración de la baya.

La tercera fase del desarrollo de la uva (fase III) corresponde a la etapa de *maduración*, dura aproximadamente entre 5 y 10 semanas y en el hemisferio norte empieza hacia el Agosto. En esta tercera etapa hay una segunda fase de crecimiento, durante la cual la baya prácticamente dobla su tamaño. Aunque la baya experimente un enorme crecimiento durante esta fase III, no hay que perder de vista la estrecha relación que existe entre el número de semillas y el tamaño final de la baya madura, y que al llegar a este punto de desarrollo, el número de semillas ya está definido. Este segundo aumento del tamaño de la baya se debe fundamentalmente al crecimiento celular, se estabiliza progresivamente a lo largo de la madurez (pudiendo llegar incluso a decrecer durante las últimas fases de la madurez debido a pérdidas de agua por evaporación) y va acompañado de importantes modificaciones fisiológicas, como la reducción de la intensidad respiratoria y el incremento de algunas actividades enzimáticas. Durante este periodo la turgencia de la baya se mantiene relativamente constante, aunque es cuando se suceden los cambios más dramáticos en la composición química de la baya y su piel. La baya empieza a acumular azúcares, cationes,

aminoácidos, compuestos fenólicos y aromáticos, mientras las concentraciones de amonio y ácido málico decrecen sustancialmente. De esta última etapa de crecimiento llamada MADUREZ dependerá, en gran medida, la composición química y la calidad de la uva en el momento de la vendimia, y, a su vez, la composición y las propiedades organolépticas del vino que con ella se elabore.

1.2. LA UVA.

La uva es la materia prima para la elaboración del vino y, por lo tanto, su composición es un punto crítico para la elaboración del vino. En este apartado se va a describir la morfología y la composición de la uva madura, en el momento de la cosecha.

1.2.1. Morfología de la baya de uva.



Figura 4. Ilustración de un raspón de uva y ejemplo de cómo se insertan las bayas en él. Adaptado de 31.

A diferencia de lo que ocurre con otros frutos-baya, las uvas se organizan en racimos, en los que cada uva está unida al **raspón** (Figura 4) mediante un pequeño pedúnculo que contiene los vasos conductores que alimentan la baya con el agua y los nutrientes que la vid le envía. Si el pedúnculo es largo, los racimos adquieren una estructura abierta y suelta, mientras que si el pedúnculo es corto, los racimos se vuelven compactos con el crecimiento del fruto. En las variedades de uva destinadas a la vinificación, la estructura del racimo suele ser bastante compacta, lo que comporta una mayor sensibilidad de este respecto a infecciones fúngicas y otros problemas fitosanitarios.^{12,13} El raspón, que adquiere su tamaño definitivo alrededor del envero, se va lignificando a lo largo del proceso de maduración y representa entre el 3 % y el 7 % del peso de un racimo de uva maduro. Estos raspones contienen algo de azúcar (menos de 10 g/Kg) y una concentración importante de ácidos (entre 180 y 200 meq/Kg) que se encuentran en forma de sales debido a la gran cantidad de cationes presentes. Además, el raspón es muy rico en compuestos fenólicos, conteniendo más del 20 % del

total de compuestos fenólicos del racimo de uva (a pesar de su escasa contribución en el peso

INTRODUCCIÓN

total del racimo).¹⁰ Mediante el raspón se organizan las bayas de uva, y se comunican con el resto de la planta, pero hay que tener en cuenta que todas las bayas de un racimo no

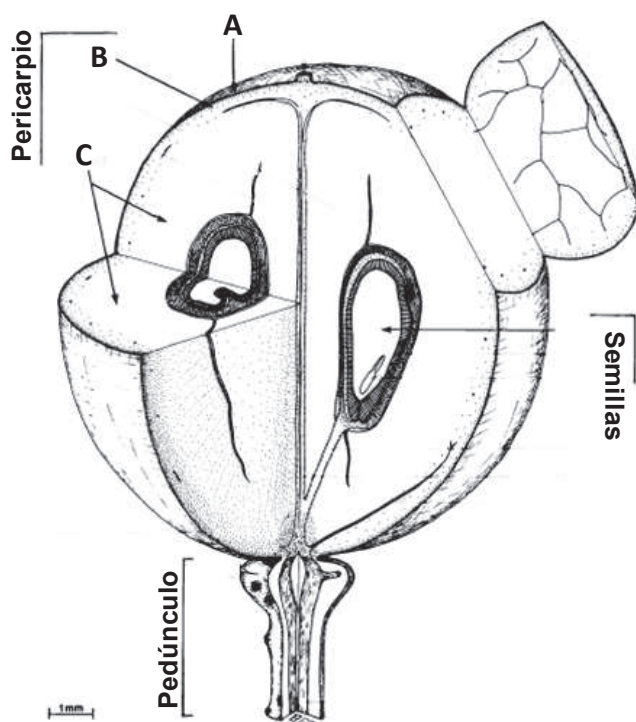


Figura 5. Ilustración de una baya de uva mostrando sus partes: el pedúnculo que la une a la planta, y las semillas rodeadas por el pericarpio, en el que a su vez se distinguen el mesocarpio (C) y el exocarpio (B), señalando también su parte más externa o cutícula (A). Adaptado de 203

de la uva), el *MESOCARPIO* (el tejido carnoso entre la piel y las semillas: la pulpa de la baya) y el *ENDOCARPIO* (la parte central de la baya que, sin distinguirse de la pulpa, contiene las semillas).¹⁰ A continuación se detalla la estructura y la composición de las distintas partes de una baya de uva madura, en el momento de la recolección.

PIEL.

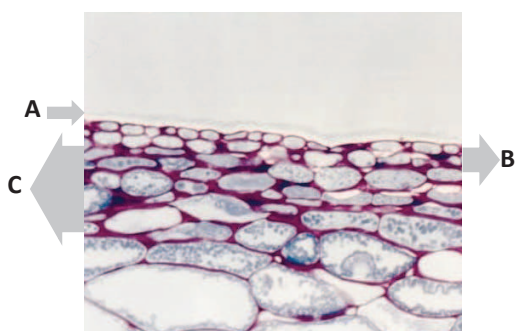


Figura 6. Corte transversal de piel de uva, en donde se puede observar ligeramente la cutícula que recubre la baya (A), la epidermis (B) Y la hipodermis (C). Fotografía extraída de 55

evolucionan exactamente a la misma velocidad, originando una fuente más de variabilidad en el grado de madurez de la uva; en ese sentido existen trabajos en donde se ha podido observar que la posición que una baya ocupa dentro del racimo es un factor importante que puede afectar a su madurez y, por lo tanto, a su composición química.¹⁴⁻¹⁶

Cada baya de uva (Figura 5) consiste en una serie de tejidos que envuelven las semillas: el conjunto de dichos tejidos recibe el nombre de *PERICARPIO*. A su vez, el pericarpio se divide en tres zonas: el *EXOCARPIO* (la parte más externa de la baya: la piel

El *EXOCARPIO*, que como se ha comentado anteriormente corresponde a la piel de la uva, representa entre el 5 % y el 10 % del peso total seco de la baya, y actúa como una barrera hidrófoba que protege la uva frente a inclemencias climáticas, radiación ultravioleta e infecciones fúngicas.¹⁷ El exocarpio consiste en una región heterogénea constituida por tres

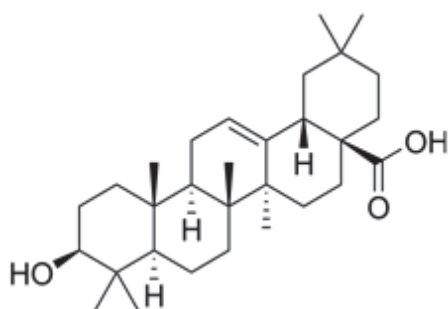


Figura 7. Estructura química del ácido oleanólico.

capas superpuestas diferenciadas: la *cutícula*, la *epidermis* y la *hipodermis*, partes que se pueden observar en la fotografía de la Figura 6. La *cutícula* es la parte más externa de la piel, compuesta básicamente de cutina (una macromolécula constituida por ácidos grasos de cadena larga unidos mediante enlaces de tipo éster), es una capa continua cuyo grosor depende de la variedad (en especies de *Vitis vinifera* esta cutícula puede tener entre 1.5 μm y 4.0 μm de espesor, pudiendo superar los 10 μm para ciertas variedades americanas). La cutina todavía está recubierta por una capa cerosa (alrededor de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) constituida de unas plaquetas superpuestas compuestas esencialmente por ácido oleanólico, la estructura del cual se muestra en la Figura 7.^{10,17-19} La *epidermis* consiste en una o dos capas de células elongadas tangencialmente cuyo grosor depende nuevamente de la variedad.^{20,21} Finalmente la *hipodermis*, la capa más interna de la piel y colindante a la pulpa, está compuesta por algunas capas de células en las que se pueden distinguir dos regiones: una región externa con una o dos capas de células rectangulares y una región interna con algunas capas de células poligonales.

Las células de la piel de uva tienen una pared celular gruesa, que forma una barrera para la difusión de compuestos como aromas y fenoles, y actúa como protector contra factores externos.²² Esta pared celular, consta básicamente de tres capas o zonas diferenciadas: la *lámina media*, la *pared celular primaria* y la *pared celular secundaria*. La *lámina media*, que ocupa el espacio intercelular y une a las células entre ellas, está mayoritariamente compuesta de pectinas (formadas por cadenas de ácido galacturónico parcialmente esterificado con metanol y algunas ramificaciones de otros azúcares neutros tales como rhamnosa, galactosa y arabinosa). La *pared celular primaria*, más gruesa que la *lámina media*, comprende tres partes estructuralmente independientes que interactúan entre ellas: las dos primeras partes (Figura 8) son de naturaleza glucídica y corresponden a una matriz péctica (10-

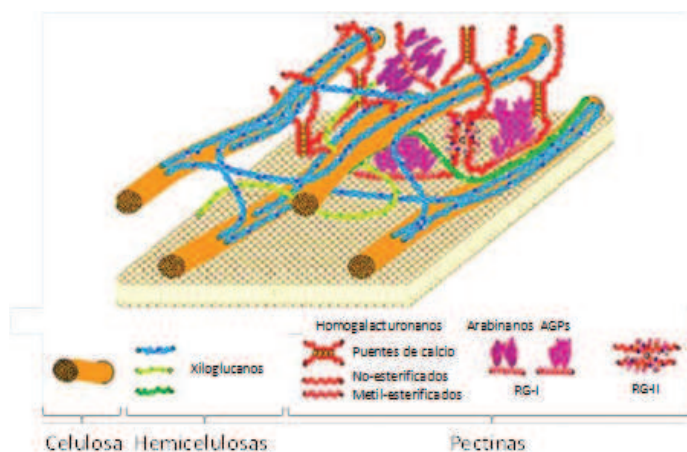


Figura 8. Diagrama con la representación de los dominios glucídicos de la pared celular primaria.

35 %) en donde se hallan incrustadas unas microfibras de celulosa (8-25 %) entrecruzadas con xiloglucanos (25-50 %). La tercera parte estructuralmente independiente de la pared celular primaria consiste en proteínas estructurales (10 %) muy ricas en hidroxiprolina. Finalmente, la *pared celular secundaria*, mucho más delgada que la primaria y adyacente a la membrana plasmática, está compuesta principalmente de microfibras de celulosa (40-80 %), que contiene también hemicelulosas (10-40 %), pectinas y algo de lignina (5-25 %).^{17,23}

La celulosa está compuesta por largas cadenas lineales de D-glucopiranosas enlazadas mediante enlaces β -(1 $\rightarrow$ 4) que se asocian entre ellas mediante interacciones de tipo puente de hidrógeno formando unas microfibras de celulosa que se hallan entrecruzadas por hemicelulosas, en el caso de la uva básicamente xiloglucanos (que representan alrededor del 2 % de las paredes celulares en células de pulpa y pieles de uva). Los xiloglucanos²⁴ consisten en cadenas de β -(1 $\rightarrow$ 4) D-glucopiranosas, en donde hasta el 75% de residuos de glucosa pueden contener ramificaciones de xilopiranosas en posición 6. Se cree que los xiloglucanos interaccionan con las microfibras de celulosa mediante interacciones por puentes de hidrógeno, mientras que se pueden hallar enlazadas covalentemente a algunos de los polisacáridos pécticos.¹⁷ En las pieles de la baya de uva, la red celulosa-xiloglucano puede representar entre el 30 y el 40 % de la pared celular. Las pectinas pueden representar hasta el 20 % de la pared celular de la piel de uva, y hay casi el doble en la pared celular de las células

del mesocarpio que en las del epicarpio.^{25,26} Los

polisacáridos pécticos consisten básicamente en tres familias: los homogalacturonanos (que corresponden prácticamente al 80 % de las pectinas), los rhamnogalacturonanos de tipo I (alrededor del 15 % de las pectinas) y los rhamnogalacturonanos de tipo II (del orden del 5 % del contenido total de las pectinas). Los homogalacturonanos (**HG**) consisten en cadenas de ácido

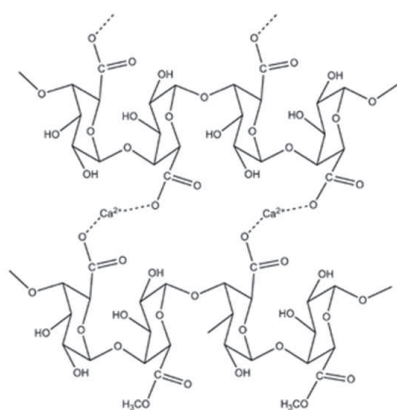


Figura 9. Estructura de dos cadenas de HG entrecruzadas mediante puentes de Calcio. Ilustración extraída de **23**

D-galacturónico enlazados mediante uniones del tipo α -(1 $\rightarrow$ 4), en los que la mayoría de grupos carboxilo se hallan esterificados con metanol (pueden llegar hasta el

75 % de residuos metilados) o bien en forma de anión carboxilato que, a través de cationes divalentes como el calcio, permiten el entrecruzamiento de distintas cadenas de HG (Figura 9).

Los rhamnogalaturonanos de tipo I (**RG-I**), consisten en una cadena formada por la repetición de un disacárido de ácido D-galacturónico y L-rhamnosa, de tipo $[\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-GalpA-(1}\rightarrow 2\text{)-}\alpha\text{-Rhap-(1}\rightarrow)]$ que se incrustan en las cadenas de HG. Entre el 20 y el 80 % de los residuos rhamnogalacturónicos están ramificados con cadenas que, en el caso de la uva, contienen básicamente L-arabinosa y D-galactosa, fragmentos conocidos como arabinanos y arabinogalactanos (que pueden llegar a representar el 25 % de las paredes celulares de la pulpa y el 7 % de las paredes celulares de la piel), siendo los arabinogalactanos de tipo II los mayoritarios en la uva y pudiendo estar unidos a proteínas. Los rhamnogalacturonanos de tipo II (**RG-II**), cuya estructura se muestra en la Figura 10 corresponden a una cadena formada por al menos ocho piranósidos de ácido D-galacturónico, unidos mediante enlaces $\alpha\text{-(1}\rightarrow 4\text{)}$. Esta cadena se halla ramificada con dos disacáridos distintos anclados en el carbono 3 del ácido galacturónico (cadenas laterales **C** y **D**), y con otros dos oligosacáridos que se anclan al carbono 2 del ácido galacturónico (cadenas laterales **A** y **B**) a través de un residuo de apiosa. A su vez, y mediante el diol *cis* de los residuos de apiosa, se pueden entrecruzar dos moléculas de RG-II a través de un átomo de boro, formando los llamados dímeros de RG-II, que se pueden observar en la representación esquemática de la Figura 10.

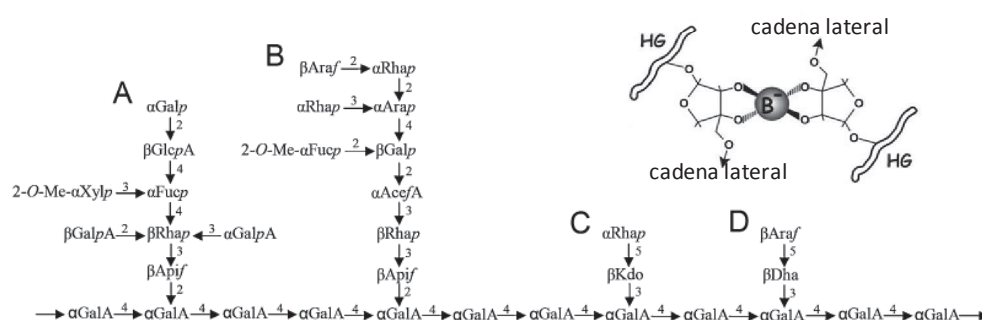


Figura 10. Diagrama de la estructura del fragmento péptico RG-II. Los números indican la posición del enlace de los residuos y sus abreviaturas corresponden a: αGalpA ($\alpha\text{-D-galacturopiranosido}$); βGalp ($\beta\text{-D-galactopiranosido}$); αFucp ($\alpha\text{-L-fucopiranosido}$); βAraf ($\beta\text{-L-arabinofuranosido}$); αArap ($\alpha\text{-L-arabinopiranosido}$); βApif ($\beta\text{-D-apiofuranosido}$); $\beta\text{Glc pA}$ ($\beta\text{-D-glucopiranosido}$); αRhap ($\alpha\text{-L-rhamnogalacturonosido}$), βRhap ($\beta\text{-L-rhamnogalacturonosido}$), $2\text{-O-Me-}\alpha\text{Fucp}$ ($2\text{-O-metil-}\alpha\text{-L-fucopiranosido}$), $2\text{-O-Me-}\alpha\text{Xilp}$ ($2\text{-O-metil-}\alpha\text{-D-xilopiranosido}$), αAcefA ($\alpha\text{-L-acérico}$), Kdo ($\text{ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-otulosónico}$), Dha ($\text{ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosónico}$). Ilustración extraída de **204**

Las células de la piel tienen una concentración de azúcares reductores muy baja, una cantidad importante de ácidos (salificados debido a la ingente cantidad de cationes presentes) donde predominan el ácido cítrico y ácido tartárico esterificado con ácidos fenólicos (mayormente *p*-cumárico y cafeico).¹⁰ El contenido de las células de la piel siempre tiene un pH más alto que las células de la pulpa, debido a la mayor cantidad de potasio presente en ellas. La piel se caracteriza especialmente por contener cantidades significativas de metabolitos

INTRODUCCIÓN

secundarios con una gran importancia enológica, tales como sustancias aromáticas y compuestos fenólicos que se van acumulando a lo largo de la madurez. El contenido fenólico de la piel de uva se encuentra entre los 500 y los 3500 mg de fenoles por Kg de piel, aunque estos datos hay que tomarlos con cautela, ya que dependen severamente de los métodos de extracción y análisis utilizados. En las células de la epidermis y en la primera capa subepidérmica de variedades blancas y tintas, podemos encontrar ácidos benzoicos y cinámicos, flavonoles, estilbenos (especialmente en el caso de uvas con infecciones fúngicas) y taninos. En variedades tintas, además, se pueden encontrar antocianos localizados esencialmente en las células de la hipodermis. Todos estos fenoles se pueden encontrar enlazados a los polisacáridos de la pared celular, confinados en las vacuolas celulares e, incluso, asociados o muy próximos al núcleo celular.^{17,27-29}

PULPA.

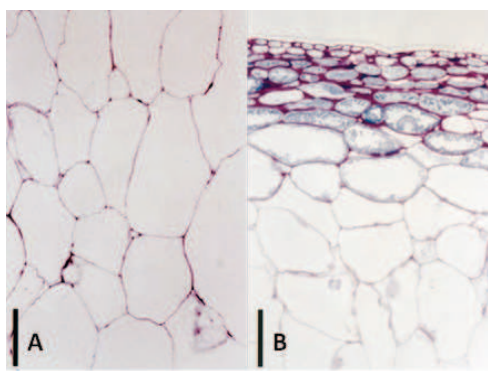


Figura 11. Comparación entre las células de la pulpa (A) y las células de la piel (B), en donde se puede observar que las células de la piel tienen las paredes celulares mucho más gruesas (teñidas de color violeta). Fotografías extraídas de 55

La pulpa, que podríamos decir que abarca el mesocarpio y el endocarpio (puesto que no existe frontera alguna entre ambas regiones y, por lo tanto, son indistinguibles), está formada por entre 25 y 30 capas de grandes células poligonales con una pared celular muy delgada (en la Figura 11 se puede observar las células de la parte central del mesocarpio (A) en comparación con las células de la piel (B)). En una baya en época de recolección, las células de la pulpa pueden llegar a ser 75 veces más grandes que las células de la hipodermis. En

ese mismo momento, las paredes celulares de las células de la hipodermis son cerca de 20 veces más gruesas que las paredes celulares de las células de la pulpa. De hecho, la uva se caracteriza por su baja concentración de sustancias pécticas al llegar a la madurez (las pectinas representan sólo entre el 0.02 % y el 0.6 % del peso fresco de la baya) en comparación con otros frutos.^{10,25}

La pulpa es la parte de la baya más importante en peso ya que puede representar entre el 75 % y el 85 % del peso total de la uva. Una gran parte del volumen de las células de la pulpa es ocupado por grandes vacuolas que contienen el mosto: un líquido turbio, de base acuosa, ligeramente coloreado, con una elevadísima densidad debida a la enorme cantidad de solutos que contiene. Los principales constituyentes del mosto son azúcares; esencialmente glucosa y

fructosa (siendo esta última ligeramente predominante en el momento de la vendimia, con una ratio glucosa/fructosa alrededor de 0.9), aunque también se han identificado otros azúcares como arabinosa, xilosa, rhamnosa, maltosa y rafinosa entre otros. La concentración de azúcares reductores en uva madura oscilaría entre los 150 y los 260 g/L. La acidez del mosto (parámetro importantísimo desde el punto de vista enológico) está determinada básicamente por tres ácidos: el tartárico, el málico y el cítrico, aunque también se pueden encontrar otros ácidos propios de los ciclos de la glicólisis y del ácido shiquímico (tales como pirúvico, α -cetoglutarico, fumárico, shiquímico, etc.) a niveles de trazas. La acidez de un mosto puede oscilar entre los 4 y los 15 g/L expresados en ácido tartárico, y su pH se encuentra normalmente entre 2.8 y 3.5. Además, la pulpa es muy rica en cationes, entre los cuales destaca el potasio (entre 0.8 y 2 g/L), muchísimo más abundante que el calcio, el magnesio y el sodio (el resto de cationes principales del mosto, que pueden representar algunas decenas o centenares de mg/L). Además el mosto contiene sustancias nitrogenadas (del orden de 40 a 220 mM de nitrógeno, ya sea en forma orgánica o amoniacal), entre las cuales destaca la fracción de aminoácidos (de 2 a 13 mM en equivalentes de leucina), en donde la prolina, la arginina, la treonina y el ácido glutámico representan cerca del 90 % de la concentración total de aminoácidos (las uvas con mayor acidez suelen ser las más ricas en aminoácidos). Dentro de la fracción de sustancias nitrogenadas, cabe añadir las proteínas solubles, que en el mosto pueden encontrarse en concentraciones entre 1.5 y 100 mg/L. A pesar de que la mayoría de los metabolitos secundarios (tales como compuestos fenólicos y compuestos aromáticos) se encuentran en la piel de la uva, en la pulpa también se acumulan algunos compuestos volátiles tales como alcoholes, aldehídos y ésteres, que participan del aroma de la uva. En la mayoría de variedades viníferas la composición fenólica de la pulpa se basa fundamentalmente en ácidos hidroxicinámicos, gran parte de los cuales se hallan esterificados con ácido tartárico.¹⁰

Todos estos compuestos contenidos en la pulpa comentados en el párrafo anterior no se encuentran distribuidos uniformemente por la pulpa de la baya, sino que se observan gradientes radiales y axiales (estos últimos considerando el eje del pedúnculo).³⁰ Esta heterogeneidad en la composición de la pulpa tiene sus repercusiones en uva de vinificación, puesto que es un factor a tener en cuenta a la hora del prensado de la uva, especialmente en el caso de la vinificación en blanco.

SEMILLAS.

Las semillas, que como se ha comentado anteriormente corresponden al desarrollo de los óvulos florales fecundados, constituyen el elemento encargado de perpetuar el individuo

INTRODUCCIÓN

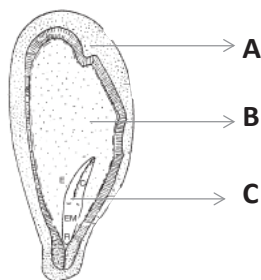


Figura 12. Ilustración de una semilla de uva, mostrando el tegumento (A), el albúmen (B) y el embrión (C). Ilustración extraída de 31

por vía sexual. Anatómicamente las semillas comprenden tres tejidos principales: la envoltura externa o *tegumento*, el *albumen* y el *embrión*, tal y como se muestra en la Figura 12. En la envoltura externa se pueden diferenciar cinco zonas, que se pueden observar en la Figura 13: una cutícula, una epidermis y tres envolturas conocidas como tegumentos; el tegumento externo (compuesto por largas células parenquimáticas), el tegumento medio (compuesto por un par de capas de células) y el tegumento interno (con alrededor de tres capas de células).

Esta envoltura externa, lignificada y rica en taninos, rodea el *albumen*: un tejido blando formado por células uniformes poligonales que contienen una gran cantidad de aceite (esencialmente ácidos oleico y linoleico, que pueden llegar a representar entre un 13 % y un 20 % del peso de la semilla) y otros elementos nutritivos que van a alimentar a la pequeña planta en el comienzo de su desarrollo a partir del *embrión* que, situado en la parte central hacia el pico de la pepita, es el encargado de dar origen a tejidos de

tallo y raíz después de la germinación.^{10,31}

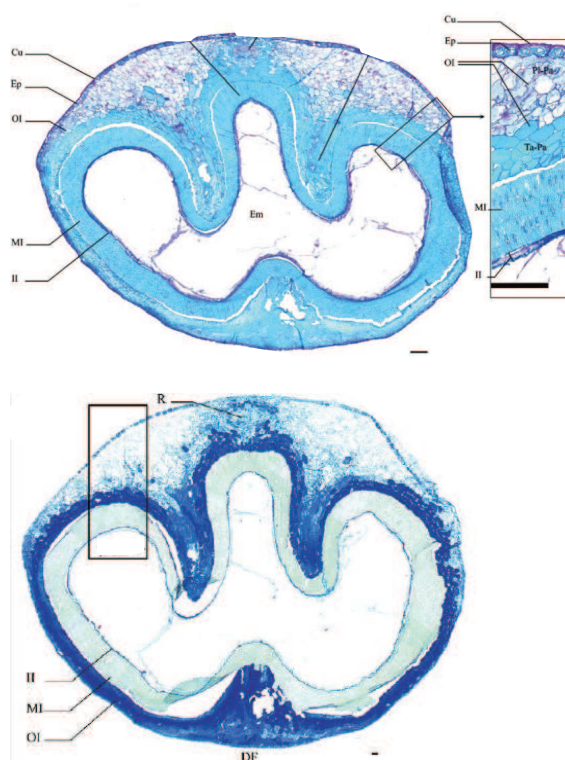


Figura 13. Fotografía de una sección transversal de semilla de uva. ARRIBA: sección transversal en la que se muestran la cutícula (Cu), la epidermis (Ep), el tegumento externo (OI), el tegumento medio (MI) y el tegumento interno (II). ABAJO: fotografía de una sección transversal de semilla en la que se ha realizado una tinción con DMACA, que tiñe los polifenoles de color azul. Imágenes extraídas de 35

Las semillas representan entre un 0 % y un 6 % del peso de la baya. Los componentes más importantes de las semillas son el agua (25-45 %), compuestos de naturaleza glucídica (34-46 %), aceite (13-20 %), sustancias nitrogenadas (4-7 %), minerales (2-4 %) y taninos (4-6 %). Estos últimos, de naturaleza fenólica, tienen una importancia cabal en la elaboración del vino tinto; las semillas resultan una fuente de compuestos fenólicos ya que pueden llegar a contener entre el 20 % y el 55 % del total de compuestos fenólicos de la baya, dependiendo su concentración y su composición de la variedad.³²⁻³⁴ Estos taninos, tal y como se puede observar en la Figura 13, se encuentran básicamente en la epidermis, el tegumento externo y la capa

interior del tegumento interno.^{35,36}

1.2.2. Compuestos fenólicos de la uva.

Hasta el momento se ha hablado ya de los compuestos fenólicos de la uva, y de su ubicación en las distintas partes de la baya. Dichos compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de la vid, cuya biosíntesis parece estar relacionada con necesidades específicas como la protección frente a la radiación ultravioleta o a los ataques fúngicos. En este apartado se revisaran las principales familias de compuestos fenólicos de la uva, sus estructuras y la nomenclatura que se utilizará en adelante para referirse a ellos en este documento.

Antes de entrar en las distintas familias, cabe considerar algunas generalidades acerca de los compuestos fenólicos de la uva, también llamados fenoles o polifenoles. La característica común de los compuestos fenólicos es, como su nombre indica, el hecho que poseen como mínimo un grupo fenol (estructura A de la Figura 14), o sea todos ellos contienen como mínimo un anillo bencénico unido, como mínimo, a un grupo hidroxilo. Si consideramos la clasificación de los compuestos fenólicos desde el punto de vista de su estructura, se puede hacer una primera distinción entre flavonoides y no

flavonoides. Los compuestos flavonoides se caracterizan por tener en común un esqueleto como el que se muestra en la Figura 14 (B): que consiste en dos anillos aromáticos unidos mediante un heterociclo de tipo pirano, conformando un sistema C6-C3-C6. De los compuestos mencionados con anterioridad en el texto corresponden a la familia de los flavonoides: los flavonoles, los antocianos y los taninos, mientras los ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos) y los estilbenos corresponden a los no flavonoides.

Una vez comentadas estas generalidades, vamos a considerar los distintos compuestos fenólicos solubles de la uva por orden de abundancia.

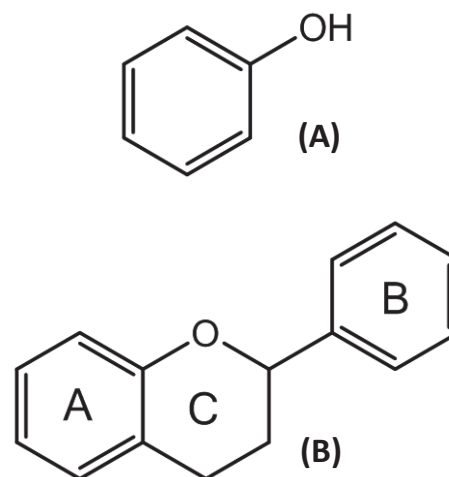


Figura 14. Estructura típica de un grupo fenol (A) y esqueleto característico de la familia de los flavonoides (B).

TANINOS.

En la sección anterior se ha mencionado la presencia de taninos en las pieles y en las semillas de la uva. El término tanino, que procede de su homólogo francés *tanin*, se usaba tradicionalmente para aquellas sustancias capaces de curtir las pieles para convertirlas en

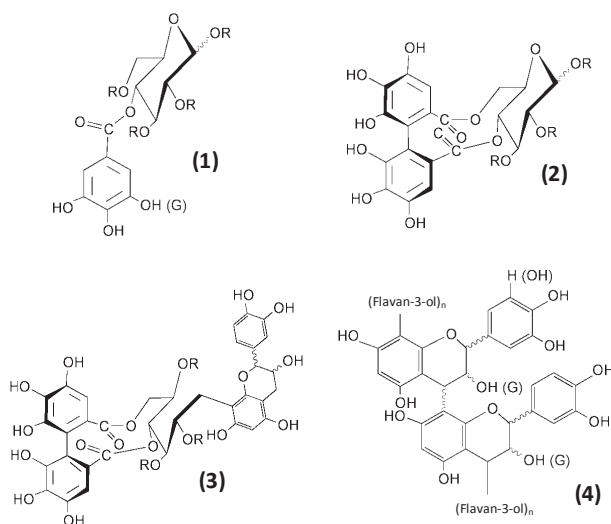


Figura 15. Clasificación de los taninos en función de su estructura. (1) Galotanninos. (2) Elagitaninos. (3) Taninos complejos. (4) Taninos condensados. (G): posiciones que pueden estar esterificadas con ácido gálico u otros sustituyentes. Extraído de 37.

cuero. Si basamos la clasificación de los taninos en función de sus características estructurales, es posible distinguir cuatro familias principales que se muestran en la Figura 15. Los *galotanninos* son aquellos taninos en los cuales unidades de ácido gálico están enlazadas a unidades de polioles o triterpenoides. Los *elagitaninos* son taninos en los cuales al menos dos

unidades de ácido gálico están enlazadas mediante una unión C-C. Los llamados *taninos complejos* son taninos en los que unidades de

flavan-3-ol están enlazadas a galotanninos o elagitaninos mediante un enlace glicosídico. Finalmente, los *taninos condensados* consisten en cadenas en donde unidades de flavan-3-ol se enlazan mediante uniones C-C entre el C-4 de una unidad y el C-6 o el C-8 de la unidad siguiente.³⁷ Los taninos procedentes de las pieles y las semillas de uva son taninos del tipo *taninos condensados*, o sea que se trata de polímeros y oligómeros de flavan-3-oles. Puesto que, tal y como hemos visto, el término tanino resulta muy genérico, de ahora en adelante se utilizará el término proantocianidinas para describir estos compuestos.

En la Figura 16 se muestra un tetrámero hipotético constituido por las subunidades mayoritarias que componen las proantocianidinas de la uva: catequina (C), epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC) y galato de epicatequina (ECg). En dicho tetrámero las unidades de flavan-3-ol se hallan unidas mediante enlaces interflavánicos C-4→C-8. Si nos fijamos en el anillo B de las unidades monoméricas de dicha proantocianidina, se puede observar que C, EC y ECg poseen dos grupos hidroxilo, mientras que la EGC contiene tres. Esta diferenciación estructural que, como se verá más adelante tiene su importancia en enología, permite hacer una sub-clasificación de las proantocianidinas: Las proantocianidinas formadas por unidades

dihidroxiladas en el anillo B (C, EC y ECg) se llamarán en adelante procianidinas, mientras que las proantocianidinas formadas por unidades trihidroxiladas en el anillo B (EGC) se llamarán prodelfinidinas. Finalmente, en el mismo tetrámero hipotético de la Figura 16, se puede observar que una de las subunidades (ECg) se halla esterificada con una molécula de ácido gálico, donde el enlace éster se forma entre el oxígeno del C-4 de la EC y el grupo ácido del ácido gálico. Esta galoilación será, como se verá más adelante, un parámetro importante en la composición de las proantocianidinas de la uva, y en las propiedades organolépticas del vino. Se pueden encontrar entre 1000 y 6000 mg de proantocianidina por cada Kg de semillas, y entre 100 y 500 mg/Kg en el caso de las pieles.³⁸

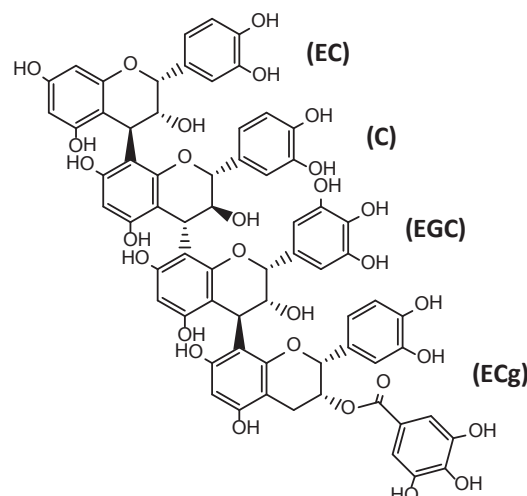


Figura 16. Tetrámero construido con los cuatro monómeros característicos de las proantocianidinas de la uva.

ANTOCIANOS.

El término antociano, que etimológicamente deriva de los vocablos griegos *anthos* (flor) y *kyanos* (azul), se utiliza para designar a una familia de pigmentos ampliamente distribuida en la naturaleza, que absorben la luz visible y son los responsables de muchos de los colores que se pueden observar en tejidos vegetales, desde el rojo hasta el azul. Los antocianos son, por lo tanto, los responsables del color de los hollejos de uva tinta, y del vino que con ella se elabora. Cuando se encuentran en forma de aglicona se habla de antocianidinas, mientras que si se hallan glicosiladas se las denomina como antocianinas. Si nos centramos en los antocianos de *Vitis vinifera*, hablaremos de cinco antocianidinas-3-O-glucósidos, que se muestran en la Figura 17

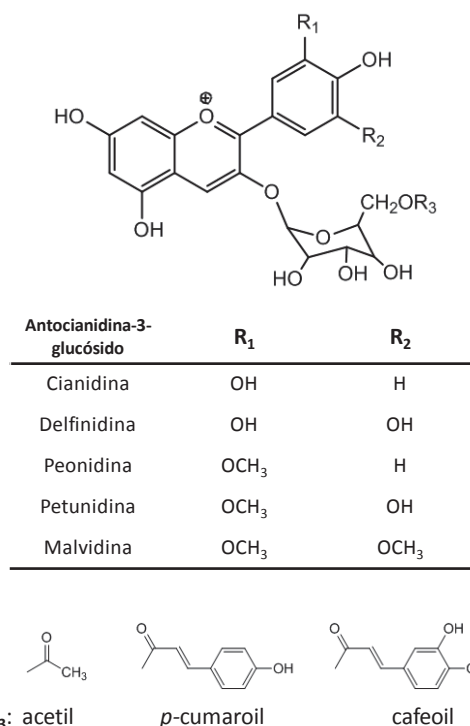


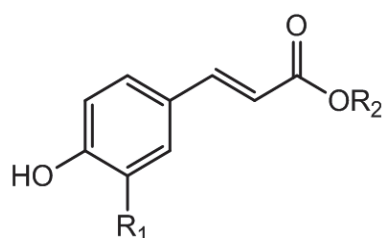
Figura 17. Estructura general de las antocianinas y principales antocianinas de la baya de uva.

INTRODUCCIÓN

(aunque en otras especies del género *Vitis*, se pueden encontrar diglucósidos en posiciones 3 y 5), siendo la malvidina-3-*O*-glucósido la antocianina mayoritaria. Además, la glucosa puede estar acilada en su posición 6 con ácido acético, ácido *p*-cumárico y ácido cafeico. Una molécula de antocianidina posee diferentes centros reactivos, tanto nucleófilos como electrófilos,³⁹ que, a lo largo de la vida del vino, contribuirán a la evolución de estas moléculas y, por consiguiente, a la evolución del color del vino tinto.^{40,41} En las pieles de uva tinta, la concentración global de antocianos se encuentra en el rango entre 500 y 3000 mg/Kg, dependiendo de la variedad.⁴²

ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS.

Los ácidos hidroxicinámicos son los compuestos fenólicos no flavonoides mayoritarios de la uva. Este hecho se debe, tal y como se ha comentado anteriormente, a que estos compuestos, además de encontrarse en la piel de la uva se encuentran también en la pulpa (la parte que más contribuye en el peso de la baya). Las estructuras de algunos de los principales ácidos hidroxicinámicos de la uva se muestran en la Figura 18 . Su forma natural es la forma *trans* (*E*), aunque se pueden encontrar, en mucha menor proporción, algunos isómeros *cis* (*Z*).⁴³ Además, estos ácidos hidroxicinámicos se suelen hallar esterificados con ácido tartárico; por ese motivo en la literatura se pueden encontrar referencias a estos compuestos bajo el nombre de hidroxicinamatos. De hecho, los ácidos hidroxicinámicos más abundantes en la uva (que se hallan en concentraciones superiores en las pieles que en la pulpa) son los ésteres tartáricos del ácido *p*-cumárico (ácido cutárico) y del ácido cafeico (ácido caftárico), que se hallan en las pieles en concentraciones del orden de 20-150 mg/Kg de uva.⁴²



Ácido hidroxicinámico	R ₁	R ₂
<i>p</i> -cumárico	H	H
cafeico	OH	H
ferúlico	OCH ₃	H
cutárico	H	
caftárico	OH	

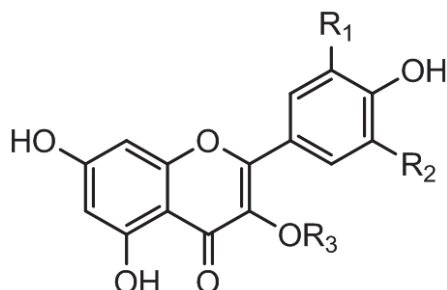
Figura 18. Estructura general de los ácidos hidroxicinámicos y principales ácidos hidroxicinámicos de la uva.

FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS.

A pesar de ser mucho menos abundantes que sus polímeros y oligómeros, también podemos encontrar flavan-3-oles monoméricos en la uva, especialmente en las semillas.⁴⁴ Los principales flavan-3-oles monoméricos de la uva son la (+)-catequina (C), la (-)-epicatequina

(EC), y el galato de (-)-epicatequina (ECg), cuyas estructuras se han mostrado al describir las proantocianidinas.

FLAVONOLES.



Flavonol	R ₁	R ₂
Kaempferol	H	H
Quercetina	OH	H
Miricetina	OH	OH
Isorhamnetina	OCH ₃	H
Laricitrina	OH	OCH ₃
Siringetina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 19. Estructura general de los flavonoles y principales flavonoles de la baya de uva.

Los flavonoles corresponden también una de las familias de flavonoides de la baya de uva. Estos compuestos, de un ligero color amarillo, parecen estar estrechamente relacionados con la protección de la uva frente a la radiación ultravioleta. Dicha relación se deduce de su espectro de absorción (con una absorbancia aguda en las longitudes de onda propias de las radiaciones ultravioletas de tipos A y B (UV-A e UV-B), y también del hecho que a mayor iluminación de la uva, mayor es la cantidad de flavonoles que en ella se concentran.^{45,46} En la Figura 19, se muestra el esqueleto característico de los flavonoles y los

principales flavonoles de la uva. Los flavonoles sólo existen en la uva como glicósidos (cuando el sustituyente R₃ es un carbohidrato), ya sea por unión con monosacáridos (en forma de glucósidos, galacturósidos o glucurónidos) o por unión con disacáridos, originando moléculas más complejas como por ejemplo la rutina (quercetina-3-*O*-rhamnosilglucósido). Las concentraciones de flavonoles en la uva se hallan en el rango de 10 a 300 mg/Kg, dependiendo de la variedad.⁴²

ESTILBENOS.

Los estilbenos, compuestos no flavonoides cuya estructura se muestra en la Figura 20, a pesar de encontrarse en la uva en concentraciones muchísimo más bajas que el resto de compuestos fenólicos tratados en este apartado, han resultado ser un foco de atención en la investigación enológica de los últimos años debido a los posibles beneficios que ejercen sobre la salud humana.⁴⁷⁻⁴⁹ Esta familia de compuestos, que como se ha indicado con anterioridad se halla en la piel de la uva, parece estar relacionada con la respuesta a ataques fúngicos (mayoritariamente de *Botrytis cinerea*) y otras fuentes de estrés como la exposición a niveles elevados de radiación ultravioleta.⁵⁰ Los principales estilbenos de la uva son el *trans*-

INTRODUCCIÓN

resveratrol (que se puede encontrar en concentraciones que rondan los 20 µg/g de piel fresca) y su derivado glucosilado: el piceido.

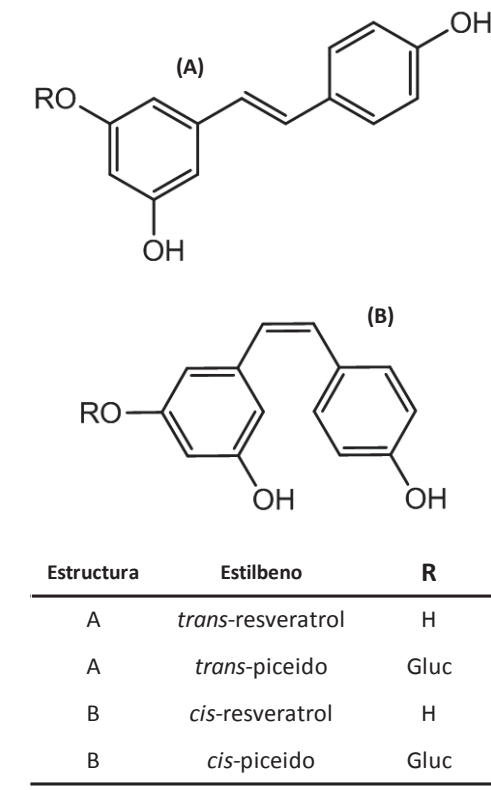


Figura 20. Estructura de los principales estilbenos de la baya de uva.

1.3. EL PROCESO DE DESARROLLO Y MADURACIÓN DE LA UVA.

Una vez descrito el ciclo anual de la vid, la morfología y composición de la baya, y los principales compuestos fenólicos que esta contiene, se va a proceder a la evaluación de la evolución de los compuestos de la uva a lo largo de la madurez, puesto que de dicha evolución dependerán en gran parte la composición y la calidad de la uva en el momento de la cosecha y, por consiguiente, la calidad del vino que con ella se elabore. Para ello se continuaran distinguiendo tres zonas en la uva: la piel, la pulpa y las semillas. Aunque resulta obvio que se producen una cantidad ingente de cambios en el fruto desde el cuajado hasta la madurez, en esta sección se van a describir los cambios más relevantes en la composición química de la uva, empezando por la pulpa debido a su mayor contribución en el peso de la baya. De la evolución de los componentes de la pulpa surgirá, como se verá más adelante el concepto de *madurez tecnológica*. Una vez descritos los cambios en la pulpa de la uva, se abordará el efecto de la madurez en los componentes y la composición química de las pieles y, finalmente el efecto del

mismo proceso en la composición química de las semillas de uva. De la evolución de los componentes de pieles y semillas surgirá, como veremos más adelante, el concepto de *madurez fenólica*.

El proceso de maduración, es un proceso complejo que no tiene porque desarrollarse siempre del mismo modo, puesto que alcanzar una correcta madurez depende de muchos factores. Dichos factores se van a discutir también al final de este apartado.

1.3.1. Evolución de los componentes de la pulpa durante el desarrollo de la baya.

Los principales componentes químicos de la pulpa de la uva madura en orden de concentración corresponden, tal y como se ha explicado en la sección 1.2.1, a los azúcares, seguidos por los ácidos orgánicos y por las sustancias minerales (especialmente el catión potasio (K^+)). A pesar de que, como se ha descrito, hay muchos otros compuestos en la pulpa de la uva, esta sección se centrará en la evolución de estas tres familias de compuestos, puesto que son las que se hallan en

mayor contenido y que, tradicionalmente, se han utilizado para evaluar el nivel de madurez de la uva. En la Figura 21, se puede observar la evolución de la concentración de azúcares y ácidos orgánicos a lo largo del proceso de desarrollo de la baya descrito en la sección 1.1.2. Cuando el cociente entre la concentración de azúcares y la acidez alcanza su valor máximo, se considera que se ha alcanzado la *madurez industrial*, también conocida como *madurez de la pulpa*. Esta *madurez industrial* de la uva determinará el grado alcohólico, la acidez total y el pH del vino que se elaborará con ella: tres parámetros importantísimos y básicos que pueden tener una gran influencia sobre las características organolépticas, la calidad y la evolución de dicho vino.

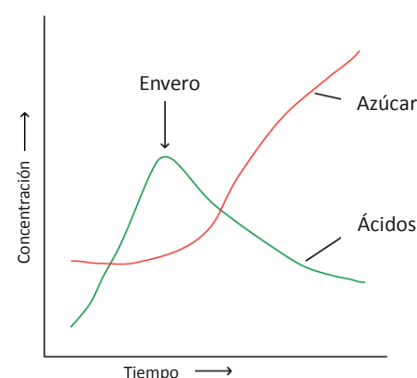


Figura 21. Evolución de los azúcares y los ácidos orgánicos de la uva durante su desarrollo y madurez.

AZÚCARES.

Sin duda el proceso más espectacular y significativo que se da en la baya durante su desarrollo desde el envero hasta llegar a la madurez completa es la acumulación de azúcares en el interior del fruto, específicamente en las vacuolas celulares de la pulpa de la uva. Esos

azúcares que acabaran endulzando la uva proceden de los órganos fotosintéticos; especialmente de las hojas (por ser estas los órganos fotosintéticos más productivos y eficientes), pero cabe recordar que todos los órganos verdes (incluyendo el fruto hasta llegar al envero) son capaces de realizar la fotosíntesis.

Las hojas contienen distintos tipos de carbohidratos que elabora gracias a la fotosíntesis, entre los que destacan especialmente la glucosa, fructosa, la sacarosa y el almidón. El almidón es una forma de reserva estable y no sufre prácticamente alteraciones durante el período vegetativo. La glucosa y la fructosa se utilizan en primer lugar para satisfacer las necesidades de las propias hojas y, los azúcares que sobran se distribuyen al resto de órganos en forma de sacarosa (la forma principal bajo la cual se realiza la migración de azúcares entre los diferentes órganos de la planta a través del floema). Los órganos receptores de los carbohidratos que sintetizan las hojas pueden ser yemas, pámpanos, tronco, raíces y bayas. El orden de prioridad es distinto según la fase del ciclo vegetativo en el que se encuentre la planta. En la fase de CRECIMIENTO del ciclo vegetativo, el órgano prioritario son las extremidades de los pámpanos. Desde la *floración*, y gracias a sus elevadas concentraciones de hormonas de crecimiento, las inflorescencias empiezan a ejercer una fuerte demanda de nutrientes, que se mantiene hasta la completa madurez (o hasta el momento de la vendimia). Una vez realizada la cosecha, durante el AGOSTAMIENTO, los órganos leñosos (raíces, tronco, brazos y sarmientos) son los que gozan de prioridad como receptores de los azúcares procedentes de las hojas.⁵¹

Durante el periodo de crecimiento herbáceo de la baya (fase I), el fruto recibe sacarosa procedente de las hojas adultas que realizan la fotosíntesis, y mediante un complejo sistema de invertasas de membrana la sacarosa penetra en las células vegetales en forma de glucosa y fructosa. A pesar de ello, el incremento de la concentración de azúcares en las bayas es discreto, hecho que se debe a que los azúcares importados diariamente son parcialmente metabolizados para el desarrollo del fruto y, especialmente para el crecimiento y maduración de las semillas. Durante esta fase de crecimiento herbáceo, la intensidad respiratoria incrementa proporcionalmente a la multiplicación celular, y la respiración se produce principalmente en la pulpa (dónde se utilizan los azúcares y los ácidos orgánicos como sustrato de la respiración) y especialmente en las semillas (dónde además se pueden utilizar ácidos grasos que contienen como sustrato de la respiración). Durante la fase I de crecimiento herbáceo, la concentración de azúcares va aumentando progresivamente pero de una manera discreta, ya que no excede los 20 g de azúcares reductores por cada Kg de peso fresco de uva. Más del 85 % de estos azúcares reductores corresponde a glucosa (probablemente debido al

uso de la fructosa como sustrato para la biosíntesis celular, aunque también se ha postulado la existencia de epimerasas que transforman la fructosa en glucosa), al inicio del crecimiento herbáceo la relación glucosa / fructosa (G/F) se sitúa alrededor de 5, y decrece hasta 2 en el envero.⁵²

Durante el *envero* se producen cambios profundos en el metabolismo de la baya, y a partir de este fenómeno, con el inicio de la fase de MADURACIÓN, comienza una acumulación masiva de glucosa y fructosa en las vacuolas de las células de la pulpa. Una compleja y frenética actividad enzimática se mantiene activa a lo largo del proceso de maduración pudiendo llegar a acumular hasta 2.5 mmol de azúcar por hora y por baya, disminuyendo progresivamente la velocidad de acumulación a medida que avanza el período de maduración, al mismo ritmo al que se reduce la tasa respiratoria, que en esta fase III se desplaza hacia la piel de la uva. Unos veinte días después del envero, el contenido de hexosas en la baya se sitúa cerca de 1 M, con una relación G/F cercana a la unidad, y una vez alcanzada la madurez la pulpa puede contener de 150 a 250 g/L de hexosas, con una relación G/F entre 0.9 y 1. En el grano de uva maduro, además, pequeñas cantidades de ácido málico pueden utilizarse para biosintetizar glucosa (como se discutirá más adelante), lo que también puede contribuir a un incremento discreto de azúcar en la pulpa de la baya de uva.^{8,10}

Resumiendo, se puede afirmar que la acumulación de azúcares en la pulpa de la baya se debe al balance positivo que resulta entre las hexosas importadas (azúcares procedentes de la fotosíntesis y azúcares procedentes de las sustancias de reserva acumuladas en la planta) y producidas (la glucosa procedente de la degradación del ácido málico) y las hexosas consumidas (catabolizadas durante la respiración del racimo, o utilizadas por este para biosintetizar otros compuestos), considerando también el efecto de dilución debido a la acumulación de agua y el incremento del volumen de la baya.

ÁCIDOS ORGÁNICOS.

Desde el cuajado hasta la madurez, la uva contiene la mayoría de los ácidos involucrados en las principales rutas metabólicas de los seres vivos: la vía del ácido shiquímico, la glicólisis, el ciclo de Krebs... aunque la mayoría de ellos se encuentran en cantidades muy bajas, prácticamente insignificantes, excepto el ácido cítrico, que puede llegar a encontrarse en concentraciones de 500 mg/L en el momento de la vendimia. La acidez total de la uva viene definida básicamente por las concentraciones de ácido tartárico y ácido málico, que representan alrededor del 90 % de los ácidos de la uva, y cuyas estructuras químicas se

INTRODUCCIÓN

muestran en la Figura 22. A pesar de la similitud de sus estructuras moleculares, estos ácidos se forman en las bayas por vías muy distintas, y su evolución a lo largo del proceso de madurez difiere también significativamente, tal y como se detalla a continuación.

La uva es el único fruto cultivado de origen europeo que acumula cantidades significativas de ácido tartárico, concretamente el enantiómero L-(+)-tartárico, molécula que se genera como producto secundario del metabolismo de los azúcares, formándose principalmente en los granos de uva.

Durante el período de CRECIMIENTO HERBÁCEO (fase I), cuando la multiplicación celular es muy intensa, se acumulan rápidamente en la baya grandes cantidades de ácido

tartárico, pudiendo llegar a los 20 g/L. Después del envero la concentración de ácido tartárico disminuye ligeramente, y se mantiene más o menos constante (entre 10 y 3.5 g/L) durante el período de maduración (fase III), a pesar del aumento del volumen del fruto por la acumulación de agua. La cantidad de ácido tartárico en la uva suele mantener una proporcionalidad directa con la humedad, mientras parece mantener una proporcionalidad inversa con la temperatura.^{10,30}

El ácido málico de la uva consiste básicamente en el enantiómero L-(-)-málico. Durante el período de crecimiento herbáceo (fase I), el ácido málico se acumula en las vacuolas de las células del mesocarpio de la baya (pudiendo llegar a concentraciones superiores a 15 mg/g de peso fresco de baya) como producto secundario del catabolismo de los azúcares, aunque también se ha descrito una ruta de formación del ácido málico en la baya por β -carboxilación del ácido pirúvico. A partir del envero, la concentración de ácido málico empieza a descender; dicho descenso se debe por un lado a su utilización como sustrato para la respiración celular, así como a su utilización para biosintetizar glucosa mediante la gluconeogénesis (aunque la cantidad de málico transformado en glucosa no excede el 5 % del málico acumulado en la baya, lo que vendría a representar menos de 10 g/L de glucosa biosintetizada por esta vía). La concentración de ácido málico en el momento de la vendimia se sitúa entre 2 y 3 mg/g de peso fresco de pulpa (lo que vendría a representar entre 1 y 5 g/L de mosto).^{10,30,53}

Ambos ácidos, que como se ha comentado determinan la acidez total y el pH del mosto, juegan también un interesante rol como reguladores iónicos, pues de algún modo, la

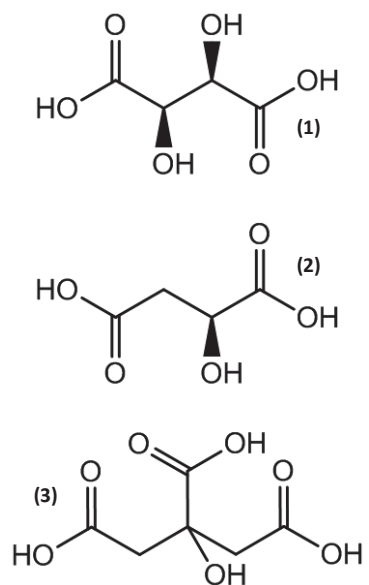


Figura 22. Principales ácidos orgánicos de la uva. (1) Ácido L-(+)-tartárico. (2) Ácido L-(-)-málico. (3) Ácido cítrico.

importación de cationes y el consumo de protones durante el desarrollo de la baya inducen o favorecen la producción de estos ácidos a partir de los azúcares. A modo de resumen se puede afirmar que la síntesis de estos ácidos durante las primeras etapas del desarrollo del fruto conduce a una gran acumulación de estos en las vacuolas celulares. A partir del envero la acidez empieza a disminuir (a pesar de que su biosíntesis no se detiene) a causa de la combustión del málico durante la respiración, aunque la disminución de la acidez total del mosto durante la maduración también se debe a la salificación o neutralización de los ácidos por parte de los cationes importados a las bayas y el fenómeno de dilución debido al incremento de volumen de las mismas por acumulación de agua.

SUSTANCIAS MINERALES.

Las sustancias minerales, que se hallan en la vid en forma de sales minerales (aniones y cationes), proceden del suelo y son traslocadas principalmente a través del xilema. En función de su concentración, se clasifican habitualmente en tres tipos: macroelementos, oligoelementos y elementos traza. Los macroelementos acumulados, corresponden a los que tienen una función plástica en la fisiología vegetal, entre los que destacan nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, cloro, sodio calcio y magnesio. En cambio, los oligoelementos se caracterizan por una actividad catalizadora de reacciones, y entre ellos se pueden contar el hierro, el cobre, el zinc, el manganeso, el níquel, el cobalto, el boro y el aluminio. Cerca del momento de la vendimia, los macroelementos se pueden encontrar en concentraciones que varían entre 20 y 400 g/Kg de peso fresco, (dependiendo de la cantidad de potasio del suelo, de las condiciones meteorológicas, del portainjerto y de la variedad entre otros factores) siendo el catión potasio el elemento más importante, pudiendo llegar a representar hasta el 50 % de las sustancias minerales totales. Esa gran abundancia del potasio le confiere una importancia cabal en la calidad de la uva y del mosto, ya que la proporción de ácidos y cationes que contiene el mosto determina su pH, y, al ser el ácido tartárico y el potasio el ácido y el catión mayoritarios de este, el pH depende fundamentalmente de la relación entre ambos compuestos.

Debido a la gran importancia del potasio frente al resto de elementos minerales, vamos a centrarnos en dicho elemento mayoritario. El contenido de potasio en el citoplasma de las células es entre 5 y 10 veces superior que el contenido del mismo en las vacuolas celulares: este hecho tiene su importancia en la distribución del potasio dentro de la baya. Puesto que en la madurez de la uva, las células del hollejo son más pequeñas y tienen una mayor cantidad de citoplasma que las células de la pulpa, en las que las vacuolas ocupan prácticamente la totalidad del volumen de las células, el contenido de potasio es mayor en la piel que en la

pulpa: a pesar de ello, vamos a considerar la evolución del potasio a lo largo del proceso de maduración de la uva en esta sección, dedicada a la evolución de los componentes de la pulpa, por dos motivos: en primer lugar por ser uno de los componentes más abundantes de la pulpa y en segundo lugar por estar este catión íntimamente relacionado con la madurez industrial, debido a la gran influencia que el potasio ejerce sobre la acidez y el pH del mosto.

El potasio se acumula de forma continua en la baya durante su desarrollo, puesto que en esta no se metaboliza. Dicha acumulación es especialmente notable a partir del periodo del envero, pudiendo incrementarse la concentración respecto del peso fresco, o en algunos casos permanecer relativamente estable debido al aumento del volumen de la baya. Considerando solamente la pulpa, cabe comentar que la mayor concentración de potasio se encuentra en la zona periférica de la misma junto al hollejo, así como en la parte central (el endocarpio) junto a las semillas, mientras que en la zona intermedia de la pulpa el contenido en potasio es inferior.

Los macroelementos más importantes después del potasio (que puede llegar a encontrarse en cantidades superiores a los 2 g/L de mosto) corresponden al calcio y al magnesio, que se encuentran en la baya en cantidades del orden de los 100 mg/L de mosto. En el caso del magnesio, la pulpa se enriquece más rápidamente que el hollejo a lo largo del proceso de maduración. En el caso del calcio, este elemento se acumula de forma importante hasta cerca del envero; a partir de este momento, su contenido varía relativamente poco hasta el momento de la vendimia. El calcio migra de la pulpa hacia el hollejo de manera que al alcanzar la madurez, la mayor parte del calcio se localiza en las pieles (especialmente en las paredes celulares, en donde ejerce una función estructural).

1.3.2. Evolución de los componentes de la piel durante el desarrollo de la baya.

En la sección anterior se han abordado las modificaciones que sufre la pulpa de la baya de uva a lo largo del proceso de maduración; tal y como se ha indicado, de dicha evolución surge el término de la *madurez tecnológica*. Este concepto de madurez tecnológica, surge de la relación entre los azúcares reductores y la acidez, pero no tiene en cuenta la composición de la uva en metabolitos secundarios, tales como aromas y compuestos fenólicos, elementos esenciales desde un punto de vista enológico. Para la elaboración de vinos tintos de calidad, el concepto de madurez tecnológica resulta insuficiente, pues los aromas y los compuestos

fenólicos juegan un rol fundamental, y no tienen porqué alcanzar su máxima expresión en el momento en que se llega a la madurez tecnológica. En el momento en que la acumulación de metabolitos secundarios alcanza su máximo decimos que se ha alcanzado la *madurez fenólica* o *madurez de la piel*.

A pesar que como se ha comentado anteriormente, la piel de uva también contiene ácidos, sustancias minerales, e incluso algo de azúcares reductores, en esta sección nos centraremos en la evolución de los compuestos de la piel que ayudan a determinar la *madurez fenólica* de la uva, que condicionan su calidad y la del vino que con ella se elabora. Así pues, en esta sección se evaluarán fundamentalmente la evolución de los componentes no volátiles de la piel con interés enológico a lo largo del proceso de desarrollo y madurez del fruto, mientras que se obviará la evolución de aquellas sustancias ya comentadas en la sección de maduración de la pulpa.

EVOLUCIÓN DE LAS PAREDES CELULARES.

La evolución de las paredes celulares tiene una gran importancia desde el punto de vista enológico por dos motivos fundamentales: en primer lugar por ser una de las fuentes originaria de los polisacáridos del vino y, en segundo lugar por su implicación en la extractabilidad de compuestos fenólicos de la uva durante la elaboración del vino tinto. Como se ha comentado anteriormente, la pared celular de las células vegetales consta básicamente de tres capas o zonas (pared celular primaria, pared celular secundaria y lámina media) que contienen diferentes proporciones de microfibras de celulosa, hemicelulosas, pectinas y proteínas estructurales. Estos elementos que conforman la pared celular de las células de la piel de uva, sufren algunas modificaciones a nivel molecular a lo largo del proceso de desarrollo y maduración de la baya.

La síntesis de pared celular, que evidentemente se produce en la misma

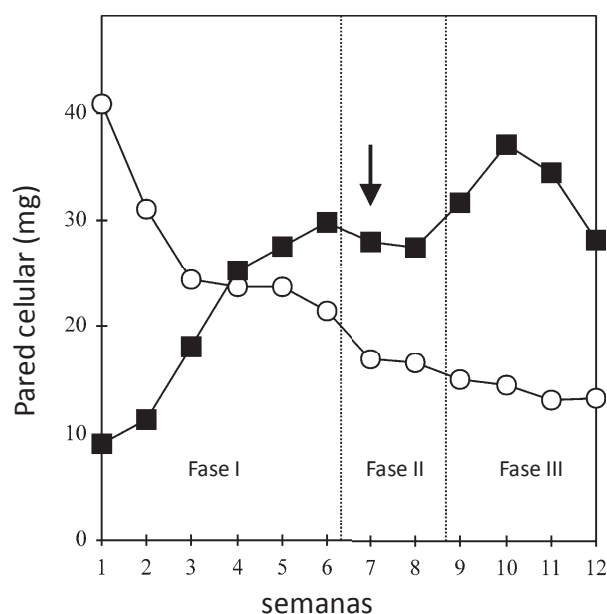


Figura 23. Evolución de la cantidad de pared celular durante el desarrollo de la baya de uva. Los círculos blancos corresponden a los miligramos de pared celular seca por cada gramo de uva fresca. Los cuadrados negros corresponden a los miligramos de pared celular seca por baya. La flecha negra indica el momento del envero. Gráfico extraído de 54.

baya, se mantiene activa a lo largo de todo el proceso de desarrollo de esta, aunque (especialmente en la pulpa) la multiplicación y la elongación celular, no está acompañado de un crecimiento proporcional de sus paredes, por lo que estas consecuentemente se debilitan. Por este motivo, la cantidad de pared celular por baya aumenta durante el proceso de desarrollo y maduración de la uva, mientras se observa una disminución de las mismas si se realiza un seguimiento de la cantidad de pared celular por cada gramo de peso fresco de tejido, tal y como se puede observar en la Figura 23.⁵⁴

Durante la fase herbácea del desarrollo de la baya, las paredes celulares contienen una gran proporción de celulosas y hemicelulosas, pero al llegar al periodo de envero, se activa la síntesis de pectinas, que aseguran la cohesión entre las fibras de celulosa y acaban siendo los componentes mayoritarios de la pared celular. Durante la etapa de maduración de la uva, no se detectan cambios importantes en el contenido de celulosas y hemicelulosas; en cambio, las pectinas sufren modificaciones significativas a nivel molecular debido a la acción de ciertas enzimas.⁵⁵ La actividad enzimática más temprana en lo que se refiere a la modificación de las pectinas es debida a la acción de *pectina metil esterasas*, que actúan sobre los homogalacturonanos (HG) y cuya actividad se mantiene hasta el momento de la vendimia.^{54,56} Esta actividad provoca la ruptura de los enlaces éster de los HG, liberando metanol al medio y dejando libres los grupos carboxilato, provocando que las cadenas de HG sean accesibles para otras enzimas y, a la vez, permitiendo el aumento del entrecruzamiento de cadenas mediante puentes de calcio. El grado de metilación de los HG puede reducirse entre un 5 y un 20 % a lo largo del proceso de maduración. A medida que se van desmetilando las cadenas de HG, estas se vuelven un sustrato accesible para otras enzimas tales como *poligalacturonasas* y *pectina liasas*, que provocan una despolimerización de dichas pectinas, liberando monómeros y oligómeros de ácido galacturónico, que pasaran a engrosar la fracción soluble de las paredes celulares.^{56,57} Esta despolimerización de las pectinas va acompañada de un incremento en la cantidad de proteínas estructurales en la misma pared celular.⁵⁸

Además de la despolimerización de los HG, durante la maduración también se observan modificaciones en las zonas que contienen RG-I, debido a la acción de *β -galactosidasas*, que actúan sobre las cadenas laterales de los RG-I formadas por galactanos y arabinogalactanos, provocando una continua disminución de la cantidad total de residuos D-galactopiranosos en la pared celular desde el envero hasta la madurez.⁵⁹ Los RG-II, en cambio, debido a su complejidad estructural y a su composición en azúcares extraños, son resistentes a la actividad

enzimática y prácticamente no sufren modificaciones estructurales durante el proceso de maduración de la uva.

EVOLUCIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS.

Las proantocianidinas consisten, tal y como se ha explicado al describir los compuestos fenólicos de la uva, en polímeros de flavan-3-oles. Las proantocianidinas de la piel de uva difieren de las que se encuentran en las semillas en cuanto a su composición monomérica y su grado medio de polimerización (mDP), conteniendo tanto procianidinas como prodelfinidinas, un mDP mayor que el de las proantocianidinas de las semillas (pudiendo contener desde dímeros y trímeros hasta oligómeros con más de 30 subunidades de flavan-3-ol) y una proporción menor de unidades galoiladas.⁶⁰⁻⁶²

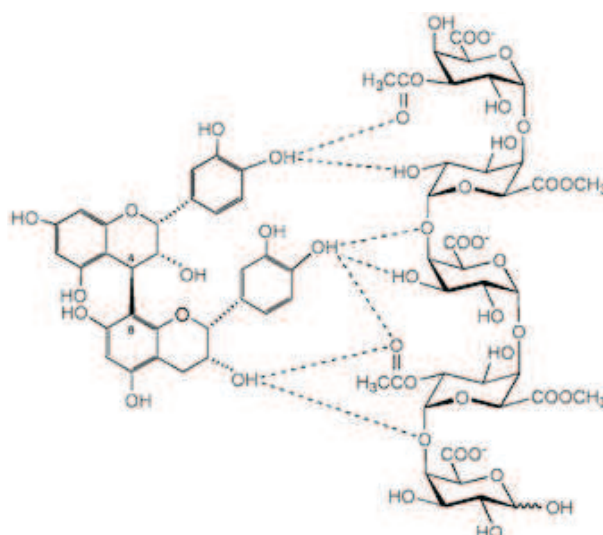


Figura 24. Diagrama esquemático donde se muestra la formación de interacciones de tipo puente de hidrógeno entre las proantocianidinas y los carbohidratos de la pared celular. Ilustración extraída de 23

Estos compuestos se pueden hallar unidos o enredados con los polisacáridos de las paredes celulares (generalmente con un mDP más elevado y que tiende a aumentar al final de la madurez) o bien confinados en el interior de las vacuolas celulares (con un mDP inferior y que se mantiene relativamente constante). En el primer caso, se barajan dos hipótesis para explicar la formación de los complejos polisacárido-polifenol: la primera hipótesis plantea la interacción mediante puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos y

los átomos de oxígeno de los polisacáridos de la pared celular (ya sean los oxígenos implicados en el enlace glicosídico o los oxígenos de los grupos carboxilo de los HG), tal y como se indica en la Figura 24. La segunda hipótesis postula la formación de cavidades hidrofóbicas resultantes de la estructura secundaria de los polisacáridos de la pared celular en donde se pueden encapsular polifenoles complejos mediante interacciones hidrofóbicas. En el segundo caso descrito, las proantocianidinas de los hollejos se pueden hallar dentro de las vacuolas celulares, ya sea homogéneamente distribuidos en el interior de estas, o formando inclusiones esféricas que pueden estar libres dentro de la vacuola o unidas a su membrana (llamada *tonoplasto*), tal y como se muestra en la Figura 25. Finalmente, cabe destacar que en otros

vegetales se han descrito recientemente compuestos fenólicos libres en el citoplasma celular e incluso asociados o muy próximos al núcleo de la célula (lo que podría estar relacionado con la posible habilidad de los compuestos fenólicos para atrapar radicales libres protegiendo así el ADN contra el estrés oxidativo).^{23,27}

La biosíntesis de las proantocianidinas está relacionada con el catabolismo de los azúcares, y es muy activa durante el período herbáceo de la baya (fase I), provocando un rápido incremento de su concentración en el inicio del desarrollo de la baya llegando a un máximo de acumulación de estos

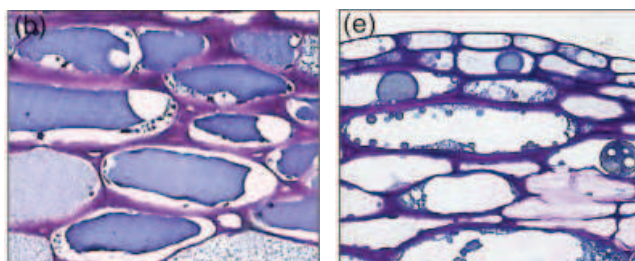


Figura 25. Localización de los taninos en el interior de las células de los hollejos de uva. IZQUIERDA: Polifenoles distribuidos homogéneamente por toda la vacuola. DERECHA: polifenoles distribuidos en inclusiones esféricas vacuolares. Fotografías tomadas de **27**

compuestos durante el envero (fase II), a partir de este momento, durante la maduración (fase III), la acumulación de las proantocianidinas parece que se ralentiza, manteniéndose su cantidad relativamente constante durante las últimas etapas de la maduración.^{60,63,64} A lo largo del proceso de maduración, no se han descrito diferencias importantes en cuanto a la composición monomérica de las proantocianidinas de la uva, aunque sí que se ha descrito una evolución de su mDP, que aumenta desde el período herbáceo hasta el momento de la vendimia.⁶⁵

EVOLUCIÓN DE LOS ANTOCIANOS.

La biosíntesis de los antocianos empieza durante el envero; de hecho las antocianinas empiezan a acumularse en las pieles un par de semanas antes de que se pueda observar color en las uvas (suceso indicativo que se ha alcanzado la fase II o período de envero). La concentración de antocianinas en los hollejos se incrementa a lo largo del proceso de maduración, alcanzando un máximo (que suele coincidir con el punto que llamamos madurez fenólica) y disminuyendo levemente después, durante la etapa de sobre-maduración.^{66,67} Las antocianinas se encuentran básicamente en las células de la *hipodermis*, y, pueden encontrarse en solución dentro de las vacuolas celulares o bien unidas a las proteínas de la membrana vacuolar o tonoplasto, formando las llamadas inclusiones vacuolares, donde parece ser que hay una mayor proporción de antocianinas aciladas (acetiladas y *p*-cumariladas) que de antocianinas no aciladas.¹⁷

EVOLUCIÓN DE LOS HIDROXICINAMATOS.

Tal y como se ha descrito al presentar las distintas familias de compuestos fenólicos de la uva, los ácidos hidroxicinámicos se encuentran tanto en las pieles como en la pulpa de las bayas; hecho que los convierte en los compuestos fenólicos más abundantes en mostos y en vinos blancos. La cantidad de ácidos hidroxicinámicos por baya incrementa durante el período herbáceo de la baya (fase I) alcanzando su máximo justo antes del envero, decreciendo posteriormente y manteniéndose relativamente constante durante las últimas etapas de la maduración.⁶⁸ Esta desaparición de ácidos hidroxicinámicos en las bayas durante la madurez puede estar reflejando un catabolismo de dichos compuestos, o bien su utilización como sustrato para la biosíntesis de otros compuestos fenólicos, o, posiblemente, ambos procesos a la vez.⁴³

EVOLUCIÓN DE LOS FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS.

Los monómeros de flavan-3-ol siguen un patrón comparable al de otros compuestos fenólicos durante el desarrollo y la madurez de la uva: incrementando bruscamente durante las primeras etapas de desarrollo de la uva (fase I o período herbáceo), llegando a un máximo de acumulación durante el envero y decreciendo posteriormente durante la madurez.⁶⁰ La disminución de flavan-3-oles durante el período de maduración parece estar relacionada con la incorporación de dichos compuestos a las proantocianidinas, lo que resulta en el aumento del mDP de las proantocianidinas descrito previamente.

EVOLUCIÓN DE LOS FLAVONOLES.

El patrón de acumulación de los flavonoles en los hollejos de baya de uva es comparable al de las antocianinas, incrementando rápidamente a partir del envero y ralentizándose posteriormente su acumulación hasta alcanzar su máximo un par de semanas antes de la vendimia, pudiendo decrecer ligeramente durante las últimas etapas de la madurez, al igual que ocurre en el caso de los antocianos.⁶⁹ A pesar de este patrón general, se ha observado una estrecha relación entre la concentración de antocianos en la uva y el nivel de insolación de la misma, aumentando significativamente la concentración de los flavonoles en uvas con mayor exposición solar.^{70,71}

1.3.3. Evolución de los componentes de las semillas durante el desarrollo de la baya.

Al igual que sucede en el caso de las pieles de la uva, la evolución de los componentes de las semillas tiene importancia desde un punto de vista enológico ya que estos contribuyen significativamente en la composición fenólica de los vinos y, por lo tanto, también están involucrados en la llamada *madurez fenólica* de la uva. Los compuestos fenólicos solubles mayoritarios de las semillas de uva son proantocianidinas y, en menor proporción, flavan-3-oles monoméricos. Tal y como se ha apuntado al describir la evolución de las proantocianidinas en los hollejos de uva, la composición de las proantocianidinas de las semillas difiere de las de las pieles: mientras las pieles contienen procianidinas y prodelfinidinas, las semillas solo contienen procianidinas con un bajo mDP y con un elevado porcentaje de subunidades galoiladas.⁶⁰⁻⁶²

En general, tanto las procianidinas como los flavan-3-oles monoméricos de las semillas se concentran durante el periodo herbáceo de la baya (fase I) alcanzando un máximo justo después del envero (fase II), para posteriormente decrecer considerablemente durante la maduración de la baya (fase III).^{63,72-74} La disminución de procianidinas y flavan-3-oles de las semillas va acompañada de un cambio de color de las



Figura 26. Evolución del color de las semillas a lo largo del proceso de evolución de la baya.

semillas, que pasan de una coloración verdosa a color marrón leñoso tal y como se muestra en la Figura 26. Se cree que ambos fenómenos están relacionados, ya que se ha postulado que el cambio de coloración de las semillas se debe a fenómenos de lignificación³⁵ o de oxidación^{44,72} de las procianidinas durante la maduración, aunque todavía no se han descrito las estructuras químicas resultantes de esa presunta oxidación.⁴³ Además de estos fenómenos de oxidación, la disminución de procianidinas en las semillas también se ha relacionado con la formación de interacciones covalentes entre estas y la matriz insoluble de las semillas, hecho que los convierte en compuestos no extraíbles durante el proceso de vinificación.⁶⁰

1.3.4. Factores que influyen en el proceso de maduración de la uva.

Una vez consideradas las generalidades de los procesos de maduración de la baya de uva, se abordaran los factores que ejercen influencia sobre el proceso de maduración de la

uva. Dejando a un lado los factores accidentales (tales como heladas, granizadas, infecciones fúngicas, etc.), destacan los llamados factores permanentes y los factores variables.

FACTORES PERMANENTES.

Se consideran como factores permanentes todos aquellos que quedan fijados en el momento de la plantación de la vid; tales como el clima y el microclima de la parcela, el tipo de suelo, la variedad y el portainjerto de vid, el sistema de conducción, la orientación y la densidad de plantación. De algún modo la influencia de todos estos factores permanentes es lo que define el término de origen francés *terroir*, considerando el *terroir* como la tipicidad de un vino elaborado en una zona vitícola concreta.

El clima es el resultado de las condiciones atmosféricas generales anuales donde se asienta el viñedo (considerando la latitud, la altitud respecto al nivel del mar, la distancia a grandes masas de agua, etc.), mientras que el microclima afecta a las condiciones particulares o locales que rodean el viñedo (destacando entre ellas la orografía como de mayor singularidad). En general, se puede afirmar que en climas cálidos, la vid produce vendimias ricas en azúcares y pobres en acidez, sucediendo lo contrario en climas fríos.^{75,76}

Otro factor con gran incidencia sobre la madurez reside en el suelo vitícola. Una de las principales consecuencias del tipo de suelo es la habilidad de éste para retener el agua; en general, los suelos que ofrecen un débil poder de retención de la humedad suelen producir un adelanto de la maduración. Por otro lado, los suelos con una gran capacidad de retención de agua, en general retrasan la maduración de la uva, generando cosechas abundantes, con elevadas concentraciones de ácidos y sustancias nitrogenadas, pero con una baja concentración de azúcares. Además de la cantidad de agua disponible para la cepa, el suelo también condiciona la cantidad de sales y nutrientes accesibles para la cepa. Si bien las carencias de nutrientes tienen efectos negativos sobre la producción de uva para su vinificación, provocando una reducción de la cosecha, un retraso del envero, bayas de tamaño pequeño y poca calidad, si el suelo es muy fértil y contiene un exceso de nutrientes, se producen cosechas muy abundantes pero con una baja calidad del fruto. En general, suelos muy fértiles y con una buena retención de agua provocan un exceso de vigor en las cepas, lo que va en detrimento de la calidad del fruto. Aún así, la cantidad de nutrientes asimilables tiene que ser suficiente para evitar la aparición de carencias que pueden debilitar a la cepa.⁷⁵

Como se desprende de lo comentado con anterioridad, los factores permanentes y la adaptación de la cepa ejercen una gran influencia en el vigor de la planta y éste, está

íntimamente relacionado con el rendimiento y la calidad de la cosecha.^{77,78} De algún modo, es necesario equilibrar la producción del viñedo con el potencial del medio vitícola (condicionado por el suelo, el clima y el microclima). Por este motivo y a lo largo de la historia vitivinícola se han desarrollado diferentes operaciones vitícolas con el fin de conseguir un adecuado equilibrio entre la superficie foliar y los racimos de uva que se alimentan de ella, ya que si esta correlación es insuficiente la vendimia no madurará como es debido.^{79,80} Para mantener este equilibrio, el viticultor utiliza la poda de invierno y las operaciones en verde como operaciones de control de la vegetación,^{81,82} mientras diferentes modalidades de aclareo de frutos se han desarrollado como herramientas de control de la producción.^{12,83-85}

FACTORES VARIABLES.

Se consideran como factores variables aquellos que, ejerciendo una enorme influencia sobre el proceso de maduración, sufren variaciones de un año a otro, tales como la temperatura, la radiación y la humedad. De algún modo, la influencia de estos factores variables son los que definen el término de la *añada*, considerando la *añada* como la tipicidad y la calidad de un vino elaborado durante una campaña concreta.

En general está aceptado que temperaturas elevadas provocan una mayor acumulación de azúcares y una disminución de la acidez, mientras que temperaturas bajas producen el efecto contrario. Si la temperatura es demasiado baja (inferior a los 10 °C) el desarrollo del racimo es muy difícil, ya que se ralentizan la síntesis de compuestos fenólicos y las migraciones de los compuestos formados en los órganos fotosintéticos hacia la baya. Así pues, las temperaturas demasiado altas o demasiado bajas, perjudican el correcto desarrollo de la uva y su maduración, aunque se ha observado que una alternancia de temperaturas altas durante el día y bajas durante la noche favorece la acumulación de taninos y antocianos.^{45,75} El nivel de radiación o iluminación que precisa un viñedo está en función directa de su superficie foliar equilibrada con su producción. En general, se considera como aceptada la hipótesis de que a mayores niveles de radiación se observan una mayor concentración de flavonoides en la uva.^{45,70} Durante el periodo herbáceo de la baya y hasta llegada la etapa de maduración del fruto, la planta debe disponer de suficiente agua para asegurar un desarrollo normal de los racimos. El exceso de humedad durante el periodo de maduración de la baya (fase III) retrasa la maduración, formando en los racimos una menor cantidad de azúcares y compuestos fenólicos y una mayor acidez, además de provocar un aumento excesivo del volumen de la baya, pudiendo llegar incluso a abrirse los granos de uva con los consiguientes problemas por aparición de infecciones fúngicas.^{75,86}

EL IMPACTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO.

En la sección anterior, se han comentado los factores variables que afectan al proceso de maduración de la uva, siendo estos factores de tipo meteorológico, que oscilan alrededor de un valor medio que viene determinado por factores permanentes como el clima y el microclima. Esta distinción entre factores permanentes y factores variables, aunque ampliamente utilizada en el sector vitícola, puede resultar inadecuada si tenemos en consideración que desde la aparición de la vid sobre la tierra, el clima no ha parado de cambiar: históricamente la temperatura media de la tierra no ha sido siempre la misma, oscilando notablemente durante las últimas glaciaciones, así como también en ligeras variaciones en los últimos siglos y años. En la actualidad está aceptado que la actividad industrial desde el siglo XIX, con la generación de dióxido de carbono como principal responsable del efecto invernadero en la atmósfera, contribuye a la elevación progresiva de la temperatura media del planeta,^{87,88} que el *Panel Intergubernamental por el Cambio Climático (IPCC)* ha cuantificado en un aumento de 0.6 ± 0.2 °C durante el siglo XX. Este incremento, se espera que se acentúe durante las próximas décadas, esperándose un aumento medio de la temperatura del planeta de 2 °C a 6 °C a finales del siglo XXI, con un incremento más acusado en el hemisferio norte que en el hemisferio sur debido a la mayor presencia de masas de agua en éste último. Además del efecto invernadero, también durante las últimas décadas se ha producido un aumento de la radiación solar, especialmente en la zona ultravioleta del espectro electromagnético, debido en parte al maltrecho estado de la capa de ozono, siendo los clorofluorocarburos (CFCs) los principales responsables de su degradación. Además, aunque se prevé un aumento de las precipitaciones medias a escala mundial, estas precipitaciones disminuirán en muchas zonas subtropicales, y se concentrarán en periodos cortos de tiempo en forma de lluvias torrenciales, espaciadas por periodos de intensa sequía.

Todos estos fenómenos, relacionados con el conocido *cambio climático*, tienen un impacto directo en los factores variables que afectan a la madurez de la uva detallados en el apartado anterior. Resulta una obviedad, pues, que el cambio climático ejercerá una influencia en el proceso de maduración de la uva (y en consecuencia sobre la calidad del vino) que no se debe menospreciar.⁸⁹ Dejando de un lado el desplazamiento de los cultivos hacia latitudes más septentrionales y hacia mayores altitudes, las zonas vitícolas más meridionales con tradición vitivinícola, deberán adaptar la viticultura y la enología a las nuevas condiciones de elevadas temperaturas, excesos de insolación y falta de agua durante una buena parte del periodo vegetativo de la vid.⁹⁰ De hecho, en España, hoy en día ya se están notando los efectos del *cambio climático* en la vitivinicultura, con madureces precoces y la obtención de vinos con

contenidos de alcohol más elevados y niveles de acidez más bajos, lo que ha obligado al sector a dotarse de técnicas de desalcoholización de los vinos así como equipos para la corrección a la baja de su pH.⁷⁵ Este hecho queda contrastado al considerar las resoluciones aprobadas los últimos años por la *Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV)* que regulan la desalcoholización parcial (Resolución OIV-ECO 433-2012 y Resolución OIV-OENO 394B-2012) o total de vinos (Resolución OIV-ECO 432-2012 y resolución OIV-OENO 394A-2012), así como las resoluciones que regulan la acidificación mediante electrodiálisis o intercambio catiónico de los mostos (Resolución OIV/Oeno 360/2010) o de los vinos (Resolución OIV/Oeno 361/2010).

1.4. LA VINIFICACIÓN EN TINTO.

El proceso de vinificación consiste en una serie de operaciones que permiten la transformación de la uva en vino. Dicha transformación se debe fundamentalmente a la acción de las levaduras, microorganismos que mediante la fermentación alcohólica metabolizan los azúcares presentes en el mosto liberando alcohol etílico en su lugar: cambiando el solvente acuoso del mosto por una mezcla hidroalcohólica en el vino, hecho que afectará la solubilidad de sus componentes y las propiedades organolépticas del vino. En el caso del vino tinto, y debido a que la mayoría de compuestos de interés enológico se hallan en las pieles y las semillas de la uva, la fermentación alcohólica se realiza en presencia de las partes sólidas de la baya, de modo que se produce una maceración que permitirá la solubilización de los compuestos de pieles y semillas hacia el vino.

1.4.1. El proceso de vinificación en tinto.

Una vez cosechada la uva y transportada hasta la bodega, ésta generalmente se DESPALILLA para eliminar el raspón, ya que los raspones contienen una gran cantidad de agua y potasio, mientras que contiene bajos niveles de azúcares y ácidos, lo que comporta una disminución del grado alcohólico del vino y su acidez, a la vez que provoca un aumento de su pH. Además, los raspones contienen compuestos que pueden aportar notas vegetales y herbáceas desagradables al vino. La uva despallada se ESTRUJA para favorecer la solubilización de los compuestos de interés enológico desde las partes sólidas hacia el líquido,⁶¹ ayudando además a obtener un fluido más homogéneo que puede ser bombeado con facilidad y que permite la dosificación más eficaz de la levadura y el sulfuroso. El hecho de pisar la uva favorece la fermentación alcohólica (gracias a la aireación del mosto la fermentación alcohólica sucede con más celeridad, provocando un mayor incremento de la temperatura) e

impide la presencia de azúcares residuales en el vino de prensado, facilita la maceración y acentúa la solubilización de antocianos y proantocianidinas. Una vez pisada la uva, esta se bombea hacia el tanque de fermentación en donde se producirán simultáneamente la maceración y la fermentación alcohólica. Esta simultaneidad de ambos fenómenos nos permite distinguir tres etapas que corresponden a: la MACERACIÓN PREFERMENTATIVA, la MACERACIÓN FERMENTATIVA y la MACERACIÓN POSTFERMENTATIVA.^{91,92}

La MACERACIÓN PREFERMENTATIVA transcurre entre el llenado de la cuba y el inicio de la fermentación alcohólica. Su duración, por lo general bastante corta (puede ir desde unas horas hasta algunos días), dependerá de la fase de latencia de las levaduras, y está condicionada, entre otros factores, por la temperatura del medio y por la dosis añadida de sulfuroso. Al no haberse iniciado la fermentación alcohólica, esta maceración prefermentativa se realiza en un medio acuoso y a temperaturas moderadas.

La MACERACIÓN FERMENTATIVA corresponde al periodo en que se desarrolla la fermentación alcohólica. En esta etapa, en que la levadura realiza la fermentación alcohólica se pasa de un medio acuoso muy rico en azúcares y con una elevada densidad a un medio hidroalcohólico mucho menos denso, al mismo tiempo que se incrementa significativamente la temperatura debido al calor que liberan las levaduras en fermentación. Durante la fermentación alcohólica, la levadura excreta cantidades ingentes de dióxido de carbono al medio, que empuja las partes sólidas del tanque de fermentación hacia la parte superior del mismo, formando el llamado sombrero donde se acumulan los hollejos que contienen la mayor parte de las sustancias de interés enológico a extraer. La duración de esta fase (que suele hallarse entre los 3 y los 10 días) depende de múltiples factores, como la concentración inicial de azúcares, la cepa de levadura, los nutrientes presentes en el medio, el nivel de aireación y la temperatura.

La MACERACIÓN POSTFERMENTATIVA comprende el periodo que transcurre entre el final de la fermentación alcohólica y el descube. Su duración (que puede ir desde algunos días hasta varias semanas) depende fundamentalmente de la decisión del enólogo. Al haberse finalizado la fermentación alcohólica, esta maceración postfermentativa se realiza en un medio hidroalcohólico.

Una vez, por decisión del enólogo se procede al descubado del tanque de fermentación, el contenido de dicho tanque se lleva a la prensa, en donde se extraerá el vino que queda retenido en las partes sólidas que, una vez prensadas, se pueden desechar. El vino obtenido,

ya está listo para ser estabilizado y, en función de su vocación, ser embotellado y consumido como vino joven o bien entrar en un proceso de crianza.

1.4.2. Extracción de los compuestos fenólicos durante la maceración.

A pesar de que la extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino tinto durante la maceración depende de la madurez de la uva y de muchos otros factores y prácticas en

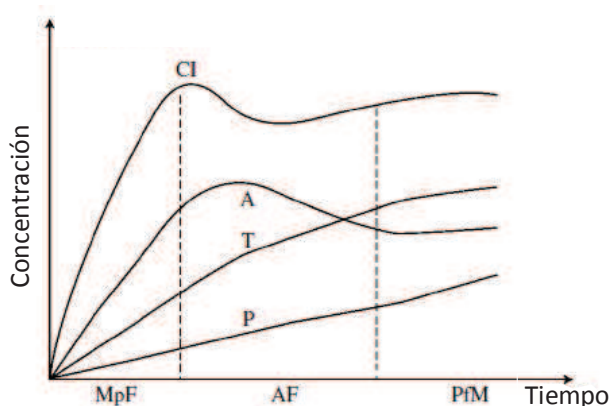


Figura 27. Extracción de los distintos componentes de la uva hacia el vino durante la maceración. MpF: Maceración pre-fermentativa, AF: Maceración fermentativa. PfM: Maceración post-fermentativa. CI: Intensidad colorante. A: Antocianos. T: Proantocianidinas. P: Polisacáridos. Extraído de 91

bodega que se analizarán más adelante, en general, se acepta que la cinética de extracción de los antocianos, las proantocianidinas y los polisacáridos durante las tres etapas descritas de la maceración es la que se muestra en la Figura 27, en donde también se puede observar la evolución de la intensidad colorante o cantidad de color del vino. Este proceso de extracción de compuestos fenólicos durante la maceración es un fenómeno complejo que requiere un

análisis más detallado que el que se muestra en la Figura 27. A continuación se detalla la extracción y enriquecimiento del vino en cada una de las familias de compuestos fenólicos descritos en la uva.

EXTRACCIÓN DE PROANTOCIANIDINAS.

El contenido de proantocianidinas de la uva es mucho más elevado que su contenido en el vino, ya que durante la vinificación ni si quiera se llega a extraer la mitad de las proantocianidinas de la uva,^{23,93} aunque el rendimiento de extracción puede ser muy variable.⁶³ En el caso de las pieles, se extraen entre un 30 % y un 50 % de las proantocianidinas durante el proceso de vinificación.^{29,61,93} Las proantocianidinas de las pieles tienen una cinética de extracción distinta a las de las semillas, ya que se empiezan a solubilizar durante la maceración pre-fermentativa, si bien su extracción se prolonga y acentúa más allá de esta etapa, ya que aunque las proantocianidinas que se hallan en las vacuolas celulares se extraen

rápidamente, las proantocianidinas ligadas a la pared celular parecen presentar una extracción mucho más lenta.⁹⁴ El incremento de la solubilización posterior parece deberse, en parte a la aparición del etanol y el incremento de temperatura que provoca la fermentación alcohólica favorecen la extracción de proantocianidinas durante las etapas de maceración fermentativa y postfermentativa. Esta cinética de extracción de las proantocianidinas de las pieles se puede corroborar viendo que el porcentaje de prodelfinidinas y el mDP son más elevados durante los primeros días de maceración, reduciéndose ambos parámetros con el avance de la maceración, cuando se empiezan a liberar las procianidinas de las semillas,⁶¹ que no se solubilizan hasta que el nivel de alcohol es suficiente para disolver la cutícula de las semillas facilitando la liberación de las procianidinas de las semillas al medio,^{95,96} que se extiende en el tiempo hasta el descube del vino y cuyo rendimiento de extracción es aún inferior al de las pieles.⁹³

EXTRACCIÓN DE LOS ANTOCIANOS.

En general se acepta que el comportamiento de extracción de los antocianos (responsables en gran medida del color del vino tinto) indica que estos se extraen relativamente rápido (ya que pueden ser extraídos sin presencia de etanol en el medio), iniciándose su extracción durante la etapa de maceración prefermentativa, prolongándose y alcanzando su nivel máximo durante la etapa de maceración fermentativa y decreciendo ligeramente después,^{91,92} debido a fenómenos de oxidación, polimerización y adsorción en la superficie del tanque de fermentación y sobre las paredes celulares de las levaduras.^{97,98} Aún así, los perfiles de antocianos de la uva y del vino difieren bastante entre sí,^{99,100} cuya causa es que la difusión de las moléculas de antocianos desde las pieles al vino parece estar influenciada por su estructura y, en particular, por el número de grupos hidroxilo o metoxilo en el anillo B de la molécula: Los antocianos dioxigenados (cianidina y peonidina) parecen difundirse más rápido en el vino que los trioxilados (delfinidina, petunidina y malvidina), aunque estos últimos, a pesar de extraerse con más dificultad, también son menos susceptibles a reacciones de oxidación.^{99,101} Del mismo modo, parece que la acilación de la glucosa también influye en la eficacia de la extracción, siendo los derivados *p*-cumarilados los que difunden más lentamente desde la piel hacia el vino, en comparación con los monoglucósidos o los derivados acetilados.^{29,99,101} Estas diferencias de extractabilidad de los antocianos en función de su estructura parecen estar relacionadas con la habilidad de los antocianos para interactuar con las paredes celulares de la piel de uva,¹⁰² lo que podría

también explicar las diferencias de extractabilidad en función de la variedad de uva y de las características de su piel.¹⁰³

EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS.

Tal y como se ha comentado en la descripción de los compuestos fenólicos de la uva, los ácidos hidroxicinámicos se hallan tanto en la pulpa como en los hollejos de la uva. Este hecho tiene sus implicaciones desde el punto de vista de su extracción. Los ácidos hidroxicinámicos de la pulpa se liberan al mosto en el momento de pisar la uva. Durante los primeros días de maceración, se van solubilizando gradualmente los ácidos hidroxicinámicos presentes en las pieles, estabilizándose posteriormente su contenido hasta el descube.¹⁰⁴

EXTRACCIÓN DE FLAVAN-3-OLES MONOMÉRICOS.

Los flavan-3-oles monómeros tienen una cinética de extracción parecida a la de sus polímeros, ya que al igual que estos se encuentran tanto en las pieles como en las semillas. Aunque la extracción de flavan-3-oles se debe inicialmente a la extracción de las pieles, posteriormente y a medida que incrementa el grado alcohólico, se produce la extracción de los flavan-3-oles de las semillas, que representan la fuente mayoritaria de flavan-3-oles monoméricos del vino.⁹⁶ La combinación de la extracción de pieles y semillas, produce que se observe un incremento gradual y paulatino del contenido de flavan-3-oles desde la maceración prefermentativa hasta el descube.¹⁰⁴

EXTRACCIÓN DE LOS FLAVONOLES.

En la uva los flavonoles se encuentran glicosilados con distintos carbohidratos.¹⁰⁵ Su disolución durante el proceso de maceración se inicia de forma temprana en la fase de maceración prefermentativa, extendiéndose su liberación durante la etapa de maceración fermentativa.¹⁰⁴ Al liberarse los glicósidos de flavonoles al medio, el enlace glicosídico se hidroliza (el grado de hidrólisis parece que depende tanto de la estructura del flavonol como del azúcar que lo glicosila) liberando las correspondientes agliconas de flavonol, más sensibles a la degradación y que pueden precipitar debido a su baja solubilidad, pudiendo provocar una disminución de los flavonoles durante la etapa de maceración postfermentativa y envejecimiento del vino.¹⁰⁵

1.4.3. Factores que influyen en la extracción de compuestos fenólicos.

Dada la suma importancia de los compuestos fenólicos en las propiedades organolépticas del vino tinto, la extracción de estos compuestos durante la vinificación y los principales factores que influyen en la eficacia de dicha extracción, son un fenómeno de gran interés. Durante años se han desarrollado técnicas enológicas para aumentar la extracción de estos compuestos durante la vinificación. En esta sección se abordarán los principales factores que ejercen una influencia sobre la eficacia de la extracción, así como las principales prácticas enológicas utilizadas para mejorarla. Antes de entrar en materia, pero, hay que considerar que las pieles, además de contener compuestos fenólicos contienen mucho potasio y que, al aumentar la extracción de compuestos de las pieles, también se está aumentando el nivel de potasio del vino, pudiendo este aumentar el pH del vino y disminuir su acidez.

NIVEL DE MADUREZ DE LA UVA.

El nivel de madurez de la uva es un factor crítico en la extracción de compuestos fenólicos desde la uva hacia el vino, ya que de esta depende la cantidad de compuestos fenólicos de la uva. Pero la influencia del nivel de madurez de la uva en la extracción de polifenoles hacia el vino no consiste únicamente en la cantidad de estas sustancias contenidas en la uva, sino que también influye en su extractabilidad, fenómeno especialmente estudiado en el caso de las proantocianidinas.

Tal y como se ha detallado anteriormente al describir los compuestos fenólicos de la uva, una parte de las proantocianidinas de la uva se hallan en las vacuolas celulares, mientras que el resto (más del 50%, pudiendo incluso a representar hasta el 80 % de las proantocianidinas) se halla interaccionando con las paredes celulares de la uva o con las proteínas del tonoplasto, mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.^{17,23} La extracción de las proantocianidinas de las vacuolas se realiza bastante rápido, mientras que la extracción de las proantocianidinas asociadas a la pared celular muestra una cinética de extracción mucho más lenta.⁹⁴ La efectividad de la extracción de estas últimas dependerá pues, en parte, de la habilidad para romper las interacciones que las ligan a la pared celular y que, a su vez, dependen tanto de la estructura de las proantocianidinas como de la de la estructura de los carbohidratos que conforman la pared celular, que como se ha detallado en secciones anteriores cambian a lo largo del proceso de maduración de la uva.

En lo que respecta a la estructura de las proantocianidinas, se ha observado (en el caso de proantocianidinas y pared celular de manzana) que la magnitud de las interacciones con la pared celular depende tanto del mDP, como de su composición monomérica. Al incrementar el mDP de las proantocianidinas, por cada monómero adicional incrementan los puntos reactivos capaces de generar puentes de hidrógeno, permitiendo que la molécula reaccione simultáneamente por más de un punto con las paredes celulares. Aunque las interacciones generadas entre las proantocianidinas y las paredes celulares son de tipo débil, para tener una idea de la fuerza total de la interacción hay que considerar la suma de las energías de enlace de la molécula entera, y entonces resulta evidente que como mayor es el polímero mayor será la fuerza de la interacción. A este efecto del peso molecular del polímero hay que añadirle que un incremento del tamaño de la proantocianidina comporta un incremento en su carácter hidrofóbico, incrementando su capacidad para establecer interacciones de tipo hidrofóbico con las paredes celulares. En cuanto a la composición monomérica, a mayor cantidad de prodelfinidinas y mayor grado de galoilación suponen un incremento de las interacciones con las paredes celulares: Tanto las prodelfinidinas como el ácido gálico aportan al polímero grupos hidroxilo adicionales capaces de intervenir en la formación de interacciones de tipo puente de hidrógeno. El ácido gálico, además, también comporta un incremento del carácter hidrofóbico del polímero. En general, si la proantocianidina tiene una conformación flexible o abierta (hecho que depende tanto de su composición monomérica como del enlace interflavánico) puede orientarse y ajustarse mejor en el espacio para interaccionar más eficazmente con las paredes celulares.¹⁰⁶

Del mismo modo que la estructura de las proantocianidinas condiciona el nivel de interacción entre estas y las paredes celulares, la estructura de la pared celular también tiene su influencia en la extensión de las interacciones entre ambas familias de compuestos. Mientras que la celulosa y las hemicelulosas tienen muy poca afinidad por los compuestos fenólicos, las pectinas muestran una afinidad mucho mayor, al igual que sucede con las proteínas estructurales que se insertan en la matriz péctica.¹⁰⁷

Si se considera simultáneamente los condicionantes estructurales para la formación de interacciones entre los compuestos fenólicos y las paredes celulares y su evolución a lo largo del proceso de madurez, se puede tener una idea de cómo evoluciona la extractabilidad de los compuestos fenólicos unidos a las paredes celulares. Por un lado, considerando la disminución del contenido de pectinas a lo largo del proceso de maduración (debido en gran parte a su despolimerización), la extractabilidad de los compuestos fenólicos unidos a las paredes

celulares debería aumentar. Por otro lado, considerando el aumento de mDP de las proantocianidinas y el aumento de la cantidad de proteínas estructurales de la pared celular durante la maduración, se debería observar una disminución de la extractabilidad de los compuestos fenólicos unidos a las paredes celulares. Así pues, hoy en día hay argumentos para postular un incremento o un detrimento de la extractabilidad de los compuestos fenólicos de la uva ligados a las paredes celulares, aunque todavía no está muy claro cuáles son los mecanismos con mayor influencia en dicha extractabilidad.

A pesar de que hace falta todavía realizar más ensayos para llegar a comprender la relación entre la madurez y la extractabilidad de compuestos fenólicos, desde hace algunos años se han desarrollado productos enológicos basados en preparados con enzimas de tipo pectinasa,¹⁰⁸ que se añaden a la pasta de vendimia en maceración para degradar las paredes celulares de la uva y romper las interacciones de estas con los compuestos fenólicos liberándolos así al mosto/vino. El uso de ENZIMAS PECTOLÍTICAS, ha demostrado ser útil para incrementar la cantidad y la estabilidad del color de los vinos tintos,^{108,109} y su contenido de polifenoles totales.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Estos preparados enzimáticos comerciales, parecen acelerar el proceso de extracción de los compuestos fenólicos,¹¹⁰ no solo procedentes de las pieles sino incluso, como postula algún estudio, procedentes de las semillas.¹¹² Estos preparados enzimáticos, como cabe esperar, alteran la composición de los polisacáridos del vino,¹¹³ al alterar la estructura de la pared celular de la uva.¹¹⁴

TEMPERATURA.

La temperatura es un factor determinante en la eficacia de la extracción de compuestos fenólicos durante la maceración. Al aumentar la temperatura de la maceración, se incrementa la solubilidad de los compuestos fenólicos y la permeabilidad de las células de la hipodermis, liberando con más facilidad los antocianos y, especialmente, las proantocianidinas, favoreciendo la extracción. Con el incremento de la temperatura durante la maceración también se observa un incremento del color del vino y de su estabilidad: Este fenómeno se debe al hecho que, tal y como postula la ley de Arrhenius, al incrementar la temperatura se acelera la cinética de las reacciones químicas entre los antocianos y otros compuestos presentes en el medio, incrementando y estabilizando el color del vino. Para conseguir una buena extracción se deben alcanzar temperaturas del orden de los 28-29 °C; si la temperatura es más baja la extracción será pobre, y si es mucho más alta se puede extraer un exceso de tanino, pero perder antocianos a causa de su degradación.^{92,115}

Una de las técnicas enológicas desarrolladas para aprovechar el efecto de la temperatura en la extracción de compuestos fenólicos al vino es la llamada TERMOVINIFICACIÓN, que consiste en calentar la pasta de vendimia entre 60 y 70 °C durante un breve lapso de tiempo, realizar el prensado y enfriar el mosto antes de empezar la fermentación alcohólica. Las elevadas temperaturas provocan la degradación de las membranas y las paredes celulares, permitiendo una mayor extracción de compuestos fenólicos, especialmente en el caso de los antocianos (por desarrollarse este calentamiento antes del inicio de la fermentación alcohólica y, por lo tanto realizarse en un medio acuoso). Además, el empleo de temperaturas elevadas aportan a la técnica otras ventajas, como la desnaturalización de enzimas polifenoloxidasas (que podrían comportar una pérdida de color), la eliminación de gran parte de la microbiota presente, facilitando la imposición del inóculo de levadura (y reduciendo el riesgo de desviaciones microbiológicas) que tendrá disponible una mayor cantidad de nutrientes (ya que las temperaturas elevadas también aumentan la solubilidad de los nutrientes presentes en la uva) para realizar la fermentación alcohólica.^{17,115}

TIEMPO DE MACERACIÓN.

El tiempo de maceración es, sin lugar a dudas, uno de los factores con mayor impacto en el grado de extracción de compuestos de la uva, ya que corresponde al tiempo en el que permanecen en contacto las partes sólidas a extraer con el medio líquido extractor. Tal y como se ha comentado anteriormente, la extracción de antocianos se produce durante las primeras fases de la maceración, mientras que la extracción de proantocianidinas se extiende más allá en el tiempo: alargar el tiempo de maceración, pues, no comporta habitualmente un incremento de los antocianos, aunque sí comporta un incremento de la concentración de proantocianidinas al vino.¹¹⁶ Al incrementarse la cantidad de proantocianidinas del medio, se favorecen las reacciones de combinación de estas con los antocianos, aportando mayor cantidad y estabilidad del color del vino a largo plazo.¹¹⁷

Al final, el tiempo de maceración dependerá de la decisión del enólogo a la hora de descubrir, y dicha decisión estará íntimamente relacionada con el tipo de vino que se desee elaborar: Si se pretende elaborar vinos jóvenes las maceraciones son generalmente más cortas (suficientemente largas como para que el vino posea la cantidad necesaria de color y aromas afrutados, pero lo suficientemente cortas como para no enriquecerlo demasiado en taninos que pueden conferir demasiada dureza al mismo) en cambio, para elaborar vinos destinados a la crianza, se realizan generalmente maceraciones más largas, para obtener vinos bien estructurados, y con una buena estabilidad del color. Hay que tener en cuenta, que alargar

demasiado las maceraciones puede comportar una sobremaceración que conducirá a la obtención de vinos duros, amargos y herbáceos, especialmente en el caso que la uva no esté lo suficientemente madura.¹¹⁸

TÉCNICAS PARA MEJORAR LA EXTRACCIÓN DURANTE LA MACERACIÓN PREFERMENTATIVA.

Durante años se han desarrollado distintas técnicas enológicas para mejorar la extracción durante la etapa de maceración prefermentativa. Entre estas destacan la MACERACIÓN PREFERMENTATIVA EN FRÍO, la CONGELACIÓN DE LA UVA O EL MOSTO, el uso de DOSIS ALTAS DE SO₂ y el SANGRADO PARCIAL.

Mediante la llamada MACERACIÓN PREFERMENTATIVA EN FRÍO, se mantiene el mosto entre 10 y 15 °C durante algunos días antes de empezar la fermentación alcohólica. El hecho de mantener el mosto a bajas temperaturas impidiendo el arranque de la fermentación, alarga la etapa de maceración prefermentativa, mejorando la extracción de antocianos (que se puede realizar en fase acuosa) y el color del vino, aunque no está muy claro que dicho color se conserve a lo largo de la vida del vino. Al retrasar la fermentación, también se retrasa la formación del sombrero, logrando así una mayor superficie de contacto entre los hollejos y el mosto. La CONGELACIÓN DE LA UVA O EL MOSTO antes de la fermentación, parece tener un efecto mucho más grande que la inmersión en frío, ya que bajar la temperatura por debajo del punto de congelación provoca la ruptura de las paredes y las membranas de las células de los hollejos de uva, liberando fácilmente los antocianos, y facilitando la futura solubilización de las proantocianidinas. Esta práctica de congelación, se ha realizado mediante el uso de nieve carbónica (CO₂ sólido) obteniendo buenos resultados, ya que este tiene la ventaja que al congelar la uva sublima, recubriendo el mosto con dióxido de carbono gaseoso que protege el mosto del oxígeno atmosférico y, por lo tanto, de fenómenos de oxidación.^{92,112,115,119,120}

El uso de DOSIS ALTAS DE SO₂, técnica conocida también como maceración sulfítica, se generalizó hace algunos años en la zona de la Borgoña. El SO₂ ejerce un doble efecto: por un lado y debido a su efecto antiséptico, provoca un retraso en el comienzo de la fermentación alcohólica, alargando la etapa de maceración prefermentativa (en ausencia de alcohol) con los efectos ya comentados que este hecho comporta. Por otro lado, a concentraciones suficientemente elevadas de sulfuroso y especialmente a bajas temperaturas, parece que el SO₂ actúa degradando las paredes celulares de la piel de uva, facilitando una mejor extracción del color.^{17,115,121,122}

La práctica de SANGRADO PARCIAL, también conocida como DOBLE PASTA, consiste en realizar un sangrado parcial de la cuba justo al día siguiente de su llenado, en la mayoría de ocasiones antes de que arranque la fermentación alcohólica. El mosto que se extrae puede ser utilizado para la elaboración de vino rosado, y en el conjunto restante se incrementa la proporción de pieles y semillas respecto del volumen de mosto. Este incremento de la ratio sólidos-líquido comporta una mejor calidad del vino final, ya que los vinos obtenidos mediante esta práctica presentan una mayor cantidad de antocianos y proantocianidinas, lo que incrementa el color del vino y su estabilidad, además de la tanicidad y la capacidad del vino para la crianza.^{92,115,120,123-125}

TÉCNICAS PARA MEJORAR LA EXTRACCIÓN A PARTIR DE LA MACERACIÓN FERMENTATIVA.

Para mejorar el proceso de extracción de compuestos fenólicos durante la etapa de maceración fermentativa, cuando se forma el sombrero con las partes sólidas en la parte superior del tanque de fermentación, se han desarrollado técnicas como la de SOMBRERO SUMERGIDO, el REMONTADO, y tratamientos mecánicos del sombrero como el BAZUQUEO o el *DÉLESTAGE*, para facilitar el contacto entre las partes sólidas y el líquido, favoreciendo la extracción y disolución de compuestos fenólicos.⁹²

La técnica del SOMBRERO SUMERGIDO consiste en instalar un entramado dentro de la tina que impida que la pasta suba a la superficie, de tal manera que el sombrero permanece mayoritariamente sumergido en el mosto en fermentación. El hecho que el sombrero esté sumergido durante toda la fermentación debería permitir una mayor extracción,¹²⁶ ya que el contacto entre los hollejos y el líquido es continuo, pero puede suceder que el sombrero se compacte demasiado debido al empuje del dióxido de carbono, impidiendo una correcta extracción.⁹²

Los REMONTADOS consisten en enviar el líquido (mosto/vino) mediante una bomba desde la parte inferior del tanque hasta la parte superior, distribuyéndolo sobre el sombrero. Esta técnica permite mejorar la extracción de la materia colorante al poner en contacto el líquido con los hollejos, además de resuspender las levaduras y airear el mosto para que estas se puedan multiplicar sin problemas. Este procedimiento, además, permite homogeneizar la temperatura y liberar el CO₂ que se hallaba disuelto en el líquido saturando la atmósfera del espacio de cabeza que cubre el sombrero una vez terminada la fermentación alcohólica. El volumen de líquido a remontar y la frecuencia de los remontados tienen una gran influencia sobre la extracción de antocianos y de proantocianidinas. A mayor frecuencia y volumen de

remontado mayor será la extracción de compuestos fenólicos, así como la intensidad del color y su estabilidad.^{92,127} El uso de los REMONTADOS para favorecer la extracción de los compuestos fenólicos es una técnica habitual en bodega, hasta el punto que en el mercado existen tanques de fermentación con sistemas automatizados para realizar los remontados.¹²⁸

Los tratamientos mecánicos del sombrero persiguen el objetivo de aumentar el contacto del líquido con los sólidos que forman el sombrero, que en ciertas ocasiones se compacta mucho, dificultando la extracción, que solo se realiza eficazmente en aquellas partes del sombrero menos compactadas. El BAZUQUEO consiste en el hundimiento del sombrero para descompactarlo, hecho que permite mejorar la extracción del color y de los compuestos fenólicos.^{92,128} El DÉLESTAGE consiste en vaciar todo el líquido del tanque de fermentación y, pasadas un par de horas, volver a enviar el líquido por arriba del tanque de fermentación. Este tratamiento mecánico del sombrero, permite igual que el bazuqueo descompactar el sombrero mejorando la extracción, pero además permite una aireación del mosto favoreciendo la multiplicación de levaduras durante la fermentación alcohólica.¹²⁹

Además de estas prácticas, cabe todavía considerar que la cepa de levadura inoculada puede influir sobre el color final del vino tinto. El efecto más llamativo de las levaduras en el color es la pérdida de este, ya que las levaduras tienen la capacidad de absorber antocianos sobre sus paredes celulares y modificar la composición fenólica y el color del vino.¹³⁰⁻¹³² Aunque esta capacidad de absorber antocianos depende de la cepa de levadura, también se ha observado cierto efecto de la estructura del antociano en dicha absorción, siendo los derivados acilados (tanto acetilados como *p*-cumarilados) absorbidos más fuertemente que los monoglucósidos no acilados, con la excepción de la peonidina-3-O-glucósido, que también parece ser fuertemente absorbida, como sus derivados acilados.⁹⁸

1.4.4. Extracción de los polisacáridos.

Los polisacáridos tienen una cinética de extracción sumamente compleja, ya que los procedentes de la uva se solubilizan rápidamente pero pueden sufrir degradaciones enzimáticas y equilibrios de precipitación debidos al aumento de etanol en el medio. Además de los polisacáridos de origen vegetal, también la levadura libera polisacáridos y glicoproteínas al medio, de tal manera que, si bien se puede afirmar que la concentración de polisacáridos totales va aumentando paulatinamente a lo largo del proceso de maceración, este fenómeno de enriquecimiento del vino en polisacáridos es un fenómeno mucho más complejo de lo que

parece y merece un análisis más detallado clasificando los polisacáridos en función de su origen.

POLISACÁRIDOS DE ORIGEN VEGETAL.

Los polisacáridos de origen vegetal proceden de las paredes celulares de la uva, que mediante los tratamientos mecánicos y la actividad enzimática se fragmentan y se disuelven en el mosto/vino. De los tres dominios de naturaleza glucídica de la pared celular vegetal, las celulosas y las hemicelulosas no son solubles y, por lo tanto, únicamente se solubilizan significativamente fragmentos de los llamados polisacáridos pécticos. El contenido de dichos polisacáridos en el vino final depende de la cantidad inicial de polisacáridos en los distintos tejidos de la uva, de su solubilidad y de su resistencia a la hidrólisis enzimática.²⁶

Los homogalacturonanos (**HG**), que corresponden a los polisacáridos pécticos más abundantes en la uva (pudiendo llegar a representar hasta el 80 % de las pectinas), se hallan en cantidades muy pequeñas en el vino. Al pisar la uva, parte de estos HG se solubilizan y sufren una intensa actividad enzimática, que en primer lugar rompe los enlaces éster liberando metanol al medio, y posteriormente hidroliza las propias cadenas de polisacárido, degradándolo de tal modo que al final de la fermentación alcohólica la cantidad que se encuentra en el vino es prácticamente negligible.^{26,133}

Los rhamnogalacturonanos de tipo I (**RG-I**), que corresponden aproximadamente al 15 % de las pectinas de la pared celular de la uva, son también bastante sensibles a la hidrólisis enzimática, representan tan solo entre un 2 % y un 4 % de los polisacáridos totales del vino tinto.²⁶ En cambio, sus ramificaciones (mayoritariamente arabinanos y arabinogalactanos), sí que contribuyen significativamente en la composición polisacáridica del vino tinto. De entre estos, los de mayor importancia en el vino son los arabinogalactanos de tipo II, que contienen una parte proteica en su estructura, también conocidos como arabinogalactan-proteína (**AGP**). Gran parte de los AGPs se encuentran en forma soluble en las paredes celulares, de modo que son fácilmente extraíbles (debido a la actividad enzimática endógena durante el proceso de maduración de la uva) durante el pisado de la uva y las primeras etapas de la maceración.¹³⁴ Estos AGP se solubilizan muy temprano, alcanzando su máximo antes de que finalice la fermentación alcohólica, y luego su contenido decrece durante las últimas etapas de la fermentación alcohólica ya sea debido a su precipitación por el incremento de etanol en el medio o a su degradación enzimática.¹³³ A pesar de que estos AGP no representan más del 25 % de los polisacáridos totales de la pulpa de uva, ni más del 7 % de los polisacáridos totales de

las pieles, en el vino pueden llegar a representar hasta un 40 % de los polisacáridos totales, siendo uno de los polisacáridos mayoritarios.^{26,135}

Finalmente, los rhamnogalacturonanos de tipo II (**RG-II**), por su compleja estructura y composición, son muy resistentes a la hidrólisis enzimática, manteniendo su estructura a lo largo del tiempo. La extracción de RG-II es prácticamente negligible durante la maceración prefermentativa y durante las primeras etapas de la fermentación alcohólica, y no es hasta bien avanzada la fermentación alcohólica que incrementa su concentración de forma significativa, mostrando la necesidad de maceración para extraerlos y solubilizarlos en el vino. Después de su solubilización, el contenido de RG-II se mantiene más o menos constante en el vino, en donde puede llegar a representar entre el 15 % y el 20 % de los polisacáridos totales del vino tinto.^{26,133,136}

Así pues, alrededor de la mitad de los polisacáridos del vino tienen un origen vegetal y se solubilizan al vino durante el pisado de la uva y la maceración fermentativa, siendo los AGP y los RG-II los compuestos de origen vegetal más abundantes en el vino tinto acabado.

POLISACÁRIDOS DE ORIGEN MICROBIOLÓGICO.

Además de los polisacáridos de origen vegetal, los microorganismos pueden representar otra fuente importante de polisacáridos para el vino; ya sean hongos, levaduras o bacterias. Si bien el aporte de polisacáridos por parte de hongos (patógenos de la vid, presentes en uva en mal estado sanitario) y bacterias (lácticas y/o acéticas que pueden proceder del medio vitícola o del ambiente de la bodega) puede ser importante en algunos casos, esta sección se centrará en el aporte de polisacáridos por parte de las levaduras que realizan la fermentación alcohólica.

Los polisacáridos aportados por la levadura, análogamente a lo que sucede con los polisacáridos de origen vegetal, proceden de sus paredes celulares, que representan hasta un 25 % del peso seco de la levadura y tienen una estructura análoga

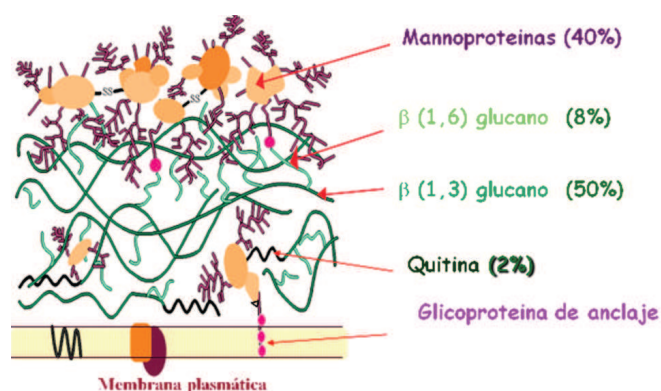


Figura 28. Diagrama de la pared celular de la levadura en donde se muestran sus componentes.

a la que se muestra en el diagrama de la Figura 28. La composición de la pared celular de la levadura depende de la cepa utilizada, pero en general está formada por dos capas bien diferenciadas: una pared externa de carácter elástico compuesta de manoproteínas y β -(1 $\rightarrow$ 6)-glucanos y una pared interna de carácter rígido formada por una red tridimensional de quitina y β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanos.^{137,138} De todos estos componentes de la pared celular de la levadura, las macromoléculas que se solubilizan al vino y que poseen interés enológico son las manoproteínas, glicoproteínas con un alto grado de glicosidación (entre el 80 y el 90 %) compuestas mayoritariamente por manosa (>90 %) y algo de glucosa, que pueden representar entre el 30 y el 50 % de la pared celular de la levadura y se hallan unidas covalentemente a la malla de β -glucanos. Las manoproteínas liberadas al vino presentan tamaños moleculares muy variables, desde 5 KDa hasta 800 KDa, y su carga eléctrica (que varía con el pH) al pH del vino es negativa.¹³⁹ Estas manoproteínas, en general, poseen una estructura tridimensional basada en un núcleo proteico con dos tipos de cadenas laterales: cadenas cortas de manosa enlazadas mediante enlaces glicosídicos del tipo α -(1 $\rightarrow$ 2) y α -(1 $\rightarrow$ 3) unidas a la parte proteica a nivel de residuos de serina o treonina, y cadenas largas polimanosídicas con enlaces del tipo α -(1 $\rightarrow$ 6) ramificadas con cadenas laterales de manosa mediante enlaces del tipo α -(1 $\rightarrow$ 2) y α -(1 $\rightarrow$ 3), que se enlazan a la parte peptídica mediante un par de residuos de N-acetil-glucosamina que, a su vez, se unen a un residuo de asparragina.¹³⁷

En el vino se pueden distinguir dos tipos de manoproteínas: en primer lugar manoproteínas secretadas durante la fase de crecimiento exponencial de las levaduras que se acumulan durante la fermentación y en segundo lugar manoproteínas liberadas por la autólisis celular de las levaduras durante la crianza del vino sobre lías (o durante la maceración postfermentativa, cuando la fermentación alcohólica ha concluido, la temperatura aún es elevada y el enriquecimiento de los vinos tintos en coloides procedentes de la autólisis está favorecida). La cantidad de manoproteínas liberadas por la levadura durante la fermentación alcohólica, depende de la cepa de levadura utilizada,¹⁴⁰ pero también de la temperatura de fermentación y del contenido coloidal inicial del mosto, aunque a pesar de esta variabilidad, en un vino tinto las manoproteínas corresponden a uno de los polisacáridos mayoritarios, pudiendo representar entre el 30 y el 50 % de los polisacáridos totales del vino.^{133,136,137}

Su cinética de extracción durante la vinificación en tinto empieza con el inicio de la fermentación alcohólica, aunque no es hasta la fase de crecimiento exponencial de las levaduras (que coincide con la fase tumultuosa de la fermentación alcohólica) en cuando se observa un incremento notable en su concentración al mosto en fermentación. A partir de ese

momento, el enriquecimiento del mosto/vino en manoproteínas es continuo, aunque mucho más lento, y se prolonga hasta el momento del descube, cuando se separan la mayor parte de las lías del vino acabado.¹³³

Además de las manoproteínas liberadas por la levadura durante la fermentación alcohólica y durante la autólisis de ésta, durante los últimos años se ha generalizado el uso de aditivos enológicos basados en manoproteínas debido a sus múltiples beneficios en la calidad del vino.^{109,141}

1.5. COMPOSICIÓN Y EVOLUCIÓN DEL VINO TINTO: IMPLICACIONES

SENSORIALES.

Una vez caracterizada la materia prima (la uva), su desarrollo y madurez, y el proceso de vinificación, en esta última sección se realizará un repaso general de la composición química del vino tinto así como la influencia directa y notoria que dicha composición ejerce sobre los atributos sensoriales del vino.

1.5.1. Composición química del vino tinto.³

El proceso de fermentación alcohólica del mosto conlleva un cambio de composición no solo a nivel cualitativo sino también cuantitativo. El fenómeno con mayor impacto en la transformación del mosto en vino mediante la fermentación alcohólica es la práctica desaparición de los azúcares (fundamentalmente glucosa y fructosa, componentes mayoritarios de la uva madura), cuya concentración pasa de ser del orden de los 250 g/L a menos de 5 g/L, mientras el etanol (producto de la fermentación) pasa a ser el componente mayoritario del vino después del agua, llegando a representar entre el 12 % y el 16 % en volumen del vino. La aparición de estas cantidades de etanol, modifica las características de la disolución, que pasa de una solución acuosa en el mosto, a una solución hidroalcohólica en el vino, hecho que afecta significativamente a la solubilidad de los compuestos procedentes de la uva y, por lo tanto, a la composición final del vino tinto.

Así pues, el agua es el componente mayoritario del vino, pudiendo llegar a representar más de un 85 % del volumen del vino acabado. Como se ha apuntado anteriormente, el segundo componente del vino es el etanol, pudiendo representar entre 12 % y el 16 % del

³ Para la elaboración de esta sección se han utilizado las fuentes bibliográficas **142-144**.

volumen del vino acabado. El agua y el etanol, pues, representan prácticamente la totalidad de la composición del vino en cuanto a volumen se refiere. El tercer componente en importancia de concentración es otro producto de la fermentación alcohólica: el glicerol, pudiéndose hallar en el vino en un rango de concentraciones entre 5 y 15 g/L. En concentraciones inferiores a las de estos tres compuestos mayoritarios encontramos ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, sustancias minerales y otros compuestos minoritarios (tales como compuestos volátiles, sustancias nitrogenadas y vitaminas).

En lo que respecta a los ácidos del vino, durante la fermentación alcohólica aparecen una serie de ácidos procedentes del metabolismo de las levaduras, fundamentalmente ácido succínico, ácido acético y pequeñas cantidades de ácido láctico. Por otra parte, los ácidos procedentes de la uva que se pueden hallar en el mosto, también sufren modificaciones durante el proceso de fermentación alcohólica. A medida que el grado alcohólico aumenta, el principal ácido orgánico procedente de la uva; el ácido (L)-Tartárico; disminuye su concentración (a pesar de ser muy resistente a los ataques de bacterias y otros microorganismos presentes habitualmente en el vino) debido fundamentalmente a la disminución de la solubilidad de su sal principal (bitartrato de potasio) en presencia de etanol, de tal modo que al aumentar el etanol del medio, el bitartrato de potasio precipita y se deposita en el fondo del tanque de fermentación. Análogamente, el segundo ácido mayoritario de la uva madura; el ácido (L)-Málico, también disminuye a lo largo del proceso de vinificación en tinto, pero en este caso debido al metabolismo de microorganismos vínicos (ya se trate de ciertas cepas de levadura capaces de metabolizar una cantidad importante de málico o de la acción de las bacterias responsables de la llamada fermentación malo-láctica, que consumen el málico en su totalidad transformándolo en ácido (L)-Láctico). El ácido cítrico, que se halla en el mosto en concentraciones entre 0.1 y 0.5 g/L, no es degradado por las levaduras, aunque si puede ser metabolizado por las bacterias lácticas durante la fermentación maloláctica, incrementando la producción de ácido acético (y aumentando, por lo tanto, la acidez volátil).

A parte de los ácidos, y dejando a un lado los compuestos fenólicos cuya cesión desde la uva hacia el vino ha sido detallada en la sección de vinificación en tinto, cabe resaltar la presencia en el vino de otros componentes tales como minerales y compuestos aromáticos. En lo que respecta a los minerales, para un correcto desarrollo de la fermentación alcohólica es necesaria la presencia de distintos cationes (tales como potasio, magnesio, cobre, hierro, calcio, cobalto y zinc). El potasio y el calcio son los cationes más importantes del mosto y el vino a nivel cuantitativo, y su concentración disminuye durante la fermentación alcohólica

debido a que con el incremento de etanol en el medio se produce una precipitación de las sales tartáricas de ambos cationes (bitartrato potásico y tartrato de calcio), que comporta la disminución de su contenido total en el vino acabado. Finalmente, las levaduras son responsables de la formación de compuestos volátiles que participan del aroma del vino e influyen notablemente en sus propiedades organolépticas. Estos compuestos aromáticos que tienen su origen en el proceso de fermentación alcohólica del mosto pertenecen a distintas familias químicas, entre las que predominan alcoholes superiores (mayoritarios si su concentración está por encima de los 10 mg/L, tales como el 1-propanol, el isobutanol, el alcohol isoamílico y el 2-feniletanol; o minoritarios si su concentración está por debajo de los 10 mg/L, tales como butanol, pentanol y hexanol entre otros), compuestos carbonílicos tanto aldehídos (acetaldehído, propanal, hexanal, benzaldehído...) como cetonas (diacetilo, acetoína...), y ésteres (siendo los mayoritarios los acetatos de distintos alcoholes y los ésteres etílicos).

1.5.2. El color del vino tinto: Los antocianos y su evolución.

El color del vino tinto es uno de los aspectos organolépticos más importantes de un vino, ya que al ser la vista el primer sentido que interviene en una degustación, ejerce una enorme influencia sobre las expectativas del resto de percepciones que están por venir. De algún modo, si el color del vino condiciona las expectativas del consumidor se debe a que el color del vino es un reflejo de su composición química y (con los conocimientos adecuados) a partir del color de un vino se pueden deducir parámetros como su edad, su potencial tánico, su estado de conservación, etc. Por estos motivos, hace décadas que se intenta caracterizar el color del vino tinto de una forma objetiva que permita relacionar el color y la composición

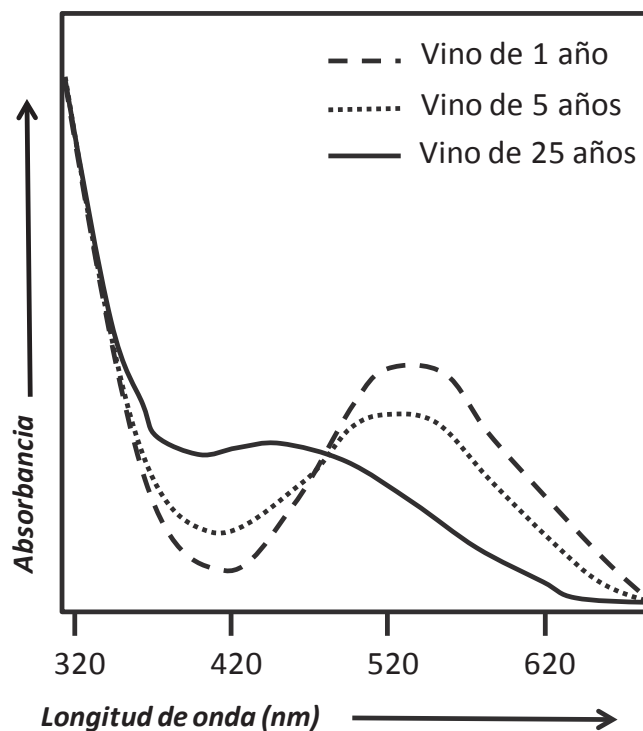


Figura 29. Espectro visible de tres vinos de diferente edad. Ilustración adaptada de 92.

química del vino tinto.

Sin duda el color de un vino tinto viene definido por su espectro de absorción en la zona del visible, que para un vino tinto cualquiera tendría un aspecto como el que se muestra en la Figura 29, donde se puede observar un máximo alrededor de 520 nm (que corresponde al color rojo) y en donde se señalan también las zonas correspondientes a la componente amarilla (420 nm) y a la componente azul (620 nm). Los parámetros tradicionalmente utilizados para caracterizar el color de un vino se basan en las absorbancias a estas tres longitudes de onda correspondientes a las componentes roja, amarilla y azul: Por un lado, la intensidad colorante (IC) que indica la cantidad de color que tiene un vino, se obtiene mediante la suma de las tres absorbancias (a las longitudes de onda de 420 nm, 520 nm y 620 nm). Por otra parte, se define la tonalidad, que indica la importancia relativa del amarillo respecto al rojo, se obtiene mediante el cociente entre la componente amarilla y la componente roja, y se suele expresar de forma porcentual. Estos parámetros tradicionales, aunque indicativos e útiles para un cierto control del color del vino, no permiten realizar una correcta definición del color de un vino; con este fin se definió a finales de los años 70, el llamado espacio CIELAB, en el que se trata de representar en un espacio imaginario de tres dimensiones la totalidad de los colores, de tal manera que el color queda perfectamente definido, mediante el uso de tres coordenadas que indican un punto concreto del espacio CIELab, y que definen exactamente el color.

Los pigmentos procedentes de la uva y mayores responsables del color del vino tinto son los antocianos. En su forma roja o de catión flavilio, esta familia de compuestos posee una carga positiva, lo que los debería hacer compuestos extremadamente reactivos e inestables; en cambio el color de la uva y del vino tinto es notable y perdurable, y eso se debe al hecho de que su carga positiva se encuentra deslocalizada a lo largo de toda su estructura mediante el fenómeno conocido como resonancia, que la estabiliza significativamente. El hecho que la carga se pueda deslocalizar por toda la molécula, se debe a que esta posee orbitales π conjugados que son los responsables de que la molécula absorba la radiación visible y, por lo tanto los responsables finales de su color. A pesar del efecto de resonancia que los estabiliza, los antocianos siguen siendo moléculas reactivas, puesto que poseen distintos centros

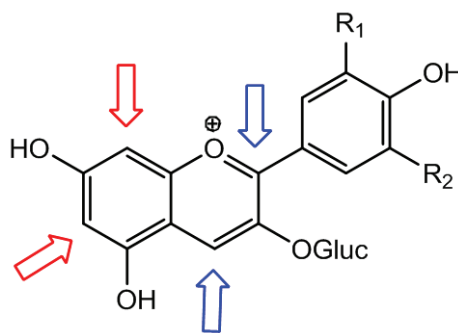


Figura 30. Estructura característica de un antociano en donde se muestran sus posiciones nucleófilas (flechas rojas) y posiciones electrófilas.

reactivos (Figura 30). Si un nucleófilo ataca a cualquiera de las posiciones electrófilas del antociano, esta adición comporta una ruptura de la conjugación y, por lo tanto la pérdida del color de la molécula. Estas reacciones, aunque reversibles, son las responsables, por ejemplo, de la decoloración de los antocianos por parte del hidrogenosulfito.

Siendo los antocianos los responsables del color del vino, resulta evidente que el color del vino ha de depender de la concentración de antocianos presentes y de la proporción de

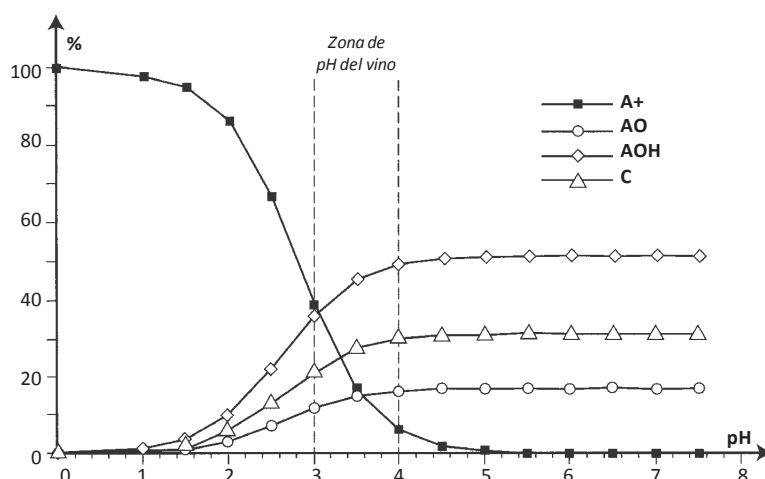


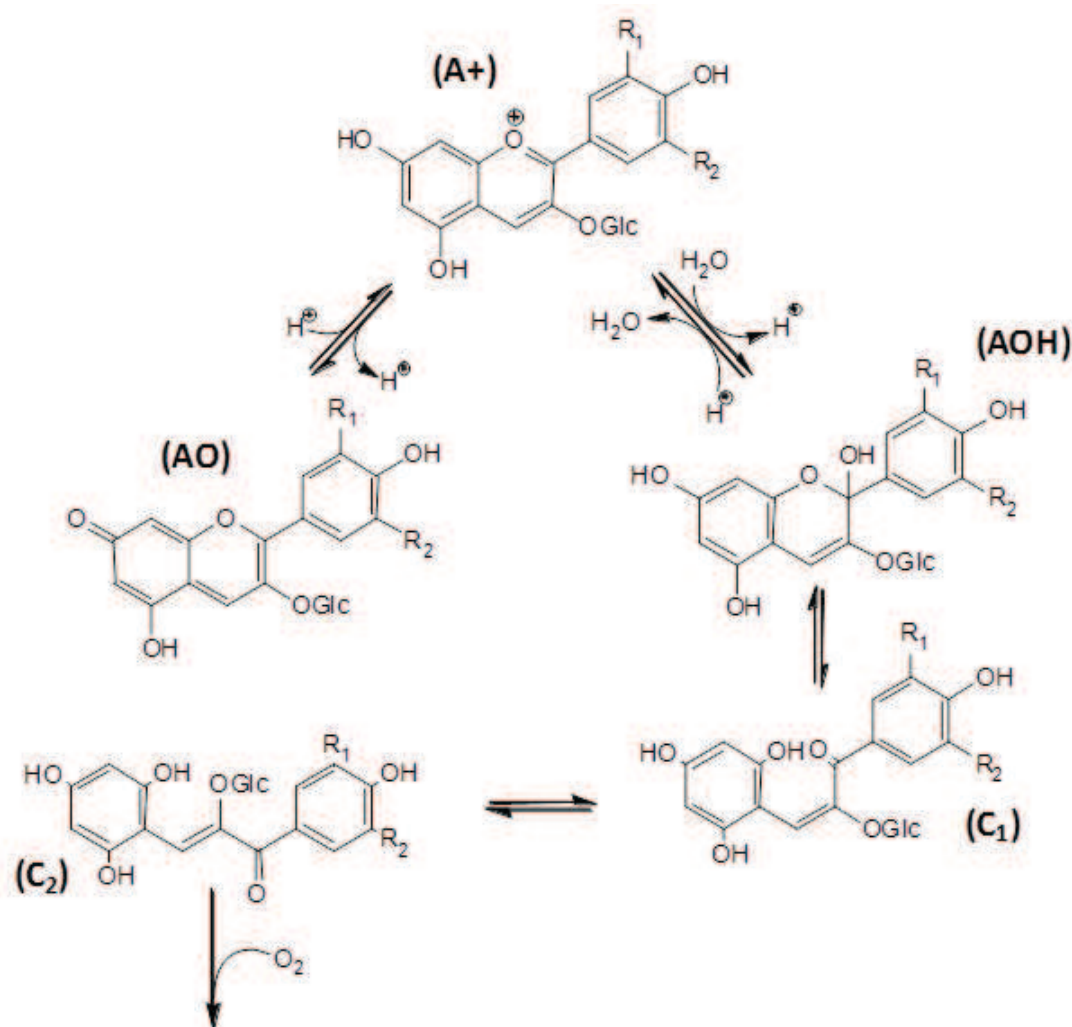
Figura 31. Proporción de las distintas formas de los antocianos en equilibrio en función del pH. A+: catión flavilio (rojo). AO: forma quinona (azul). AOH: forma carbinol (incolora). C: forma calcona (amarilla). Ilustración tomada de 91

afectan a su color (Figura 32). Considerando las distintas formas en equilibrio y sus constantes en función del pH, la cantidad de antocianos coloreados del vino debería ser muy pequeña respecto a la cantidad de antocianos que se hallan bajo las formas carbinol y calcona (formas incolora y amarilla respectivamente) tal y como se puede observar en la Figura 31. El hemiacetal de la forma carbinol, además de estar en equilibrio con el catión flavilio, también está en equilibrio con la calcona *cis*, que a su vez posee un equilibrio con su isómero *trans*, que se puede oxidar mediante una reacción irreversible para originar ácidos fenólicos (incolores) que conllevan una pérdida del color del vino tinto (ya que los ácidos fenólicos son incoloros). La formación de las calconas se ve muy favorecida por temperaturas elevadas, y en la etapa irreversible de la degradación de los antocianos se produce una oxidación en donde participa el oxígeno molecular; así pues, una mala manipulación o conservación del vino que implique o combine temperaturas elevadas y oxigenación puede comportar pérdidas importantes e irreversibles de color.

Considerando dichos equilibrios y sus constantes, para valores de pH superiores a 4, la cantidad de antocianos en forma de base quinona (violácea), superaría la cantidad de

estos que presenten coloración, aunque dicha proporción de antocianos coloreados no depende únicamente de las reacciones de adición nucleófila que se acaban de mencionar, sino que los antocianos son moléculas que presentan una serie de equilibrios en función del pH que

antocianos en forma de catión flavilio (roja), por lo que muchos vinos tintos deberían mostrarse mucho más azulados de lo que los observamos en realidad, hecho que no sucede, debido a que el vino no es una simple disolución de antocianos puros, sino que es una mezcla



Ácidos benzoicos y cinámicos

Figura 32. Distintas formas en equilibrio de los antocianos. A+: forma catión flavilio. AO: forma quinona. AOH: forma carbinol. C₁: calcona *cis*. C₂: calcona *trans*.

muy compleja en donde los distintos compuestos interactúan entre sí y evolucionan afectando, entre otros parámetros, al espectro de absorción del vino en la zona del visible y, por lo tanto su color. De algún modo, pues, se puede afirmar que además del pH y la temperatura, otros factores influyen en los equilibrios entre los antocianos, aumentando y estabilizando el color del vino.

Entre los mecanismos, que contribuyen a explicar el incremento y la estabilización del color del vino tinto, el de mayor importancia para los vinos jóvenes es el fenómeno conocido como copigmentación, mientras que a medida que los vinos envejecen la copigmentación va

perdiendo influencia frente a la formación de nuevos pigmentos derivados de los antocianos procedentes de la uva.

COPIGMENTACIÓN.

La copigmentación se considera uno de los principales mecanismos de estabilización del color del vino tinto, y consiste en la formación de complejos en los que el antociano bajo una de sus formas coloreadas se asocia a otra molécula (copigmento) dando lugar a estructuras tipo sándwich con un número de capas variable entre 2 y 10. La formación del complejo antociano-copigmento se basa en interacciones débiles no covalentes (de baja energía), que se forman con facilidad pero también se pueden disociar fácilmente, y están relacionadas con interacciones hidrofóbicas de tipo π - π *stacking* entre los anillos aromáticos del antociano y el copigmento. En función de la naturaleza del copigmento implicado, se habla de *autocopigmentación* (cuando el copigmento es otra molécula de antociano), *copigmentación intramolecular* (cuando el copigmento es una porción de la propia molécula de antociano, como el sustituyente cumarilo de una antocianina *p*-cumarilada) o de *copigmentación intermolecular* (cuando el copigmento es una molécula distinta a un antociano, como ácidos fenólicos, nucleótidos, aminoácidos u otros flavonoides).⁴⁰

Las estructuras tipo sándwich fruto de la copigmentación, generan un entorno hidrofóbico que protege al antociano de la adición nucleófila (que conlleva la desaparición del color),⁴⁰ de tal manera que una proporción mayor de antocianos de la que correspondería de acuerdo con el pH del vino contribuirán al color, siempre que en el medio existan los copigmentos adecuados. Además de incrementar el color del vino (fenómeno conocido como efecto hiperocrómico), la copigmentación también puede modificar su tonalidad hacia tonos más azulados (fenómeno conocido como efecto batocrómico).¹⁴⁵

Hay distintos factores que influyen en la importancia y la estabilidad de los complejos de copigmentación, entre los que destacan la estructura y la concentración relativa de antocianos y copigmentos. En lo que respecta al antociano, parece que los complejos de copigmentación son más estables cuando mayor es el grado de glicosilación y mayor la acilación. Los flavonoles son los mejores copigmentos, seguidos de los ácidos hidroxicinámicos, aunque sus bajas concentraciones en el medio disminuyen su influencia. En cambio, los flavan-3-oles monómeros y los oligómeros de proantocianidina, a pesar de ser copigmentos menos efectivos, pueden llegar a tener relevancia en el fenómeno de la copigmentación debido a su mayor concentración en el medio.¹⁴⁶ Además de la estructura y la cantidad de pigmentos y

INTRODUCCIÓN

copigmentos, otros factores como la temperatura, la fuerza iónica, el pH y la concentración de etanol ejercen una gran influencia sobre la estabilidad de los complejos de copigmentación.^{145,147}

En vinos jóvenes, la copigmentación involucra prácticamente la mitad de los antocianos monoméricos, y puede llegar a representar entre el 30 y el 50 % del color el vino, a pesar que hay algunos resultados contradictorios que indican que la copigmentación se mantiene más allá de la crianza en barrica o en botella, por lo general se acepta que este fenómeno de copigmentación pierde importancia a partir de los nueve meses, debido fundamentalmente a la transformación de los antocianos monoméricos libres en pigmentos poliméricos que, debido a su estructura, no se pueden copigmentar. De hecho, se ha postulado que precisamente la copigmentación puede ser el paso previo a la formación de pigmentos poliméricos más estables, facilitando la formación de uniones covalentes entre antocianos y flavanoles,¹⁴⁸ de tal modo que se podría decir que la copigmentación permite actuar como un reservorio de antocianos, permitiendo que los antocianos extraídos permanezcan coloreados y estables en solución hasta que se formen pigmentos poliméricos mucho más estables.

FORMACIÓN DE PIGMENTOS DERIVADOS DE LOS ANTOCIANOS.

Aunque tradicionalmente se ha atribuido la evolución y la estabilización del color de los vinos tintos durante su envejecimiento a la formación de pigmentos poliméricos mediante

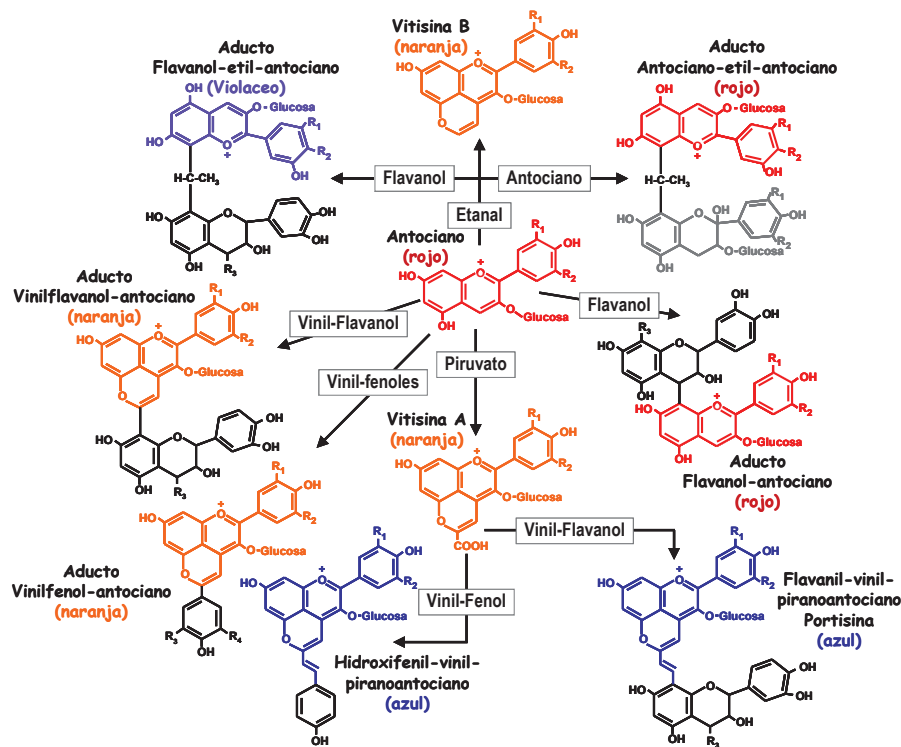


Figura 33. Diagrama esquemático en el que se muestran los principales derivados de los antocianos formados durante la elaboración y envejecimiento del vino tinto, así como su color. Ilustración extraída de 202.

reacción entre los antocianos monoméricos y las proantocianidinas, hoy en día se han descrito en el vino una gran variedad de pigmentos derivados de los antocianos. La enorme variedad de

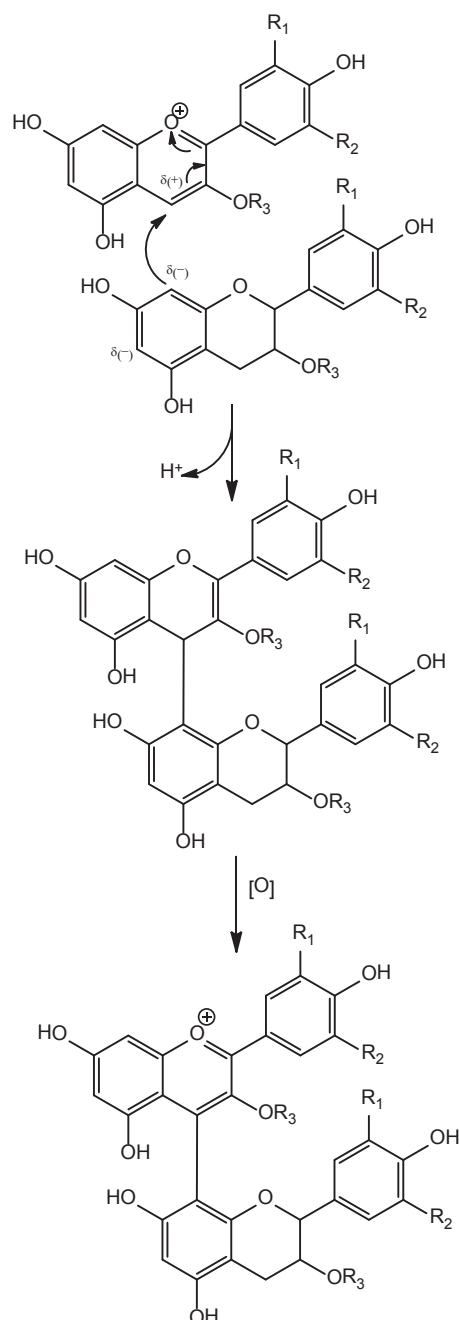


Figura 34. Esquema de la reacción de adición antociano-tanino (A⁺-F). Esquema adaptado de 152

nuevos pigmentos derivados de los antocianos no es de extrañar si a la reactividad de éstos se le añade la enorme complejidad de la matriz del vino. La modificación estructural que sufren los antocianos supone también una modificación de sus características cromáticas, y, por consiguiente, la formación de derivados de antociano contribuirá a la evolución del color del vino. En el diagrama esquemático de la Figura 33 se resumen los principales derivados de los antocianos descritos en el vino así como su color, en el que se pueden distinguir dos tipos de derivados de antociano: por un lado se encuentran **ADUCTOS** en los que una molécula de antociano se combina directamente con otra molécula (ya sea de antociano o de flavanol, pudiendo tratarse de flavanoles monoméricos o poliméricos), y por otro lado se encuentran los llamados **PIRANOANTOCIANOS**, derivados en los que se ha formado un anillo pirano adicional mediante la condensación directa de los antocianos con moléculas insaturadas de bajo peso molecular.

Respecto a los **ADUCTOS** de antociano, aunque se ha postulado la presencia en el vino de algunos dímeros de antocianina¹⁴⁹ que se obtienen mediante la condensación de dos moléculas de antocianina, generalmente se postulan tres mecanismos mediante los cuales se forman los pigmentos poliméricos.^{92,150-}

¹⁵² Estos mecanismos son: la adición antociano-tanino, que se muestra en la Figura 34 (en donde el C6 u el C8 del flavanol atacan a la posición electrófila C4 del antociano), la adición tanino-antociano, que se muestra en la Figura 35 (en donde el C6 y el C8 del antociano atacan a la posición C4 del flavanol, que se encuentra en forma de carbocatión resultante de la despolimerización de las proantocianidinas en medio ácido) y la adición tanino-antociano por

medio del acetaldehído (cuyo mecanismo no se conoce con exactitud, aunque se acepta que las posiciones nucleófilas del tanino atacan al carbono carbonílico del acetaldehído, que mediante la pérdida de una molécula de agua, genera un nuevo carbocatión que es atacado por las posiciones nucleófilas del antociano).¹⁵⁰

La formación de este conjunto de pigmentos poliméricos explica en gran medida los cambios de coloración que sufren los vinos tintos durante su crianza y envejecimiento: la pérdida de intensidad colorante, la resistencia del color ante las adiciones de sulfitos y la desaparición de las tonalidades púrpuras de los vinos jóvenes para pasar a tonalidades más anaranjadas en los vinos añejos.

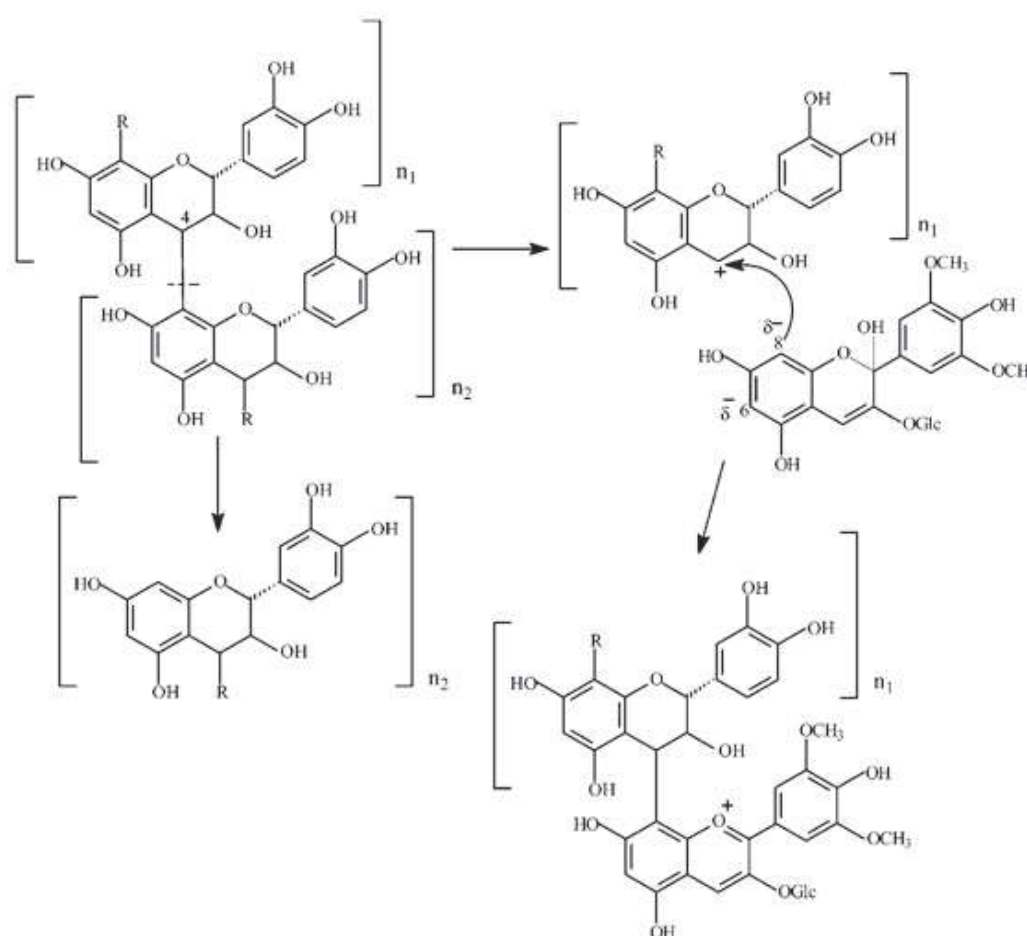


Figura 35. Esquema de la reacción de adición tanino-antociano ($F-A^+$). Esquema extraído de 152

Por un lado, estas reacciones de polimerización comportan la práctica desaparición de los monómeros de antocianina, lo que comporta, a su vez, la desaparición del fenómeno de copigmentación y, por lo tanto de sus efectos hipercrómico y batocrómico, lo que conduce a una disminución de la intensidad colorante y de la componente púrpura del color del vino. Además, con el tiempo, los pigmentos poliméricos formados van aumentando su tamaño, hasta que se forman polímeros con un grado de polimerización muy elevado, que hace

disminuir su solubilidad y que finalmente precipitan: este mecanismo explica tanto la pérdida de intensidad colorante como la aparición de depósitos de materia colorante que se observan en vinos envejecidos. El conjunto de combinaciones entre taninos y antocianos modifican las propiedades cromóforas de los pigmentos, que pasan a tener una coloración rojo-anaranjada, así como también modifican sus constantes de equilibrio en función del pH, de tal manera que, para un mismo pH, el total de formas coloreadas es mayor en el caso de los pigmentos poliméricos que en los antocianos libres. Finalmente, cabe añadir que estas reacciones de polimerización, confieren a los nuevos pigmentos una mayor estabilidad que la que poseen los antocianos libres, ya que, al bloquear parte de las posiciones reactivas del antociano, lo protege de los ataques nucleófilos que provocan la decoloración.

A pesar de que la formación de pigmentos poliméricos parece explicar la evolución del color del vino a lo largo de su envejecimiento, durante las últimas décadas se ha puesto de relieve otro fenómeno que ocurre en el vino y que comporta la formación de unos nuevos pigmentos conocidos como **PIRANOANTOCIANOS**.^{41,150,153-156} Mediante reacciones de cicloadición, los antocianos reaccionan con distintos compuestos de bajo peso molecular presentes en el vino, formando un anillo pirano adicional que define la estructura característica de los piranoantocianos (Figura 36). La mayoría de compuestos que reaccionan con los antocianos mediante reacciones de este tipo son metabolitos producidos por la levadura durante la fermentación alcohólica,^{157,158} como el acetaldehído o el ácido pirúvico, aunque también se han descrito incorporaciones de otras moléculas más voluminosas como ácidos hidroxycinámicos o vinil-flavanoles. La formación de los piranoantocianos se inicia durante la fermentación alcohólica y sigue durante el proceso de vinificación, crianza y envejecimiento del vino. A pesar de su baja concentración en el vino, los derivados piranoantociánicos son buenos candidatos para contribuir significativamente al color de los vinos añejos, ya que son muy estables frente a la

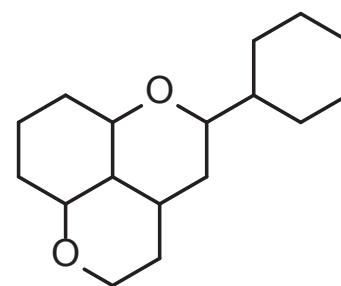


Figura 36. Esqueleto característico de los piranoantocianos.

decoloración con bisulfito, las variaciones de pH, la degradación oxidativa y la temperatura, de tal manera que su práctica totalidad contribuyen al color del vino. Además, son cromóforos más débiles que sus predecesores (antocianinas) y poseen (muchos de ellos) tonos rojo-anaranjados. Así pues, parece que todos los fenómenos de formación de nuevos pigmentos concuerdan perfectamente con la evolución del color del vino tinto durante su envejecimiento.

1.5.3. Flavan-3-oles y Proantocianidinas: Amargor y astringencia del vino tinto.

A parte del color, y al margen de las sustancias volátiles correspondientes al aroma del vino (ya que no han sido objeto de estudio en este trabajo) dos de las percepciones que más condicionan la calidad de un vino tinto son, sin duda, la astringencia y el amargor; ambas íntimamente relacionadas con los flavan-3-oles y sus polímeros.

EL AMARGOR.

El amargor es uno de los cinco gustos básicos, y por lo tanto su presencia se debe a interacciones específicas entre compuestos amargos y receptores específicos de la lengua. Aunque durante la última década se han publicado trabajos acerca del amargor de los flavonoles,¹⁵⁹⁻¹⁶¹ tradicionalmente se ha considerado a los flavan-3-oles (tanto en forma de monómeros como de pequeños oligómeros) y a los ácidos fenólicos (como el ácido gálico) como los principales responsables del sabor amargo de los vinos.¹⁶² Ya que todos los vinos tintos contienen este tipo de moléculas, durante años se ha intentado esclarecer los factores más influyentes en la percepción del amargor. Al tratarse de reacciones específicas, resulta lógico que al incrementar la concentración de los compuestos amargos incremente la amargor del vino, aunque también se ha observado un efecto de la estructura del flavan-3-ol, siendo la (-)-epicatequina más amargante que la (+)-catequina, y los monómeros más amargos que los oligómeros, de tal manera que la sensación de amargor disminuye a medida que aumenta el grado de polimerización.^{163,164} Además de la estructura de los flavan-3-oles, parece que el grado alcohólico del vino también juega un papel importante en la percepción del amargor, que se intensifica al aumentar la concentración de etanol en el medio.¹⁶⁵

LA ASTRINGENCIA.

A diferencia del amargor, que es un gusto básico, la astringencia se considera una percepción táctil, fruto de una interacción entre las proteínas lubricantes salivares y las proantocianidinas, que forman un complejo tanino-proteína que comporta la pérdida del efecto lubricante de la saliva.¹⁶⁶ La astringencia no es una sensación ligada a una zona particular de la boca, es un fenómeno difuso que demora unos segundos en manifestarse, y se caracteriza por una sensación de rugosidad, sequedad y aspereza en la cavidad bucal, que se atribuyen a la presencia del precipitado del complejo tanino-proteína sobre la lengua y el

paladar. Tanto la saliva y su fracción proteica, como la composición en proantocianidinas del vino influyen en la percepción de astringencia.¹⁶⁷

La saliva está constituida principalmente por agua (99.5%), y el resto son sustancias inorgánicas y proteínas, principalmente glicoproteínas como las mucinas, proteínas ricas en prolina (PRPs) y algunos péptidos de bajo peso molecular como las histatinas. Últimamente se ha observado que la percepción de la astringencia no está ligada únicamente a un tipo de proteína concreta, sino que todas las proteínas salivares juegan un papel.^{168,169} Las características intrínsecas de las proteínas (como su hidrofobicidad, su tamaño y flexibilidad estructural) influyen severamente en su capacidad para interactuar con los taninos, aunque también influyen factores extrínsecos como el pH, la temperatura, la fuerza iónica del medio, la presencia de solventes orgánicos y de carbohidratos, así como otros factores como el flujo salival, la viscosidad de la saliva, o la presencia de ácidos, edulcorantes y minerales.¹⁶⁷

En lo que respecta a las proantocianidinas, parece que estas actúan como un ligando multidentado, con participación de sus núcleos aromáticos y fenólicos en interacciones de tipo hidrofóbico y de tipo puente de hidrógeno.¹⁷⁰ La percepción de astringencia depende de la concentración de proantocianidinas, y de su estructura, aunque esta última parece ejercer mayor influencia que la concentración. Todavía no se conocen todos los factores estructurales que influyen en la astringencia de las proantocianidinas, aunque se han observado algunas diferencias de astringencia entre la (-)-epicatequina y la (+)-catequina,^{171,172} o entre los dímeros con uniones interflavánicas C4→C6 y C4→C8,¹⁷² aunque estos efectos estructurales todavía no están del todo claros. Lo que sí que parece estar bien establecido es que la percepción de la astringencia aumenta con el grado de galoilación de las proantocianidinas¹⁷³ y con su grado de polimerización.^{161,174} Al actuar las proantocianidinas como ligandos multidentados, es natural que su capacidad de interactuar con las proteínas aumente con su grado de polimerización. En este sentido recientemente se ha demostrado la presencia de proantocianidinas de alto peso molecular muy astringentes en soluciones hidroalcohólicas comparables al vino.¹⁷³

En general, pues, se podría afirmar que la astringencia de un vino aumenta con la concentración de proantocianidinas, y con el grado medio de polimerización y el grado de galoilación de estas, y disminuye con el aumento del grado alcohólico y el pH del vino.^{165,167,175,176} Aunque un vino tinto que se precie ha de ser necesariamente amargo y astringente debido a su contenido en flavan-3-oles y proantocianidinas, es necesario que estos atributos no resulten excesivos y estén equilibrados con el resto de percepciones. A lo largo

del proceso de crianza y envejecimiento del vino, su astringencia se va moderando y suavizando, evolución que se ha intentado relacionar con las distintas reacciones en las que intervienen las proantocianidinas.

LA EVOLUCIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS.

Las proantocianidinas son moléculas reactivas tal y como se ha podido comprobar con la formación de pigmentos poliméricos, en donde las proantocianidinas juegan un papel fundamental. Además de reaccionar con los antocianos, las proantocianidinas también evolucionan durante el proceso de envejecimiento del vino, reaccionando entre sí, evolución que suele comportar un incremento del tamaño de las moléculas que van aumentando su grado medio de polimerización hasta formar complejos tan grandes que se vuelven insolubles y precipitan. Se han propuesto tres mecanismos (que siempre que se den las condiciones necesarias desarrollan simultáneamente) mediante los cuales las proantocianidinas polimerizan durante el proceso de crianza y envejecimiento del vino tinto.⁹²

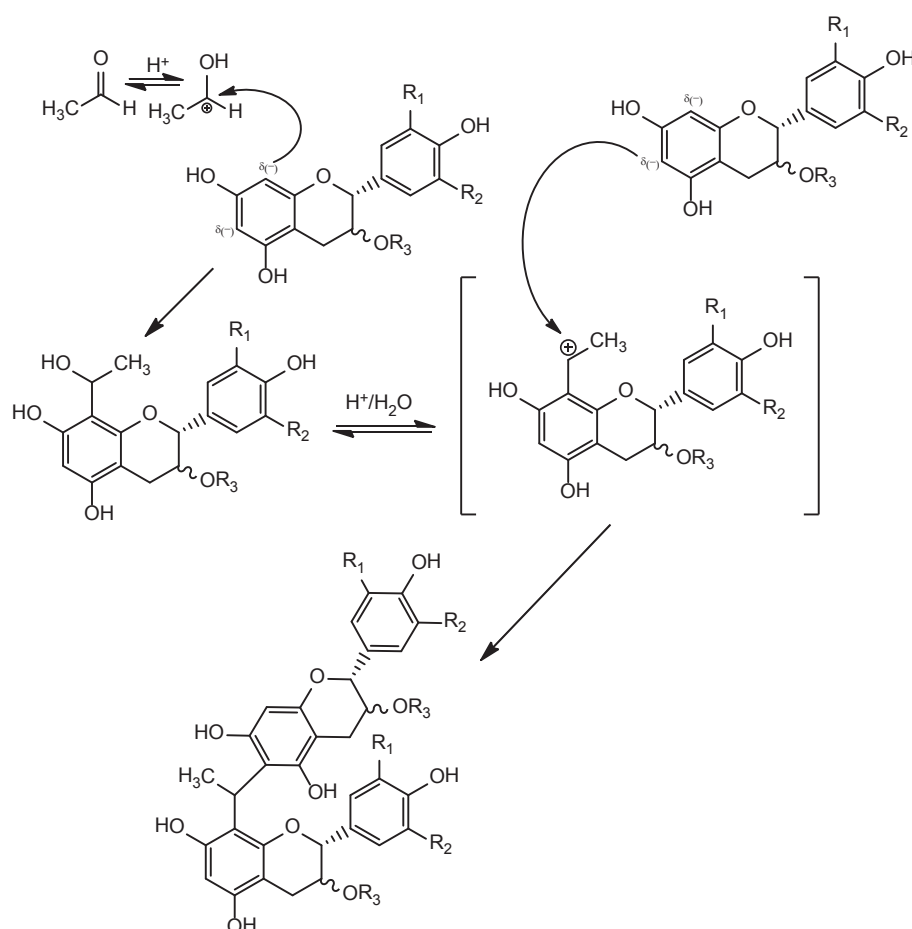


Figura 37. Mecanismo de reacción de la polimerización de flavan-3-oles mediante la participación del acetaldehído. Esquema adaptado de **180**.

El primer mecanismo descrito consiste en la POLIMERIZACIÓN MEDIANTE LA FORMACIÓN DE UN CARBOCATIÓN. Este mecanismo, análogo al que se ha mostrado en la Figura 35 para el caso de la adición tanino-antociano, se basa en la ruptura del enlace interflavánico que se produce en medio ácido y que conduce a la formación de un carbocatión en posición C4, que posteriormente es atacado por los nucleófilos presentes en el medio, entre ellos los antocianos (como en el caso comentado anteriormente) y otras moléculas como flavan-3-oles y otras proantocianidinas.^{151,177} A lo largo del tiempo, se desarrollan toda una serie de procesos de ruptura y recombinación que conducen a un incremento global del grado de polimerización de las proantocianidinas.¹⁷⁸ Este tipo de polimerización, solamente requiere la presencia de medio ácido y se da tanto durante la maceración como en las etapas posteriores de crianza en bodega y en botella.^{91,92}

El segundo mecanismo descrito es la POLIMERIZACIÓN MEDIANTE LA PARTICIPACIÓN DEL ACETALDEHÍDO. En este tipo de reacciones, cuyo mecanismo se muestra en la Figura 37, requiere la presencia de acetaldehído, que aparece en pequeñas cantidades en el vino mediante la oxidación del etanol (por lo tanto son reacciones que requieren la presencia de oxígeno). En este tipo de reacciones, los centros nucleófilos de un flavan-3-ol o de una proantocianidina (C6 y C8), atacan al carbono carbonílico del acetaldehído, que, después de incorporarse a la molécula, resulta un sustrato perfecto para que, mediante una sustitución nucleófila que comporta la pérdida de agua, sea atacado por otra molécula de flavan-3-ol u otra proantocianidina.^{91,179,180} Al igual que sucedía en el caso anterior, con el tiempo se desarrollan una serie de procesos de ruptura y recombinación que conducen al aumento de grado de polimerización de las proantocianidinas.

Finalmente, se ha descrito un tercer mecanismo de polimerización de las proantocianidinas que consiste en la POLIMERIZACIÓN MEDIANTE LA FORMACIÓN DE SEMIQUINONAS. Este tipo de reacciones transcurren por vía radicalaria, y en ella participan semiquinonas formadas a partir de la oxidación de los grupos *orto*-difeno, ^{181,182} ya sea por vía enzimática o con la participación del oxígeno y la presencia de hierro y/o cobre (que actúan como catalizadores).^{91,92}

y sensoriales.

atribuido una infinidad de efectos relacionados con las propiedades del vino.

polimérico del vino.^{192,193}

extensión, su persistencia.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

cantidades significativas de Ocratoxina A.¹⁸⁷

REFERENCIAS

1. Hidalgo Fernández-Cano, L.; Hidalgo Togores, J. La vid, In *Tratado de viticultura*; Mundi-Prensa: Madrid, España, 2011; Vol.I pp. 135-154.
2. Hidalgo Fernández-Cano, L.; Hidalgo Togores, J. Fisiología de la vid, In *Tratado de viticultura*; Mundi-Prensa: Madrid, España, 2011; Vol.I pp. 193-289.
3. Hidalgo Fernández-Cano, L.; Hidalgo Togores, J. Oragnografía de la vid, In *Tratado de viticultura*; Mundi-Prensa: Madrid, España, 2011; Vol.I pp. 155-192.
4. Keller, M. *The science of grapevines: Anatomy and physiology*. Academic Press / Elsevier: Singapore, China, 2010; pp. 377.
5. Martínez de Toda Fernández, F. *Biología de la vid: fundamentos biológicos de la viticultura*. Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, 1991; pp. 346.
6. Mullins, M.G.; Bouquet, A.; Williams, L.E. *Biology of the grapevine*. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1992; pp. 239.
7. Blouin, J.; Guimberteau, G.; Vidal, J.(.). *Madurez y maduración de la uva*. Mundi-Prensa: Madrid, España, 2004; pp. 151.
8. Conde, C.; Silva, P.; Fontes, N.; Dias, A.C.P.; Tavares, R.M.; Sousa, M.J.; Agasse, A.; Delrot, S.; Gerós, H. Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. *Food* **2007**, *1*, 1-22.
9. Coombe, B.G. Research on Development and Ripening of the Grape Berry. *Am. J. Enol. Vitic.* **1992**, *43*, 101-110.
10. Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. The Grape and its Maturation, In *Handbook of Enology*, 2nd ed.; Anonymous ; John Willey & Sons, Ltd.: Chinchester, UK, 2006; Vol.I: The Microbiology of wine and Vinification pp. 241-297.
11. Coombe, B.G.; McCarthy, M.G. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 131-135.
12. Molitor, D.; Behr, M.; Hoffmann, L.; Evers, D. Impact of Grape Cluster Division on Cluster Morphology and Bunch Rot Epidemic. *Am. J. Enol. Vitic.* **2012**, *63*, 508-514.
13. Hed, B.; Ngugi, H.K.; Travis, J.W. Relationship Between Cluster Compactness and Bunch Rot in Vignoles Grapes. *Plant Dis.* **2009**, *93*, 1195-1201.
14. Tarter, M.E.; Keuter, S.E. Effect of rachis position on size and maturity of Cabernet Sauvignon berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 86-89.
15. Figueiredo-Gonzalez, M.; Simal-Gandara, J.; Boso, S.; Martinez, M.C.; Santiago, J.L.; Cancho-Grande, B. Anthocyanins and flavonols berries from *Vitis vinifera* L. cv. Brancellao separately collected from two different positions within the cluster. *Food Chem.* **2012**, *135*, 47-56.
16. Noguerol-Pato, R.; Gonzalez-Barreiro, C.; Cancho-Grande, B.; Santiago, J.L.; Martinez, M.C.; Simal-Gandara, J. Aroma potential of Brancellao grapes from different cluster positions. *Food Chem.* **2012**, *132*, 112-124.
17. Pinelo, M.; Arnous, A.; Meyer, A.S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 579-590.
18. Commenil, P.; Brunet, L.; Audran, J.C. The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. *J. Exp. Bot.* **1997**, *48*, 1599-1607.
19. Grncarev.M; Radler, F. Review of Surface Lipids of Grapes and their Importance in Drying Process. *Am. J. Enol. Vitic.* **1971**, *22*, 80-86.
20. Ortega-Regules, A.; Ros-Garcia, J.M.; Bautista-Ortin, A.B.; Lopez-Roca, J.M.; Gomez-Plaza, E. Changes in skin cell wall composition during the maturation of four premium wine grape varieties. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 420-428.

21. Jona, R.; Vallania, R.; Rosa, C. Cell-Wall Development in the Berries of 2 Grapevines. *Sci. Hortic-Amsterdam* **1983**, *20*, 169-178.
22. Lecas, M.; Brillouet, J.M. Cell-Wall Composition of Grape Berry Skins. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1241-1243.
23. Hanlin, R.L.; Hrmova, M.; Harbertson, J.F.; Downey, M.O. Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2010**, *16*, 173-188.
24. Doco, T.; Williams, P.; Pauly, M.; O'Neill, M.A.; Pellerin, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **2003**, *53*, 253-261.
25. Ortega-Regules, A.; Maria Ros-Garcia, J.; Belen Bautista-Ortin, A.; Maria Lopez-Roca, J.; Gomez-Plaza, E. Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis vinifera* L.): technological implications. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 223-231.
26. Vidal, S.; Williams, P.; O'Neill, M.A.; Pellerin, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *45*, 315-323.
27. Cadot, Y.; Chevalier, M.; Barbeau, G. Evolution of the localisation and composition of phenolics in grape skin between veraison and maturity in relation to water availability and some climatic conditions. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 1963-1976.
28. Gagne, S.; Saucier, C.; Geny, L. Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9465-9471.
29. Fournand, D.; Vicens, A.; Sidhoum, L.; Souquet, J.; Moutounet, M.; Cheynier, V. Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7331-7338.
30. Possner, D.R.E.; Kliever, W.M. The Localization of Acids, Sugars, Potassium and Calcium in Developing Grape Berries. *Vitis* **1985**, *24*, 229-240.
31. Jakson, R.S. Grapevine structure and function, In *Wine science*, 3rd ed.; Elsevier: 2008; pp. 50-107.
32. Bordiga, M.; Travaglia, F.; Locatelli, M.; Coisson, J.D.; Arlorio, M. Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chem.* **2011**, *127*, 180-187.
33. Nunez, V.; Gomez-Cordoves, C.; Bartolome, B.; Hong, Y.J.; Mitchell, A.E. Non-galloylated and galloylated proanthocyanidin oligomers in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 915-921.
34. Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E.M.; Escribano-Bailón, M.T. Comparative Flavan-3-ol Composition of Seeds from Different Grape Varieties. *Food Chem.* **1995**, *53*, 197-201.
35. Cadot, Y.; Minana-Castello, M.T.; Chevalier, M. Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. cabernet franc during fruit development. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9206-9215.
36. Thorngate, J.H.; Singleton, V.L. Localization of Procyanidins in Grape Seeds. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, *45*, 259-262.
37. Khanbabaee, K.; van Ree, T. Tannins: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 641-649.
38. Fregoni, M.; Fregoni, C.; Ferrarini, R.; Spagnolli, F. Composizione della bacca e chimica della maturazione, In *Chimica viticolo-enologica: con elementi di genetica e genomica della vite*, 2nd ed.; Reda Edizioni: Torino, Italy, 2008; pp. 38-55.
39. Iacobucci, G.A.; Sweeny, J.G. The Chemistry of Anthocyanins, Anthocyanidins and Related Flavylum Salts. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 3005-3038.

40. He, F.; Liang, N.N.; Mu, L.; Pan, Q.H.; Wang, J.; Reeves, M.J.; Duan, C.Q. Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules* **2012**, *17*, 1571-1601.
41. He, F.; Liang, N.N.; Mu, L.; Pan, Q.H.; Wang, J.; Reeves, M.J.; Duan, C.Q. Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules* **2012**, *17*, 1483-1519.
42. Ferrandino, A.; Carra, A.; Rolle, L.; Schneider, A.; Schubert, A. Profiling of Hydroxycinnamoyl Tartrates and Acylated Anthocyanins in the Skin of 34 *Vitis vinifera* Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 4931-4945.
43. Adams, D.O. Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 249-256.
44. Kennedy, J.A.; Troup, G.J.; Pilbrow, J.R.; Hutton, D.R.; Hewitt, D.; Hunter, C.R.; Ristic, R.; Iland, P.G.; Jones, G.P. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 244-254.
45. Downey, M.O.; Dokoozlian, N.K.; Krstic, M.P. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 257-268.
46. Makris, D.P.; Kallithraka, S.; Kefalas, P. Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *J. Food Comp. Anal.* **2006**, *19*, 396-404.
47. Athar, M.; Back, J.H.; Tang, X.; Kim, K.H.; Kopelovich, L.; Bickers, D.R.; Kim, A.L. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *224*, 274-283.
48. Savouret, J.F.; Quesne, M. Resveratrol and cancer: a review. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56*, 84-87.
49. Opie, L.H.; Lecour, S. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. *Eur. Heart J.* **2007**, *28*, 1683-1693.
50. Sun, B.; Ribes, A.M.; Leandro, M.C.; Belchior, A.P.; Spranger, M.I. Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 382-390.
51. Hidalgo Togados, J. Morfología, maduración y composición del racimo, In *Tratado de Enología*, 2nd ed.; MundiPrensa: Madrid, Spain, 2011; Vol.I pp. 57-221.
52. Moreno, J.J.; Peinado, R.A. Azúcares del mosto, In *Química Enológica*, 1st ed.; Mundi Prensa: Madrid, España, 2010; pp. 117-132.
53. Moreno, J.J.; Peinado, R.A. Ácidos de la uva, In *Química Enológica*, 1st ed.; Mundi Prensa: Madrid, Spain, 2010; pp. 147-162.
54. Barnavon, L.; Doco, T.; Terrier, N.; Ageorges, A.; Romieu, C.; Pellerin, P. Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 693-701.
55. Nunan, K.J.; Sims, I.M.; Bacic, A.; Robinson, S.P.; Fincher, G.B. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiol.* **1998**, *118*, 783-792.
56. Deytieu-Belleau, C.; Vallet, A.; Doneche, B.; Geny, L. Pectin methylesterase and polygalacturonase in the developing grape skin. *Plant. Physiol. Bioch.* **2008**, *46*, 638-646.
57. Cabanne, C.; Doneche, B. Changes in polygalacturonase activity and calcium content during ripening of grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 331-335.
58. Huang, X.M.; Huang, H.B.; Wang, H.C. Cell walls of loosening skin in post-veraison grape berries lose structural polysaccharides and calcium while accumulate structural proteins. *Sci. Horticulture* **2005**, *104*, 249-263.

59. Barnavon, L.; Doco, T.; Terrier, N.; Ageorges, A.; Romieu, C.; Pellerin, P. Analysis of cell wall neutral sugar composition, beta-galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant. Physiol Bioch.* **2000**, *38*, 289-300.
60. Downey, M.O.; Harvey, J.S.; Robinson, S.P. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2003**, *9*, 15-27.
61. Cerpa-Calderon, F.K.; Kennedy, J.A. Berry integrity and extraction of skin and seed proanthocyanidins during red wine fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9006-9014.
62. Hernandez-Jimenez, A.; Gomez-Plaza, E.; Martinez-Cutillas, A.; Kennedy, J.A. Grape Skin and Seed Proanthocyanidins from Monastrell x Syrah Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10798-10803.
63. Harbertson, J.F.; Kennedy, J.A.; Adams, D.O. Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 54-59.
64. Hanlin, R.L.; Downey, M.O. Condensed Tannin Accumulation and Composition in Skin of Shiraz and Cabernet Sauvignon Grapes during Berry Development. *Am. J. Enol. Vitic.* **2009**, *60*, 13-23.
65. Kennedy, J.A.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E.J.; Jones, G.P. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5348-5355.
66. Ryan, J.M.; Revilla, E. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3372-3378.
67. Fernandezlopez, J.A.; Hidalgo, V.; Almela, L.; Roca, J.M.L. Quantitative Changes in Anthocyanin Pigments of *Vitis-Vinifera* Cv Monastrell during Maturation. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, *58*, 153-155.
68. Romeyer, F.M.; Macheix, J.J.; Goiffon, J.P.; Reminiac, C.C.; Sapis, J.C. The Browning Capacity of Grapes .3. Changes and Importance of Hydroxycinnamic Acid Tartaric Acid-Esters during Development and Maturation of the Fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 346-349.
69. Kennedy, J.A.; Matthews, M.A.; Waterhouse, A.L. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 268-274.
70. Thomas Matus, J.; Loyola, R.; Vega, A.; Pena-Neira, A.; Bordeu, E.; Arce-Johnson, P.; Antonio Alcalde, J. Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 853-867.
71. Ristic, R.; Downey, M.O.; Iland, P.G.; Bindon, K.; Francis, I.L.; Herderich, M.; Robinson, S.P. Exclusion of sunlight from Shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2007**, *13*, 53-65.
72. Kennedy, J.A.; Matthews, M.A.; Waterhouse, A.L. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 77-85.
73. Liu, Y.; Pan, Q.; Yan, G.; He, J.; Duan, C. Changes of Flavan-3-ols with Different Degrees of Polymerization in Seeds of 'Shiraz', 'Cabernet Sauvignon' and 'Marselan' Grapes after Veraison. *Molecules* **2010**, *15*, 7763-7774.
74. Bautista-Ortin, A.B.; Rodriguez-Rodriguez, P.; Gil-Munoz, R.; Jimenez-Pascual, E.; Busse-Valverde, N.; Martinez-Cutillas, A.; Lopez-Roca, J.M.; Gomez-Plaza, E. Influence of berry ripeness on concentration, qualitative composition and extractability of grape seed tannins. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2012**, *18*, 123-130.
75. Hidalgo Fernández-Cano, L.; Hidalgo Togores, J. Factores de la producción vitícola. El clima, In *Tratado de viticultura*; Mundi-Prensa: Madrid, España, 2011; Vol.I pp. 291-387.
76. Jackson, D.I.; Lombard, P.B. Environmental and Management-Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality - a Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 409-430.
77. Chapman, D.M.; Matthews, M.A.; Guinard, J.X. Sensory attributes of cabernet sauvignon wines made from vines with different crop yields. *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, *55*, 325-334.
78. Nuzzo, V.; Matthews, M.A. Response of fruit growth and ripening to crop level in dry-farmed Cabernet Sauvignon on four rootstocks. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 314-324.

79. Howell, G.S. Sustainable grape productivity and the growth-yield relationship: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 165-174.
80. Petrie, P.R.; Trought, M.C.T.; Howell, G.S. Fruit composition and ripening of Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) in relation to leaf area. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 46-51.
81. Lee, J.; Skinkis, P.A. Oregon 'Pinot noir' grape anthocyanin enhancement by early leaf removal. *Food Chem.* **2013**, *139*, 893-901.
82. Holt, H.E.; Francis, I.L.; Field, J.; Herderich, M.J.; Iland, P.G. Relationships between berry size, berry phenolic composition and wine quality scores for Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) from different pruning treatments and different vintages. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2008**, *14*, 191-202.
83. Ough, C.S.; Nagaoka, R. Effect of Cluster Thinning and Vineyard Yields on Grape and Wine Composition and Wine Quality of Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* **1984**, *35*, 30-34.
84. Sun, Q.; Sacks, G.L.; Lerch, S.D.; Vanden Heuvel, J.E. Impact of Shoot and Cluster Thinning on Yield, Fruit Composition, and Wine Quality of Corot noir. *Am. J. Enol. Vitic.* **2012**, *63*, 49-56.
85. Gatti, M.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Poni, S. Effects of cluster thinning and preflowering leaf removal on growth and grape composition in cv. Sangiovese. *Am. J. Enol. Vitic.* **2012**, *63*, 325-332.
86. Matthews, M.A.; Anderson, M.M. Fruit Ripening in *Vitis-Vinifera* L - Responses to Seasonal Water Deficits. *Am. J. Enol. Vitic.* **1988**, *39*, 313-320.
87. Barnett, T.; Zwiers, F.; Hegerl, G.; Allen, M.; Crowley, T.; Gillett, N.; Hasselmann, K.; Jones, P.; Santer, B.; Schnur, R.; Scott, P.; Taylor, K.; Tett, S.; Int Ad Hoc Detention Attribution Detecting and attributing external influences on the climate system: A review of recent advances. *J. Clim.* **2005**, *18*, 1291-1314.
88. Mears, C.A.; Wentz, F.J. The effect of diurnal correction on satellite-derived lower tropospheric temperature. *Science* **2005**, *309*, 1548-1551.
89. Jones, G.V.; White, M.A.; Cooper, O.R.; Storchmann, K. Climate change and global wine quality. *Clim. Change* **2005**, *73*, 319-343.
90. Kenny, G.J.; Harrison, P.A. The effects of climate variability and change on grape suitability in Europe. *J. Wine Res.* **1992**, *3*, 163-183.
91. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. Phenolic Compounds, In *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, 2nd ed.; Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D., Eds.; John Wiley and Sons, LTD: Chinchester, UK, 2006; Vol.2 pp. 141-203.
92. Zamora, F. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. AMV & Mundi-Prensa: Madrid, 2003; pp. 225.
93. Bindon, K.A.; Smith, P.A.; Holt, H.; Kennedy, J.A. Interaction between Grape-Derived Proanthocyanidins and Cell Wall Material. 2. Implications for Vinification. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10736-10746.
94. Geny, L.; Saucier, C.; Bracco, S.; Daviaud, F.; Glories, Y. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 8051-8054.
95. Canals, R.; Llaudy, M.C.; Valls, J.; Canals, J.M.; Zamora, F. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4019-4025.
96. Gonzalez-Manzano, S.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 283-289.
97. Kelebek, H.; Canbas, A.; Selli, S.; Saucier, C.; Jourdes, M.; Glories, Y. Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs. Bogazkere and Okuzgozu. *J. Food Eng.* **2006**, *77*, 1012-1017.

98. Morata, A.; Gomez-Cordoves, M.C.; Suberviola, J.; Bartolome, B.; Colomo, B.; Suarez, J.A. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4084-4088.
99. Garcia-Beneytez, E.; Revilla, E.; Cabello, F. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *215*, 32-37.
100. Revilla, E.; Garcia-Beneytez, E.; Cabello, F.; Martin-Ortega, G.; Ryan, J.M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr. A* **2001**, *915*, 53-60.
101. Guidoni, S.; Hunter, J.J. Anthocyanin profile in berry skins and fermenting must/wine, as affected by grape ripeness level of *Vitis vinifera* cv. Shiraz/R99. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, *235*, 397-408.
102. Ortega-Regules, A.; Romero-Cascales, I.; Ros-Garcia, J.M.; Lopez-Roca, J.M.; Gomez-Plaza, E. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 26-32.
103. Rio Segade, S.; Giacosa, S.; Gerbi, V.; Rolle, L. Berry skin thickness as main texture parameter to predict anthocyanin extractability in winegrapes. *LWT - Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 392-398.
104. Morel-Salmi, C.; Souquet, J.M.; Bes, M.; Cheynier, V. Effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4270-4276.
105. Castillo-Munoz, N.; Gomez-Alonso, S.; Garcia-Romero, E.; Hermosin-Gutierrez, I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 992-1002.
106. Le Bourvellec, C.; Guyot, S.; Renard, C.M.G.C. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2004**, *1672*, 192-202.
107. Le Bourvellec, C.; Bouchet, B.; Renard, C.M.G.C. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2005**, *1725*, 10-18.
108. Romero-Cascales, I.; Ignacio Fernandez-Fernandez, J.; Maria Ros-Garcia, J.; Maria Lopez-Roca, J.; Gomez-Plaza, E. Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2008**, *43*, 1295-1305.
109. Guadalupe, Z.; Palacios, A.; Ayestaran, B. Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4854-4862.
110. Romero-Cascales, I.; Ros-Garcia, J.M.; Lopez-Roca, J.M.; Gomez-Plaza, E. The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. *Food Chem.* **2012**, *130*, 626-631.
111. Revilla, I.; Gonzalez-SanJose, M.L. Compositional changes during the storage of red, wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivative levels. *Food Chem.* **2003**, *80*, 205-214.
112. Busse-Valverde, N.; Gomez-Plaza, E.; Lopez-Roca, J.M.; Gil-Munoz, R.; Bautista-Ortin, A.B. The Extraction of Anthocyanins and Proanthocyanidins from Grapes to Wine during Fermentative Maceration Is Affected by the Enological Technique. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5450-5455.
113. Ayestaran, B.; Guadalupe, Z.; Leon, D. Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 29-39.
114. Doco, T.; Williams, P.; Cheynier, V. Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6643-6649.
115. Sacchi, K.L.; Bisson, L.F.; Adams, D.O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 197-206.

116. Yokotsuka, K.; Sato, M.; Ueno, N.; Singleton, V.L. Colour and Sensory Characteristics of Merlot Red Wines Caused by Prolonged Pomace Contact. *J. Wine Res.* **2000**, *11*, 7-18.
117. Gomez-Plaza, E.; Gil-Munoz, R.; Lopez-Roca, J.M.; Martinez-Cutillas, A.; Fernandez-Fernandez, J.I. Phenolic compounds and color stability of red wines: Effect of skin maceration time. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 266-270.
118. Scudamore-Smith, P.D.; Hooper, R.L.; McLaran, E.D. Color and Phenolic Changes of Cabernet Sauvignon Wine Made by Simultaneous Yeast/Bacterial Fermentation and Extended Pomace Contact. *Am. J. Enol. Vitic* **1990**, *41*, 57-67.
119. Heredia, F.J.; Escudero-Gilete, M.L.; Hernanz, D.; Gordillo, B.; Melendez-Martinez, A.J.; Vicario, I.M.; Gonzalez-Miret, M.L. Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. *Food Chem.* **2010**, *118*, 377-383.
120. Puertas, B.; Guerrero, R.F.; Jurado, M.S.; Jimenez, M.J.; Cantos-Villar, E. Evaluation of Alternative Winemaking Processes for Red Wine Color Enhancement. *Food Sci. Technol. Int.* **2008**, *14*, 21-27.
121. Ough, C.S.; Amerine, M.A. Studies on controlled fermentation. V. Effects on color, composition, and quality of red wines. *Am. J. Enol. Vitic* **1961**, *12*, 9-19.
122. Amrani Joutei, K.; Glories, Y. Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Rev. Fran. Oenol.* **1995**, *35*, 28-31.
123. Singleton, V.L. Effects on Red Wine Quality of Removing Juice before Fermentation to Simulate Variation in Berry Size. *Am. J. Enol. Vitic.* **1972**, *23*, 106-8.
124. Bautista-Ortin, A.B.; Fernandez-Fernandez, J.I.; Lopez-Roca, J.M.; Gomez-Plaza, E. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *J. Food Comp. Anal.* **2007**, *20*, 546-552.
125. Zamora, F.; Luengo, G.; Margalef, P.; Magrina, M.; Arola, L. Effect of drawing off on color and phenolic-compounds composition of red wine. *Rev. Esp. Cien. Tec. Ali.* **1994**, *34*, 663-671.
126. Bosso, A.; Panero, L.; Petrozziello, M.; Follis, R.; Motta, S.; Guaita, M. Influence of Submerged-Cap Vinification on Polyphenolic Composition and Volatile Compounds of Barbera Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2011**, *62*, 503-511.
127. Hidalgo Togores, J. Elaboración de vinos tintos y claretes, In *Tratado de enología*, 2nd ed.; MundiPrensa: Madrid, Spain, 2011; Vol.I pp. 879-975.
128. Fischer, U.; Strasser, M.; Gutzler, K. Impact of fermentation technology on the phenolic and volatile composition of German red wines. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2000**, *35*, 81-94.
129. Baiano, A.; Terracone, C.; Gambacorta, G.; La Notte, E. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Primitivo Wine: Comparison among Winemaking Technologies. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, C258-C267.
130. Caridi, A.; Cufari, A.; Lovino, R.; Palumbo, R.; Tedesco, I. Influence of yeast on polyphenol composition of wine. *Food Technol. Biotech.* **2004**, *42*, 37-40.
131. Bautista-Ortin, A.B.; Romero-Cascales, I.; Fernandez-Fernandez, J.I.; Lopez-Roca, J.M.; Gomez-Plaza, E. Influence of the yeast strain on Monastrell wine colour. *Innov. Food Sci. Emerg.* **2007**, *8*, 322-328.
132. Monagas, M.; Gomez-Cordoves, C.; Bartolome, B. Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and colour characteristics of wines. *Food Chem.* **2007**, *104*, 814-823.
133. Guadalupe, Z.; Ayestaran, B. Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of Tempranillo red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10720-10728.
134. Vidal, S.; Doco, T.; Moutounet, M.; Pellerin, P. Soluble polysaccharide content at initial time of experimental must preparation. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 115-121.
135. Dietrich, H.; Schmitt, H.; Wucherpfenning, K. The alteration of the colloids of must and wine during winemaking II. Change of the charge and the molecular weight distribution of the polysaccharides. *Vitic. Enol. Sci.* **1992**, *47*, 87-95.

136. Doco, T.; Brillouet, J.M.; Moutounet, M. Evolution of grape (Carignan noir cv) and yeast polysaccharides during fermentation and post-maceration. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, *47*, 108-110.
137. Aguilar-Uscanga, B.; Francois, J.M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* **2003**, *37*, 268-274.
138. Klis, F.M.; Boorsma, A.; De Groot, P.W.J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2006**, *23*, 185-202.
139. Vernhet, A.; Pellerin, P.; Prieur, C.; Osmianski, J.; Moutounet, M. Charge properties of some grape and wine polysaccharide and polyphenolic fractions. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, *47*, 25-30.
140. Escot, S.; Feuillat, M.; Dulau, L.; Charpentier, C. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2001**, *7*, 153-159.
141. González-Royo, E.; Urtasun, A.; Gil, M.; Kontoudakis, N.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J.M.; Zamora, F. Effect of yeast strain and supplementation with inactive yeast during alcoholic fermentation on wine polysaccharides. *Am. J. Enol. Vitic.* **2013**, *64*, 268-273.
142. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubordieu, D. *Handbook of Enology: The chemistry of wine stabilization and treatments*. John Wiley and Sons, Ltd: Chinchester, UK, 2006; Vol. 2, pp. 441.
143. Moreno Vigar, J.J.; Peinado Amores, R.A. *Química enológica*. Mundi-Prensa and AMV Ediciones: Madrid, Spain, 2010; pp. 511.
144. Jackson, R.S. Chemical constituents of grapes and wines, In *Wine science: principles, practice, perception*, 3rd ed.; Academic Press: Dan Diego, EUA., 2008; pp. 270-331.
145. Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 67-87.
146. Berke, B.; de Freitas, V.A.P. Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin. *Food Chem.* **2005**, *90*, 453-460.
147. Hermosin Gutierrez, I. Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a cencibel young red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4079-83.
148. EscribanoBailon, T.; Dangles, O.; Brouillard, R. Coupling reactions between flavylum ions and catechin. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1583-1592.
149. Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailon, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Identification of dimeric anthocyanins and new oligomeric pigments in red wine by means of HPLC-DAD-ESI/MSn. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 735-748.
150. Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailon, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing - A comprehensive study. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 238-254.
151. Jurd, L. Review of Polyphenol Condensation Reactions and their Possible Occurrence in Aging of Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1969**, *20*, 191-195.
152. Salas, E.; Fulcrand, H.; Meudec, E.; Cheynier, V. Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7951-7961.
153. Mateus, N.; Oliveira, J.; Pissarra, J.; Gonzalez-Paramas, A.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C.; Silva, A.M.S.; de Freitas, V. A new vinylpyranoanthocyanin pigment occurring in aged red wine. *Food Chem.* **2006**, *97*, 689-695.
154. Fulcrand, H.; Duenas, M.; Salas, E.; Cheynier, V. Phenolic reactions during winemaking and aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 289-297.
155. Rentzsch, W.; Schwarz, M.; Winterhalter, P. Pyranoanthocyanins - an overview on structures, occurrence, and pathways of formation. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, 526-534.
156. de Freitas, V.; Mateus, N. Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 1463-1473.

157. Morata, A.; Gomez-Cordoves, M.C.; Calderon, F.; Suarez, J.A. Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *106*, 123-129.
158. Morata, A.; Gonzalez, C.; Suarez-Lepe, J.A. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *116*, 144-152.
159. Preys, S.; Mazerolles, G.; Courcoux, P.; Samson, A.; Fischer, U.; Hanafi, M.; Bertrand, D.; Cheynier, V. Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 126-136.
160. Sáenz-Navajas, M.; Ferreira, V.; Dzy, M.; Fernández-Zurbano, P. Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *673*, 151-159.
161. Saenz-Navajas, M.; Avizcuri, J.; Ferreira, V.; Fernandez-Zurbano, P. Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chem.* **2012**, *134*, 1484-1493.
162. Robichaud, J.L.; Noble, A.C. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *J. Sci. Food Agric.* **1990**, *53*, 343-353.
163. Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A.C. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 1123-1128.
164. Lesschaeve, I.; Noble, A.C. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 330S-335S.
165. Fontoin, H.; Saucier, C.; Teissedre, P.; Glories, Y. Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Qual. Prefer.* **2008**, *19*, 286-291.
166. Thorngate, J.H. The physiology of human sensory response to wine: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, *48*, 271-279.
167. Gawel, R. Red wine astringency: A review. *Austr. J. Grape Wine Res.* **1998**, *4*, 73-95.
168. Soares, S.; Sousa, A.; Mateus, N.; de Freitas, V. Effect of Condensed Tannins Addition on the Astringency of Red Wines. *Chem. Senses* **2012**, *37*, 191-198.
169. Lee, C.A.; Ismail, B.; Vickers, Z.M. The Role of Salivary Proteins in the Mechanism of Astringency. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, C381-C387.
170. Golebiowski, J.; Fiorucci, S.; Adrian-Scotto, M.; Fernandez-Carmona, J.; Antonczak, S. Molecular Features Underlying the Perception of Astringency as Probed by Molecular Modeling. *Mol. Inf.* **2011**, *30*, 410-414.
171. Thorngate, J.H.; Noble, A.C. Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R(-)-Epicatechin and 3S(+)-Catechin. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *67*, 531-535.
172. De Freitas, V.; Mateus, N. Structural Features of Procyandin Interactions with Salivary Proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 940-945.
173. Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E.J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 564-573.
174. Sun, B.; de Sa, M.; Leandro, C.; Caldeira, I.; Duarte, F.L.; Spranger, I. Reactivity of Polymeric Proanthocyanidins toward Salivary Proteins and Their Contribution to Young Red Wine Astringency. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 939-946.
175. Rinaldi, A.; Gambuti, A.; Moio, L. Precipitation of Salivary Proteins After the Interaction with Wine: The Effect of Ethanol, pH, Fructose, and Mannoproteins. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, C485-C490.

176. Obreque-Slier, E.; Pena-Neira, A.; Lopez-Solis, R. Interactions of enological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are affected by pH. *LWT - Food Sci. Technol.* **2012**, *45*, 88-93.
177. Vidal, S.; Cartalade, D.; Souquet, J.M.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2261-2266.
178. Haslam, E. In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2577-2582.
179. Drinkine, J.; Lopes, P.; Kennedy, J.A.; Teissedre, P.; Saucier, C. Ethylidene-bridged flavan-3-ols in red wine and correlation with wine age. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6292-6299.
180. Fulcrand, H.; Doco, T.; EsSafi, N.E.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography ion spray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1996**, *752*, 85-91.
181. Guyot, S.; Vercauteren, J.; Cheynier, V. Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1279-1288.
182. Oliveira, C.M.; Silva Ferreira, A.C.; De Freitas, V.; Silva, A.M.S. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1115-1126.
183. Vernhet, A.; Pellerin, P.; Belleville, M.-.; Planque, J.; Moutounet, M. Relative impact of major wine polysaccharides on the performances of an organic microfiltration membrane. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 51-56.
184. Vernhet, A.; Moutounet, M. Fouling of organic microfiltration membranes by wine constituents: importance, relative impact of wine polysaccharides and polyphenols and incidence of membrane properties. *J. Membr. Sci.* **2002**, *201*, 103-122.
185. Gonçalves, F.; Fernandes, C.; De Pinho, M.N. White wine clarification by micro/ultrafiltration: Effect of removed colloids in tartaric stability. *Sep. Purif. Technol.* **2001**, *22-23*, 423-429.
186. McKinnon, A.J.; Williams, P.J.; Scollary, G.R. Influence of uronic acids on the spontaneous precipitation of calcium L-(+)-tartrate in a model wine solution. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1382-1386.
187. Caridi, A. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **2006**, *89*, 417-422.
188. Waters, E.J.; Pellerin, P.; Brillouet, J.M. A wine arabinogalactan-protein that reduces heat-induced wine protein haze. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 43-48.
189. Waters, E.J.; Pellerin, P.; Brillouet, J.-. A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydr. Polym.* **1994**, *23*, 185-191.
190. Williams, P.J. Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 724-730.
191. Dupin, I.V.S.; McKinnon, B.M.; Ryan, C.; Boulay, M.; Markides, A.J.; Jones, G.P.; Williams, P.J.; Waters, E.J. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: Their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3098-3105.
192. Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T.; Moutounet, M. Aggregation of grape seed tannins in model wine - Effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids* **2002**, *16*, 17-23.
193. Poncet-Legrand, C.; Doco, T.; Williams, P.; Vernhet, A. Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: Effect of polysaccharide molecular weight. *Am. J. Enol. Vitic.* **2007**, *58*, 87-91.
194. De Freitas, V.; Carvalho, E.; Mateus, N. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chem.* **2003**, *81*, 503-509.

195. Soares, S.I.; Goncalves, R.M.; Fernandes, I.; Mateus, N.; de Freitas, V. Mechanistic Approach by Which Polysaccharides Inhibit alpha-Amylase/Procyanidin Aggregation. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4352-4358.
196. Dufour, C.; Bayonove, C.L. Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 671-677.
197. Pozo-Bayon, M.A.; Andujar-Ortiz, I.; Alcaide-Hidalgo, J.M.; Martin-Alvarez, P.J.; Moreno-Arribas, M.V. Characterization of Commercial Inactive Dry Yeast Preparations for Enological Use Based on Their Ability To Release Soluble Compounds and Their Behavior toward Aroma Compounds in Model Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10784-10792.
198. Chalier, P.; Angot, B.; Delteil, D.; Doco, T.; Gunata, Z. Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem.* **2007**, *100*, 22-30.
199. Aguirre, M.J.; Isaacs, M.; Matsuhira, B.; Mendoza, L.; Zuniga, E.A. Characterization of a neutral polysaccharide with antioxidant capacity from red wine. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 1095-1101.
200. Tahiri, M.; Pellerin, P.; Tressol, J.C.; Doco, T.; Pepin, D.; Rayssiguier, Y.; Coudray, C. The rhamnogalacturonan-II dimer decreases intestinal absorption and tissue accumulation of lead in rats. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 249-253.
201. Pellerin, P.; O'Neill, M.A. The interaction of the pectic polysaccharide Rhamnogalacturonan II with heavy metals and lanthanides in wines and fruit juices. *Analysis* **1998**, *26*, M32-M36.
202. Zamora, F. La química del color del vino. *SEBBM* **2013**, *76*, 18-22.
203. Coombe, B.G. Distribution of Solutes within the Developing Grape Berry in Relation to its Morphology. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, *38*, 120-127.
204. Vincken, J.P.; Schols, H.A.; Oomen, R.J.F.J.; McCann, M.C.; Ulvskov, P.; Voragen, A.G.J.; Visser, R.G.F. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 1781-1789.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

Para la elaboración de esta tesis doctoral se planteó la siguiente **hipótesis**:

“La madurez de la uva condiciona severamente la composición química del vino tinto, lo que sin duda tiene consecuencias en sus atributos sensoriales. A pesar de ello, mediante ciertas prácticas vitivinícolas, se puede incidir positivamente en la composición química del vino, ya sea a través de acciones que influyan en el proceso de maduración o bien paliando en bodega las consecuencias de una madurez inadecuada.”

Con el fin de confirmar la hipótesis, se plantearon los siguientes **objetivos**:

1. Caracterizar la composición química de vinos tintos elaborados a partir de uvas con distinto nivel de madurez.
2. Evaluar la incidencia del tiempo de maceración en uvas de distinta madurez fenólica sobre la composición química de los vinos tintos.
3. Evaluar el impacto sobre la composición química del vino tinto de dos técnicas vitícolas, aclareo de racimos y aclareo de bayas, para reducir el rendimiento de vides con un vigor excesivo.
4. Evaluar el impacto sobre la composición del vino de la desalcoholización parcial mediante osmosis inversa de vinos tintos procedentes de uvas con una madurez fenólica adecuada pero con un exceso de graduación.
5. Evaluar la influencia del tamaño de la baya sobre la composición química del vino tinto.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

3. RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

CAPÍTULO I. Impacto de la madurez de la uva y del tiempo de maceración sobre la composición química del vino tinto

Para la elaboración de los vinos tintos que hoy en día demanda el mercado, es necesaria la correcta madurez de la uva, ya que de esta depende la composición química del vino y sus atributos sensoriales. Por otro lado, el tiempo de maceración es la herramienta más accesible para el enólogo para modular los atributos del vino, puesto que el momento de descube es su decisión. Es bien sabido en el sector que las maceraciones cortas son las más adecuadas para uva verde (para evitar obtener vinos excesivamente herbáceos y con una tanicidad agresiva), mientras que las maceraciones largas se pueden realizar con uvas bien maduras (con el fin de obtener vinos tintos con buenos atributos de cuerpo, estructura y color). Debido a esto, se consideró evaluar

conjuntamente el impacto de la madurez y el tiempo de maceración sobre la composición química del vino tinto.

En este capítulo se abordan los objetivos 1 y 2 descritos anteriormente. En el primer objetivo, se planteó caracterizar químicamente los vinos elaborados con uvas de distinto nivel de madurez, y para ello se vinificaron uvas de tempranillo y cabernet sauvignon recolectadas en tres fechas distintas. Para cada nivel de madurez, se elaboraron cuatro vinos tintos con cuatro períodos distintos de maceración (de una a cuatro semanas), con el fin de evaluar el impacto del tiempo de maceración sobre la composición química de vinos tintos elaborados a partir de uvas con distintos niveles de madurez fenólica.

Este capítulo se divide en dos apartados: El primero corresponde a las analíticas de los vinos elaborados, realizadas en el laboratorio del grupo de *tecnología enológica* (TECNENOL) del Departamento de Bioquímica i Biotecnología de la Universitat Rovira i Virgili (URV, Tarragona); resultados publicados en la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* en el artículo titulado **“Influence of Grape Maturity and Maceration Length on Color, Polyphenolic Composition, and Polysaccharide Content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Wines”**. El segundo apartado corresponde a un análisis con mayor profundidad de la composición en polisacáridos de los vinos elaborados con la variedad cabernet sauvignon, análisis realizados en el laboratorio del grupo de *metabolismo, genética y biotecnología de levaduras enológicas* (MICROWINE) del Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV, Logroño).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

Influence of Grape Maturity and Maceration Length on Color, Polyphenolic Composition, and Polysaccharide Content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Wines

Mariona Gil, Nikolaos Kontoudakis, Elena González, Mireia Esteruelas, Francesca Fort, Joan Miquel Canals, and Fernando Zamora

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Grup de Recerca en Tecnologia Enològica (Tecnol), Universitat Rovira i Virgili, Campus de Sescelades, C/Marcel·li Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

Received: May 15, 2012

Revised: July 23, 2012

Accepted: July 24, 2012

Published: July 24, 2012

ABSTRACT: The aim of this paper was to study how maturity and maceration length affect color, phenolic compounds, polysaccharides, and sensorial quality of Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines at three stages of grape ripening. Ripeness increased color extractability, phenolic compounds, and polysaccharide concentrations. Moreover, the proanthocyanidin mean degree of polymerization (mDP) and the percentage of prodelphinidins also increased with maturity, whereas the percentage of galloylation decreased. In general, wines from riper grapes contain higher proportions of skin proanthocyanidins. Color and anthocyanin concentration decreased when the maceration was longer, whereas polysaccharide and proanthocyanidin concentrations did the opposite. It was also detected that the mDP and the percentage of prodelphinidins decreased when the maceration was extended, whereas the percentage of galloylation increased. These data seem to indicate that proanthocyanidin extraction from seeds is clearly increased throughout the maceration time.

KEYWORDS: wine, grape maturity, maceration length, color, phenolic compounds, polysaccharides

INTRODUCTION

Phenolic compounds are generally considered to be major determinants of the quality of red wines. Most of the main sensory attributes such as color, body, mouthfeel, bitterness, and astringency are directly associated with the composition of wine in anthocyanins, proanthocyanidins, and other phenolic compounds.^{1–3} Other compounds such as polysaccharides have also been associated with texture sensations, and it has been proposed that their presence can smooth wine bitterness and astringency.^{4,5}

During winemaking, anthocyanins are released from grape skins, whereas proanthocyanidins, also known as condensed tannins, are released from both skins and seeds.^{6,7} The composition of proanthocyanidins depends on their origin. Thus, seed proanthocyanidins are made up of (+)-catechin, (–)-epicatechin, and (–)-epicatechin-3-gallate,⁸ whereas skin proanthocyanidins also contain (–)-epigallocatechin and have a much lower proportion of (–)-epicatechin-3-gallate.^{9,10} Therefore, skins release procyanidins and prodelphinidins, whereas seeds only release procyanidins with a higher proportion of galloylation.

On the other hand, the mean degree of polymerization (mDP) of seed proanthocyanidins is lower than that of skin proanthocyanidins.¹¹ It has been reported that molecular sizes, and especially the monomeric composition of proanthocyanidins, have a considerable influence on the perception of astringency.¹² More specifically, a greater degree of polymerization and a greater percentage of galloylation cause a greater sensation of astringency.^{1,12,13}

Polysaccharides are components of cell walls that cover and protect the plasma membrane of plant cells (grape berries)¹⁴ and the microorganisms involved in the winemaking process (yeasts and lactic acid bacteria).^{15,16} Moreover, fungal grape diseases can increase the polysaccharide content of wine, which can cause technological problems.¹⁷ Furthermore, the use of such enological additives as arabic gum or carboxymethylcellulose can also alter the composition of wine polysaccharides.¹⁸

Hence, wine polysaccharides can be classified on the basis of their origin in grape polysaccharides, microbial polysaccharides, or additive polysaccharides. There are several types of grape polysaccharides, but many of them are enzymatically degraded or precipitated during alcoholic fermentation, so wine contains appreciable amounts of only arabinogalactan proteins (AGP) and type II rhamnogalacturonans (RG-II).^{19,20} The other major source of wine polysaccharides is yeasts, which can release significant amounts of mannoproteins (MP).²¹

It is generally considered that grape ripeness strongly influences the phenolic and polysaccharide composition of its respective red wines.^{22,23} The synthesis of anthocyanins starts during veraison and remains active throughout grape ripening,²⁴ which causes a gradual accumulation in the skins.²⁵ In contrast, proanthocyanidin concentration is highest at veraison and subsequently decreases until just

before complete ripeness, after which time it remains relatively constant.²⁶ Simultaneously, the mDP increases throughout ripening.^{26–28}

Moreover, the progressive enzymatic degradation of the walls of skin cells during ripening²⁹ augments the presence of soluble polysaccharides^{30,31} in the grape juice and also increases the extractability of phenolic compounds.^{32–34} By contrast, the extractability of proanthocyanidins from seeds behaves in quite the opposite fashion, probably because oxidation phenomena and gradual seed lignification³⁵ prevent them from dissolving. For this reason, it is generally considered that grapes that are not well ripened may produce more astringent wines because their seeds can release more proanthocyanidins, which are highly galloylated.

Grape maturity can also exert an indirect but non-negligible effect on polyphenol and polysaccharide solubilization. In particular, higher ethanol levels, usually present in wines from well-ripened grapes, seem to favor polyphenol extraction^{10,36} but diminish polysaccharide concentration by precipitation.²⁰

Nowadays, deeply colored and full-bodied red wines are highly valued by consumers. For this reason, winemakers try to produce this kind of wine, which is necessarily very tannic. Many techniques have been proposed to improve color and phenolic compound extraction such as the use of pectolytic enzymes,³⁷ cold prefermentative maceration,³⁸ thermovinification,³⁹ flash expansion,⁴⁰ and greater volume and frequency of pumping over and pigeage (punchdown) or delestage (rack and return).⁴¹ Nevertheless, the length of time the wine is in contact with skins and seeds is probably the main factor.^{7,42}

All of these procedures have proved to be useful for increasing the color and polyphenol concentration of wine, but they can sometimes extract an excess of proanthocyanidins, which makes the wine too astringent and bitter,⁴³ especially when grapes are not completely ripened.⁴⁴

Numerous studies have investigated the changes in anthocyanin,²⁴ proanthocyanidin,⁴⁵ and polysaccharide²³ composition during berry development and maturation. Other studies have focused on the extraction of these compounds into wine⁴⁶ with regard to maceration time.^{47,48} However, very few papers have simultaneously studied the influence of grape maturity and maceration length on the extractability of polyphenols^{7,36} and, to our knowledge, none have studied the extractability of polysaccharides.

The aim of this paper was to study how grape maturity and maceration length affect the color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Equipment. Methanol, acetonitrile, formic acid, and acetic acid were of HPLC grade and were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Acetaldehyde, phloroglucinol, ascorbic acid, sodium acetate, and ammonium formate were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Absolute ethanol and hydrochloric acid were purchased from Panreac. Malvidin-3-O-glucoside chloride ($\geq 95\%$), proanthocyanidin dimer B2 ($\geq 90\%$), (+)-catechin ($\geq 99\%$), (–)-epicatechin ($\geq 99\%$), (–)-epigallocatechin ($\geq 98\%$), and (–)-epicatechin-3-O-gallate ($\geq 97.5\%$) were purchased from Extrasynthese (Genay, France). A pullulan calibration kit Shodex P-82 (P-5, Mw = 5.9 kDa; P-10, Mw = 11.8 kDa; P-20, Mw = 22.8 kDa; P-50, Mw = 47.5 kDa; P-100, Mw = 112 kDa; P-200, Mw = 212 kDa; P-400, Mw = 404 kDa; P-800, Mw = 788 kDa) was obtained from Waters (Barcelona, Spain), whereas a pullulan 1.3 kDa and four dextrans BioChemika (12, 25, 50, and 80 kDa) were obtained from Fluka (St. Louis, MO, USA). The polysaccharides used as external standards for quantification were pectins from citrus fruit ($\geq 90\%$) and dextrans synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* ($\geq 99.9\%$) purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The HPLC analyses were performed using an Agilent 1200 series liquid chromatograph equipped with a G1362A refractive index detector (RID), a G1315D diode array detector (DAD), a G1311A quaternary pump, a G1316A column oven, and a G1329A autosampler (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). All of the Spectrophotometric measurements were performed using a Helios Alpha UV–vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Grapes and Wines. This study was carried out with grapes from two *Vitis vinifera* cultivars of the 2009 vintage: Tempranillo, from the experimental vineyard of the Oenology Faculty (Rovira i Virgili University) at Constantí (AOC Tarragona), and Cabernet Sauvignon, from the Juvé & Camps estates at Mediona (AOC Penedès). Both cultivars were harvested at three maturity levels (around 3, 5, and 7 weeks after veraison). Thirty-six microvinifications were carried out for each cultivar in an attempt to study the influence of grape maturity and maceration length on wine composition and quality. At each maturity level, 80 kg of grapes was harvested and carefully destemmed. Subsequently, the berries were randomly distributed in 12 groups of 6 kg each, crushed with a semiautomatic crusher (Gual, Villafranca del Penedès, Spain), sulfited (100 mg $K_2S_2O_5$ /kg), and placed in 8 L tanks equipped with a submerged cap system according to the winemaking method described by Sampaio et al.⁴⁹ All tanks were immediately inoculated with 200 mg/kg of selected yeast (EC1118, Lallemant Inc., Montreal, Canada) and maintained at a room temperature of 25 ± 1 °C. All of these microvinifications were controlled daily by measuring the temperature and the density of the juice. Two mechanical punchdowns of the cap were made around 1060 and 1020 density units to improve color extraction. After 1, 2, 3, and 4 weeks of maceration, the wines from three of the tanks were racked. Once alcoholic fermentation had completely finished, wines were sulfited (100 mg $K_2S_2O_5$ /L) and kept at 4 °C for 1 month for tartaric stabilization. Malolactic fermentation was inhibited to prevent any possible variations in the rhythm of this transformation that could affect each wine differently. Finally, wines were bottled and

stored in a dark cellar at 15 °C until analysis. The analyses started 2 months after bottling and were finished 3 weeks later.

Standard Grape Juice Analysis. The analytical methods recommended by the International Organization of Vine and Wine (OIV) were used to determine the sugar concentration and Titratable acidity of the grape juices.⁵⁰

Standard Wine Analysis. Ethanol content (% v/v) was analyzed with a FTIR spectrometer BACCHUS II (TDI, Gavà, Spain). pH values were determined by a pH-meter Basic-20 (CRISON, Barcelona, Spain). The total polyphenol index (TPI) was determined by measuring the 280 nm absorbance of a 1:100 dilution of wine with a spectrophotometer, using a 10 mm quartz cuvette and multiplying the absorbance value by 100 as described by Ribéreau-Gayon et al.⁴⁴ The total anthocyanin content was determined by spectrophotometry using the method described by Niketic-Aleksic et al.⁵¹

Color Parameters. Ten microliters of a 10% (v/v) acetaldehyde solution was added to 1 mL of wine sample 20 min before color measurement to avoid sulfite interferences. The color intensity (CI) was estimated using the method described by Glories.⁴⁴ The CIELAB coordinates, lightness (L*), chroma (C*), hue (h*), red-greenness (a*), and yellow-blueness (b*), were determined according to the method of Ayala et al.,⁵² and data processing was performed with MSCV software.⁵³

HPLC Anthocyanidin Analysis. Reversed-phase HPLC analyses of the anthocyanidins were carried out by injecting 40 µL of wine into an Agilent 1200 series liquid chromatograph (HPLC-DAD) and using an Agilent Zorbax Eclipse XDBC18, 4.6 × 250 mm, 5 µm column (Agilent Technologies). The solvents used were 10% aqueous formic acid (solvent A) and a mixture of 45% methanol, 45% water, and 10% formic acid (solvent B) in accordance with the method described by Valls.⁵⁴ Chromatograms were recorded at 530 nm, and anthocyanin standard curves were made using malvidin-3-*O*-glucoside chloride. Compounds were identified by recording their UV spectra with the diode array detector and comparing these with the UV spectra reported in the literature. The five anthocyanidin-3-monoglucosides of wine (delphinidin, cyanidin, peonidin, petunidin, and malvidin) and their respective acetylated and *p*-coumarylated anthocyanins were quantified.

Wine Proanthocyanidin Analysis. Acid-catalyzed depolymerization of proanthocyanidin in the presence of an excess of phloroglucinol was used to analyze the content of proanthocyanidins, their monomeric composition, and their mDP, as described by Kennedy and Jones.⁵⁵ A 10 mL sample of wine was evaporated under a low-pressure vacuum (Univapo 100 ECH, Uni Equip, Germany). Subsequently, it was resuspended in 6 mL of distilled water and then applied to Set Pak Plus C18 Environmental cartridges (Waters, Milford, MA, USA) that had previously been activated with 10 mL of methanol and 15 mL of water. The samples were washed with 15 mL of distilled water, and then the proanthocyanidins were eluted with 12 mL of methanol, immediately evaporated under a vacuum, and redissolved in 2 mL of methanol. Finally, 100 µL of this sample was reacted with a 100 µL phloroglucinol solution (0.2 N HCl in methanol, containing 100 g/L phloroglucinol and 20 g/L ascorbic acid) at 50 °C for 20 min. The reaction was stopped by adding 1000 µL of 40 mM aqueous sodium acetate. Reversed-phase HPLC analysis (Agilent series 1200 HPLC-DAD) was carried out with an Agilent Zorbax Eclipse XDBC18, 4.6 × 250 mm, 5 µm column (Agilent Technologies) as described below, and the injection volume was 30 µL. The solvents used were 1% aqueous acetic acid (solvent A) and methanol (solvent B) at a flow rate of 1 mL/min. The elution conditions were 1.0 mL/min. Elution was performed with a gradient starting at 5% B for 10 min, a linear gradient from 5 to 20% B in 20 min, and a linear gradient from 20 to 40% B in 25 min. The column was then washed with 90% B for 10 min and re-equilibrated with 5% B for 5 min before the next injection. The monomers (+)-catechin, (–)-epicatechin, and (–)-epicatechin-3-*O*-gallate were identified by comparing their retention times with those of the pure compounds. The phloroglucinol adducts of (+)-catechin, (–)-epicatechin, (–)-epigallocatechin, and (–)-epicatechin-3-*O*-gallate were identified by their retention time (described in the literature) and confirmed through an HPLC-MS analysis. Analyses were performed with the Agilent 1200 series HPLC using an Agilent 6210 time-of-flight (TOF) mass spectrometer equipped with an electrospray ionization system (ESI). Elution was carried out under the same HPLC analysis conditions described below. The capillary voltage was 3.5 kV. Nitrogen was used both as a dry gas at a flow rate of 12 L/min at 350 °C and as a nebulizer gas at 60 psi. Spectra were recorded in positive ion mode between *m/z* 50 and 2400. This assay was also carried out without the addition of phloroglucinol to measure the flavan-3-ol monomers that are naturally present in wine. The number of terminal subunits was considered to be the difference between the total monomers measured in normal conditions (with phloroglucinol and acid) and that obtained when the analysis was performed without phloroglucinol and acid addition. The number of extension subunits was considered as the addition of all the phloroglucinol adducts. The mDP was calculated by adding the terminal and extension subunits (in moles) and dividing by the terminal subunits. Because acid catalysis with phloroglucinol is not completely efficient, the real yield of the reaction was measured using a pure B2 proanthocyanidin dimer [(–)-epicatechin-(4→8)-(–)-epicatechin]. This yield was used to calculate the total proanthocyanidin concentration from wine.

Polysaccharide Analysis. Wine samples were processed using the methodology described by Ayestarán et al.³⁷ Briefly, 10 mL of wine was centrifuged (8500 rpm, 20 min) by a Biofuge Primo centrifuge (Heraeus, Hanau, Germany), and the supernatant was concentrated to a final volume of 2 mL using a vacuum evaporator (Univapo 100ECH, Uniequip, Martinsried, Germany). Total soluble polysaccharides were precipitated by adding 10 mL of cold acidified ethanol (0.3 M HCl in absolute ethanol) and kept for 24 h at 4 °C. Then, the samples were centrifuged (8500 rpm, 10 min, 4 °C), the supernatants were discarded, and the pellets were washed four times with cold ethanol to remove the interference materials. Finally, the precipitates were dissolved in 1 mL of ultrapure water, frozen to –80 °C, and freeze-dried using a lyophilizer Christ Alpha 1-4 (Martin Christ, Osterode am Harz, Germany). To determine the molecular distribution and quantify the polysaccharides obtained from wines, the soluble fractions were analyzed by high resolution size exclusion chromatography (HRSEC) using a refraction index detector (RID). The lyophilized

samples were resuspended in 1mL of 30mM ammonium formate and filtered through a 0.45 μ m pore size nylon membrane, after which 100 μ L was injected onto the column. Separation was carried out at 20 $^{\circ}$ C using two Shodex OHpak SB-803 HQ and SB-804 HQ columns connected in series (300mm $\times$ 8mm i.d.; Showa Denko, Japan). The mobile phase consists of an aqueous solution of 30mM ammonium formate, applied with a constant flow of 0.6mL/min for 60 min, and a RID cell temperature of 35 $^{\circ}$ C. The molecular weight distribution of the wine fractions was followed by calibration with pullulan and dextran standards of different molecular weights (see above). The polysaccharides were quantified on the basis of the peak area for each fraction, using the external standard method with pectin and dextran commercial standards. The calibration curve was obtained by injecting standard solutions, under the same conditions as for the samples analyzed, in the range between 0 and 2 g/L.

Sensory Analysis. All of the wines were tasted by a group of eight expert enologists from the Rovira i Virgili University 6 months after bottling. A sensory training session was held beforehand so that the experts could homogenize criteria. They all took part in two descriptive trials in which they evaluated each wine for six sensorial attributes on a scale from 1 to 10: fruitiness, vegetal, acidity, astringency, bitterness, and mouthfeel. The values indicate the intensity of the sensation for each attribute. The first trial was focalized to maturity employing wines of 2 and 3 weeks of maceration, and the data correspond to the average of both maceration times. The second trial was focalized to maceration length, and all samples were tasted.

Statistical Analysis. All of the data are expressed as the arithmetic average of three replicates. Two- and one-factor ANOVA tests were carried out with SPSS software.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the changes in sugar concentration and Titratable acidity of the grape juices of both cultivars at the three different ripening stages. As expected, sugar concentration increased throughout the maturation time, whereas titratable acidity decreased. All of these data confirm that the grapes had ripened correctly and that the three crops were different from one another.

Table 1. Changes on sugar concentration and titratable acidity of the grape juices of both cultivars at the three different ripening stages.

Cultivar	Maturity Level	Sugar content (g/L)	Titratable Acidity (g/L)
<i>Cabernet Sauvignon</i>	1	192,1 $\pm$ 1,7 a	9,9 $\pm$ 0,3 c
	2	217,6 $\pm$ 1,7 b	7,1 $\pm$ 0,5 b
	3	236,3 $\pm$ 1,7 c	5,9 $\pm$ 0,7 a
<i>Tempranillo</i>	1	192,1 $\pm$ 3,4 a	6,1 $\pm$ 0,3 c
	2	204,0 $\pm$ 1,7 b	5,1 $\pm$ 0,1 b
	3	217,6 $\pm$ 1,7 c	3,8 $\pm$ 0,1 a

Results are expressed as the average values of twelve replicates $\pm$ standard deviation (n=12). Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$) for an ANOVA test

Tables 2 (Cabernet Sauvignon) and 3 (Tempranillo) show the evolution of ethanol content, pH, total anthocyanin concentration (measured by spectrophotometry), and total phenolic index (TPI) of different wines as a function of the level of maturity and the length of maceration. The ethanol content of wines increased throughout ripening in both cultivars, and their values were, in general terms, in agreement with the corresponding sugar concentration observed in grapes. As expected, the length of maceration seems not to have any influence on this parameter with the only exception of the Cabernet Sauvignon wines from the latest harvest. This may be due to the presence of some dried grapes, which delay their sugar release and are therefore responsible for the increased ethanol content observed after the second week of maceration.

As expected, ripening had a clear effect on wine pH (the riper the grape, the higher the pH). In general terms, maceration length also affected wine pH. The longer the maceration time, the higher the pH. This effect was clearer when the grapes were riper.

Total anthocyanin content also increased throughout ripening in both cultivars, which indicates that grape skins have also ripe. These data are in agreement with data from other studies^{22,36} and confirm the previously described influence of ripening on anthocyanin concentration.^{24,25} In contrast, total anthocyanin concentration diminished when the maceration time was longer. This observation may be due to different causes. On the one hand, anthocyanins may be degraded and/or absorbed by yeasts and the tank surface,⁵⁶ and, on the other hand, anthocyanins can be transformed in new pigments with a different maximum wavelength.

Table 2. General analytic parameters of Cabernet sauvignon wines.

Parameter	Maturity level	Maceration length (weeks)				
		1	2	3	4	GLOBAL
Ethanol content	1	12.1 ± 0.1 α, A	12.1 ± 0.1 α, A	12.1 ± 0.0 α, A	12.1 ± 0.1 α, A	12.1 ± 0.0 a
	2	13.7 ± 0.0 β, A	13.7 ± 0.0 β, A	13.8 ± 0.1 β, A	13.8 ± 0.1 β, A	13.8 ± 0.0 b
	3	14.0 ± 0.3 β, A	14.6 ± 0.0 γ, B	14.6 ± 0.1 γ, B	14.6 ± 0.2 γ, B	14.4 ± 0.0 c
(% v/v)	GLOBAL	13.3 ± 0.0 a	13.5 ± 0.0 b	13.5 ± 0.0 b	13.5 ± 0.0 b	p-interaction value: 0.0022
pH	1	3.41 ± 0.05 α, A	3.47 ± 0.04 α, A	3.51 ± 0.04 α, AB	3.57 ± 0.12 α, B	3.49 ± 0.01 a
	2	3.73 ± 0.04 β, AB	3.71 ± 0.03 β, A	3.76 ± 0.01 β, B	3.76 ± 0.04 α, B	3.73 ± 0.01 b
	3	3.78 ± 0.01 β, AB	3.78 ± 0.01 γ, A	3.79 ± 0.01 β, AB	3.85 ± 0.07 β, B	3.80 ± 0.01 c
	GLOBAL	3.64 ± 0.01 a	3.65 ± 0.01 ab	3.69 ± 0.01 bc	3.72 ± 0.01 c	p-interaction value: 0.0158
Total anthocyanins	1	653 ± 29 α, C	615 ± 32 α, C	553 ± 32 α, B	462 ± 36 α, A	571 ± 10 a
	2	810 ± 66 β, C	738±16 β, C	630 ± 62 α, B	606 ± 7 β, A	696 ± 10 b
	3	920 ± 10 γ, C	929±16 γ, C	823 ± 12 β, B	737 ± 31 γ, A	852 ± 10 c
(mg/L)	GLOBAL	794 ± 11 d	761 ± 11 c	669 ± 11 b	602 ± 11 a	p-interaction value: 0.2244
TPI	1	40.0 ± 1.7 α, A	47.4 ± 1.7 α, B	51.8 ± 3.1 α, BC	52.3 ± 2.8 α, C	47.9 ± 0.6 a
	2	49.7 ± 3.5 β, A	56.3 ± 0.9 β, B	61.5 ± 2.9 β, C	62.7 ± 0.3 β, C	57.6 ± 0.6 b
	3	54.4 ± 1.6 β, A	66.2 ± 0.4 γ, B	67.6 ± 1.8 γ, B	68.4 ± 2.0 γ, B	64.2 ± 0.6 c
	GLOBAL	48.0 ± 0.7 a	56.6 ± 0.7 b	60.3 ± 0.7 c	61.1 ± 0.7 c	p-interaction value: 0.4611

Triplicates data are expressed as the average values of three replicates ± standard deviation (n = 3). Global data for maturity level and maceration length are expressed as the average values ± standard error (n=12 for maturity level, n=9 for maceration length). Total anthocyanins are expressed as mg/L of malvidine-O-3-glucoside. TPI corresponds to the Total Phenolic Index. Different letters indicate statistical differences (p < 0.05). Greek letters are used to compare the wines of the same maceration length and different maturity level by one-way ANOVA. Capital Latin letters are used to compare the wines of the same maturity level and different maceration length by one-way ANOVA. Small Latin letters are used to compare all data by two-factor ANOVA.

Table 3. General analytic parameters of Tempranillo wines.

Parameter	Maturity level	Maceration length (weeks)				
		1	2	3	4	GLOBAL
Ethanol content	1	12.1 ± 0.4 α, A	11.9 ± 0.4 α, A	11.9 ± 0.3 α, A	11.9 ± 0.0 α, A	12.0 ± 0.1 a
	2	12.7 ± 0.1 β, A	12.8 ± 0.0 β, A	12.9 ± 0.1 β, A	12.7 ± 0.1 β, A	12.8 ± 0.1 b
	3	14.1 ± 0.3 γ, A	14.2 ± 0.1 γ, A	14.0 ± 0.3 γ, A	13.8 ± 0.2 γ, A	14.0 ± 0.1 c
(% v/v)	GLOBAL	13.0 ± 0.1 a	13.0 ± 0.1 a	12.9 ± 0.1 a	12.8 ± 0.1 a	p- interaction value: 0.7711
pH	1	3.40 ± 0.02 α, A	3.40 ± 0.02 α, A	3.42 ± 0.02 α, A	3.40 ± 0.01 α, A	3.40 ± 0.01 a
	2	3.65 ± 0.03 β, A	3.68 ± 0.01 β, AB	3.67 ± 0.01 β, A	3.67 ± 0.02 β, B	3.69 ± 0.01 b
	3	3.67 ± 0.05 β, A	3.73 ± 0.01 γ, AB	3.80 ± 0.11 γ, BC	3.89 ± 0.01 γ, C	3.77 ± 0.01 c
	GLOBAL	3.57 ± 0.01 a	3.60 ± 0.01 ab	3.63 ± 0.01 b	3.69 ± 0.02 c	p- interaction value: 0.0150
Total anthocyanins	1	458 ± 47 α, B	405 ± 37 α, B	270 ± 18 α, A	282 ± 36 α, A	354 ± 12 a
	2	655 ± 63 β, C	582 ± 24 β, BC	531 ± 21 β, AB	473 ± 11 β, A	561 ± 12 b
	3	622 ± 68 β, B	581 ± 28 β, B	552 ± 24 β, AB	483 ± 13 β, A	560 ± 12 b
(mg/L)	GLOBAL	578 ± 13 d	523 ± 13 c	451 ± 13 b	414 ± 14 a	p- interaction value: 0.1823
TPI	1	45.8 ± 1.8 α, A	48.7 ± 1.9 α, A	46.0 ± 2.1 α, A	49.6 ± 2.4 α, A	47.5 ± 0.7 a
	2	57.4 ± 2.7 β, A	59.1 ± 1.4 β, A	59.8 ± 1.5 β, A	59.9 ± 1.8 β, A	59.0 ± 0.7 b
	3	56.8 ± 4.5 β, A	59.9 ± 3.3 β, AB	63.0 ± 1.7 β, B	62.8 ± 1.5 β, B	60.6 ± 0.7 b
	GLOBAL	53.3 ± 0.8 a	55.9 ± 0.8 b	56.3 ± 0.8 b	57.4 ± 0.9 b	p- interaction value: 0.3567

Triplicates data are expressed as the average values of three replicates ± standard deviation (n = 3). Global data for maturity level and maceration length are expressed as the average values ± standard error (n=12 for maturity level, n=9 for maceration length). Total anthocyanins are expressed as mg/L of malvidine-O-3-glucoside. TPI corresponds to the Total Phenolic Index. Different letters indicate statistical differences (p < 0.05). Greek letters are used to compare the wines of the same maceration length and different maturity level by one-way ANOVA. Capital Latin letters are used to compare the wines of the same maturity level and different maceration length by one-way ANOVA. Small Latin letters are used to compare all data by two-factor ANOVA.

Table 4. Color Parameters. Cabernet Sauvignon wines.

Parameter	Maturity level	Maceration length (weeks)				
		1	2	3	4	GLOBAL
CI	1	11.2 ± 0.6 α, A	12.2 ± 0.3 α, A	11.9 ± 0.4 α, A	12.0 ± 0.9 α, A	11.8 ± 0.2 a
	2	14.1 ± 1.4 β, A	14.8 ± 0.4 β, A	14.1 ± 0.9 β, A	14.0 ± 0.2 β, A	14.3 ± 0.2 b
	3	14.1 ± 0.5 β, A	15.1 ± 0.4 β, A	14.7 ± 0.1 β, A	14.6 ± 1.0 β, A	14.7 ± 0.2 b
	GLOBAL	13.1 ± 0.2 a	14.1 ± 0.2 b	13.6 ± 0.2 ab	13.5 ± 0.2 ab	p- interaction value: 0.9550
C*	1	56.1 ± 2.4 α, B	56.1 ± 1.9 α, B	54.4 ± 1.2 α, AB	49.9 ± 4.0 α, A	54.1 ± 0.6 a
	2	56.9 ± 2.2 α, A	57.2 ± 0.6 α, A	54.7 ± 2.3 α, A	54.1 ± 0.8 α, A	55.7 ± 0.6 a
	3	55.3 ± 0.7 α, B	55.8 ± 0.3 α, B	54.9 ± 0.1 α, B	52.4 ± 2.5 α, A	54.6 ± 0.6 a
	GLOBAL	56.1 ± 0.6 b	56.4 ± 0.6 b	54.6 ± 0.6 b	52.1 ± 0.6 a	p- interaction value: 0.5815
L*	1	51.5 ± 3.4 β, B	47.0 ± 0.7 β, A	47.3 ± 1.0 β, A	46.5 ± 2.3 β, A	48.1 ± 0.51 b
	2	43.2 ± 3.1 α, A	41.1 ± 0.9 α, A	42.4 ± 1.9 α, A	42.6 ± 0.1 α, A	42.3 ± 0.51 a
	3	42.3 ± 1.1 α, B	39.9 ± 0.7 α, A	41.0 ± 0.2 α, AB	40.9 ± 2.1 α, AB	41.0 ± 0.51 a
	GLOBAL	45.7 ± 0.6 b	42.7 ± 0.6 a	43.6 ± 0.6 a	43.3 ± 0.6 a	p- interaction value: 0.4540
H*	1	5.14 ± 2.64 α, A	6.11 ± 0.72 α, A	7.26 ± 0.97 α, AB	9.69 ± 0.85 α, B	7.05 ± 0.36 a
	2	8.37 ± 1.04 αβ, A	10.18 ± 0.77 β, AB	12.56 ± 2.07 β, BC	13.34 ± 0.88 β, C	11.11 ± 0.36 b
	3	8.85 ± 0.86 β, A	9.78 ± 0.62 β, A	11.87 ± 0.77 β, B	13.30 ± 1.13 β, B	10.95 ± 0.36 b
	GLOBAL	7.45 ± 0.42 a	8.69 ± 0.42 b	10.56 ± 0.42 c	12.11 ± 0.42 d	p- interaction value: 0.8694

Triplicates data are expressed as the average values of three replicates ± standard deviation (n = 3). Global data for maturity level and maceration length are expressed as the average values ± standard error (n=12 for maturity level, n=9 for maceration length). CI: Color Intensity, C*: Chroma, L*: Lightness and H*: Hue. Different letters indicate statistical differences (p < 0.05). Greek letters are used to compare the wines of the same maceration length and different maturity level by one-way ANOVA. Capital Latin letters are used to compare the wines of the same maturity level and different maceration length by one-way ANOVA. Small Latin letters are used to compare all data by two-factor ANOVA.

Table 5. Color Parameters. Tempranillo wines.

Parameter	Maturity level	Maceration length (weeks)				
		1	2	3	4	GLOBAL
CI	1	12.4 ± 0.8 α, B	12.3 ± 0.6 α, B	11.9 ± 0.5 α, AB	11.1 ± 0.6 α, A	11.9 ± 0.2 a
	2	13.7 ± 0.2 αβ, A	14.0 ± 0.1 β, A	13.3 ± 1.3 α, A	12.8 ± 1.2 β, A	13.5 ± 0.2 b
	3	14.7 ± 1.2 β, B	14.3 ± 0.8 β, B	12.9 ± 1.3 α, AB	11.6 ± 0.2 αβ, A	13.4 ± 0.2 b
	GLOBAL	13.6 ± 0.3 c	13.5 ± 0.3 c	12.7 ± 0.3 b	11.8 ± 0.3 a	p- interaction value: 0.3864
C*	1	57.1 ± 1.0 α, B	55.1 ± 1.2 α, B	47.8 ± 1.3 α, A	48.4 ± 2.5 α, A	52.1 ± 0.5 a
	2	57.9 ± 0.2 α, C	55.2 ± 0.5 α, B	53.9 ± 0.5 β, B	49.6 ± 2.6 α, A	54.2 ± 0.5 b
	3	58.3 ± 0.8 α, C	55.9 ± 0.7 α, CB	52.9 ± 3.6 β, B	48.5 ± 0.4 α, A	53.9 ± 0.5 b
	GLOBAL	57.8 ± 0.5 d	55.4 ± 0.5 c	51.5 ± 0.5 b	48.8 ± 0.5 a	p- interaction value: 0.0398
L*	1	44.5 ± 2.2 β, A	44.0 ± 1.6 β, A	43.1 ± 1.3 α, A	46.1 ± 1.5 β, A	44.4 ± 0.6 b
	2	41.9 ± 0.4 αβ, A	40.3 ± 0.2 α, A	41.6 ± 3.7 α, A	42.1 ± 2.8 α, A	41.5 ± 0.6 a
	3	39.9 ± 2.5 α, A	40.4 ± 1.7 α, A	42.9 ± 2.8 α, AB	46.3 ± 0.5 β, B	42.4 ± 0.6 a
	GLOBAL	42.1 ± 0.7 a	41.5 ± 0.7 a	42.6 ± 0.7 a	44.8 ± 0.7 b	p- interaction value: 0.1827
H*	1	363.4 ± 1.0 β, B	362.3 ± 2.1 β, AB	359.4 ± 0.6 α, A	360.8 ± 3.3 α, AB	361.5±0.5 b
	2	358.5 ± 0.7 α, A	357.7 ± 0.1 α, A	357.9 ± 2.0 α, A	358.2 ± 2.5 α, A	358.1 ± 0.5 a
	3	356.6 ± 1.3 α, A	355.6 ± 0.7 α, A	357.6 ± 1.5 α, A	357.3 ± 0.3 α, A	356.8 ± 0.5 a
	GLOBAL	359.5 ± 0.5 a	358.5 ± 0.5 a	358.3 ± 0.5 a	358.8 ± 0.5 a	p- interaction value: 0.1234

Triplicates data are expressed as the average values of three replicates ± standard deviation (n = 3). Global data for maturity level and maceration length are expressed as the average values ± standard error (n=12 for maturity level, n=9 for maceration length). CI: Color Intensity, C*: Chroma, L*: Lightness and H*: Hue. Different letters indicate statistical differences (p < 0.05). Greek letters are used to compare the wines of the same maceration length and different maturity level by one-way ANOVA. Capital Latin letters are used to compare the wines of the same maturity level and different maceration length by one-way ANOVA. Small Latin letters are used to compare all data by two-factor ANOVA.

Maturity and maceration length also influence the total phenolic content of wines in both cultivars. Specifically, TPI was higher when the grapes were riper and when the maceration length was longer. These results are quite logical and coincide with those of previous studies.^{36,47}

The changes in the color parameters of wines from both cultivars are shown in Tables 4 (Cabernet Sauvignon) and 5 (Tempranillo). In general terms, the wine color intensity (CI) of both cultivars increased and lightness (L*) decreased with maturity, especially between the first and second harvests. In contrast, neither chroma (C*) nor hue (H*) showed a clear trend. These data confirm that wines from riper grapes show a deeper red color.

The effect of the length of maceration, however, seemed to depend on the cultivar. Therefore, the behavior of CI and C* was not well-defined for Cabernet Sauvignon wines, but both parameters decreased significantly with maceration length in Tempranillo wines. L* did not show a clear trend during maceration in either of the cultivars. However, it increased significantly in the third harvest of Tempranillo and decreased significantly between the first and the second weeks of Cabernet Sauvignon from the first harvest. Finally, H* increased significantly with maceration time in Cabernet Sauvignon wines, whereas no clear behavior was found in Tempranillo wines.

Table 6. Anthocyanidin quantification by HPLC-DAD (mg Malvidine-O-3-glucósido/L). Cabernet sauvignon wines.

Parameter	Maturity level	Maceration length (weeks)				
		1	2	3	4	GLOBAL
Total anthocyanins (HPLC)	1	306.2 ± 19.9 α, D	250.9 ± 29.9 α, C	207.6 ± 18.9 α, B	139.4 ± 20.7 α, A	226.1 ± 5.2 a
	2	288.0 ± 11.9 α, B	253.3 ± 5.4 α, B	195.8 ± 36.5 α, A	185.3 ± 3.3 β, A	230.6 ± 5.2 a
	3	414.1 ± 11.7 β, D	380.1 ± 7.0 β, C	315.0 ± 8.8 β, B	266.4 ± 5.8 γ, A	343.9 ± 5.2 b
	GLOBAL	336.1 ± 6.0 d	294.8 ± 6.0 c	239.5 ± 6.0 b	197.1 ± 6.0 a	p- interaction value: 0.0744
Anthocyanidin-3-monoglucosides (HPLC)	1	209.4 ± 11.6 α, C	173.5 ± 22.2 α, B	144.2 ± 13.4 α, B	96.6 ± 14.9 α, A	155.9 ± 3.6 a
	2	210.0 ± 4.5 α, C	183.4 ± 3.3 α, B	148.0 ± 25.4 α, A	139.1 ± 3.5 β, A	170.1 ± 3.6 b
	3	296.1 ± 7.0 β, D	276.0 ± 4.7 β, C	230.6 ± 5.1 β, B	197.8 ± 3.9 γ, A	250.1 ± 3.6 c
	GLOBAL	238.5 ± 4.1 d	211.0 ± 4.1 c	174.3 ± 4.1 b	144.5 ± 4.1 a	p- interaction value: 0.0804
Acetylated anthocyanins (HPLC)	1	84.1 ± 7.5 β, D	67.2 ± 6.5 β, C	55.4 ± 4.4 β, B	37.9 ± 5.2 α, A	61.1 ± 1.5 b
	2	63.4 ± 6.1 α, B	58.0 ± 1.5 α, B	40.0 ± 9.0 α, A	38.7 ± 1.5 α, A	50.0 ± 1.5 a
	3	100.9 ± 4.5 γ, D	89.0 ± 2.1 γ, C	72.7 ± 3.5 γ, B	80.5 ± 1.5 β, A	80.5 ± 1.5 c
	GLOBAL	82.8 ± 1.7 d	71.4 ± 1.7 c	56.1 ± 1.7 b	45.3 ± 1.7 a	p- interaction value: 0.0346
p-Coumarylated anthocyanins (HPLC)	1	12.7 ± 1.0 α, D	10.3 ± 1.1 α, C	8.1 ± 1.2 α, B	4.9 ± 0.9 α, A	9.0 ± 0.3 a
	2	14.6 ± 1.6 α, C	11.9 ± 0.6 β, B	7.8 ± 2.2 α, A	7.5 ± 0.2 β, A	10.4 ± 0.3 b
	3	17.2 ± 0.4 β, D	15.1 ± 0.1 γ, C	11.7 ± 0.4 β, B	9.2 ± 0.2 γ, A	13.3 ± 0.3 c
	GLOBAL	14.8 ± 0.3 d	12.4 ± 0.3 c	9.2 ± 0.3 b	7.2 ± 0.3 a	p- interaction value: 0.3105

Triplicates data are expressed as the average values of three replicates ± standard deviation (n = 3). Global data for maturity level and maceration length are expressed as the average values ± standard error (n=12 for maturity level, n=9 for maceration length). Different letters indicate statistical differences (p < 0.05). Greek letters are used to compare the wines of the same maceration length and different maturity level by one-way ANOVA. Capital Latin letters are used to compare the wines of the same maturity level and different maceration length by one-way ANOVA. Small Latin letters are used to compare all data by two-factor ANOVA.

Tables 6 and 7 show the quantification of anthocyanins by HPLC-DAD in Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines, respectively. Cabernet Sauvignon wines had higher anthocyanin concentrations than Tempranillo wines at similar maturation stages and maceration times. Moreover, Cabernet Sauvignon wines had a significantly higher proportion of acetylated anthocyanins and a lower proportion of coumarylated anthocyanins than their corresponding Tempranillo wines. These differences in the proportion of acetylated and coumarylated anthocyanins have previously been described by other authors and are currently used as parameters to distinguish varieties.⁵⁷

As a general rule, the total anthocyanin concentrations determined by HPLC-DAD were similar to, although somewhat lower than, the total anthocyanin concentrations measured by spectrophotometry. This is logical because Spectrophotometric analysis includes the contribution from other pigments in the measurement and, therefore, overestimates the total anthocyanin concentration, whereas the HPLC-DAD methods detect only free anthocyanins.⁵⁸ The total anthocyanin concentration of wines from both cultivars tended to increase significantly with maturity,²² although in some cases a slight decrease between the first and second harvests was detected. In contrast, total anthocyanin concentration decreased significantly with maceration length.^{41,56} In general terms, this behavior was observed in both nonacylated

and acylated anthocyanins (acetylated and coumarylated). As has been mentioned above, these results are in agreement with previously published data.

Table 7. Anthocyanidin quantification by HPLC-DAD (mg Malvidine-O-3-glucósido/L). Tempranillo wines.

Parameter	Maturity level	Maceration length (weeks)				
		1	2	3	4	GLOBAL
Total anthocyanins (HPLC)	1	168.5 ± 32.7 α, B	134.7 ± 24.7 α, B	30.3 ± 11.6 α, A	47.5 ± 22.5 α, A	95.3 ± 5.6 a
	2	194.4 ± 8.6 α, C	138.8 ± 10.9 α, B	118.6 ± 22.7 β, AB	87.4 ± 16.9 β, A	134.8 ± 6.0 b
	3	267.5 ± 22.8 β, C	229.5 ± 20.9 β, B	201.4 ± 14.9 γ, B	162.1 ± 7.4 γ, A	215.1 ± 5.6 c
	GLOBAL	210.2 ± 6.5 c	167.7 ± 6.5 b	116.8 ± 6.5 a	99.0 ± 7.0 a	p- interaction value: 0.0159
Anthocyanidin-3-monoglucosides (HPLC)	1	131.3 ± 27.7 α, B	95.7 ± 26.5 α, B	16.3 ± 5.2 α, A	31.5 ± 17.0 α, A	68.7 ± 4.9 a
	2	162.8 ± 6.0 α, C	117.9 ± 9.2 α, B	101.5 ± 198 β, AB	75.2 ± 14.7 β, A	14.4 ± 5.2 b
	3	208.2 ± 20.7 β, C	180.1 ± 17.7 β, BC	158.7 ± 12.2 γ, B	127.2 ± 5.7 γ, A	168.5 ± 4.9 c
	GLOBAL	167.4 ± 5.7 c	131.2 ± 5.7 b	92.2 ± 5.7 a	77.9 ± 6.1 a	p- interaction value: 0.0291
Acetylated anthocyanins (HPLC)	1	25.0 ± 4.1 β, B	29.6 ± 2.6 β, B	12.6 ± 6.0 α, A	13.8 ± 6.0 αβ, A	20.3 ± 0.9 b
	2	15.0 ± 1.5 α, C	10.3 ± 0.7 α, B	8.5 ± 0.9 α, AB	6.7 ± 0.9 α, A	10.1 ± 1.0 a
	3	31.1 ± 1.0 γ, C	28.1 ± 1.8 β, BC	24.9 ± 1.7 β, B	20.4 ± 1.6 β, A	26.1 ± 0.9 c
	GLOBAL	23.7 ± 1.0 b	22.7 ± 1.0 b	15.3 ± 1.0 a	13.7 ± 1.1 a	p- interaction value: 0.0078
p-Coumarylated anthocyanins (HPLC)	1	12.3 ± 3.4 α, B	9.4 ± 0.8 α, B	1.4 ± 0.4 α, A	2.2 ± 1.1 α, A	6.3 ± 0.5 a
	2	16.6 ± 1.4 α, C	10.6 ± 1.2 α, B	8.5 ± 1.9 β, AB	5.5 ± 1.2 β, A	10.3 ± 0.6 b
	3	28.2 ± 34 β, C	21.2 ± 1.9 β, B	17.8 ± 1.5 γ, AB	14.6 ± 0.3 γ, A	20.4 ± 0.5 c
	GLOBAL	19.0 ± 0.6 c	13.7 ± 0.6 b	9.2 ± 0.6 a	7.4 ± 0.7 a	p- interaction value: 0.1277

Triplicates data are expressed as the average values of three replicates ± standard deviation (n = 3). Global data for maturity level and maceration length are expressed as the average values ± standard error (n=12 for maturity level, n=9 for maceration length). Different letters indicate statistical differences (p < 0.05). Greek letters are used to compare the wines of the same maceration length and different maturity level by one-way ANOVA. Capital Latin letters are used to compare the wines of the same maturity level and different maceration length by one-way ANOVA. Small Latin letters are used to compare all data by two-factor ANOVA.

Table 8. Proanthocyanidin analysis by phloroglucinolysis. Cabernet sauvignon wines.

Parameter	Maturity level	Maceration length (weeks)				
		1	2	3	4	GLOBAL
Total Proanthocyanidins	1	1007 ± 72 α, A	1116 ± 91 α, A	1830 ± 87 α, B	1751 ± 82 α, B	1426 ± 50 a
	2	1162 ± 151 α, A	1574 ± 25 αβ, B	2135 ± 83 α, C	2101 ± 170 αβ, C	1743 ± 52 b
	3	1281 ± 125 α, A	2088 ± 332 β, B	2066 ± 267 α, B	2171 ± 192 β, B	1902 ± 52 c
	GLOBAL	1150 ± 59 a	1593 ± 63 b	2010 ± 59 c	2008 ± 53 c	p- interaction value: 0.0434
mDP	1	8.34 ± 0.49 α, C	6.90 ± 0.29 α, B	6.31 ± 0.31 α, AB	6.14 ± 0.42 α, A	6.93 ± 0.13 a
	2	8.92 ± 0.5 α, C	6.90 ± 0.27 α, B	6.52 ± 0.28 α, AB	6.03 ± 0.25 α, A	7.09 ± 0.14 a
	3	10.50 ± 0.53 β, B	12.15 ± 0.83 β, C	8.93 ± 0.16 β, A	8.26 ± 0.68 β, A	9.96 ± 0.14 b
	GLOBAL	9.25 ± 0.16 c	8.65 ± 0.16 b	7.26 ± 0.16 a	6.81 ± 0.15 a	p- interaction value: 0.0000
%Prodelphinidines	1	30.8 ± 0.2 α, C	24.8 ± 0.8 α, B	23.1 ± 0.9 α, A	23.1 ± 0.6 α, A	25.4 ± 0.2 a
	2	33.6 ± 0.8 β, C	27.3 ± 0.7 β, B	25.2 ± 0.7 β, A	24.2 ± 0.8 α, A	27.6 ± 0.2 b
	3	34.4 ± 0.6 β, C	29.4 ± 0.2 γ, B	27.5 ± 1.2 γ, A	26.7 ± 0.2 β, A	29.5 ± 0.2 c
	GLOBAL	32.9 ± 0.2 c	27.1 ± 0.2 b	25.3 ± 0.2 a	24.7 ± 0.2 a	p- interaction value: 0.2941
%Galloilation	1	3.9 ± 0.3 α, A	6.3 ± 0.5 β, B	6.3 ± 0.2 α, B	6.1 ± 0.1 β, B	5.7 ± 0.1 b
	2	3.4 ± 0.0 α, A	5.3 ± 0.1 α, B	5.6 ± 0.6 α, B	5.6 ± 0.3 α, B	5.0 ± 0.1 a
	3	3.3 ± 0.4 α, A	5.9 ± 0.0 αβ, B	5.6 ± 0.3 α, B	5.4 ± 0.1 α, B	5.0 ± 0.1 a
	GLOBAL	3.5 ± 0.1 a	5.8 ± 0.1 b	5.8 ± 0.1 b	5.7 ± 0.1 b	p- interaction value: 0.6579

Triplicates data are expressed as the average values of three replicates ± standard deviation (n = 3). Global data for maturity level and maceration length are expressed as the average values ± standard error (n=12 for maturity level, n=9 for maceration length). Different letters indicate statistical differences (p < 0.05). Greek letters are used to compare the wines of the same maceration length and different maturity level by one-way ANOVA. Capital Latin letters are used to compare the wines of the same maturity level and different maceration length by one-way ANOVA. Small Latin letters are used to compare all data by two-factor ANOVA.

The results of analyzing wine proanthocyanidins obtained by acid depolymerization in the presence of excess phloroglucinol are shown in Tables 8 (Cabernet Sauvignon) and 9 (Tempranillo). The total proanthocyanidin concentration of Cabernet Sauvignon wines was affected by maturity and maceration length and, in general, was higher when the grapes were riper and the maceration longer. These data are completely logical and agree with the data available in the literature.^{41,46,47} Moreover, maturity seems to affect proanthocyanidin extractability. In the first harvest, when the grapes were very unripe, no changes were observed in the proanthocyanidin concentration between the first and second weeks of maceration, and it was necessary to wait until the third week of maceration to observe any significant increase. In the second harvest, when grapes were more or less ripe, the proanthocyanidin concentration increased significantly until the third week of maceration, when the values stabilized. Finally, in the third harvest, when the grapes were very ripe, the proanthocyanidin concentration increased significantly until the second week of maceration, which indicates that thorough extraction was achieved quickly. It seems therefore that the riper the grapes are, the faster the solubilization of proanthocyanidins.

In contrast, the total proanthocyanidin concentration in Tempranillo wines was not affected by the maturity level of the grapes. In fact, no significant differences in this parameter were found at any maturity level with the only exception being the second harvest and 4 weeks of maceration. These unexpected data seem to indicate that the Tempranillo grapes used in this study were not really well-ripened, at least as far as the skins and seeds are concerned. Nevertheless, maceration length affects Tempranillo in a similar way as Cabernet Sauvignon wines inasmuch as the global proanthocyanidin concentration was greater when the maceration was longer,⁴⁵ despite this behavior not being shown in all maturity levels.

Table 9. Proanthocyanidin analysis by phloroglucinolysis. Tempranillo wines.

Parameter	Maturity level	Maceration length (weeks)				
		1	2	3	4	GLOBAL
Total Proanthocyanidins	1	1049 ± 96 α, A	1238 ± 100 α, AB	1248 ± 10 α, AB	1304 ± 128 β, B	1211 ± 34 a
	2	1150 ± 128 α, A	1084 ± 234 α, A	1176 ± 120 α, A	1076 ± 51 α, A	1121 ± 36 a
	3	1061 ± 74 α, A	1266 ± 153 α, AB	1178 ± 77 α, A	1415 ± 46 β, B	1229 ± 37 a
	GLOBAL	1087 ± 42 a	1197 ± 42 ab	1201 ± 40 ab	1264 ± 40 b	p- interaction value: 0.1131
mDP	1	9.06 ± 0.15 β, C	7.27 ± 0.18 α, B	6.21 ± 0.22 α, A	6.24 ± 0.29 α, A	7.19 ± 0.08 a
	2	9.35 ± 0.37 β, C	7.76 ± 0.44 α, B	7.02 ± 0.17 β, A	6.56 ± 0.33 α, A	7.67 ± 0.08 b
	3	7.27 ± 0.35 α, B	8.9 ± 0.02 β, C	7.57 ± 0.03 γ, B	6.34 ± 0.05 α, A	7.52 ± 0.09 b
	GLOBAL	8.56 ± 0.10 d	7.97 ± 0.10 c	6.93 ± 0.10 b	6.38 ± 0.10 a	p- interaction value: 0.0000
%Prodelphinidines	1	18.9 ± 0.2 β, C	17.8 ± 0.1 α, B	16.6 ± 0.6 α, A	16.8 ± 0.2 α, A	17.5 ± 0.3 a
	2	18.3 ± 1.3 β, A	17.5 ± 1.4 α, A	18.4 ± 0.8 α, A	17.2 ± 1.1 α, A	17.8 ± 0.3 a
	3	15.4 ± 1.0 α, A	27.2 ± 0.7 β, C	24.6 ± 4.0 β, BC	22.0 ± 0.7 β, B	22.3 ± 0.4 b
	GLOBAL	17.5 ± 0.4 a	20.8 ± 0.4 b	19.9 ± 0.4 b	18.7 ± 0.4 a	p- interaction value: 0.0000
%Galloilation	1	2.8 ± 0.1 β, A	3.2 ± 0.0 β, B	4.1 ± 0.3 β, C	3.8 ± 0.1 β, C	3.5 ± 0.1 c
	2	2.3 ± 0.1 α, A	2.7 ± 0.2 α, B	2.9 ± 0.1 α, B	3.6 ± 0.2 β, C	2.9 ± 0.1 b
	3	3.0 ± 0.2 β, B	2.3 ± 0.3 α, A	2.5 ± 0.5 α, AB	2.6 ± 0.1 α, AB	2.6 ± 0.1 a
	GLOBAL	2.7 ± 0.1 a	2.8 ± 0.1 a	3.2 ± 0.1 b	3.4 ± 0.1 b	p- interaction value: 0.0000

Triplicates data are expressed as the average values of three replicates ± standard deviation (n = 3). Global data for maturity level and maceration length are expressed as the average values ± standard error (n=12 for maturity level, n=9 for maceration length). Different letters indicate statistical differences (p < 0.05). Greek letters are used to compare the wines of the same maceration length and different maturity level by one-way ANOVA. Capital Latin letters are used to compare the wines of the same maturity level and different maceration length by one-way ANOVA. Small Latin letters are used to compare all data by two-factor ANOVA.

In general terms, the mDP of proanthocyanidins of wines from both cultivars increased significantly when the grapes were riper. This increase in mDP throughout ripening has previously been described by other authors.^{27,28} As is well-known, seed proanthocyanidins have a lower mDP than skin proanthocyanidins.^{11,59–61} Consequently, the mDP of wines from riper grapes may be higher for two reasons. First, the mDP of grape proanthocyanidins increases with maturity or, second, riper grapes release a higher proportion of proanthocyanidins from skins than from seeds. Both alternatives are possible. In our particular case, the increase in mDP in wines from riper grapes was much clearer in Cabernet Sauvignon than in Tempranillo wines, which indicates, as has been mentioned above, that Tempranillo skins and seeds are less ripe than those of Cabernet Sauvignon.

Maceration length also had a significant effect on the proanthocyanidin mDP of wines from both cultivars. In the wines from the first and second harvests the mDP decreased continuously throughout maceration time. In contrast, the wines from the third harvest of both cultivars behaved somewhat

differently because the mDP increased between the first and second weeks and then decreased significantly. These interesting data suggest that the solubilization kinetics of skin and seed proanthocyanidins are different and confirm that proanthocyanidins are released more quickly from skins than from seeds.^{10,45}

Moreover, the maturity level of grapes also seems to have a different effect on proanthocyanidin extraction kinetics from skins and seeds during the wine maceration process. The observed increase in proanthocyanidin mDP between the first and second weeks of maceration in wines from both cultivars in the third harvest suggests that the riper grapes can release higher amounts of skin proanthocyanidins and for a longer time. These data also suggest that seed proanthocyanidins from riper grapes are released more slowly.

The percentage of prodelphinidins also supports these findings. Specifically, the proportion of prodelphinidins tends to increase in wines from the riper grapes and to decrease throughout maceration time in both cultivars. Because prodelphinidins are present only in skins,^{9,10} these data confirm that maturation increases the amount of skin proanthocyanidins released into wine. The changes in the percentage of galloylation also support this behavior. It is wellknown that seed proanthocyanidins have a higher presence of (–)-epicatechin gallate than skin proanthocyanidins.^{10,11} Consequently, the observed decrease in this percentage when the grapes are riper indicates that the contribution of seeds to total wine proanthocyanidins tends to decrease with maturity.

These results also indicate that the maceration length significantly affects the percentage of prodelphinidins and galloylation. These two parameters behaved quite differently as the percentage of prodelphinidins decreased throughout maceration, whereas the percentage of galloylation increased. Because seeds have no (–)-epigallocatechin and have a higher proportion of (–)-epicatechin gallate,¹¹ these results also support that skin proanthocyanidins are released more quickly than seed proanthocyanidins.

Tables 10 and 11 show the polysaccharide concentration of Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines, respectively. In general terms, the total wine polysaccharide concentration tended to increase with maturity in both cultivars and at any maceration time. However, the increase was slight and, sometimes, nonsignificant. The molecular weight fractions also tended to increase. The one exception was the medium molecular weight fraction of Tempranillo wines, which did not change, and the high molecular weight fraction of Cabernet Sauvignon wines, which decreased in wines from the ripest grapes.

Table 10. Polysaccharide analysis by HRSEC (mg POLYSACCHARIDE/L). Cabernet sauvignon wines.

Parameter	Maturity level	Maceration length (weeks)				
		1	2	3	4	GLOBAL
Total Polysaccharides	1	463.0 ± 18.1 α, A	552.4 ± 28.2 αβ, B	613.2 ± 2.6 α, C	677.1 ± 26.5 αβ, D	576.4 ± 6.8 a
	2	488.5 ± 45.5 α, A	542.2 ± 9.6 α, A	667.9 ± 21.5 β, B	658.6 ± 16.2 α, B	589.3 ± 6.8 a
	3	610.9 ± 12.4 β, A	591.1 ± 23.2 β, A	653.5 ± 14.7 β, B	710.1 ± 0.7 β, C	641.4 ± 6.8 b
	GLOBAL	520.8 ± 8.6 a	561.1 ± 7.5 b	644.9 ± 7.5 c	682.0 ± 8.1 d	p- interaction value: 0.0009
H.M.W. Polysaccharides	1	119.7 ± 0.1 α, A	134.5 ± 7.4 α, B	161.8 ± 7.2 β, C	171.6 ± 7.2 β, C	147.7 ± 3.3 b
	2	125.5 ± 8.6 α, A	130.1 ± 9.1 α, A	155.9 ± 13.7 β, B	199.0 ± 31.9 β, C	154.6 ± 3.3 b
	3	115.7 ± 4.6 α, A	121.3 ± 7.2 α, A	132.8 ± 9.2 α, AB	142.4 ± 9.8 α, B	125.5 ± 3.3 a
	GLOBAL	120.3 ± 4.1 a	128.6 ± 3.6 a	152.0 ± 3.6 b	169.4 ± 3.8 c	p- interaction value: 0.0083
M.M.W. Polysaccharides	1	200.7 ± 8.4 α, A	240.1 ± 23.5 α, B	250.4 ± 19.3 α, BC	290.9 ± 18.0 β, C	247.5 ± 4.9 a
	2	225.0 ± 34.6 α, A	252.0 ± 4.6 αβ, A	304.7 ± 2.6 β, B	256.1 ± 4.3 α, A	259.8 ± 4.9 a
	3	243.9 ± 7.1 α, A	277.4 ± 9.0 β, B	303.0 ± 1.8 β, BC	318.0 ± 17.4 γ, C	284.7 ± 4.9 b
	GLOBAL	223.2 ± 6.2 a	256.5 ± 5.4 b	288.2 ± 5.4 c	288.2 ± 5.8 c	p- interaction value: 0.0220
L.M.W. Polysaccharides	1	142.5 ± 9.8 α, A	177.8 ± 12.5 αβ, A	186.6 ± 15.4 α, B	222.3 ± 21.7 α, C	181.2 ± 4.6 a
	2	138.0 ± 17.8 α, A	160.1 ± 13.3 α, A	194.8 ± 5.2 α, B	203.5 ± 11.4 α, B	174.9 ± 4.6 a
	3	251.2 ± 24.0 β, B	192.4 ± 16.7 β, A	231.4 ± 18.9 β, B	236.8 ± 23.4 β, B	231.2 ± 4.6 b
	GLOBAL	177.3 ± 5.8 a	176.8 ± 5.1 a	204.6 ± 5.1 b	224.3 ± 5.5 c	p- interaction value: 0.0012

Triplicates data are expressed as the average values of three replicates ± standard deviation (n = 3). Global data for maturity level and maceration length are expressed as the average values ± standard error (n=12 for maturity level, n=9 for maceration length). H.M.W. Polysaccharides: High Molecular Weight Fraction (M.W.>75KDa); M.M.W. Polysaccharides: Medium Molecular Weight Fraction (75KDa>M.W.>15KDa); L.M.W. Polysaccharides: Low Molecular Weight Fraction (M.W.<15KDa). Different letters indicate statistical differences (p < 0.05). Greek letters are used to compare the wines of the same maceration length and different maturity level by one-way ANOVA. Capital Latin letters are used to compare the wines of the same maturity level and different maceration length by one-way ANOVA. Small Latin letters are used to compare all data by two-factor ANOVA.

Theoretically, the progressive pectin degradation that takes place throughout ripening in skin cell walls^{30,31} should favor polysaccharide solubilization in the grape juice. Consequently, wines from riper grapes should have a higher polysaccharide concentration. However, the higher ethanol concentration of wines from riper grapes could also induce greater precipitation of polysaccharides, which would explain why their concentration increased only slightly with maturation.

Table 11. Polysaccharide analysis by HRSEC (mg POLYSACCHARIDE/L). Tempranillo wines.

Parameter	Maturity level	Maceration length (weeks)				
		1	2	3	4	GLOBAL
Total Polysaccharides	1	369.8 ± 11.0 α, A	429.1 ± 34.5 α, BC	405.0 ± 12.3 α, AB	445.5 ± 14.9 α, C	412.4 ± 15.0 a
	2	385.1 ± 59.6 α, A	501.9 ± 95.9 α, A	503.6 ± 96.8 α, A	505.3 ± 47.3 β, A	473.9 ± 15.0 b
	3	350.2 ± 50.1 α, A	468.8 ± 47.1 α, B	453.0 ± 36.0 α, B	570.2 ± 10.8 γ, C	460.6 ± 15.9 b
	GLOBAL	368.4 ± 17.3 a	466.5 ± 18.7 bc	453.9 ± 17.3 b	507.0 ± 17.3 c	p- interaction value: 0.2635
H.M.W. Polysaccharides	1	119.0 ± 7.1 α, A	132.7 ± 6.6 α, B	139.0 ± 9.8 α, C	168.6 ± 16.7 α, D	138.8 ± 2.8 a
	2	120.8 ± 11.3 α, A	164.8 ± 15.0 β, B	167.3 ± 20.1 β, BC	191.1 ± 10.1 β, C	161.9 ± 2.8 b
	3	128.2 ± 6.5 α, A	156.6 ± 17.0 αβ, B	175.7 ± 8.8 β, C	195.3 ± 4.6 β, D	164.8 ± 3.0 b
	GLOBAL	122.7 ± 3.3 a	151.4 ± 3.5 b	164.6 ± 3.3 c	181.9 ± 3.3 d	p- interaction value: 0.0787
M.M.W. Polysaccharides	1	147.5 ± 11.2 α, A	175.7 ± 14.8 α, B	143.1 ± 12.4 α, A	185.5 ± 22.7 α, B	162.2 ± 5.6 a
	2	146.9 ± 25.7 α, A	182.6 ± 31.0 α, A	181.5 ± 47.1 α, A	188.3 ± 20.1 αβ, A	176.8 ± 5.6 a
	3	122.0 ± 14.2 α, A	158.9 ± 14.1 α, B	169.5 ± 10.0 α, B	198.6 ± 4.1 β, C	161.0 ± 5.9 a
	GLOBAL	138.8 ± 6.5 a	172.4 ± 7.0 bc	168.1 ± 6.5 b	187.4 ± 6.5 c	p- interaction value: 0.2120
L.M.W. Polysaccharides	1	103.3 ± 7.9 α, A	120.7 ± 13.7 α, A	104.3 ± 6.2 α, A	119.2 ± 21.0 α, A	111.3 ± 7.4 a
	2	117.4 ± 23.5 α, A	154.2 ± 54.9 α, A	137.1 ± 48.0 α, A	125.9 ± 17.1 α, A	135.2 ± 7.4 b
	3	99.9 ± 32.2 α, A	153.2 ± 16.0 α, BC	139.8 ± 41.9 α, AB	180.3 ± 9.7 β, C	134.8 ± 7.9 b
	GLOBAL	106.1 ± 8.6 a	142.7 ± 9.3 b	121.1 ± 8.6 b	137.6 ± 8.6 b	p- interaction value: 0.1799

Triplicates data are expressed as the average values of three replicates ± standard deviation (n = 3). Global data for maturity level and maceration length are expressed as the average values ± standard error (n=12 for maturity level, n=9 for maceration length). H.M.W. Polysaccharides: High Molecular Weight Fraction (M.W.>75KDa); M.M.W. Polysaccharides: Medium Molecular Weight Fraction (75KDa>M.W.>15KDa); L.M.W. Polysaccharides: Low Molecular Weight Fraction (M.W.<15KDa). Different letters indicate statistical differences (p < 0.05). Greek letters are used to compare the wines of the same maceration length and different maturity level by one-way ANOVA. Capital Latin letters are used to compare the wines of the same maturity level and different maceration length by one-way ANOVA. Small Latin letters are used to compare all data by two-factor ANOVA.

In contrast, the polysaccharide concentration increased significantly with maceration time in both cultivars and at any ripening stage. This effect, which was much clearer than that exerted by maturity, was also observed in nearly all molecular weight fractions. Fanzone et al.⁶² have reported that highly prized Argentinean wines contain significantly higher polysaccharide concentration than cheaper ones, which was related with the fact that these wines are usually elaborated with longer macerations.

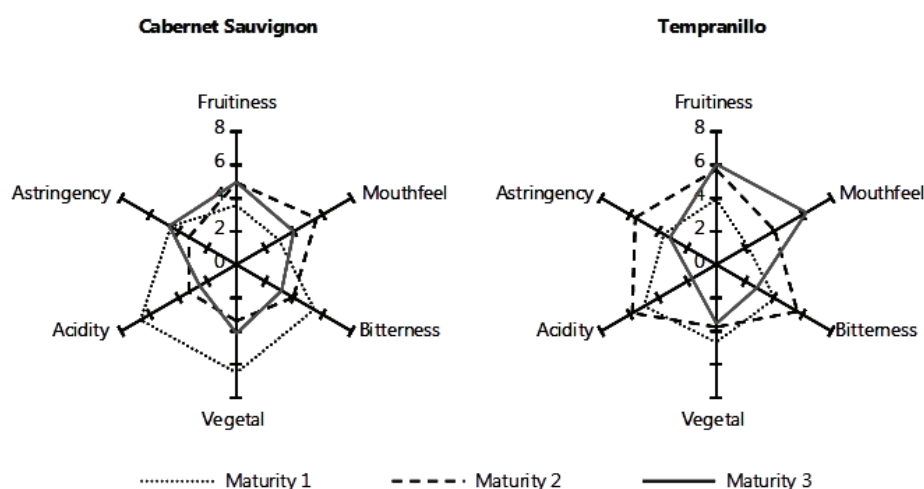


Figure 1. Cobweb diagram of six sensory attributes obtained from sensory analysis of wines elaborated with three different maturity levels.

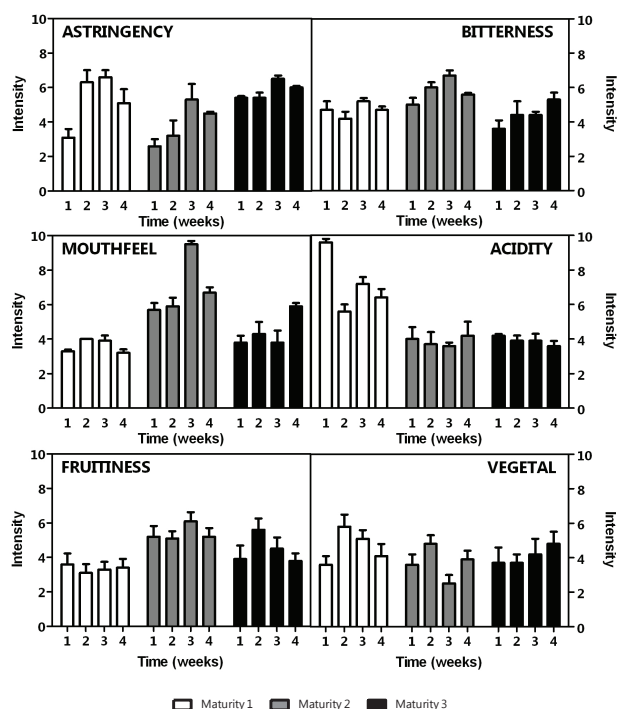


Figure 2. Sensory analysis results for the wines elaborated with Cabernet Sauvignon, using three different maturity levels and four different maceration lengths.

the first harvest, probably because the wines of the second harvest were more tannic. The mouthfeel of second-harvest Cabernet Sauvignon wines was higher than in the riper grapes. However, the general tendency confirms that riper grapes produce fruitier and full-bodied wines, which are less acidic, less vegetal, less astringent, and less bitter.

Figure 2 compares the sensory attributes of wines as a function of maceration time for the three maturity levels for Cabernet Sauvignon and Figure 3, for Tempranillo.

In the case of Tempranillo wines, astringency, bitterness, and mouthfeel tended to increase when macerations were longer. However, a decrease in mouthfeel was observed between the third and fourth weeks of maceration of the less ripe grapes. In contrast, no clear tendency was detected in the other sensory attributes, except in the case of the wines from the third harvest, in which vegetal notes increased with the maceration length. In the case of Cabernet Sauvignon wines, astringency and bitterness tended to increase when maceration

It seems quite logical that this increase in polysaccharide concentration came from two possible sources. The first was direct polysaccharide solubilization from skins due to the longer contact time, and the second was the release of yeast mannoprotein and polysaccharides. However, the analytical procedure used cannot distinguish among the different types of polysaccharide, so it is not possible to establish the extent to which they all contribute.

Figure 1 shows two cobweb diagrams that compare the sensory attributes of wines from both cultivars at the three different levels of grape maturity. The diagrams were built using the average value of the second and third weeks of maceration for each maturity level. In general, astringency, acidity, bitterness, and vegetal notes tended to decrease when the grapes were riper, whereas fruitiness and mouthfeel tended to increase. There were some exceptions to this behavior. For example, in Tempranillo wines the astringency of the second harvest was greater than that of

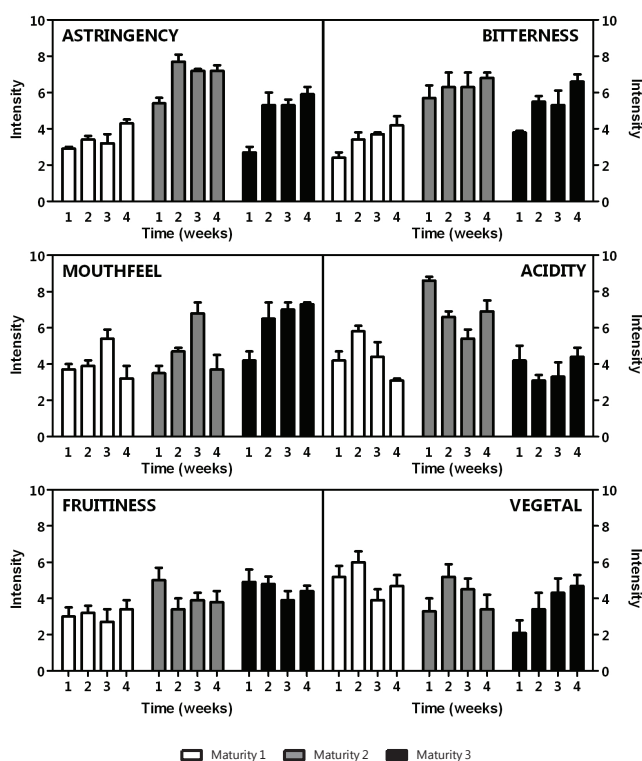


Figure 3. Sensory analysis results for the wines elaborated with Tempranillo, using three different maturity levels and four different maceration lengths.

was longer, although this was not so in all cases. The increase in astringency was particularly clear in the wines from the less ripe grapes, whereas no increase in bitterness was observed in the wines from the first harvest. Mouthfeel also tended to increase with maceration length, but this was less clear than in the case of Tempranillo. No clear trend was observed in acidity, fruitiness, or vegetal notes.

It can be concluded that grape maturity and maceration length really have a considerable influence on the color, chemical composition, and sensory quality of wines. In general, color intensity and the concentrations of anthocyanins, proanthocyanidins, and polysaccharides are higher when the grapes are riper. The changes in proanthocyanidins are also interesting inasmuch as the percentages of mDP and prodelphinidin are greater and the galloylation percentage is lower in wines from riper grapes. This suggests that grape maturity favors skin proanthocyanidin extraction. These chemical changes may explain the differences observed in some of the sensory attributes of these wines. Specifically, the decrease in astringency and bitterness may be associated with the increase in prodelphinidins and polysaccharides and with the decrease in the percentage of proanthocyanidin galloylation. On the other hand, when macerations were longer, color and anthocyanin concentration tended to decrease, whereas polysaccharide and proanthocyanidin concentration tended to increase. The mDP and prodelphinidin percentage also decreased and the galloylation percentage increased when the maceration time was longer. This suggests that the maceration length favors proanthocyanidin extraction from seeds. In this case, these chemical changes may also explain the differences observed in some of the sensory attributes. The increase in astringency and bitterness may be associated with the increase in proanthocyanidins and the percentage of galloylation, whereas the increase in mouthfeel may be related to the increase in polysaccharide concentration. Further studies are needed to better understand how maturity and maceration length influence the chemical composition of wine and, in particular, to understand the relationship between chemical composition and some of the key sensory attributes of red wines such as astringency, bitterness, and mouthfeel.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: + 34 977 55 87 96. Fax: + 34 977 55 86 86. E-mail: fernando.zamora@urv.cat.

Funding

We thank CICYT (AGL2011-29708-C02-01) and CDTI (Project CENIT Demeter) for financial support.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

- (1) Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E. J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 564–573.
- (2) Vidal, S.; Francis, L.; Noble, A.; Kwiatkowski, M.; Cheynier, V.; Waters, E. J. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 57–65.
- (3) Chira, K.; Schmauch, G.; Saucier, C.; Fabre, S.; Teissedre, P. Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 545–553.
- (4) Vidal, S.; Francis, L.; Williams, P.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E. J. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chem.* **2004**, *85*, 519–525.
- (5) Carvalho, E.; Mateus, N.; Plet, B.; Pianet, I.; Dufourc, E.; De Freitas, V. Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8936–8944.
- (6) Downey, M. O.; Dokoozlian, N. K.; Krstic, M. P. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 257–268.
- (7) Llaudy, M. C.; Canals, R.; Canals, J. M.; Zamora, F. Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in winesimulated macerations. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226*, 337–344.
- (8) Santos-Buelga, C.; Francis-Aricha, E. M.; Escribano-Bailón, M. T. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chem.* **1995**, *53*, 197–201.

- (9) Souquet, J. M.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Moutounet, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 509–512.
- (10) Gonzalez-Manzano, S.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 283–289.
- (11) Souquet, J. M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Les proanthocyanidins du raisin. *Bull. O.I.V.* **2000**, *73*, 601–609.
- (12) De Freitas, V.; Mateus, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 940–945.
- (13) De Freitas, V.; Mateus, N. Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *82*, 113–119.
- (14) Vidal, S.; Williams, P.; O'Neill, M. A.; Pellerin, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *45*, 315–323.
- (15) Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. Chapter 1: Cytology, taxonomy and ecology of grape and wine yeasts. In *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications*; Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., Eds.; Wiley: Chichester, U.K., 2006; Vol. 1, pp 1–51.
- (16) Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. Chapter 4: Lactic acid bacteria. In *The Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications*; Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., Eds.; Wiley: Chichester, U.K., 2006; Vol. 1, pp 115–137.
- (17) Francolí, S.; Buxaderas, S.; Pellerin, P. Influence of Botrytis cinerea on the polysaccharide composition of Xarel.lo musts and cava base wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 456–460.
- (18) Pellerin, P.; Cabanis, J. C. Les glucides. In *OEnologie; Fondements Scientifiques et Technologiques*; Flancy, C., Ed.; Lavoisier: Paris, France, 1998; pp 39–92.
- (19) Vidal, S.; Williams, P.; Doco, T.; Moutounet, M.; Pellerin, P. The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydr. Polym.* **2003**, *54*, 439–447.
- (20) Guadalupe, Z.; Ayestarán, B. Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of Tempranillo red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10720–10728.
- (21) Escot, S.; Feuillat, M.; Dulau, L.; Charpentier, C. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2001**, *7*, 153–159.
- (22) Perez-Magarino, S.; Gonzalez-San Jose, M. L. Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1181–1189.
- (23) Vicens, A.; Fournand, D.; Williams, P.; Sidhoum, L.; Moutounet, M.; Doco, T. Changes in polysaccharide and protein composition of cell walls in grape berry skin (cv. Shiraz) during ripening and over-ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2955–2960.
- (24) Ryan, J. M.; Revilla, E. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3372–3378.
- (25) Fernandez-López, J.; Hidalgo, V.; Almela, L.; Roca, J. M. L. Quantitative changes in anthocyanin pigments of Vitis vinifera cv. Monastrell during maturation. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, *58*, 153–155.
- (26) Downey, M. O.; Harvey, J. S.; Robinson, S. P. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2003**, *9*, 15–27.
- (27) Kennedy, J. A.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E. J.; Jones, G. P. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5348–5355.
- (28) Kontoudakis, N.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J. M.; De Freitas, V.; Zamora, F. Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chem.* **2011**, *124*, 767–774.
- (29) Nunan, K. J.; Davies, C.; Robinson, S. P.; Fincher, G. B. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta* **2001**, *214*, 257–264.
- (30) Silacci, M. W.; Morrison, J. C. Changes in pectin content of Cabernet Sauvignon grape berries during maturation. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 111–115.
- (31) Nunan, K. J.; Sims, I. M.; Bacic, A.; Robinson, S. P.; Fincher, G. B. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiol.* **1998**, *118*, 783–792.
- (32) Hanlin, R. L.; Hrmova, M.; Harbertson, J. F.; Downey, M. O. Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2010**, *16*, 173–188.

- (33) Bindon, K. A.; Kennedy, J. A. Ripening-induced changes in grape skin proanthocyanidins modify their interaction with cell walls. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2696–2707.
- (34) Pinelo, M.; Arnous, A.; Meyer, A. S. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 579–590.
- (35) Cadot, Y.; Minana-Castello, M. T.; Chevalier, M. Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during fruit development. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *29*, 9206–9215.
- (36) Canals, R.; Llaudy, M. C.; Valls, J.; Canals, J. M.; Zamora, F. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4019–4025.
- (37) Ayestarán, B.; Guadalupe, Z.; León, D. Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 29–39.
- (38) Parenti, A.; Spungnoli, P.; Calamai, L.; Ferrari, S.; Gori, C. Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *218*, 360–366.
- (39) Timberlake, C. F.; Bridle, P. The effect of processing and other factors on the colour characteristics of some red wines. *Vitis* **1976**, *15*, 37–49.
- (40) Morel-Salmi, C.; Souquet, J.; Bes, M.; Cheynier, V. Effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4270–4276.
- (41) Sacchi, K. L.; Bisson, L. F.; Adams, D. O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 197–206.
- (42) Kovac, V.; Alonso, E.; Bourzeix, M.; Revilla, E. Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1953–1957.
- (43) Yokotsuka, K.; Sato, M.; Ueno, N.; Singleton, V. L. Colour and sensory characteristics of Merlot red wines caused by prolonged pomace contact. *J. Wine Res.* **2000**, *11*, 7–18.
- (44) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubordieu, D. Chapter 6: Phenolic compounds. In *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments*; Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubordieu, D., Eds.; Wiley: Chichester, U.K., 2006; Vol. 2, pp 141–203.
- (45) Harbertson, J. F.; Kennedy, J. A.; Adams, D. O. Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 54–59.
- (46) Kennedy, J. A.; Matthews, M. A.; Waterhouse, A. L. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 268–274.
- (47) Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J. M.; Martínez- Cutillas, A.; Fernández-Fernández, J. I. Phenolic compounds and color stability of red wines: effect of skin maceration time. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *53*, 266–270.
- (48) Busse-Valverde, N.; Gomez-Plaza, E.; Lopez-Roca, J. M.; Gil- Munoz, R.; Bautista-Ortin, A. B. The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5450–5455.
- (49) Sampaio, T. L.; Kennedy, J. A.; Vasconcelos, M. C. Use of microscale fermentations in grape and wine research. *Am. J. Enol. Vitic.* **2007**, *58*, 534–539.
- (50) Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*; OIV: Paris, France, 2009; Vol. 1, pp 419.
- (51) Niketic-Aleksic, G. K.; Hrazdrina, G. Quantitative analysis of the anthocyanin content in grape juices and wine. *Lebensm. -Wiss. Technol.* **1972**, *5*, 163–165.
- (52) Ayala, F.; Echavarri, J. F.; Negueruela, A. I. A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rose wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, *48*, 357–363.
- (53) Ayala, F.; Echavarri, J. F.; Negueruela, A. I. MSCVes.zip. URL <http://www.unizar.es/negueruela/MSCV.es>, 2001.
- (54) Valls, J. Ph.D. thesis: Composició fenòlica en varietats negres de *Vitis vinifera*. Influència de diferents factors; Universitat Rovira i Virgili, 2004.
- (55) Kennedy, J. A.; Jones, G. P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1740–1746.

- (56) Kelebek, H.; Canbas, A.; Selli, S.; Saucier, C.; Jourdes, M.; Glories, Y. Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs. Bogazkere and Okuzgozu. *J. Food Eng.* **2006**, *77*, 1012–1017.
- (57) Otteneder, H.; Holbach, B.; Marx, R.; Zimmer, M. Identification of the grape variety in red wine by means of the anthocyanin composition. In *26th World Congress and 81st General Assembly of the Office International de la Vigne et du Vin*, Adelaide, South Australia, 2001; pp 181–191.
- (58) Rivas-Gonzalo, J. C.; Gutierrez, Y.; Hebrero, E.; Santos-Buelga, C. Comparisons of methods for the determination of anthocyanins in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1992**, *43*, 210–214.
- (59) Peyrot des Gachons, C.; Kennedy, J. A. Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5877–5881.
- (60) Bordiga, M.; Travaglia, F.; Locatelli, M.; Coisson, J. D.; Arlorio, M. Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chem.* **2011**, *127*, 180–187.
- (61) Hanlin, R. L.; Kelm, M. A.; Wilkinson, K. L.; Downey, M. O. Detailed characterization of proanthocyanidins in skin, seeds, and wine of Shiraz and Cabernet Sauvignon wine grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 13265–13276.
- (62) Fanzone, M.; Pena-Neira, A.; Gil, M.; Jofre, V.; Assof, M.; Zamora, F. Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. *Food Res. Int.* **2012**, *45*, 402–414.

Influence of Grape Maturity and Maceration Length on Polysaccharide Composition of Cabernet Sauvignon Wines

Mariona Gil[§], Manuel Quirós*, Pilar Morales*, Ramón Gonzalez*, Joan Miquel Canals[§], and Fernando Zamora[§]

Over the last decades has been growing interest about wine polysaccharides, mainly due to the positive impact that they could exert. Briefly, polysaccharides seem to increase mouthfeel, smooth astringency, and contribute to wine stabilization. Mainly there are two types of wine polysaccharides as a function of their origin: vegetable polysaccharides (those come from grape cell walls) and yeast polysaccharides (those come from yeast cell walls).[1] Yeast polysaccharides, usually called mannoproteins (MP), are mainly mannose polymers with a small protein portion. The main vegetable polysaccharides of wine correspond to the type II arabinogalactans (a highly branched polymer of galactose with arabinose terminal units, also called arabinogalactan proteins, AGP) and the type II rhamnogalacturonans (A complex polysaccharide composed by a linear rhamnose-galacturonic acid copolymer with four different side chains formed by different carbohydrate molecules, RG-II).[2,3] In spite of the great structural differences between these polysaccharide families, it is yet difficult to quantify each family separately. For that reason the analysis of wine polysaccharide composition is usually performed by acid hydrolysis of polysaccharides followed by an analysis of the monomeric composition by chromatographic techniques.[4]

Despite the increasing interest about wine polysaccharides, little is known about how the winemaking conditions affect the polysaccharide content and composition of wine. To highlight this concern, our group performed an experiment to evaluate the effect of grape maturity and maceration length over the phenolic composition and the polysaccharide content of cabernet sauvignon and tempranillo red wines.[5] The results of the aforementioned experiment show a slight increase in wine polysaccharide content with grape maturity, and a more acute increase with maceration length. Although these interesting data, the employed method to quantify the polysaccharide content of wines did not allow distinguishing among polysaccharide families. In order to attain a deeper knowledge of the influence of grape maturity and maceration length on the polysaccharide composition of red wines, the polysaccharides of cabernet sauvignon wines of the aforementioned experiment were

[§]Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Grup de Recerca en Tecnologia Enològica (Tecnol), Universitat Rovira i Virgili, Campus de Sescelades, C/Marcel·li Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

*Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC-UR-CAR), C/ Madre de Dios 51, 26006 Logroño, La Rioja, Spain

hydrolyzed and five monoglucosides (Galactose, Arabinose, Rhamnose, Glucose and Mannose) from the hydrolyzed samples were quantified by using the method described by Quirós et al. [6]

Since the analyzed wines stay two years bottled and stored in a dark cellar previously to this analysis, a new quantification of polysaccharides by HRSEC-RID was performed, but not differences about the amount of polysaccharides were found between the young wines (previously published in [5]) and the two years aged wine (data not shown), so it seems that polysaccharide content was not affected by ageing as previously described by Doco et al. [7]

Table1. Concentration of monomeric carbohydrates quantified after acid hydrolysis of wine polysaccharides. Results expressed as mg of monosaccharide per L of wine.

	Maceration weeks ^(a)	Maturity level of grapes ^(b)			Global
		1	2	3	
Gal	1	A 84.9 ± 2.9 a	B 95.0 ± 1.6 a	C 101.8 ± 0.9 a	93.9 ± 1.7 a
	2	A 81.2 ± 8.0 a	B 98.1 ± 4.5 ab	C 112.0 ± 1.6 b	97.1 ± 3.3 b
	3	A 84.5 ± 2.7 a	B 100.2 ± 1.7 b	C 116.8 ± 3.5 c	100.5 ± 3.2 c
	4	A 93.3 ± 5.8 b	B 107.6 ± 4.0 c	C 119.5 ± 3.8 c	106.8 ± 2.8 d
	Global	A 86.0 ± 1.4	B 100.2 ± 5.6	C 112.5 ± 1.5	p = 0.0001
Ara	1	A 86.2 ± 3.9 a	B 108.3 ± 5.7 a	C 123.8 ± 7.0 a	106.1 ± 3.9 a
	2	A 70.0 ± 19.1 a	B 132.0 ± 15.1 b	B 142.4 ± 28.1 ab	114.8 ± 9.1 a
	3	A 94.4 ± 29.0 a	B 150.3 ± 25.0 b	B 159.5 ± 16.9 b	134.7 ± 8.8 b
	4	A 123.6 ± 18.0 b	B 147.5 ± 8.2 b	C 198.1 ± 5.6 c	156.4 ± 8.0 c
	Global	A 93.6 ± 5.5	B 134.5 ± 4.6	C 155.9 ± 6.6	p = 0.0040
Rha	1	A 22.8 ± 2.2 a	B 27.4 ± 3.1 a	B 30.1 ± 3.3 a	26.8 ± 1.0 a
	2	A 18.9 ± 7.4 a	B 39.2 ± 6.6 b	B 35.0 ± 6.8 ab	31.0 ± 2.6 b
	3	A 25.2 ± 7.6 a	B 43.3 ± 9.1 b	B 38.4 ± 4.0 b	35.6 ± 2.4 c
	4	A 35.2 ± 5.6 b	A 41.1 ± 6.2 b	B 55.2 ± 4.9 c	43.8 ± 2.4 d
	Global	A 25.5 ± 1.7	B 37.8 ± 1.8	C 39.7 ± 1.3	p = 0.0001
Glu	1	A 5.4 ± 0.5 a	A 6.5 ± 1.6 a	A 6.2 ± 0.6 a	6.0 ± 0.2 a
	2	A 4.5 ± 0.6 a	B 5.7 ± 0.7 a	B 5.9 ± 0.4 a	5.4 ± 0.2 a
	3	A 5.1 ± 1.2 a	A 6.6 ± 1.4 a	A 6.5 ± 0.3 b	6.1 ± 0.3 a
	4	A 6.5 ± 0.6 b	A 7.5 ± 1.1 a	A 6.6 ± 0.3 b	6.8 ± 0.2 b
	Global	A 5.4 ± 0.2	B 6.6 ± 0.3	B 6.3 ± 0.5	p = 0.5800
Man	1	A 108.0 ± 1.6 a	A 103.8 ± 8.3 a	A 107.4 ± 4.4 b	106.4 ± 1.3 a
	2	B 116.1 ± 5.8 b	B 110.2 ± 8.1 a	A 101.7 ± 4.5 a	109.3 ± 2.0 a
	3	C 140.4 ± 3.8 c	B 126.6 ± 6.9 b	A 111.3 ± 3.2 b	126.1 ± 3.1 b
	4	B 134.2 ± 5.0 d	AB 128.1 ± 8.8 b	A 121.5 ± 4.6 c	127.9 ± 1.9 b
	Global	C 124.6 ± 2.8	B 117.17 ± 2.6	A 110.5 ± 1.7	p = 0.0001

(a) Lowcase letters indicates statistical differences ($p < 0.05$) between monosaccharide content among maceration weeks by one way ANOVA. (b) Capital letters indicates statistical differences ($p < 0.05$) between monosaccharide content among wines from grapes of different maturity levels by one way ANOVA.

Results about monosaccharide analysis from wine polysaccharides are shown in table 1 and figure 1 shows the results for the most abundant monosaccharides. Galactose (*Gal*) amount clearly increases with grape maturity. With the exception of the first harvest, *Gal* amounts

also increase with maceration length, suggesting a continuous release of *Gal* until the end of the maceration. Arabinose (*Ara*) concentration increases also with grape maturity level, but not statistical differences were observed between the second and the third harvest until the fourth week of maceration. As occurs with *Gal*, the release of *Ara* seems to be continuous with the exception of the first harvest, in which only the wines with four weeks of maceration show statistically higher amounts of *Gal* and *Ara*. *Gal* and *Ara* mainly come from AGP (vegetable origin). It has been reported information about changes occurred in grape cell walls during ripening, that causes a decrease of insoluble AGP and an increase of water soluble AGP throughout maturity.[8] Our results seem to reinforce the idea that grape maturity enhances the dissolution of AGPs from grape to wine during winemaking. Finally we note that if both *Gal* and *Ara* formed AGPs, it seems that the *Ara* proportion of the third harvest wines is lower than wines from the other harvests, which could indicate a modification of AGP structure throughout maturity.

Rhamnose (*Rha*) also has a vegetable origin, since it could come from pectic polysaccharides such as RG-II or RG-I (found in wines as free fragments of grape parietal RG-I [9] or as RG-I fragments bounded to the AGPs [10]). *Rha* concentration increases severely between the first and the second harvest, but not statistical differences were found between the second harvest and the third one, with the only exception of fourth week macerated wines. Focusing on maceration length, wines from the first harvest show a similar behavior than *Gal* and *Ara*, increasing statistically only in the fourth week of maceration. In contrast, the wines from the second harvest shows an increase of *Rha* content during the second week of maceration, and then *Rha* remains roughly constant. The wines from the third harvest show a continuous release of throughout maceration, with an acute increase between the third and the fourth weeks of maceration.

Taking into account the *Gal*, *Ara* and *Rha* results, it could be asserted that wines from ripper grapes contains higher amounts of vegetable polysaccharides, and those release from grape to wine seem continuous throughout maceration.

The glucose results don't show a clear trend with maturity level of grapes nor maceration length. Considering that all the analyzed monosaccharides come from polysaccharides (because purification by gel permeation chromatography was performed to remove the residual sugars of fermentation), the glucose could come from yeast β -glucans, from solubilized grape hemicelluloses or even from both sources. Taking its dual origin into account, it is quite logical that glucose doesn't show any statistical clear trend among grape maturity

nor among maceration length. Moreover, the observed glucose levels are really very low and do not seem to be of great enologic interest.

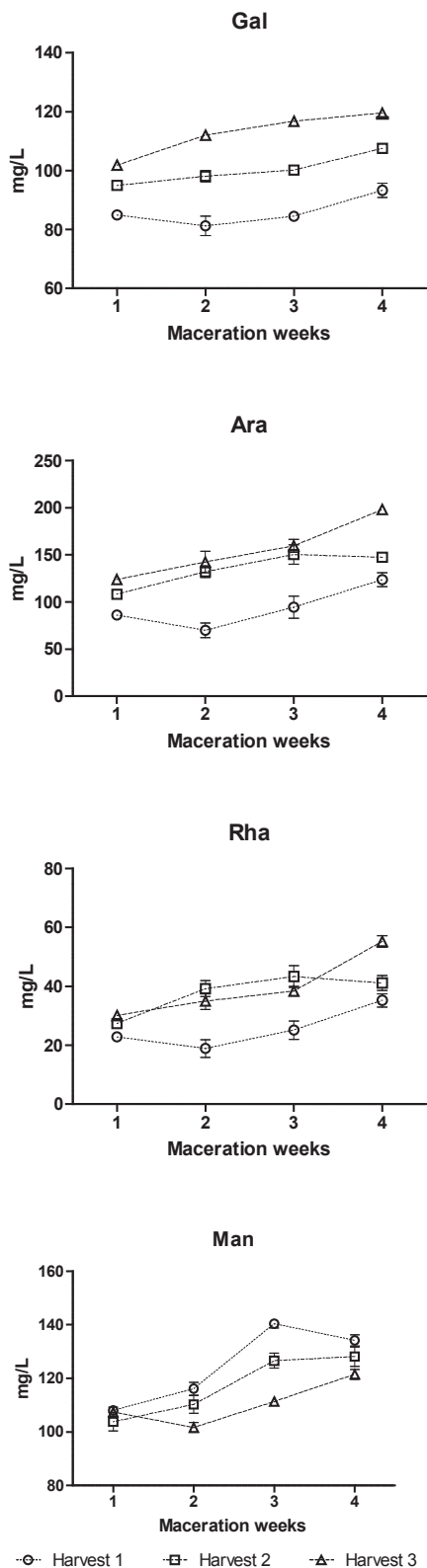


Figure 1. Concentration of the main quantified monosaccharides from wine polysaccharide hydrolysis.

Mannose is the main quantified monosaccharide, and it comes from yeast MP. As can be observed in the results of table 1, as well as in figure 1, it seems that a continuous release of mannoproteins among maceration occurs, which seems quite logical and agrees with previously published data.[2] On the other hand, looking at the behavior of mannose content among grape maturity, it seems that the higher the maturity level of grapes, the lower the MP content. This curious result could be related with the data published by Guilloux-Benatier et al. [11] which indicates that yeast production of macromolecules depends on the initial concentration of colloids in the fermentation medium. The results of Guilloux-Benatier et al. agree with our results, since it seems that yeasts produces less MP in the wines from ripper grapes, precisely those containing higher amounts of grape polysaccharides.

It can be concluded that grape maturity has a great influence in wine polysaccharide composition. The riper the grapes the higher total polysaccharide concentration. However, a different behavior exists depending on polysaccharide origin. It seems that the amount of vegetable polysaccharides in wines increases with grape maturity whereas MP behaves the opposite. It can be also asserted that maceration length exert a great

influence on all polysaccharide families. Our results indicate that both, vegetable polysaccharides as well as yeast MP, are continuously released which implies that long maceration wines are richer in polysaccharides.

METHODS. Experimental design and micro scale vinifications was described in [5]. The extraction and analysis of polysaccharides was performed as follows: 10 mL of wine was evaporated five times. After the evaporation, 10 mL of cold acidified absolute ethanol (0.3 M HCl) was added and the mixture was placed 24 hours at 4 °C. After that the samples were centrifuged (8500 rpm, 20 min) and the pellets recovered, washed three times with cold absolute ethanol, dissolved in 1 mL of ultrapure water and freeze-dried. All freeze-dried powder was dissolved in 3 mL of ultrapure water, passed through Econo-Pac® 10 DG desalting columns (BioRad). 4 mL was recovered from the desalting columns. An aliquot of 1.9 µL of the desalting column eluted fraction was evaporated under vacuum. The dry film obtained after evaporation was dissolved with 100 µL of sulfuric acid 1M and incubated during four hours at 100 °C, to perform the acid hydrolysis of polysaccharides. Once the reaction time is over, 900 µL of ultrapure water was added to hydrolyzed samples, and the mixture was passed through Strata NH₂ (55 µm, 70 Å, 500 mg / 3 mL) columns (Phenomenex) in order to eliminate the sulfuric acid. The sample volume recovered from the Strata NH₂ columns was 2 mL, filtered by syringe filters (0.22 µm pore size), and 25 µL was injected to the chromatographic system, conditioned and calibrated as described in [6]. The statistical analysis was performed by using the SPSS software. Student-Newman-Keuls method was used for ANOVA multiple comparisons. Statistics attached to the global data corresponds to a two way ANOVA analysis, showing the *p*-interaction value between maturity level and maceration length in the right-bottom cell of each monosaccharide table.

References

- [1] Doco T, Brillouet JM, Moutounet M (1996) *Am J Enol Vitic* 47:108-110
- [2] Guadalupe Z, Ayestarán B (2007) *J Agric Food Chem* 55:10720-10728
- [3] Vidal S, Williams P, Doco T, Moutounet M, Pellerin P (2003) *Carbohydr Polym* 54:439-447
- [4] Guadalupe Z, Martínez-Pinilla O, Garrido A, Carrillo JD, Ayestarán B (2012) *Food Chem* 131:367-374
- [5] Gil M, Kontoudakis N, González E, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, Zamora F (2012) *J Agric Food Chem* 60:7988-8001
- [6] Quirós M, Gonzalez R, Morales P (2012) *Food Chem* 134:1205-1210
- [7] Doco T, Quéllec N, Moutounet M, Pellerin P (1999) *Am J Enol Vitic* 50:25-32
- [8] Vicens A, Fournand D, Williams P, Sidhoum L, Moutounet M, Doco T (2009) *J Agric Food Chem* 57:2955-2960
- [9] Guadalupe Z, Ayestarán B (2007) *J Agric Food Chem* 55:10720-10728
- [10] Pellerin P, Vidal S, Williams P, Brillouet J- (1995) *Carbohydr Res* 277:135-143
- [11] Guilloux-Benatier M, Guerreau J, Feuillat M (1995) *Am J Enol Vitic* 46:486-492

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

CAPÍTULO II. Influencia del aclareo de racimos y el aclareo de bayas sobre la composición química del vino tinto.

El exceso de vigor, asociado a producciones abundantes que no llegan a alcanzar un buen grado de madurez fenólica, es uno de los problemas más frecuentes con los que se encuentra el viticultor. Para solventar este tipo de problemas, el sector se ha dotado de una serie de operaciones en verde entre las que destacan las técnicas de aclareo. Si bien el aclareo de racimos es una técnica habitual y sobre la cual existe una gran cantidad de literatura científica, el aclareo de bayas o despunte de racimos es una técnica mucho menos popular sobre la cual existe, hoy en día, muy poca información científica.

En este capítulo se aborda el objetivo número 3, en el que se plantéo evaluar el impacto de dos

técnicas vitícolas (aclareo de racimos y aclareo de bayas) para la reducción del rendimiento de la cosecha sobre la composición química del vino tinto. Para ello se seleccionó una parcela de la variedad Syrah con problemas de vigor excesivo y sobreproducción y se seleccionaron tres bloques representativos. En el primer bloque no se realizó ningún tratamiento de aclareo para obtener el vino control, en el segundo bloque se realizó un aclareo del 50 % de los racimos durante el envero, y en el tercer bloque se se procedió a cortar la punta de todos los racimos justo después del cuajado. Las uvas de cada bloque fueron cosechadas el mismo día, y cada bloque se vinificó por separado con el fin de analizar los vinos.

Las analíticas de los vinos obtenidos fueron realizadas en el laboratorio del grupo de Tecnología Enológica (TECNENOL) del Departamento de Bioquímica i Biotecnología de la Universitat Rovira i Virgili (URV, Tarragona) y en Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA) de la Escuela de Ingenieros Agrónomos de la Universidad de Castilla la Mancha (UCLM, Ciudad Real). Los resultados del ensayo fueron publicados en el *Journal of Agricultural and Food Chemistry* en el artículo titulado “**Effect of Two Different Treatments for Reducing Grape Yield in *Vitis vinifera* cv Syrah on Wine Composition and Quality: Berry Thinning versus Cluster Thinning**”

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

Effect of Two Different Treatments for Reducing Grape Yield in *Vitis vinifera* cv Syrah on Wine Composition and Quality: Berry Thinning versus Cluster Thinning

M. Gil,[†] M. Esteruelas,[†] E. González,[†] N. Kontoudakis,[†] J. Jiménez,[‡] F. Fort,[†] J. M. Canals,[†] I. Hermosín-Gutiérrez,[§] and F. Zamora^{*,†}

[†] Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Grup de Recerca en Tecnologia Enològica (Tecnol), Universitat Rovira i Virgili, Campus de Sescelades, C/Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

[‡] Juvé y Camps SA. C/Sant Venat, 1. 08770 Sant Sadurní d'Anoia, Barcelona, Spain

[§] Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA), Escuela de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Castilla-La Mancha, Ronda de Calatrava 7, 13071 Ciudad Real, Spain

Received: February 14, 2013

Revised: April 23, 2013

Accepted: April 30, 2013

Published: April 30, 2013

ABSTRACT: The influence of two treatments for reducing grape yield – cluster thinning and berry thinning – on red wine composition and quality were studied in a *Vitis vinifera* cv Syrah vineyard in AOC Penedès (Spain). Cluster thinning reduced grape yield per vine by around 40% whereas berry thinning only reduced it by around 20%. Cluster thinning grapes had higher soluble solids content than control grapes and their resultant wines have a greater anthocyanin and polysaccharide concentrations than control wine. Wine obtained from berry thinning grapes had a higher total phenolic index, greater flavanol, proanthocyanidin and polysaccharide concentrations, and lower titratable acidity than control wine. Wines obtained from both treatments were sufficiently different from the control wine to be significantly distinguished by a trained panel in a triangular test. Even though both treatments seem to be effective at improving the quality of wine, berry thinning has the advantage because it has less impact on crop reduction.

KEYWORDS: Cluster thinning, Berry thinning, Wine composition, Wine quality, Polyphenols, Polysaccharides

INTRODUCTION

Grape is the raw material of wine production and, therefore, grape quality directly affects wine composition and quality. It is well known that some families of chemical compounds from grapes are closely related to such sensory attributes of wine as color and tasting perceptions as bitterness, astringency and mouthfeel. The color of red wine is mainly due to anthocyanins¹ and other derived pigments.² However, wine color is also influenced by other phenolic compounds, such as phenolic acids, flavonols and flavanols, which exert a copigmentation effect.³ Flavanols and their polymers (proanthocyanidins) have also been related to the bitterness and astringency of wine,⁴ and some relations has been established between these perceptions and the proanthocyanidin structures.⁵ As well as polyphenols, the polysaccharide family of grape compounds also has an effect on buccal sensations. Specifically it has been reported that polysaccharides smooth astringency and increase mouthfeel.⁶

A range of studies have established close relations between grape maturity and wine composition, and shown the importance of grape maturity in wine quality. On the one hand, anthocyanin synthesis starts during veraison and remains active throughout grape ripening, which causes gradual accumulation in grape skins.⁷ The same thing happens with flavonols.⁸ On the other hand, proanthocyanidin content is highest at veraison and subsequently decreases until just before complete ripeness, after which time it remains relatively constant.⁸ The structure of proanthocyanidins depends on their origin: while seed proanthocyanidins⁹ are smaller polymers made up of (+)-catechin, (–)-epicatechin and (–)-epicatechin-3-gallate, skin proanthocyanidins¹⁰ also contain (–)-epigallocatechin and a much lower proportion of (–)-epicatechin-3-gallate. Therefore, skins release procyanidins and prodelphinidins with a higher mean degree of polymerization (mDP) whereas seeds only release procyanidins with a higher proportion of galloylation and a lower mDP. Throughout maturity, the progressive enzymatic degradation¹¹ of skin cell walls has a double effect: it increases the presence of soluble polysaccharides¹² and also improves the phenolic extraction¹³ of skins into red wine during maceration. In contrast, seed proanthocyanidin

extraction diminishes with ripening probably because of oxidation phenomena and gradual seed lignification¹⁴ which prevent them from dissolving in the wine. It is generally accepted that seed proanthocyanidins are much more astringent (because of their large content of galloylated units) and bitter (probably due to their lower mDP) than skin proanthocyanidins, so it is quite logical that riper grapes lead to better quality wines.

Consumers value deeply colored and full-bodied red wines. To make wines of this nature, grapes need to be just ripe enough from both the technological and the phenolic point of view. When grapes are well-ripe, many techniques are available for winemakers to improve color and phenolic compound extraction,¹⁵ and produce full-bodied and deeply colored red wines with balanced bitterness and astringency. However, if grapes are not well-ripe, winemakers have few options: excessive maceration makes the wine too bitter and astringent,¹⁶ while too little maceration leads to bodiless and lightly-colored red wines.

One of the most important factors to bear in mind if wines are to be of high quality is grape ripening and, because of this importance, a series of cultural practices have been developed over the years to improve it. Factors such as crop level and the ratio between leaf area and total fruit weight per plant are regarded as being essential to control and ensure the correct maturity and development of berries.¹⁷ Several studies have attempted to relate both parameters with wine composition and sensorial quality. It is well known that a vigorous canopy growth (and consequent low cluster-light exposure) can lead to lower grape quality.¹⁸ This vigorous canopy growth can be controlled by such practices as leaf removal and/or summer pruning. Likewise, it is well accepted that very high crop yields delay ripening and reduce fruit and wine quality.¹⁹ Plant yield can be controlled by such practices as winter pruning and corrected with summer practices such as cluster thinning. All these techniques represent an additional cost because of the workforce required. In the particular case of cluster thinning, this additional cost is especially acute because production is lower.²⁰

Despite the economic impact of cluster thinning, it is a common practice, and several studies have been carried out to determine the effect it has on grape maturity and wine composition and quality. It has been clearly demonstrated that cluster thinning can not only advance grape maturity²¹ but also improve grape composition from a phenolic point of view.²² It seems to be very effective with cultivars that tend to over crop,²³ because it improves the phenolic content of grapes and, therefore, the phenolic content of wine. It has been suggested recently that the effectiveness of cluster thinning is related to the vine water regime²⁴ and this may explain why the positive effect of cluster thinning often depends on the vintage.²⁵ Besides improving the phenolic content of grapes, cluster thinning tends to diminish acidity and increase soluble solids and pH.²⁶ However, it should be pointed out that cluster thinning usually increases the grape size,²⁷ which decreases the skin-to-pulp ratio and, therefore, the positive effect on wine quality.

An alternative to traditional cluster thinning practices to improve grape maturity is berry thinning.²⁸ This practice consists of removing the tips of all the clusters just after flowering to obtain blunted clusters of grapes. This is done because some studies ascribe a better,²⁹ and earlier³⁰ maturity of grapes from the shoulders and the top of the cluster than from the tips.

Although some scientific articles discuss the influence of berry thinning on grape maturity, to our knowledge they all focus on table grapes³¹ and none of them have studied the influence of this practice on the quality of red wines.

The aim of this paper was to determine the effect of cluster thinning and especially of berry thinning on grape production and wine quality. This study was performed in a vineyard of *Vitis vinifera* cv Syrah which have got problems of over production and insufficient maturity during last years in order to determine if these treatments may be useful for advancing ripeness and consequently obtaining wines of better quality.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Equipment. Methanol, acetonitrile, formic acid and acetic acid were of HPLC grade (>99%) and purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Acetaldehyde, poly(vinylpyrrolidone), phloroglucinol, ascorbic acid, sodium acetate and ammonium formate were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). The commercial

standards were from Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany): malvidin 3-glucoside, trans-caftaric acid, caffeic and p-coumaric acids, trans-resveratrol, and trans-piceid. Absolute ethanol and hydrochloric acid were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Commercial standards of kaempferol, quercetin, isorhamnetin, myricetin and syringetin, and the 3-glucosides of kaempferol, quercetin, isorhamnetin, syringetin, proanthocyanidin dimer B2, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin and (-)-epicatechin-3-O-gallate were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Other non commercial flavonol standards (myricetin 3-glucoside and quercetin 3-glucuronide) were kindly supplied by Dr. Ullrich Engelhardt (Institute of Food Chemistry, Technical University of Braunschweig, Germany). The trans isomers of resveratrol and piceid (resveratrol 3-glucoside) were transformed into their respective cis isomers by UV-irradiation (366 nm light for 5 min in quartz vials) of 25% MeOH solutions of the trans isomers. Vitisin A (10-carboxy-pyranomalvidin-3-glucoside) and 10-p-monohydroxyphenyl-pyranomalvidin-3-glucoside (MHP-pymv-3-glc) were quantified using previously obtained standards.³² A pullulan calibration kit Shodex P-82 (P-5, Mw=5.9 kDa; P-10, Mw=11.8 kDa; P-20, Mw=22.8 kDa; P-50, Mw=47.5 kDa; P-100, Mw=112 kDa; P-200, Mw=212 kDa; P-400, Mw=404 kDa; P-800, Mw=788 kDa) was obtained from Waters (Barcelona, Spain), while a pullulan 1.3 kDa and four dextrans BioChemika (12, 25, 50 and 80 kDa) were obtained from Fluka (St. Louis, Missouri). The polysaccharides used as external standards for quantification were pectins from citrus fruit and dextrans synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). The HPLC analysis for proanthocyanidins and polysaccharides was performed using an Agilent 1200 Series liquid chromatograph equipped with a G1362A refractive index detector (RID), a G1315D diode array detector (DAD), a G1311A quaternary pump, a G1316A column oven, and a G1329A autosampler (Agilent Technologies, Santa Clara, California). Low molecular weight wine phenolic compounds (namely, anthocyanin and non-anthocyanin phenolics) were HPLC separated, identified and quantified on an Agilent 1100 Series system (Agilent, Germany), equipped with DAD (G1315B) and LC/MSD Trap VL (G2445C VL) electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MSn), and coupled to an Agilent Chem Station (version B.01.03) data-processing station. The mass spectra data were processed with the Agilent LC/MS Trap software (version 5.3). All the spectrophotometric measurements were performed using a Helios Alpha UV-vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts).

Vineyard. The experiment was carried out in a *Vitis vinifera* cv Syrah vineyard on the Juvé & Camps estate in Mediona (AOC Penedès; 41°31' 30.1080" (N) and 1°42'47.4516" (E)) during the 2011 vintage. The vineyard is located at an altitude of 600 meters above sea level. The grapevines, grafted on 110 Richter rootstock, were planted in 2004, trained on a vertical trellis system, pruned using unilateral Royat cordon system, and arranged in north-south rows spaced 2.60 m apart, with 1.0 m between plants in the row. The vineyard was managed according to standard viticultural practices for the cultivar and region. Winter pruning was carried out leaving 10 buds per vine. Canopy management practices were all performed manually.

Vine treatments. Three representative and consecutive rows were selected for this assay. The first one was the control, the second one was used for cluster thinning and the third row was used for berry thinning. Berry thinning was carried out when grapes were pea size (June 10) by cutting the tip of all the clusters roughly in half (Type II) according to the procedure described by Winkler.²⁸ Cluster thinning was carried out at mid veraison (August 14) by cutting 50% of the clusters.

Harvest. Grapes were harvested manually on October 18 when it was considered that they were sufficiently ripe (around 13.5% of potential ethanol content). Grapes from each vine were weighed to determine the plant yields for each treatment. All the grapes from each treatment were mixed together after weighing so as to obtain more homogeneous samples for further analysis and winemaking. The grapes were immediately transported to the experimental winery of the Enology Faculty of the Rovira i Virgili University in Constantí (Tarragona).

Clusters characterization For each treatment ten clusters were randomly selected and weighed. Then, clusters were manually destemmed in order to determine the weight proportion of stems and grapes.

Wines. Nine microvinifications were carried out in an attempt to study how the vine treatment (cluster thinning and berry thinning) influenced wine composition and quality. The berries for each vine treatment were manually destemmed and randomly distributed in three groups of six kilograms each, crushed with a semi-automatic crusher machine (Gual, Villafranca del Penedès, Spain), sulphited (100 mg of K₂S₂O₅/Kg) and placed in eight liter tanks equipped with a submerged cap system in accordance with the winemaking method described by Sampaio et al.³³ All tanks were immediately inoculated with 200 mg/Kg of selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast (EC1118, Lallemend Inc, Montreal, Canada) and maintained at a room temperature of 25 ± 1 °C. All these microvinifications were controlled daily by measuring the temperature and the density of the juice using a portable density meter (METTLER TOLEDO, L'Hospitalet de Llobregat, Spain). The cap was mechanically punched down once around 1040 density units in order to improve color extraction. After 2 weeks of maceration, the wines were racked. Once alcoholic fermentation had completely finished, wines were sulphited (100 mg of K₂S₂O₅/L) and maintained at 4 °C for three months to allow tartaric salts to stabilize. Hence, malolactic fermentation was inhibited to avoid any variations introduced by it. Subsequently, wines were bottled and stored in a dark cellar at 15 °C until analysis.

Grapes characterization. For each vine treatment, a triplicate of 100 manually destemmed grapes was used. The weight of one hundred grapes was established by using an analytical scale. The volume of one hundred grapes was established by the displacement of a known volume of water into a graduated cylinder. The theoretical surface (S) of skins was calculated from the previously measured berry volume and assuming that the berries were perfect sphere ($S = 4\pi \cdot [3v/4\pi]^{2/3}$). The ratio between berry surface and volume was calculated by dividing the theoretical surface by the average berry volume. To determine the grape density distribution, twelve solutions of sucrose dissolved in distilled water between 1070 mg/mL and 1125 mg/mL (every five mg) were prepared. One hundred berries were placed in the less dense solution (1070 mg/mL). The floating berries were considered to have a lower density than the solution.

They were separated from the berries that sank and counted. Then, the berries that sank were removed and placed in the next denser solution (1075 mg/mL). The same process was repeated with all sucrose solutions. All these measurements were carried out in triplicate.

Standard grape juice and wine analysis. The titratable acidity was measured by titrimetry using NaOH 0.1N and bromothymol blue as indicator. pH values were determined by a pH meter Basic-20 (CRISON, Barcelona, Spain). Soluble solids of grape juice were determined by refractometry and the ethanol content of wine was determined by ebulliometry (GAB system, Barcelona Spain). The total polyphenol index (TPI) was analyzed by measuring the 280 nm absorbance of a 1:100 dilution of wine with a spectrophotometer, using a 10 mm quartz cuvette and multiplying the absorbance value by 100 as described by Ribéreau-Gayon et al.³⁴

Color parameters. Twenty µL of a 10% (v/v) solution of acetaldehyde was added to 2 mL of wine sample in order to avoid sulphite interferences. After 20 min of incubation spectrophotometric measurements were made using a 1 mm quartz cuvette. The color intensity (CI) was estimated using the method described by Glories.³⁵ The CIELAB coordinates, lightness (L*), chroma (C*), hue (h*), red-greenness (a*) and yellow-blueness (b*) were determined according to Ayala et al.³⁶ and the data were processed with the MSCV® software.³⁷ All absorbance measurements were taken with a Helios Alpha (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) UV-vis spectrophotometer.

Analysis of low molecular weight phenolic compounds. Sample preparation: Anthocyanin-free wine fractions were isolated from diluted red wines (3 mL wines and 3 mL of HCl 0.1N) following the procedure previously described by Castillo-Muñoz et al.³⁸ using SPE cartridges (Oasis MCX cartridges, Waters Corp., Milford, MA; 6 mL cartridges filled with 500 mg of adsorbent). The eluate containing non-anthocyanin phenolic compounds was dried in a rotary evaporator (35 °C), re-dissolved in 3 mL of 25% methanol and stored at -18 °C until use. These anthocyanin-free fractions were used to analyse non-anthocyanin phenolic compounds, with the exception of flavan-3-ols.

HPLC-DAD-ESI-MSⁿ analysis of wine phenolic compounds: All the standards were used for identification and quantification using calibration curves. All the expected concentration ranges were covered (usually 0-100 mg/L, with the exception of malvidin 3-glucoside covering a range of 0-1000 mg/L). When a standard was not available, the quantification was made using the calibration curve of the most similar compound (with subsequent molecular mass correction): malvidin 3-glucoside was used for all native grape anthocyanins; vitisin A was used for vitisin B; *p*-coumaric acid was used for coutaric acids; flavonol 3-glycosides with non-available standard as their corresponding 3-glucoside derivatives. Anthocyanins and non-anthocyanin phenolic compounds were analyzed separately after the previously described methods had been adapted^{38, 39} for narrow bore, smaller particle size, chromatography columns. The samples were injected (10 µL for anthocyanin analysis after a 4:1 dilution of wine with HCl 0.1 N; 20 µL of anthocyanin-free wine fraction for the analysis of non-anthocyanin phenolics) after filtration (0.20 µm, polyester membrane, Chromafil PET 20/25, Machery-Nagel, Düren, Germany) on a reversed-phase column Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 × 150 mm; 3.5 µm particle; Agilent, Germany), thermostated at 40 °C. The flow rate was 0.19 mL/min. The solvents were: solvent A (acetonitrile/water/formic acid, 3:88.5:8.5, v/v/v), solvent B (acetonitrile/water/formic acid, 50:41.5:8.5, v/v/v), and solvent C (methanol/water/formic acid, 90:1.5:8.5, v/v/v). The linear solvents gradient for anthocyanin analysis was: zero min, 94% A and 6% B; 10 min, 70% A and 30% B; 30 min, 50% A and 50% B; 34 min, 100% B; 36 min, 100% B; 42 min, 96% A and 4% B; 50 min, 96% A and 4% B. The linear solvents gradient for non-anthocyanin analysis was: zero min, 98% A and 2% B; 8 min, 96% A and 4% B; 37 min, 70% A, 17% B and 13% C; 51 min, 50% A, 30% B and 20% C; 51.5 min, 30% A, 40% B and 30% C; 56 min, 50% B and 50% C; 57 min, 50% B and 50% C; 64 min, 96% A and 4% B. For identification, ESI-MSⁿ was used in both positive (anthocyanins) and negative (flavonols, hydroxycinnamic acid derivatives, and stilbenes) ion modes. The following parameters were set: dry gas, N₂, 8 L/min; drying temperature, 325 °C; nebulizer, 50 psi; ionization and fragmentation parameters were optimized by direct infusion of appropriate standard solutions (malvidin-3-glucoside and quercetin-3-glucoside for positive and negative ionization modes, respectively); scan range, 50-1200 m/z. Identification was mainly based on spectroscopic data (UV-vis and MS/MS) that had been obtained from authentic standards or previously reported.^{39, 40} For quantification, DAD-chromatograms were extracted at 520 (anthocyanins), 360 (flavonols) and 320 nm (hydroxycinnamic acid derivatives and stilbenes). Analyses were performed in duplicate.

Proanthocyanidin analysis. Acid-catalysed depolymerisation of proanthocyanidins in the presence of an excess of phloroglucinol was used to analyze the proanthocyanidin content, their monomeric composition and their mean degree of polymerization (mDP), as described by Kennedy and Jones.⁴¹ Ten milliliters of wine was evaporated under a low-pressure vacuum (Univapo 100 ECH, Uni Equip, Germany). Then, it was resuspended in 6 mL of distilled water and applied to Set Pak Plus C18 Environmental cartridges (Waters, Milford, Massachusetts) that had previously been activated with 10 mL of methanol and 15 mL of water. The samples were washed with 15 mL of distilled water, and then the proanthocyanidins were eluted with 12 mL of methanol, immediately evaporated under a vacuum, and redissolved in 2 mL of methanol. Finally, 100 µL of this sample was reacted with a 100 µL phloroglucinol solution (0.2 N HCl in methanol, containing 100 g/L phloroglucinol and 20 g/L ascorbic acid) at 50 °C for 20 min. The reaction was stopped by adding 1000 µL of 40mM aqueous sodium acetate. Reversed-phase HPLC analysis (Agilent series 1200 HPLC-DAD) was carried out with an Agilent Zorbax Eclipse XDBC18, 4.6 x 250 mm, 5 µm column (Agilent Technologies, Santa Clara, California) as described below and the injection volume was 30 µL. The solvents used were 1% aqueous acetic acid (solvent A) and methanol (solvent B) at a flow rate of 1 mL/min. The elution conditions were 1.0 mL/min. Elution was performed with a gradient starting at 5% B for 10 min, a linear gradient from 5 to 20% B in 20 min, and a linear gradient from 20 to 40% B in 25 min. The column was then washed with 90% B for 10 min and re-equilibrated with 5% B for 5 min before the next injection. The monomers (+)-

catechin, (-)-epicatechin, and (-)-epicatechin-3-*O*-gallate were identified by comparing their retention times with those of the pure compounds. The phloroglucinol adducts of (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, and (-)-epicatechin-3-*O*-gallate were identified by their retention time (described in the literature) and confirmed through an HPLC-MS analysis. Analyses were performed with the Agilent 1200 series HPLC using an Agilent 6210 time-of-flight (TOF) mass spectrometer equipped with an electrospray ionization system (ESI). Elution was carried out under the same HPLC analysis conditions as described below. The capillary voltage was 3.5 kV. Nitrogen was used both as a dry gas at a flow rate of 12 L/min at 350 °C and as a nebulizer gas at 60 psi. Spectra were recorded in positive ion mode between *m/z* 50 and 2400. This assay was also carried out without the addition of phloroglucinol to measure the flavan-3-ol monomers that are naturally present in wine. The number of terminal subunits was considered to be the difference between the total monomers measured in normal conditions (with phloroglucinol) and thus obtained when the analysis was performed without phloroglucinol addition. The number of extension subunits was considered as the addition of all the phloroglucinol adducts. The mean degree of polymerization (mDP) was calculated by adding terminal and extension subunits (in moles) and dividing by the terminal subunits. Because acid catalysis with phloroglucinol is not completely efficient, the real yield of the reaction was measured using a pure B2 proanthocyanidin dimer [(-)-epicatechin-(4→8)-(-)-epicatechin]. This yield was used to calculate the total proanthocyanidin concentration from wine.

Polysaccharide analysis. Wine samples were processed using the methodology described by Ayestarán et al.⁴² Briefly, 10 mL of wine was centrifuged (8500 rpm, 20 min) in a Biofuge Primo (Heraeus, Hanau, Germany) and the supernatant concentrated to a final volume of 2 mL using a vacuum evaporator (Univapo 100ECH, Uniequip, Martinsried, Germany). Total soluble polysaccharides were precipitated by addition of 10 mL cold acidified ethanol (0.3 M HCl in absolute ethanol) and kept for 24 h at 4 °C. Then, the samples were centrifuged (8500 rpm, 10 min, 4°C), the supernatants were discarded, and the pellets were washed four times with cold ethanol to remove the interfering materials. Finally, the precipitates were dissolved in 1 mL of ultra pure water, frozen to -80 °C and freeze-dried using a Christ Alpha 1-4 (Martin Christ, Osterode am Harz, Germany). In order to determine the molecular distribution and quantify the polysaccharides obtained from wines, the soluble fractions were analyzed by high-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC) using a refraction index detector (RID). The lyophilized samples were resuspended in 1 mL of 30mM ammonium formate, filtered through a 0.45 µm pore size nylon membrane, and then 100 µL was injected onto the column. Separation was carried out at 20 °C using two Shodex OHpak SB-803 HQ and SB-804 HQ columns connected in series (300mm×8 mmI.D.; Showa Denko, Japan). The mobile phase consists of an aqueous solution of 30 mM ammonium formate applied with a constant flow of 0.6 mL/min for 60 min, and the temperature of cell RID was 35 °C. The molecular weight distribution of the wine fractions was followed by calibration with pullulan and dextran standards of different molecular weight (see above). The polysaccharides were quantified according to the peak area for each fraction, using the external standard method with pectin and dextran commercial standards. The calibration curve was obtained by injection of standard solutions, under the same conditions as for the samples analyzed, in the range between 0 and 2 g/L.

Sensory analysis. All the wines were tasted by a group of 24 expert oenologists from the Rovira i Virgili University 12 months after bottling. Three triangular tests were performed comparing the three wines in pairs.

Statistics. All the physical and chemical data are expressed as the arithmetic average ± the standard deviation. In the case of yield production the statistics were drawn up from data from 20 vines. In the case of cluster characterization the statistics were drawn up with data from 10 clusters. All the remaining statistics, grapes, grape juice and wines, were done in triplicate. One-factor analysis of variance (ANOVA) was carried out with SPSS software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), and comparison between samples were performed by using the least squares differences (LSD) post-hoc test. The level of significance of the sensory triangle tests was determined using Jackson's method.⁴³



Figure 1. Appearance of clusters for each experimental condition. C: Control. D: Berry thinning. A: Cluster Thinning.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the yield production per vine of three experimental conditions. As expected, both of the treatments for reducing grape yield decreased the grape production per vine although this was only statistically significant in the case of cluster thinning. Specifically, berry thinning reduced yield by only 22% whereas cluster thinning reduced it by 43% with respect to the control.

Several articles have been published on the effect of cluster thinning on vine yield production and our data is generally very similar to those described by other authors.^{23, 44} Very little information exists about the influence of berry thinning on yield production, all of which was obtained using table grapes. Moreover, all this information was published a long time ago. Specifically, Winkler^{28, 45} reported a decrease in yield production of around 20-30% which is in agreement with our results. Our data indicate that berry thinning decreases production less than cluster thinning, which is an advantage from the economic standpoint.

Table1. Yield Values and Cluster and Berry Characterization for Each Experimental Condition. Different Letters in a Row Indicates Statistical Differences ($p < 0.05$) Between Experimental Conditions.

	Parameter	Control	Berry Thinning	Cluster Thinning
Vine Yield	Yield ^a	1.88 ± 0.53, b	1.47 ± 0.56, ab	1.08 ± 0.24, a
	Yield Reduction ^b	-	22%	43%
Cluster Characterization	% Stems ^c	6.0 ± 1.2, a	6.1 ± 0.6, a	6.6 ± 1.3, a
	% Berries ^d	94.0 ± 1.2, a	93.9 ± 0.6, a	93.4 ± 1.3, a
	Changes in Weight per cluster ^e	-	-18.77%	+18.83%
Berry Characterization	m ₁₀₀ ^f	169 ± 10, a	181 ± 9, ab	186 ± 5, b
	V ₁₀₀ ^g	152 ± 10, a	165 ± 5, ab	168 ± 8, b
	S/V ^h	2.51 ± 0.22, a	2.27 ± 0.14, a	2.19 ± 0.09, a

^a Yield expressed as Kg/vine | ^b Yield reduction for each treatment respect the control | ^c Percentage (W/W) of stems in grape clusters | ^d Percentage (W/W) of berries in grape clusters | ^e Changes in weight per cluster for each treatment respect the control | ^f Weight of 100 berries expressed as g | ^g Volume of 100 berries expressed as mL | ^h Theoretical ratio skin surface/berry volume expressed as cm²/mL

Data about cluster characterization is shown in Table 1. No significant differences were found in the proportion of grapes versus stems in any of the experimental conditions. However, grape bunches were around 19% heavier after cluster thinning. This increase in bunch weight in cluster thinning vines is in agreement with previous data.^{21, 46} In contrast, the average weight of bunches in berry thinning vines was approximately 19% lighter than those in control vines. In general this reduction is very similar to the little information available in the literature on the subject.^{28, 45, 47} These bunch weight variations were in agreement with the observed yield production per vine. In the case of cluster thinning, it must be taken into account that half of clusters were removed which should theoretically reduce production by half. However, the real decrease in production was somewhat lower because the bunches treated in this way were heavier on average than the controls. Similar results have been described by other authors^{46, 48} who have attributed this phenomenon to the fact that the vines distribute the resources available among a smaller number of grapes.³¹

The application of these treatments in the vineyard modified the appearance of the clusters, at least in the case of berry thinning (see Figure 1). As expected, after berry thinning clusters were more rounded since

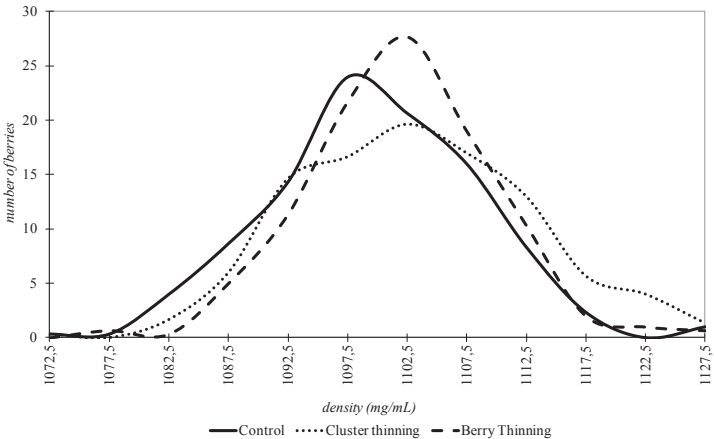


Figure 2. Density distribution of berries for each experimental condition.

the tip had been cut. No evident visual differences between control and cluster thinning were detected. However, some differences were found when the berries were characterized. Specifically, the weight and the volume of the berries from the cluster thinned vines were significantly higher (10%) than those from control vines. These data are in agreement with the increase in the weight of bunches mentioned above. A similar tendency was observed in grapes from berry thinning vines (7%) although in this case differences were not significant. Although the theoretical surface/volume ratio of the berries seemed to be lower in berries from both treatments than in controls, no significant differences were detected in any of the experimental conditions.

Table 2. Grape Juice Characterization for the Three Experimental Conditions. Different Letters in a Row Indicate Statistical Differences ($p < 0.05$) Between Treatments

	Control	Berry thinning	Cluster thinning
pH	3.33 ± 0.04, a	3.41 ± 0.07, ab	3.46 ± 0.01, b
Titrateable acidity^a	4.4 ± 0.2, b	3.9 ± 0.2, a	3.6 ± 0.1, a
Soluble solids^b	21.73 ± 0.46, a	22.42 ± 0.49, ab	22.57 ± 0.20, b
Initial density of grape juice^c	1095.2 ± 1.2, a	1098.1 ± 2.2, a	1098.2 ± 0.8, a

^a Titrateable acidity expressed as g/L of tartaric acid | ^b Soluble solids expressed as °Brix | ^c Initial density of grape juice expressed as mg/mL

Figure 2 shows the density distribution curve of berries in the three experimental conditions. In all the cases a classical Gaussian bell curve is observed which confirms the expected heterogeneity in the maturity of the berry grapes. These data have been previously described⁴⁹ and indicate that in any grape crop there is always a certain proportion of unripe and overripe grapes. Analyzing the geometry of these curves, it can be observed that the height of the control curve is maximum at a lower density than both treatments. This confirms that both cluster thinning and berry thinning advance the maturity of the grapes. Moreover, berry thinning presents a more symmetrical, narrower and higher curve, which indicates lower heterogeneity. In principle this should be positive because the proportion of unripe grapes, which can affect negatively the quality of the wine, is lower.⁴⁹

Table 3. General Parameters of Wines Made From Grapes For the Three Experimental Conditions. Different Letters in a Row Indicate Statistical Differences ($p < 0.05$) Between Treatments

	Control	Berry thinning	Cluster thinning
% vol.^a	14.0 ± 0.6, a	14.3 ± 0.4, a	14.6 ± 0.1, a
pH	3.69 ± 0.07, a	3.78 ± 0.06, a	3.74 ± 0.03, a
TA^b	5.5 ± 0.1, b	5.2 ± 0.1, a	5.4 ± 0.1, ab
TPI^c	65.4 ± 2.1, a	70.2 ± 3.5, b	67.0 ± 0.9, ab

^a Ethanol content of wines, expressed as a percentage (v/v). | ^b Titrateable acidity, expressed as g/L of tartaric acid. | ^c Total polyphenolic index.

Table 2 shows the grape juice characterization of the three experimental conditions. In general, the parameters of both treatments indicate that the maturity of the grapes is better than in the control. The total soluble solids and pH of the juice from cluster thinning grapes was significantly higher than in controls. The grape juice density was also somewhat higher although the differences were not significant. In contrast, titrateable acidity was significant lower. In the case of berry thinning only titrateable acidity was significant lower. In general these results agree with those of Weaver and Winkler⁴⁷ who previously described that berry thinning leads to grapes with lower titrateable acidity.

Table 3 shows the general parameters of wines made from grapes from the three experimental conditions. No significant differences were found in ethanol content, pH, titratable acidity and TPI between Cluster-thinning and control wines which indicated that similar maturity level were reached. Berry-thinning wine also have similar values in ethanol content and pH, but its titratable acidity was significant lower and its TPI was significant higher than in control wines. These results suggest that the phenolic maturity of grapes from Berry-thinning was greater than that of control grapes.

Table 4 shows the color parameters of wines from the different experimental conditions. All the wines present similar color intensities. However, some slight but statistically significant differences were found in Chroma (C*), Hue (H*), green-red (a*) and blue-yellow (b*) components. To verify whether these small differences were large enough to be distinguished by the human eye, the total color differences (ΔE_{ab}^*) between the wines were calculated. The average of ΔE_{ab}^* was 3.51 ± 1.16 between control and berry thinning, 3.60 ± 0.95 between control and cluster thinning, and 2.84 ± 0.43 when both treatments were compared. The human eye can generally distinguish two colors when $\Delta E_{ab}^* \geq 1$.⁵⁰ However, it is also generally accepted that tasters can only distinguish the color of two wines through the glass when $\Delta E_{ab}^* \geq 5$.⁵⁰ Since this parameter was not higher than five units in any case, the effect of both treatments on wine color was not enough to be distinguished by the human eye.

Table 4. Color Parameters of Wines Made From Grapes for the Three Experimental Conditions. Different Letters in a Row Indicate Statistical Differences ($p < 0.05$) Between Treatments

	Control	Berry thinning	Cluster thinning
CI ^a	22.1 ± 0.1, a	21.2 ± 1.7, a	21.3 ± 0.3, a
L* ^b	30.4 ± 0.6, a	30.9 ± 1.8, a	31.9 ± 1.8, a
C* ^c	61.3 ± 1.0, ab	60.0 ± 1.0, a	61.7 ± 0.2, b
H* ^d	18.0 ± 0.5, b	15.3 ± 0.3, a	15.2 ± 1.3, a
a* ^e	58.4 ± 1.0, ab	57.9 ± 0.9, a	59.5 ± 0.2, b
b* ^f	18.9 ± 0.4, b	15.9 ± 0.5, a	16.2 ± 1.4, a
SAT. ^g	2.02 ± 0.01, a	1.95 ± 0.14, a	1.94 ± 0.02, a

^a Color intensity of wine | ^b Lightness values | ^c Chroma values | ^d Hue values | ^e Green/red component | ^f Blue/yellow component | ^g Saturation value (expressed as the Chroma to Lightness ratio)

Table 5 shows the monomeric anthocyanin concentration of wines made with grapes from each experimental condition. The total anthocyanin concentration in cluster thinning wine was significantly higher than in control (24%) and berry thinning wines (18%). No significant differences were found in the percentages of the five non-acylated anthocyanins among the three experimental conditions. However, some slight but significant differences were found in some of the acetylated or p-coumarylated anthocyanins. These slight differences were mainly in malvidin-3-*O*-(6''-acetyl)glucoside, which was found in lower proportions in the cluster thinning wine than in the control and berry thinning wines, and in malvidin-3-*O*-(6''-trans-*p*-coumaroyl)glucoside, which was found in lower percentages in control wines than in cluster or berry thinning wines. Similarly, the wines of the three experimental conditions showed similar concentrations of vitisins A and B although a small but significant difference was detected in 10-*p*-monohydroxyphenyl-pyranomalvidin-3-glucoside (MHP-pymv) content, which was slightly lower in control wines. This similarity among the three wines may be related to the youth of the wines at the moment of analysis and was expected because of the origin of the anthocyanin derivatives.³² vitisins A and B come from the reaction of malvidin-3-glucoside with some yeast metabolites (pyruvic acid and acetaldehyde, respectively) and the same yeast strain was used for all wines; at this stage of winemaking, MHP-pymv was formed from p-coumaric acid only by the enzymic way induced by yeast.

Table 5. Anthocyanin and derived pigments. Analysis by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ of Wines Made From Grapes for Each Experimental Condition. Different Letters in a Row Indicate Statistical Differences ($p < 0.05$) Between Treatments. Each Monomeric Anthocyanin Is Quantified as Malvidin-3-Glucoside and Expressed as a Molar Ratio (%). Total Anthocyanins Are Expressed as mg/L of Malvidin-3-Glucoside. The Pyranoanthocyanin Data Is Expressed as mg/L.

	Control	Berry thinning	Cluster thinning
Delphinidin-3-glucoside	4.76 ± 0.09, a	4.72 ± 0.62, a	5.09 ± 0.11, a
Cyanidin-3-glucoside	0.41 ± 0.01, a	0.44 ± 0.07, a	0.47 ± 0.02, a
Petunidin-3-glucoside	8.03 ± 0.15, a	8.00 ± 0.78, a	8.79 ± 0.18, a
Peonidin-3-glucoside	6.81 ± 0.44, a	6.47 ± 0.29, a	6.89 ± 0.26, a
Malvidin-3-glucoside	50.68 ± 0.60, a	50.86 ± 1.52, a	49.96 ± 1.28, a
Delphinidin-3-(6''-acetyl)glucoside	2.10 ± 0.10, a	1.95 ± 0.35, a	1.89 ± 0.41, a
Petunidin-3-(6''-acetyl)glucoside	2.59 ± 0.09, b	2.13 ± 0.26, a	2.26 ± 0.10, ab
Peonidin-3-(6''-acetyl)glucoside	2.75 ± 0.10, a	2.39 ± 0.21, a	2.39 ± 0.18, a
Malvidin-3-(6''-acetyl)glucoside	11.33 ± 0.03, b	11.82 ± 0.58, b	10.57 ± 0.04, a
Delphinidin-3-(<i>trans-p</i> -coumaroyl)glucoside	1.33 ± 0.02, a	0.97 ± 0.35, a	1.00 ± 0.19, a
Cyanidin-3-(<i>trans-p</i> -coumaroyl)glucoside	0.79 ± 0.25, a	0.58 ± 0.19, a	0.55 ± 0.15, a
Petunidin-3-(<i>trans-p</i> -coumaroyl)glucoside	1.25 ± 0.07, a	1.26 ± 0.09, a	1.27 ± 0.07, a
Malvidin-3-(<i>cis-p</i> -coumaroyl)glucoside	0.19 ± 0.00, a	0.24 ± 0.02, b	0.20 ± 0.01, a
Peonidin-3-(<i>trans-p</i> -coumaroyl)glucoside	2.23 ± 0.01, a	2.48 ± 0.19, ab	2.74 ± 0.18, b
Malvidin-3-(<i>trans-p</i> -coumaroyl)glucoside	4.73 ± 0.02, a	5.67 ± 0.19, b	5.93 ± 0.72, b
TOTAL ANTHOCYANINS	321.5 ± 11.3, a	337.0 ± 44.3, a	397.9 ± 24.0, b
Vitisin A	4.54 ± 0.29, a	4.34 ± 0.28, a	4.93 ± 1.79, a
Vitisin B	4.97 ± 1.08, a	4.44 ± 1.29, a	3.68 ± 0.54, a
MHPpymv ^a	0.31 ± 0.01, a	0.33 ± 0.02, b	0.35 ± 0.01, b

Table 6 shows the flavonol concentration of wines made from grapes for each experimental condition. The total flavonol concentration of berry thinning wines is considerably higher than that of control (83%) and cluster thinning (43%) wines. The percentages of the different flavonols were quite similar in all the experimental conditions although some slight but significant differences were found in myricetin and syringetin glycoside groups, which were somewhat lower in berry thinning wine. It has been reported that such cultivars as Brancellao have higher amounts of total flavonols in the skins of the grapes from the shoulders than in grapes from the tips.³⁰ However, these differences were not found in other Galician cultivars⁵¹ such as Mouraton. It seems therefore that there is a cultivar-dependent effect that supports previous suggestions that the flavonol profile is a cultivar characteristic for both grapes and their wines.⁵² Since wines from berry thinning have a considerably higher concentration of flavonols it is quite probable that Syrah berries from the shoulder have higher amounts of flavonols than berries from the tips. It has also been reported that exposure to the sun has a considerable effect on the flavonol content of berries.^{53, 54} The greater the exposure, the higher the flavonol content. In this regard, it is clear that grapes from the shoulders receive more sunlight than grapes from the tips because of the shadowing effect exerted by the shoulders. These data also explain why berry thinning wines have significantly higher flavonol concentrations. A higher flavonol content increases the possibility of copigmentation effects, which enhance the redness of the wine and the purplish nuances of the red.³ In fact, berry thinning wines had a

lower anthocyanin content than cluster thinning wines (Table 5) but the color parameters did not differ so much between the two wines (Table 4). A likely explanation for this apparent discrepancy is that in berry thinning wines the lower content of anthocyanins was balanced by the higher content of flavonols, which probably promoted the formation of copigmentation complexes to a greater extent.³

Table 6. Flavonol Analysis by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ of Wines Made From Grapes for Each Experimental Condition. Different Letters in a Row Indicate Statistical Differences (*p* < 0.05) Between Treatments. Total Amounts Are Expressed as mg/L of Quercetin-3-*O*-Glucoside. Flavonols Are Classified by Their Aglycone Backbone and The Data of Each Aglycone-Type Are Expressed as Molar Ratios (%)

	Control	Berry thinning	Cluster thinning
K-type ^a	1.77 ± 0.33, a	2.52 ± 0.20, a	1.79 ± 0.35, a
Q-type ^b	42.49 ± 3.58, a	49.66 ± 3.36, a	44.62 ± 1.52, a
I-type ^c	14.12 ± 1.12, a	13.66 ± 1.06, a	14.67 ± 0.52, a
M-type ^d	26.62 ± 0.57, b	22.30 ± 1.13, a	25.57 ± 1.44, b
L-type ^e	7.88 ± 0.75, a	7.11 ± 0.36, a	7.45 ± 0.28, a
S-type ^f	7.12 ± 0.85, b	4.74 ± 1.17, a	5.90 ± 0.44, ab
TOTAL	108.7 ± 1.1, a	198.8 ± 47.3, b	139.5 ± 10.4, a

^a Kaempferol glycosides group | ^b Quercetin glycosides group | ^c Isorhamnetin glycosides group
^d Myricetin glycosides group | ^e Laricitrin glycosides group | ^f Syringetin glycosides group

Table 7 shows the hydroxycinnamic acids and their derivatives in wines from the three experimental conditions. No significant differences were found in total hydroxycinnamic acids and derivatives among the three experimental wines although some slight but significant differences were found in some percentages. It seems therefore that none of the treatments affects the wine composition as far as these compounds are concerned. However, cluster thinning wine has a significantly higher concentration of cis-resveratrol than control and berry thinning wines. In contrast, no significant differences were found in any of the other stilbenes. In general, these data agree with Prajitna et al.⁵⁵ who found that cluster thinning increased the stilbene concentration in total wine. It is well known that cluster thinning usually increases berry size and, in our experimentation, cluster thinning berries were significantly heavier (10%) than control berries. Larger berries may lead to clusters being more compact in some cultivars especially those which have naturally compacted bunches. Greater compactness may also favor the development of fungal diseases⁵⁶ which, in turn, can favor synthesis of the stilbene by the plant.⁵⁷ Berry thinning grapes were also somewhat heavier than control grapes (7%) but in this case the differences were not significant. It has also been reported that berry thinning decreases bunch compactness, which explains why no differences were found between cis-resveratrol and the control. In fact, table-grape growers usually apply this treatment in an attempt to obtain less compact clusters.³¹

Table 8 shows the proanthocyanidin HPLC-DAD analysis of adducts formed by acid depolymerization in the presence of an excess of phloroglucinol. Berry thinning wine has a considerably higher proanthocyanidin concentration than control (46%) and cluster thinning (38%) wines. Moreover, the mean degree of polymerization (mDP) of proanthocyanidins from berry thinning wine was also significant higher than in the other experimental conditions. The proportion of procyanidins and prodelphinidins was similar in all experimental conditions. However, the percentage of galloylation of the proanthocyanidins from the control wine was significantly higher than in wines from both treatments. Some authors have reported that well-ripe grapes release higher amounts of proanthocyanidins from skins than unripe grapes.¹³ In contrast, seed proanthocyanidin extraction decreases with ripening.¹⁴ Berry thinning wine has greater proanthocyanidin concentrations, higher mDP and lower percentages of galloylation than control wine. Since skin proanthocyanidins have higher mDPs and lower percentages of galloylation than seed proanthocyanidins, it seems that berry thinning wine has a higher proportion of

skin proanthocyanidins and/or a lower proportion of seed proanthocyanidins. Consequently, our data confirm that berry thinning grapes have reached a higher level of phenolic maturity than control grapes. In contrast, the values for cluster thinning wine are similar to those for control wine with the only exception of the percentage of galloylation. Therefore, it seems that cluster thinning affects grape phenolic maturity less than berry thinning.

Table 7 Non Flavonoid Phenolics of Wine analyzed by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. Hydroxycinnamic Acids and Derivatives Data for Each Moiety Are Expressed as Molar Ratios (%) and the Total Amounts Are Expressed as mg/L of Caftaric Acid. Stilbene Data Are Expressed as mg/L, and Total Amounts Are Expressed as *t*-Resveratrol Equivalents. Different Letters in a Row Indicate Statistical Differences (*p* < 0.05) Between Treatments.

		Control	Berry thinning	Cluster thinning
Hydroxycinnamic Acids and Derivatives	Caftaric acid	50.49 ± 0.77, a	49.47 ± 1.01, a	51.02 ± 0.70, a
	Caffeic acid	5.58 ± 0.73, a	5.91 ± 0.49, a	6.79 ± 0.92, a
	Ethyl caffeate	1.01 ± 0.43, a	0.96 ± 0.55, a	1.47 ± 0.13, a
	Coutaric acid	34.37 ± 0.83, b	35.38 ± 1.44, b	31.68 ± 0.29, a
	<i>p</i> -Coumaric acid	2.22 ± 0.22, ab	1.90 ± 0.08, a	2.60 ± 0.40, b
	Ethyl <i>p</i> -coumarate	2.41 ± 0.83, a	2.45 ± 0.44, a	2.80 ± 0.21, a
	Fertaric acid	3.91 ± 0.33, a	3.93 ± 0.12, a	3.64 ± 0.26, a
	TOTAL	123.2 ± 9.4, a	139.8 ± 11.9, a	121.4 ± 1.5, a
Stilbenes	<i>t</i> -Piceid	10.17 ± 1.35, a	9.93 ± 0.65, a	10.70 ± 1.26, a
	<i>t</i> -Resveratrol	12.64 ± 2.64, a	13.72 ± 0.75, a	13.36 ± 2.25, a
	<i>c</i> -Piceid	9.90 ± 2.42, a	12.83 ± 0.93, a	12.28 ± 1.57, a
	<i>c</i> -Resveratrol	7.06 ± 2.95, a	9.79 ± 1.14, a	20.33 ± 8.16, b
	TOTAL	31.44 ± 6.64, a	36.81 ± 2.59, a	47.13 ± 4.76, b

Table 8. Proanthocyanidin Analysis of Wines Made From Grapes for Each Experimental Condition. The Analysis Was Performed by HPLC-DAD of Adducts Formed by Acid Depolymerization in The Presence of an Excess of Phloroglucinol. Different Letters in a Row Indicate Statistical Differences (*p* < 0.05) Between Treatments

	Control	Berry thinning	Cluster thinning
TOTAL PA^a	513.5 ± 54.0, a	748.9 ± 102.4, b	544.6 ± 9.4, a
mDP^b	4.66 ± 0.15, a	5.46 ± 0.60, b	4.30 ± 0.04, a
%PC^c	66.7 ± 1.4, a	68.2 ± 1.0, a	66.7 ± 0.5, a
%PD^d	33.3 ± 1.4, a	31.8 ± 1.0, a	33.3 ± 0.5, a
%Gal^e	3.8 ± 0.0, b	3.4 ± 0.1, a	3.4 ± 0.3, a

^a Total proanthocyanidin amount expressed as mg/L | ^b Mean degree of polymerization of analyzed proanthocyanidins | ^c Percentage of procyanidins | ^d Percentage of prodelphinidins | ^e Percentage of galloylation

Figure 3 shows the HRSEC-RID analysis of polysaccharides from wines for the three experimental conditions. Each curve is the average of three replicates. Four molecular weight fractions were obtained in all the wines with the following average molecular weights: F1 (around 177 kDa); F2 (around 71 kDa); F3 (around 39 kDa) and F4 (around 25 kDa). A visual comparison of the chromatograms of the different wines reveals that wines from both treatments have higher areas, especially of the lower molecular

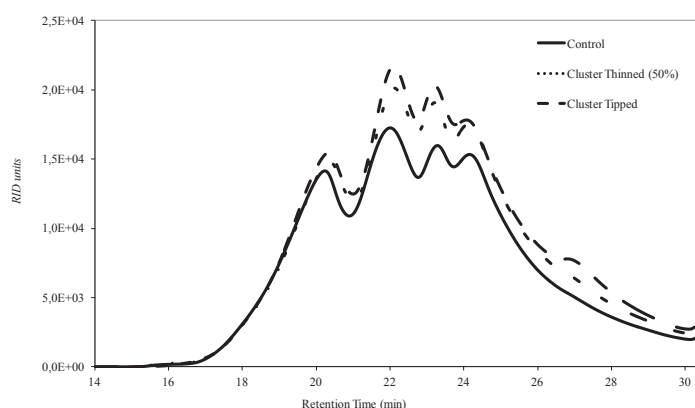


Figure 3. HRSEC-RID profiles for wine polysaccharides for each experimental condition

weight fractions. Table 9 shows the polysaccharide concentration, the number average molecular weight (M_n) and the molecular weight range (MWr) of the different fractions. These data confirm that berry thinning and especially cluster thinning wines have significantly higher total polysaccharide concentrations than the control wine. In the case of cluster thinning wine, all the fractions were significantly higher than in the control wine whereas only F4 was significantly higher in the case of berry thinning wine. The M_n and MWr results show some interesting differences. In general, the M_n of the higher molecular weight fractions (F1 and F2) from berry thinning and, particularly, cluster thinning wines are significantly lower than controls and their MWr has intervals with somewhat smaller molecular weight endpoints. In contrast, a smaller molecular weight fraction (F3) from both treatments has a significantly higher M_n than controls. During ripening, the grape berries undergo a softening process which has been attributed to the enzymatic hydrolysis of cell wall pectins.¹² Our results indicate that wines from both treatments have a higher polysaccharide concentration, a lower M_n and a molecular weight distribution which tends towards lower values than control wine. These data suggest, therefore, that skins from berry thinning and cluster thinning grapes were riper than those of control grapes.

Table 9. Analysis of Polysaccharides by HRSEC-RID. Different Letters in a Row Indicate Statistical Differences ($p < 0.05$) Between Experimental Conditions

Polysaccharide fraction		Control	Berry thinning	Cluster thinning
F1	Range ^a	2878-131	2873-124	2288-124
	M_n^b	184.0 ± 2.6, b	172.6 ± 6.7, a	174.9 ± 2.5, a
	Concentration ^c	133 ± 6, a	142 ± 5, ab	146 ± 4, b
F2	Range ^a	131-50	124-50	124-50
	M_n^b	73.3 ± 0.8, b	69.9 ± 0.7, a	70.3 ± 0.7, a
	Concentration ^c	125 ± 6, a	134 ± 4, ab	142 ± 3, b
F3	Range ^a	50-30	50-31	50-30
	M_n^b	38.0 ± 0.8, a	39.5 ± 0.5, b	39.5 ± 0.3, b
	Concentration ^c	67 ± 9, a	78 ± 3, ab	89 ± 7, b
F4	Range ^a	30-1	31-1	30-1
	M_n^b	24.6 ± 1.2, a	24.6 ± 0.6, a	25.4 ± 0.6, a
	Concentration ^c	191 ± 7, a	229 ± 12, b	239 ± 4, b
TOTAL	Concentration ^d	516 ± 26, a	583 ± 20, b	617 ± 14, b

^a Range of molecular weights considered in each fraction. The endpoints are expressed as kDa | ^b Number average molecular weight (M_n) of each fraction expressed as kDa | ^c Quantification of polysaccharides of each fraction expressed as mg/L | ^d Total quantification of polysaccharides expressed as mg/L

Table 10 shows the results of the triangular sensory analysis of the three pairs of wines. The tasters distinguished significantly ($p < 0.05$) between the wine from both treatments, and the control wine. However, they were unable to distinguish between cluster thinning and berry thinning wines ($p > 0.05$). The tasters who distinguished correctly between cluster thinning and control wines were divided in their preferences: More specifically, 7 preferred control wine whereas 7 preferred cluster thinning wine. However, in the comparison between berry thinning and control wines they clearly opted for the berry thinning wine. More specifically 9 preferred berry thinning wine whereas only 2 preferred the control wine.

Table 10. Triangular Test Results for Sensorial Analysis of Wines Made of Grapes for Each Experimental Condition

Triangular test	Positive identifications	P	Preferences		
			Control	Cluster thinning	Berry thinning
Control vs. cluster thinning	14/24	< 0.05	7	7	-
Control vs. berry thinning	13/24	< 0.05	4	-	9
Cluster thinning vs. berry thinning	9/24	ns	-	5	4

In summary, cluster thinning led to wines with a significantly higher ethanol content, increased anthocyanin and polysaccharide concentrations and generally higher concentrations of most of the other phenolic compounds although these differences were not significant. Berry thinning led to wines with significantly higher TPI, flavonol, proanthocyanidin and polysaccharide concentrations and lower titratable acidity. Moreover, the proanthocyanidin mDP of berry thinning wine was significant higher than that of control wine. Wines obtained from both treatments were sufficiently different from the control wine to be significantly distinguished by a trained panel in a triangular test. It can be concluded therefore that both treatments for reducing yield effectively enhanced grape maturity and improved wine quality. However, cluster thinning involves a considerable reduction in yield, which is a real economic disadvantage. In contrast, berry thinning seems to be more effective than cluster thinning and the yield reduction is lower.

REFERENCES

- (1) He, F.; Liang, N. N.; Mu, L.; Pan, Q. H.; Wang, J.; Reeves, M. J.; Duan, C. Q. Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules* **2012**, *17*, 1571-1601.
- (2) He, F.; Liang, N. N.; Mu, L.; Pan, Q. H.; Wang, J.; Reeves, M. J.; Duan, C. Q. Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules* **2012**, *17*, 1483-1519.
- (3) Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 67-87.
- (4) Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A. C. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 1123-1128.
- (5) De Freitas, V.; Mateus, N. Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 940-945.
- (6) Carvalho, E.; Mateus, N.; Plet, B.; Pianet, I.; Dufourc, E.; De Freitas, V. Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8936-8944.

- (7) Ryan, J. M.; Revilla, E. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3372-3378.
- (8) Kennedy, J. A.; Matthews, M. A.; Waterhouse, A. L. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 268-274.
- (9) Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E. M.; Escribano-Bailón, M. T. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chem.* **1995**, *53*, 197-201.
- (10) Souquet, J. M.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Moutounet, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 509-512.
- (11) Nunan, K. J.; Davies, C.; Robinson, S. P.; Fincher, G. B. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta* **2001**, *214*, 257-264.
- (12) Nunan, K. J.; Sims, I. M.; Bacic, A.; Robinson, S. P.; Fincher, G. B. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant. Physiol.* **1998**, *118*, 783-792.
- (13) Hanlin, R. L.; Hrmova, M.; Harbertson, J. F.; Downey, M. O. Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2010**, *16*, 173-188.
- (14) Cadot, Y.; Minana-Castello, M. T.; Chevalier, M. Anatomical, Histological, and Histochemical Changes in Grape Seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during Fruit Development. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *29*, 9206-9215.
- (15) Sacchi, K. L.; Bisson, L. F.; Adams, D. O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 197-206.
- (16) Yokotsuka, K.; Sato, M.; Ueno, N.; Singleton, V. L. Colour and Sensory Characteristics of Merlot Red Wines Caused by Prolonged Pomace Contact. *J. Wine Res.* **2000**, *11*, 7-18.
- (17) Kliewer, W. M.; Dokoozlian, N. K. Leaf area/crop weight ratios of grapevines: Influence on fruit composition and wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 170-181.
- (18) Cortell, J. M.; Halbleib, M.; Gallagher, A. V.; Righetti, T. L.; Kennedy, J. A. Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot noir) and wine proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5798-5808.
- (19) Bravdo, B.; Hepner, Y.; Loinger, C.; Cohen, S.; Tabacman, H. Effect of Crop Level on Growth, Yield and Wine Quality of a High Yielding Carignane Vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* **1984**, *35*, 247-252.
- (20) Preszler, T.; Schmit, T. M.; vanden Heuvel, J. E. A model to establish economically sustainable cluster-thinning practices. *Am. J. Enol. Vitic.* **2010**, *61*, 140-146.
- (21) Gil-Muñoz, R. R.; Vila-López, J. I.; Fernández-Fernández, Martínez-Cutillas, A. Effects of cluster thinning on anthocyanin extractability and chromatic parameters of syrah and tempranillo grapes and wines. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2009**, *43*, 45-53.
- (22) Valdés, M. E.; Moreno, D.; Gamero, E.; Uriarte, D.; Prieto, M. D. H.; Manzano, R.; Picon, J.; Intrigliolo, D. S. Effects of cluster thinning and irrigation amount on water relations, growth, yield and fruit and wine composition of tempranillo grapes in extremadura (Spain). *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2009**, *43*, 67-76.
- (23) Gatti, M.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Poni, S. Effects of cluster thinning and preflowering leaf removal on growth and grape composition in cv. Sangiovese. *Am. J. Enol. Vitic.* **2012**, *63*, 325-332.
- (24) Santesteban, L. G.; Miranda, C.; Royo, J. B. Thinning intensity and water regime affect the impact cluster thinning has on grape quality. *Vitis J. Grapevine Res.* **2011**, *50*, 159-165.
- (25) Keller, M.; Mills, L. J.; Wample, R. L.; Spayd, S. E. Cluster thinning effects on three deficit-irrigated *Vitis vinifera* cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 91-103.
- (26) Nuzzo, V.; Matthews, M. A. Response of fruit growth and ripening to crop level in dry-farmed Cabernet Sauvignon on four rootstocks. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 314-324.
- (27) Diago, M. P.; Vilanova, M.; Blanco, J. A.; Tardaguila, J. Effects of mechanical thinning on fruit and wine composition and sensory attributes of Grenache and Tempranillo varieties (*Vitis vinifera* L.). *Austr. J. Grape Wine Res.* **2010**, *16*, 314-326.

- (28) Winkler, A. J. *Berry thinning of grapes*. California Agr. Exp. Sta. Bul. University of California Printing Office: Berkeley, California, 1930; Vol. 492, pp 22.
- (29) Tarter, M. E.; Keuter, S. E. Effect of rachis position on size and maturity of Cabernet Sauvignon berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 86-89.
- (30) Figueiredo-Gonzalez, M.; Simal-Gandara, J.; Boso, S.; Martinez, M. C.; Santiago, J. L.; Cancho-Grande, B. Anthocyanins and flavonols berries from *Vitis vinifera* L. cv. Brancellao separately collected from two different positions within the cluster. *Food Chem.* **2012**, *135*, 47-56.
- (31) Winkler, A. J.; Cook, J. A.; Kliewer, W. M.; Lider, L. A. Means of Improving Grape Quality In *General Viticulture*; Winkler, A. J., Cook, J. A., Kliewer, W. M. and Lider, L. A., Eds.; University of California Press: Berkeley, California, 1974; pp 338-370.
- (32) Blanco-Vega, D.; López-Bellido, F. J.; Alía-Robledo, J. M.; Hermosín-Gutiérrez, I. HPLC-DAD-ESI-MS/MS characterization of pyranoanthocyanins pigments formed in model wine. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 9523-9531.
- (33) Sampaio, T. L.; Kennedy, J. A.; Vasconcelos, M. C. Use of microscale fermentations in grape and wine research. *Am. J. Enol. Vitic.* **2007**, *58*, 534-539.
- (34) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubordieu, D. Chapter 6: Phenolic Compounds In *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments*; Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubordieu, D., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 2006; Vol. 2, pp 141-203.
- (35) Glories, Y. La couleur des vins rouges. 2ème partie: Mesure, Origine et Interpretation. *Conn. Vigne Vin* **1984**, *18*, 253-271.
- (36) Ayala, F.; Echávarri, J. F.; Negueruela, A. I. A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rose wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, *48*, 357-363.
- (37) Ayala, F.; Echávarri, J. F.; Negueruela, A. I. MSCVes.zip. <http://www.unizar.es/negueruela/MSCV.es> (accessed 2001).
- (38) Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 992-1002.
- (39) Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Gómez, M. V.; Velders, A. H.; Hermosín-Gutiérrez, I. Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot red wine grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 209-219.
- (40) Lago-Vanzela, E. S.; Da-Silva, R.; Gomes, E.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. Phenolic composition of the Brazilian seedless table grape varieties BRS clara and BRS morena. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8314-8323.
- (41) Kennedy, J. A.; Jones, G. P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1740-1746.
- (42) Ayestarán, B.; Guadalupe, Z.; León, D. Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 29-39.
- (43) Jackson, R. S. Quantitative (technical) wine assessment In *Wine Tasting. A Professional Handbook*; Taylor, S. L., Ed.; Academic Press: Hong Kong, 2002; pp 113-185.
- (44) Guidoni, S.; Allara, P.; Schubert, A. Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 224-226.
- (45) Winkler, A. J. *Pruning and thinning experiments with grapes*; California Agr. Exp. Sta. Bul. University of California Printing Office: Berkeley, California, 1931; Vol. 519, pp 42.
- (46) Sun, Q.; Sacks, G. L.; Lerch, S. D.; Vanden Heuvel, J. E. Impact of Shoot and Cluster Thinning on Yield, Fruit Composition, and Wine Quality of Corot noir. *Am. J. Enol. Vitic.* **2012**, *63*, 49-56.
- (47) Weaver, R. J.; Winkler, A. J. Increasing the Size of Thompson Seedless Grapes by Means of 4-Chlorophenoxyacetic Acid, Berry Thinning and Girdling. *Plant Physiol.* **1952**, *27*, 626-630.

- (48) Ough, C. S.; Nagaoka, R. Effect of Cluster Thinning and Vineyard Yields on Grape and Wine Composition and Wine Quality of Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* **1984**, *35*, 30-34.
- (49) Kontoudakis, N.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J. M.; De Freitas, V.; Zamora, F. Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chem.* **2011**, *124*, 767-774.
- (50) Pérez-Magariño, S.; González-Sanjosé, M. L. Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. *Food Chem.* **2003**, *81*, 301-306.
- (51) Figueiredo-Gonzalez, M.; Simal-Gandara, J.; Boso, S.; Martinez, M. C.; Santiago, J. L.; Cancho-Grande, B. Flavonoids in Gran Negro berries collected from shoulders and tips within the cluster, and comparison with Brancellao and Mouraton varieties. *Food Chem.* **2012**, *133*, 806-815.
- (52) Hermosín-Gutiérrez, I.; Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E. Chapter 8. Flavonol Profiles for Grape and Wine Authentication In *Progress in Authentication of Food and Wine*; Ebeler, S. E., Takeoka, G. R. and Winterhalter, P., Eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2011; pp 113-129.
- (53) Ristic, R.; Downey, M. O.; Iland, P. G.; Bindon, K.; Francis, I. L.; Herderich, M.; Robinson, S. P. Exclusion of sunlight from Shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2007**, *13*, 53-65.
- (54) Adams, D. O. Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 249-256.
- (55) Prajitna, A.; Dami, I. E.; Steiner, T. E.; Ferree, D. C.; Scheerens, J. C.; Schwartz, S. J. Influence of cluster thinning on phenolic composition, resveratrol, and antioxidant capacity in chambourcin wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2007**, *58*, 346-350.
- (56) Winkler, A. J.; Cook, J. A.; Kliewer, W. M.; Lider, L. A. Grape Diseases and Disorders In *General Viticulture*; Winkler, A. J., Cook, J. A., Kliewer, W. M. and Lider, L. A., Eds.; University of California Press: Berkeley, California, 1974; pp 439-502.
- (57) Sun, B.; Ribes, A. M.; Leandro, M. C.; Belchior, A. P.; Spranger, M. I. Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 382-390.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

CAPÍTULO III. La desalcoholización parcial de vinos tintos de elevada graduación mediante ósmosis inversa: impacto sobre la composición química del vino.

La demanda de vinos tintos estructurados y con un intenso color, ha llevado al sector a esperar hasta que la uva alcance un buen nivel de madurez fenólica. En muchas ocasiones, este hecho comporta que el nivel de azúcares de la uva en el momento de la recolección sea muy elevado, lo que conduce a vinos con una graduación alcohólica excesiva, lo que también puede suponer un perjuicio, tanto des del punto de vista del consumidor (al que no le atraen vinos con un elevado grado alcohólico), como des del productor (debido a los aranceles que ciertos países imponen para bebidas de elevada graduación alcohólica).

En este capítulo se aborda el objetivo número 4, en el que se planteó evaluar el impacto que la desalcoholización parcial del vino tinto ejerce sobre la composición química del vino. Para ello se seleccionaron dos vinos de alta graduación elaborados a escala industrial procedentes de dos denominaciones de origen distintas: DOQ Priorat y DO Penedès. Mediante ósmosis inversa, se redujo el contenido alcohólico de cada vino uno y dos grados de alcohol (% vol), y se estudió el efecto que dicha técnica ejerce sobre la composición química del vino.

Las analíticas de los vinos obtenidos fueron realizadas en el laboratorio del grupo de *tecnología enológica* (TECNENOL) del Departamento de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili (URV, Tarragona). Los resultados de este ensayo fueron publicados en la revista *European Food Research and Technology* en el artículo titulado “**Influence of partial dealcoholization by reverse osmosis on red wine composition and sensory characteristics**”

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

Influence of partial dealcoholization by reverse osmosis on red wine composition and sensory characteristics.

M. Gil, S. Estévez, N. Kontoudakis, F. Fort, JM Canals, and F. Zamora[§]

Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Oenology of Tarragona, Wine Technology Research Group (Tecnol),
Rovira i Virgili University, Campus de Sescelades, C/ Marcel·li Domingo, s/n. 43007-Tarragona, Spain

Received: 7 February 2013

Revised: 29 April 2013

Accepted: 8 May 2013

Published online: 23 May 2013

ABSTRACT: Two red wines with a very high ethanol content were partially dealcoholized by reverse osmosis so that the influence of this technique on wine color, chemical composition and sensory quality could be studied. No statistically significant differences were found in pH, color intensity, total phenolic index, proanthocyanidin concentration and their mean degree of polymerization between control wines and partially dealcoholized wines (-1 vol. % and -2 vol. %). Some slight but significant differences were found in titratable acidity, anthocyanins, CIELab coordinates and polysaccharides. However, these differences were really quite small and only significant in a few cases. Moreover, a trained panel of tasters had severe difficulty in distinguishing between control and partially dealcoholized wines in triangular tests and results were statistically significant only in some of the comparisons. It is concluded that this technique can be very useful for the partial dealcoholization of red wines because they hardly alter their composition and sensory characteristics.

KEYWORDS: Wine composition, phenolic compounds, polysaccharides, reverse osmosis, partial dealcoholization

INTRODUCTION

At present, deeply colored full-bodied red wines are highly valued by the market as long as they are not too astringent and/or bitter. Color, bitterness and texture sensations such as astringency, mouthfeel and body are closely related to the composition of wine in phenolic compounds, especially in anthocyanins and proanthocyanidins [1]. Anthocyanidins are present in grape skins, whereas proanthocyanidins are present in skins and seeds [2]. However, the chemical composition of seed and skin proanthocyanidins is not identical. Specifically, skin proanthocyanidins have a higher mean degree of polymerization (mDP) and contain a considerable proportion of epigallocatechin monomeric units [3]. In contrast, seed proanthocyanidins have a lower mDP, they do not contain epigallocatechin monomeric units and have a significantly higher proportion of epicatechin-3-*O*-gallate monomeric units [4]. It is well known that astringency and bitterness depend on the proanthocyanidin concentration and also on its chemical structure. Specifically, astringency is greater when the polymer size or the proportion of epicatechin-3-*O*-gallate is higher [5]. Likewise, bitterness has also been associated with mDP and monomer composition [6]. Consequently, it is generally accepted that seed proanthocyanidins are more astringent and bitter than skin proanthocyanidins.

Polysaccharides also seem to affect some of these wines' sensory attributes. In this regard, some authors have suggested that polysaccharides can increase mouthfeel, [7], smooth astringency [8] and even enhance aromatic persistence [9]. Several studies have been carried out on the changes in polysaccharide composition of cell walls in grapes during ripening [10]. In general, these studies suggest that the well known enzymatic degradation of pectins should lead to a greater polysaccharide concentration in wines. However, some of the polysaccharides present in grape juice are enzymatically degraded or precipitated during alcoholic fermentation, so wine only contains appreciable amounts of arabinogalactan proteins (AGP) and type II rhamnogalacturonans (RG-II) [11,12]. Wine also contains other polysaccharides and mannoproteins released by yeasts [11] which do not come from the plant. There are some studies on wine polysaccharide composition but to our knowledge only one that studies the influence of grape maturity on polysaccharide concentration [13].

[§] e-mail: fernando.zamora@urv.cat

Grape ripeness also exerts a considerable influence on wine phenolic composition. Specifically, unripe grapes have lower concentrations of anthocyanins that are less extractable than well-ripe grapes [14]. Moreover, in well-ripe grapes the concentration and extractability are higher in skin proanthocyanidins whereas are lower in seed proanthocyanidins [14]. Taking all these aspects into account, it can be asserted that unripe grapes usually release higher amounts of seed proanthocyanidin [15], which lead to very bitter and astringent wines.

For these reasons, winemakers usually wait until the skins and seeds of grapes are suitably ripe. In fact, the term phenolic maturity is usually used to describe this phenomenon. Nevertheless, grapes with complete phenolic maturity frequently have higher sugar concentrations and lower acidity, which can cause some problems. First, high ethanol content can lead to stuck and sluggish fermentations. Secondly, ethanol clearly participates in wine sensory perception and, consequently, an excess can lead to unbalanced wines that are unpleasant for consumers. Thirdly, the current wine market is very concerned with health prevention policies and, therefore, is interested in wines with a moderate alcohol level. Finally, some countries penalize high alcohol wines with higher taxes, which considerably increase their final price.

In recent years, wines have (on average) gradually increased in alcohol content probably because winemakers are looking for grapes with a high phenolic maturity. Moreover, it is generally considered that climate change increases this tendency [16]. If the temperature during ripening is higher than the optimum, the grape pulp matures faster, and the pH and sugar concentration become too high. Therefore, the period between veraison and industrial maturity decreases, making it more difficult to pinpoint proper aromatic and phenolic maturity, and leading to unbalanced wines.

In this situation, there are only two possibilities. Grapes can be harvested when the potential alcohol value is appropriate or when complete phenolic maturity has been reached. In the first case, it must be assumed that complete phenolic maturity has not been reached. In the second case, the ethanol content of the grapes would probably be excessive. Neither of these possibilities is conducive to obtaining high quality wines and winemakers are obviously concerned.

Several ways of mitigating the impact of global warming have been proposed. One is to change certain viticultural practices by introducing new cultivars, modifying culture techniques and even relocating vineyards to other production areas to delay pulp sugar accumulation [17]. Another is to use unripe grapes harvested during cluster thinning to reduce alcohol content [18]. And yet a third is to use yeast with a lower ethanol yield even though natural *Saccharomyces cerevisiae* strains seem to provide similar ethanol yields [19]. Despite these proposals, nowadays, the most commonly used methods for reducing alcohol content in wines [20] are physical ones [21]: for example, the spinning cone column [22] and reverse osmosis [23]. Little is known about how these methods affect wine composition and quality. There are very few references in the scientific literature and most of them are aimed to obtain alcohol-free wines [24,25] or very low-alcohol wines [26–28]. However, most wineries are only interested in reducing alcohol content by one or two degrees in order to obtain more balanced wines [29–31]. The aim of this work was to study the impact of partial dealcoholization by reverse osmosis in red wine composition and sensory characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Equipment. Methanol, acetonitrile, formic and acetic acids were of HPLC grade and were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). The water used was of Milli-Q quality. Acetaldehyde, phloroglucinol, ascorbic acid, sodium acetate and ammonium formate were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Absolute ethanol and hydrochloric acid were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Malvidin-3-O-glucoside chloride, proanthocyanidin dimer B2, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin and (-)-epicatechin-3-O-gallate were purchased from Extrasynthese (Genay, France). A Shodex P-82 pullulan calibration kit was acquired from Waters (Barcelona, Spain), and a pullulan 1.3 kDa and four dextrans BioChemika from Fluka (St. Louis, Missouri). The polysaccharides used as external standards for purposes of quantification were pectins from citrus fruit and dextrans synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). The HPLC analyses were performed using an Agilent 1200 Series liquid chromatograph equipped with a G1362A refractive index detector (RID), a G1315D diode array detector (DAD), a G1311A quaternary pump, a G1316A column oven, and a

G1329A autosampler (Agilent Technologies, Santa Clara, California). All the spectrophotometric measurements were performed using a Helios Alpha UV-vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts).

Wines. This study was carried out with two different wines from the 2009 vintage. The first wine was made from grapes of the cultivar *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon from the Juvé & Camps winery (AOC Penedès) and the second from grapes of the cultivars Grenache and Carignan from the Vinicola del Priorat winery (AOC Priorat). Alcoholic as well as malolactic fermentation took place in stainless steel tanks.

The ethanol content of the Cabernet Sauvignon wine was 14.8% (v/v) and for the Grenache-Carignan blend (coupage) it was 16.2% (v/v). Both wines were split into three aliquots of 550 L and the treatments were performed at cellar temperature. The first one was conserved with no modification as the control. The second one was partially dealcoholized by reverse osmosis units supplied by Société Michael Paetzold (Cadaujac, France), which reduced alcohol content by about one degree (- 1%). The third one was partially dealcoholized using the same equipment to reduce alcohol content by about two degrees (- 2%). This equipment can treat 2000 L/h for removing 1 % of ethanol and causes a slight increase of wine temperature of around one Celsius degree for every 1% ethanol removed. The AOC Penedès wines were aged in two-year-old French oak (*Quercus petraea*) barrels (225 L) whereas the AOC Priorat wines were aged in new American oak (*Quercus alba*) barrels (225 L) for 9 months at a cellar temperature of 16 ± 2 °C. A total of 12 barrels were used to carry out the experiment in duplicate. After aging, samples were taken from each barrel for chemical and sensory analysis.

Standard wine analysis. The titratable acidity was measured by titrimetry using NaOH 0.1N and bromothymol blue as indicator. pH values were determined by a pH meter Basic-20 (CRISON, Barcelona, Spain) and ethanol content was determined by ebullometry (GAB system, Barcelona, Spain) as described by García-Barceló [32]. The Total Polyphenol Index (TPI) was analyzed by measuring the 280 nm absorbance of a 1:100 dilution of wine with a spectrophotometer, using a 10 mm quartz cuvette and multiplying the absorbance value by 100 as described by Ribéreau-Gayon et al. [33].

Color parameters. Twenty μ L of a 10% (v/v) solution of acetaldehyde was added to 2 mL of wine sample in order to avoid sulfite interferences. After 20 minutes of incubation, spectrophotometric measurements were made using quartz cells with a path length of 1 mm. The color intensity (CI) was estimated using the method described by Glories [34]. The CIELab coordinates, lightness (L^*), chroma (C^*), hue (h^*), red-greenness (a^*) and yellow-blueness (b^*) were determined according to Ayala et al. [35] and the data were processed with the MSCV® software [36]. The total colour difference (ΔE_{ab}^*) between two samples was obtained using the expression: $\Delta E_{ab}^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ [37].

Phenolic compounds analysis. Anthocyanins were analyzed by direct injection of wine using reversed-phase HPLC-DAD as previously described [13]. Proanthocyanidin analysis was performed by reversed-phase HPLC-DAD of adducts formed after acid-catalysed depolymerisation of proanthocyanidin in the presence of an excess of phlorogluciol as previously described [13].

Polysaccharide analysis. Wine polysaccharides were extracted by a precipitation with acidified absolute ethanol and analyzed by HRSEC-RID as previously described [13].

Sensory analysis. All sensory analysis were performed in the tasting room of the Faculty of Enology of Tarragona (University Rovira i Virgili) which was designed according to UNE 87004.197. Tasting was carried out with the ISO official tasting glasses (ISO 3591.1977). To evaluate the effect of partial dealcoholization on wine organoleptic characteristics, all the wines were tasted by a group of eleven expert oenologists from the Rovira i Virgili University. Six sensory triangle tests were conducted for each AOC wine to compare the three wines in pairs according to UNE ISO 4120.1983. Triangular tests were performed at two different serving temperatures: 16-18 °C and 24-26 °C. The low temperature was considered as the optimum serving temperature at which the characteristics and aromas of red wines were revealed. In contrast, the higher temperature favored ethanol evaporation and was chosen to reproduce the incorrect serving conditions that sometimes occur. In all the cases, the main objective was to determine whether tasters were able to recognize the wine that was different. The second objective was to determine which wine was preferred by the panelists who correctly identified the different wine. However, this last assay was only carried out at the optimum service temperature (16-18 °C). No preference tests were carried out at 24-26 °C because there was such a presence of ethanol that it was difficult to appreciate the other attributes.

Statistics. All the physical and chemical data are expressed as the arithmetic average $\pm$ the standard deviation from two replicates. One-factor analysis of variance (ANOVA) and Scheffe's test were carried out with SPSS software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). The level of significance of sensory triangle tests was determined following Jackson's method [38].

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the general parameters of the various wines. As expected all the partially dealcoholized wines contain less ethanol than their corresponding controls. Moreover, the ethanol content of all the partially dealcoholized wines was very close to the expected value, which indicated that the application of reverse osmosis was suitable for the proposed objectives. No significant differences were found in pH or titratable acidity with the only exception of the -2% wine from AOC Priorat which had a slightly higher, but statistically significant, titratable acidity. This data is quite logical inasmuch as the solubility of potassium hydrogen tartrate depends on the ethanol content. Specifically, the higher the ethanol content is, the lower the solubility [39]. Since the wine is an oversaturated solution in potassium hydrogen tartrate immediately after alcoholic fermentation, this salt tends to precipitate over time. Consequently, the higher ethanol content of the control and -1% wines induced greater precipitation during oak aging than in -2% wine. This phenomenon was not observed in the AOC Penedès wines probably because they were partially dealcoholized when almost all the excess of potassium hydrogen tartrate had already precipitated.

Table 1. General parameters for wines.

Wine	Parameter	Control wine	Dealcoholized wines	
			-1%	-2%
AOC Penedès	Ethanol ^a	14.8 ± 0.2 c	13.8 ± 0.2 b	12.8 ± 0.2 a
	pH	3.61 ± 0.01 a	3.60 ± 0.01 a	3.61 ± 0.01 a
	TA ^b	3.2 ± 0.1 a	3.2 ± 0.1 a	3.2 ± 0.1 a
AOC Priorat	Ethanol ^a	16.2 ± 0.2 c	15.1 ± 0.2 b	14.1 ± 0.1 a
	pH	3.55 ± 0.01 a	3.55 ± 0.01 a	3.55 ± 0.01 a
	TA ^b	3.50 ± 0.01 a	3.50 ± 0.01 a	3.70 ± 0.03 b

Different letters in a row indicate statistical differences ($P < 0.05$) | ^aAlcohol degree (%vol.). | ^b Titratable acidity (expressed as g/L of sulfuric acid).

Table 2 shows the color parameters of the various wines. No statistically significant differences were found in any of the color parameters in the case of AOC Penedès wines. However, some slight but statistically significant differences were found in CIELab coordinates in partially dealcoholized wines from AOC Priorat with respect to their control. Specifically C* and L* data indicate that the control wine has a somewhat deeper color than partially dealcoholized wines. To verify whether these small differences were large enough to be distinguished by the human eye, the total color differences (ΔE_{ab}^*) between the wines were calculated. Table 3 shows the average ΔE_{ab}^* when different pairs of wines were compared. The human eye can generally distinguish two colors when $\Delta E_{ab}^* \geq 1$ [37]. However, it is also generally accepted that tasters can only distinguish the color of two wines through the glass when $\Delta E_{ab}^* \geq 5$ [37]. Since this parameter was not higher than five units in any case, the effect of reverse osmosis on wine color was not enough to be distinguished by the human eye.

Table 4 shows the HPLC-DAD quantification of anthocyanins in the different wines. The concentration of anthocyanins in AOC Penedès and especially in AOC Priorat wines was very low. However, this is quite logical considering that these wines were aged in oak barrels for 9 months. The moderate microoxygenation that took place across the staves had a considerable influence on anthocyanin chemical transformations. Oxygen can oxidize anthocyanins and can also transform anthocyanins into more complex pigments, some of which may eventually precipitate [40]. The lower anthocyanin concentration of AOC Priorat wines may be the result of these wines having consumed more oxygen since they were aged in new oak barrels which are more permeable to oxygen than the two-year-old barrels used in AOC Penedès.

Table 2. Color parameters of wines, including color intensity and CIELAB coordinates.

Wine	Parameter	Control wine	Dealcoholized wines	
			-1%	-2%
AOC Penedès	Cl ^a	15.3 ± 1.5 a	15.6 ± 0.9 a	15.4 ± 0.7 a
	C* ^b	55.8 ± 1.9 a	56.3 ± 0.7 a	55.9 ± 0.2 a
	L* ^c	40.6 ± 3.2 a	40.4 ± 1.3 a	40.8 ± 0.5 a
	h* ^d	16.8 ± 0.9 a	18.1 ± 0.9 a	17.5 ± 1.3 a
	a* ^e	55.4 ± 1.1 a	53.5 ± 0.3 a	53.4 ± 0.1 a
	b* ^f	16.1 ± 1.2 a	17.5 ± 1.1 a	16.8 ± 1.2 a
AOC Priorat	Cl ^a	15.4 ± 0.2 a	15.2 ± 0.4 a	14.5 ± 0.5 a
	C* ^b	55.3 ± 0.2 b	52.4 ± 0.5 a	52.7 ± 0.1 a
	L* ^c	37.9 ± 0.4 a	39.8 ± 1.2 ab	40.3 ± 0.1 b
	h* ^d	11.5 ± 0.1 b	11.1 ± 0.4 ab	10.5 ± 0.2 a
	a* ^e	52.3 ± 0.2 b	51.4 ± 0.3 a	51.8 ± 0.1 ab
	b* ^f	10.7 ± 0.1 b	10.1 ± 0.5 ab	9.6 ± 0.2 a

Different letters in a row indicate statistical differences (P < 0.05) | ^a Color intensity | ^b Chroma | ^c Lightness | ^d Hue | ^e Green/red color component | ^f Blue/yellow color component

Table 3. Average values for Total Color Differences (ΔEab*) between samples

	AOC Penedès	AOC Priorat
Control vs. -1 %	2.37	2.19
Control vs. -2 %	2.13	2.69
-1 % vs. -2 %	0.81	0.81

The AOC Penedès control wine and its corresponding partially dealcoholized wines have statistically similar total anthocyanin concentrations. The concentrations of monoglucosides and both acylated anthocyanidins (acetylated and *p*-coumarylated) were also similar. This data is quite logical since no color differences between these wines had been observed.

The anthocyanin composition of the -1% AOC Priorat wine was also statistically similar to that of its control. However, the total anthocyanin concentration of the -2% AOC Priorat wine was statistically significantly higher than that of the control and -1% wines. This trend was also observed in monoglucosides and acylated. This data, which was not observed in the case of AOC Penedès wine, can be related to the precipitation of tartrate salts. As it has been discussed above, the -2 % AOC Priorat wine has a significant higher titratable acidity than control wine whereas the -2% AOC Penedès have similar values. This data indicates the -2 % AOC Priorat has got a minor precipitation of these salts. It is well known that tartrate salts can absorb polyphenols [41]. Consequently, if this wine has got less precipitation of tartrate salts, it is quite logical that less anthocyanins have been absorbed.

Table 4. Anthocyanins quantification determined by HPLC-DAD, expressed as milligrams of malvidine-*O*-3-glucoside per liter.

Wine	Parameter	Control wine	Dealcoholized wines	
			-1%	-2%
AOC <i>Penedès</i>	Non-acylated anthocyanins	153.3 ± 15.5 a	151.2 ± 1.3 a	158.6 ± 1.1 a
	Acetylated anthocyanins	68.7 ± 5.7 a	65.5 ± 3.5 a	67.9 ± 3.3 a
	<i>p</i> -Coumarylated anthocyanins	8.4 ± 1.3 a	8.2 ± 0.2 a	8.6 ± 0.1 a
	Total anthocyanins	230.3 ± 22.5 a	224.9 ± 5.1 a	235.1 ± 4.5 a
AOC <i>Priorat</i>	Non-acylated anthocyanins	21.2 ± 2.6 a	20.1 ± 1.7 a	31.5 ± 4.6 b
	Acetylated anthocyanins	12.6 ± 1.8 a	14.4 ± 4.8 ab	19.3 ± 0.4 b
	<i>p</i> -Coumarylated anthocyanins	0.6 ± 0.1 a	0.7 ± 0.1 a	1.1 ± 0.1 b
	Total anthocyanins	34.5 ± 4.5 a	31.5 ± 6.7 a	51.9 ± 5.1 b

Different letters in a row indicate statistical differences ($P < 0.05$)

At first glance it may seem paradoxical that the -2% AOC Priorat wine had a higher anthocyanin concentration and a color that was slightly less deep (lower C^* and higher L^*). However, color in wines aged in wood depends more on anthocyanin derived pigments [42] which probably are in lower concentration in this wine. In any case, all these differences were so small that they have hardly any effect on the consumers' perception of quality.

Table 5. Total phenolic content by spectrophotometry and proanthocyanidin analysis by phloroglucinolysis using HPLC-DAD.

Wine	Parameter	Control wine	Dealcoholized wines	
			-1%	-2%
AOC <i>Penedès</i>	TPI ^a	73.9 ± 2.3 a	72.9 ± 2.5 a	75.8 ± 0.6 a
	TP ^b	1.8 ± 0.3 a	1.6 ± 0.2 a	1.7 ± 0.3 a
	mDP ^c	5.96 ± 0.02 a	6.11 ± 0.09 a	5.87 ± 0.17 a
	%PC ^d	70.06 ± 0.39 a	69.33 ± 0.43 a	69.42 ± 0.73 a
	%PD ^e	29.94 ± 0.39 a	30.67 ± 0.43 a	30.58 ± 0.73 a
	%Gal ^f	3.20 ± 0.16 a	3.24 ± 0.20 a	3.48 ± 0.19 a
AOC <i>Priorat</i>	TPI ^a	62.4 ± 0.5 a	62.2 ± 0.1 a	62.1 ± 0.8 a
	TP ^b	1.6 ± 0.2 a	1.7 ± 0.2 a	1.2 ± 0.3 a
	mDP ^c	4.60 ± 0.24 a	4.73 ± 0.04 a	4.69 ± 0.07 a
	%PC ^d	77.00 ± 0.06 b	76.92 ± 0.32 b	75.51 ± 0.42 a
	%PD ^e	23.00 ± 0.06 a	23.08 ± 0.32 a	24.49 ± 0.42 b
	%Gal ^f	3.98 ± 0.02 a	4.21 ± 0.38 ab	4.63 ± 0.02 b

Different letters in a row indicate statistical differences ($P < 0.05$) | ^a Total polyphenolic index | ^b Total proanthocyanidins expressed as g/L | ^c Mean degree of polymerization | ^d Percentage of procyanidins | ^e Percentage of prodelphinidins | ^f Percentage of galloylation

Table 5 shows the total phenolic index (TPI), the total proanthocyanidin concentration and related parameters. No statistically significant differences were found in TPI, total concentration of proanthocyanidins or their mean degree of polymerization (mDP) between partially dealcoholized wines and the control wine from AOC Penedès. Moreover, no differences were found in the percentages of procyanidins, prodelphinidins and galloylation. Results were similar in AOC Priorat wines although some slight but statistically significant differences were observed in the percentage of procyanidins, prodelphinidins and galloylation. These slight differences may be also related with the absorption of proanthocyanidins by tartrate salts. In any case, these differences are so low that it seems that reverse osmosis did not affect appreciably the tannic structure of these wines.

Table 6 shows the results of polysaccharide analysis by HRSEC-RID of the different wines. In general, the total polysaccharide concentration and the molecular weight fractions of -1% wines were similar to those of control wines in both Appellations. However, some slight differences appeared in -2% wines which generally have higher values in all the fractions although these differences are not always significant. This slight tendency may be due to the fact that polysaccharide solubility is lower when the ethanol concentration is higher [43]. Consequently, polysaccharide precipitation during oak ageing should be lower in dealcoholized wines.

Table 6. Polysaccharide analysis by HRSEC-RID, expressed as milligrams of polysaccharide per liter.

Wine	Parameter	Control wine	Dealcoholized wines	
			-1%	-2%
AOC Penedès	LMWf ^a	85.2 ± 10.1 a	84.1 ± 8.6 a	86.1 ± 4.7 a
	MMWf ^b	187.2 ± 5.7 a	222.7 ± 18.9 ab	237.8 ± 7.8 b
	SMWf ^c	233.8 ± 78.5 a	211.8 ± 19.6 a	221.8 ± 28.5 a
	TOTAL	506.2 ± 82.8 a	518.6 ± 47.1 a	545.7 ± 41.0 a
AOC Priorat	LMWf ^a	74.6 ± 20.2 a	65.9 ± 0.7 a	73.3 ± 4.5 a
	MMWf ^b	202.9 ± 14.8 a	170.2 ± 10.5 a	218.0 ± 19.7 a
	SMWf ^c	200.1 ± 7.4 a	167.1 ± 27.5 a	225.7 ± 14.6 a
	TOTAL	477.5 ± 27.7 ab	430.2 ± 37.4 a	516.9 ± 38.8 b

Different letters in a row indicate statistical differences (P < 0.05) | ^a Large molecular weight fraction, including polysaccharides greater than 50KDa | ^b Medium molecular weight fraction, including polysaccharides between 10KDa and 50KDa | ^c Small molecular weight fraction, including polysaccharides up to 10KDa

Bibliography also describes that some wine polysaccharides can inhibit the growth of potassium hydrogen tartrate crystals [44] and therefore is also quite logical that wines with higher polysaccharide concentration would have higher titratable acidity. This is accomplished in the case of -2 % ethanol AOC Priorat wine but not in the -2 % ethanol AOC Penedès wines which have similar titratable acidity than its control (Table 1). This phenomenon was probably not observed in the -2 % ethanol AOC Penedès wines because this wine was partially dealcoholized when almost all the excess of potassium hydrogen tartrate had already precipitated. This is an interesting data because indicate that reverse osmosis dealcoholization should be applied as soon as possible in order to prevent the usual losses of titratable acidity which happens in wines during cold stabilization.

Table 7. Sensorial analysis results for wines.

Wine	Triangular test	T (°C)	Positive identifications	P	Preferences		
					Control	-1%	-2%
AOC Penedès	Control vs. -1%	16-18	9/11	0.005	7	2	-
		24-26	8/11	0.03			
	Control vs. -2%	16-18	7/11	0.05	5	-	2
		24-26	4/11	ns			
	-1% vs. -2%	16-18	1/11	ns	-	0	1
		24-26	4/11	ns			
AOC Priorat	Control vs. -1%	16-18	4/11	ns	3	1	-
		24-26	3/11	ns			
	Control vs. -2%	16-18	5/11	ns	3	-	2
		24-26	7/11	0.05			
	-1% vs. -2%	16-18	5/11	ns	-	3	2
		24-26	7/11	0.05			

Table 7 shows the results of the sensory analysis. Tasters were able to distinguish control and -1% wines from AOC Penedès at both serving temperatures in triangular tests. Of all the tasters who distinguished them correctly, seven preferred the control wine whereas the other two tasters preferred the -1% wine. In any case, these preferences were not statistically significant ($p = 0.0703$). Results were similar when the control was compared with the -2% wine at 16-18 °C although the significance level was somewhat lower and have neither statistical significance ($p = 0.1641$). The results were more surprising when this triangular test was performed at 24-26 °C given that only 4 tasters ($p > 0.05$) managed to distinguish between them. This lack of significance may be because the excessive ethanol content in both wines at high temperatures may cause the tasters some fatigue and / or saturation. Finally, tasters were unable to distinguish between -1% and -2% wines at both serving temperatures. It seems, therefore, that tasters can distinguish the AOC Penedès control wine from its corresponding partially dealcoholized wines and that they prefer it. Nevertheless, all tasters admitted that it was not easy to distinguish between the glasses and that they had doubts when selecting their preferred wine.

In the case of the AOC Priorat wine, the results were less clear than in the case of the AOC Penedès wine. Only 4 tasters out of 11 ($p > 0.05$) matched the triangular test at 16-18 °C and only 3 out of 11 ($p > 0.05$) at 24-26 °C when control and -1% wine were compared. Neither could the panel distinguish between the control and -2% at 16-18 °C (5 tasters out of 11; $p > 0.05$). However, they could when they tasted the wines at 24-26 °C (7 tasters out of 11; $p = 0.05$). Results were identical when -1% and -2% wines were compared. These surprising results seem to indicate that wines were really very similar at least from the standpoint of sensory characteristics.

CONCLCLUSIONS

The results indicate that the application of reverse osmosis to partial wine dealcoholization does not appreciably alter the color or the chemical composition of the wines, with the only and obvious exception of the ethanol content. Significant differences were only found in some of the analyzed parameters but in all cases these differences were really very small. Moreover, a trained panel of tasters had severe difficulty in distinguishing between control and partially dealcoholized wines in triangular tests and results were statistically significant only in some of the comparisons. This technique, then, can be very

useful for the partial dealcoholization of red wines since it hardly alters their composition and sensory characteristics. Moreover, the cost of the process can be considered as affordable since the equipment manufacturer provides the service at a price of 0.15 €/L for removing 1 % of ethanol. Reverse osmosis is, therefore, an interesting tool for improving the balance of the wines from regions where grapes can easily have a very high alcohol content. This is particularly important nowadays because climatic change is increasingly causing a mismatch between the pulp and phenolic maturity of grapes.

Acknowledgments. We thank CICYT (AGL2007-66338 and AGL2011-29708-C02-01) and CDTI (Project CENIT Demeter) for financial support. We also thank the Société Michael Paetzold for providing the reverse osmosis equipment and to Juvé y Camps SA and Vinícola del Priorat SCCL wineries for providing the wines.

REFERENCES

- [1] Vidal S, Francis L, Noble A, Kwiatkowski M, Cheynier V, Waters E (2004) *Anal Chim Acta* 513:57-65
- [2] Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP (2006) *Am J Enol Vitic* 57:257-268
- [3] Souquet JM, Cheynier V, Brossaud F, Moutounet M (1996) *Phytochemistry* 43:509-512
- [4] Santos-Buelga C, Francia-Aricha EM, Escribano-Bailón MT (1995) *Food Chem* 53:197-201
- [5] De Freitas V, Mateus N (2001) *J Agric Food Chem* 49:940-945
- [6] Peleg H, Gacon K, Schlich P, Noble AC (1999) *J Sci Food Agric* 79:1123-1128
- [7] Vidal S, Francis L, Williams P, Kwiatkowski M, Gawel R, Cheynier V, Waters E (2004) *Food Chem* 85:519-525
- [8] Carvalho E, Mateus N, Plet B, Pianet I, Dufourc E, De Freitas V (2006) *J Agric Food Chem* 54:8936-8944
- [9] Chalier P, Angot B, Delteil D, Doco T, Gunata Z (2007) *Food Chem* 100:22-30
- [10] Vicens A, Fournand D, Williams P, Sidhoum L, Moutounet M, Doco T (2009) *J Agric Food Chem* 57:2955-2960
- [11] Vidal S, Williams P, Doco T, Moutounet M, Pellerin P (2003) *Carbohydr Polym* 54:439-447
- [12] Guadalupe Z, Ayestarán B (2007) *J Agric Food Chem* 55:10720-10728
- [13] Gil M, Kontoudakis N, González E, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, Zamora F (2012) *J Agric Food Chem* 60:7988-8001
- [14] Pérez-Magariño S, González-San José ML (2004) *J Agric Food Chem* 52:1181-1189
- [15] Des Gachons CP, Kennedy JA (2003) *J Agric Food Chem* 51:5877-5881
- [16] Jones GV, White MA, Cooper OR, Storchmann K (2005) *Clim Change* 73:319-343
- [17] Schultz HR, Jones GV (2010) *J Wine Res* 21:137-145
- [18] Kontoudakis N, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, Zamora F (2011) *Austr J Grape Wine Res* 17:230-238
- [19] Malherbe DF, Du Toit M, Cordero Otero RR, Van Rensburg P, Pretorius IS (2003) *Appl Microbiol Biotechnol* 61:502-511
- [20] Pickering GJ (2000) *Journal of Wine Research* 11:129-144
- [21] Schmidtke LM, Blackman JW, Agboola SO (2012) *J Food Sci* 77:R25-R41
- [22] Belisario-Sánchez Y, Taboada-Rodríguez A, Marín-Iniesta F, Loópez-Gómez A (2009) *J Agric Food Chem* 57:6770-6778
- [23] Catarino M, Mendes A (2011) *Innovative Food Sci Emerg Technol* 12:330-337
- [24] Takács L, Vatai G, Korány K (2007) *J Food Eng* 78:118-125
- [25] Gómez-Plaza E, López-Nicolás JM, López-Roca JM, Martínez-Cutillas A (1999) *LWT - Food Sci Technol* 32:384-386

- [26] Bogianchini M, Cerezo AB, Gomis A, López F, García-Parrilla MC (2011) *LWT - Food Sci Technol* 44:1369-1375
- [27] Varavuth S, Jiratananon R, Atchariyawut S (2009) *Sep Purif Technol* 66:313-321
- [28] Diban N, Athes V, Bes M, Souchon I (2008) *J Membr Sci* 311:136-146
- [29] Meillon S, Urbano C, Guillot G, Schlich P (2010) *Food Quality and Preference* 21:763-773
- [30] Meillon S, Dugas V, Urbano C, Schlich P (2010) *Am J Enol Vitic* 61:42-52
- [31] Gambuti A, Rinaldi A, Lisanti MT, Pessina R, Moio L (2011) *Eur Food Res Technol* 233:647-655
- [32] Gacia Barceló J (1990) 4. Alcoholes. In García Barceló J (ed) *Técnicas analíticas para vinos*, 1st edn. GAB Sistemática Analítica, Mola-Olérdola, Barcelona, Spain., pp 4.5-4.39
- [33] Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubordieu D (2006) Chapter 6: Phenolic Compounds. In Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A and Dubordieu D (eds) *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments*. John Wiley & Sons, Chichester, pp 141-203
- [34] Glories Y (1984) *Conn Vigne Vin* 18:253-271
- [35] Ayala F, Echavarri JF, Negueruela AI (1997) *Am J Enol Vitic* 48:357-363
- [36] Ayala F, Echavarri JF, Negueruela AI (2001) 2001
- [37] Pérez-Magariño S, González-Sanjosé ML (2003) *Food Chem* 81:301-306
- [38] Jackson RS (2002) Quantitative (technical) wine assessment. In Taylor SL (ed) *Wine Tasting. A Professional Handbook*, 1st edn. Academic Press, Hong Kong, pp 113-185
- [39] Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE (1996) The Physical and Chemical Stability of Wine. In Boulton RB (ed) *Principles and Practices of Winemaking*, 1st edn. Springer Science and Business Media, Inc., New York, pp 320-351
- [40] He F, Liang NN, Mu L, Pan QH, Wang J, Reeves MJ, Duan CQ (2012) *Molecules* 17:1483-1519
- [41] Vernhet A, Dupre K, Boulange-Petermann L, Cheynier V, Pellerin P, Moutounet M (1999) *Am J Enol Vitic* 50:398-403
- [42] Alcalde-Eon C, Escribano-Bailon M, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo J (2006) *Anal Chim Acta* 563:238-254
- [43] Ayestarán B, Guadalupe Z, León D (2004) *Anal Chim Acta* 513:29-39
- [44] Gonçalves F, Fernandes C, de Pinho MN (2001) *Sep Purif Technol* 22–23:423-429

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

CAPÍTULO IV. Influencia del tamaño de baya sobre la composición química del vino tinto

La enorme heterogeneidad de la uva es uno de los problemas con los que se enfrenta el sector vitivinícola, por lo que son muchas las bodegas que aplican técnicas para seleccionar la uva, ya sea de forma manual o mediante mesas automatizadas de selección, con el fin de separar las uvas de mejor calidad y elaborar así vinos tintos de alta gama.

En el sector siempre se ha considerado que las variedades de uva de tamaño pequeño son las más adecuadas para la vinificación, ya que la mayor parte de los compuestos de interés enológico se encuentran en las pieles y, utilizando bayas de

tamaño pequeño se consigue una mayor proporción pieles/mosto. Asumiendo esta consideración, se planteó la idea de seleccionar la uva en función de su tamaño y vinificar cada calibre por separado, como una posible técnica para mejorar la calidad de los vinos tintos de alta gama.

En este capítulo se aborda el objetivo número 5, en el que se planteaba evaluar la influencia del tamaño de la baya sobre la composición química del vino tinto. Para ello se seleccionaron, mediante dos tamizados, tres tamaños distintos de baya, procedentes de una cosecha de la variedad cabernet sauvignon.

Las analíticas de los vinos de este capítulo se realizaron: en el laboratorio del grupo de *tecnología enológica* (TECNENOL) del Departamento de Bioquímica i Biotecnología de la Universitat Rovira i Virgili (URV, Tarragona), en los laboratorios del Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA) de la Universidad de Castilla la Mancha (UCLM, Ciudad Real), y en los laboratorios del Instituto de la Vid y el Vino de Castilla la Mancha (IVICAM, Tomelloso). Los resultados de este ensayo se hallan en el manuscrito titulado **“Influence of berry size on wine composition and quality”** elaborado para ser enviado a la revista *Food Chemistry*.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

Influence of berry size on wine composition and quality

Mariona Gil,^a Olga Pascual,^a Sergio Gómez-Alonso,^{b,d} Esteban García-Romero,^c
Isidro Hermosín-Gutiérrez,^b Joan Miquel Canals,^a and Fernando Zamora.^{a,*}

^a Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Grup de Recerca en Tecnologia Enològica (Tecenol), Universitat Rovira i Virgili, Campus de Sescelades, C/Marcel·li Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain.

^b Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Universidad de Castilla-La Mancha, Campus Universitario s/n, 13071 Ciudad Real, Spain.

^c Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, Ctra. Toledo-Albacete s/n, 13700 Tomelloso, Ciudad Real, Spain.

^d Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Paseo de la Innovación, 1, 02006, Albacete, Spain.

ABSTRACT: The aim of this paper was to study how berry size affects color and chemical composition of wine. Grapes of Cabernet sauvignon were harvested at optimal maturity, and selected by two different sieves, to obtain three grape groups with different sizes (big, medium and small). Every block was used for winemaking by triplicate. The results show that color intensity, total polyphenol index, total anthocyanins, proanthocyanidins, coumaric acid derivatives, caffeic acid and stilbene concentrations were higher when the berries were smaller while pH did the opposite. Moreover, wines from smaller berries have higher proportion of prodelphinidins and lower galloylation degree of proanthocyanidins. All these data suggest that the separation of berries by size in the wineries should be an interesting tool for wine quality management.

KEYWORDS: wine composition, berry size, phenolic compounds, polysaccharides, wine color, pressing.

1. Introduction

Nowadays, international market demands red wines with deep color, full body, soft tannins and fruit scents. These sensory characteristics are closely related with the phenolic composition of wine. Specifically, wine color are largely related with anthocyanins which are red pigments originated in grape skins. However wine color also depends on wine pH and on the presence of copigments (mainly flavan-3-ols, flavonols or hydroxycinnamic acids) which protect anthocyanins of hydration enhancing color intensity (He et al., 2012). Other sensory perceptions, such as bitterness and astringency, are closely related with proanthocyanidins which are flavan-3-ol polymers from grape skins and seeds (Lesschaeve & Noble, 2005). There are some structural differences between skin and seed proanthocyanidins. Specifically, skin proanthocyanidins are larger polymers, containing epigallocatechin and a little proportion of galloylated subunits, while seed proanthocyanidins are smaller polymers, with a higher proportion of galloylated subunits and without epigallocatechin subunits within their structure (Cerpacalderon & Kennedy, 2008). It is currently accepted that astringency increases with proanthocyanidin mean degree of polymerization (mDP) and with the proportion of galloylated subunits (Chira, Pacella, Jourdes & Teissedre, 2011, Chira, Schmauch, Saucier, Fabre & Teissedre, 2009, De Freitas & Mateus, 2001). In contrast, monomeric flavan-3-ols and their smaller polymers are mainly responsible of bitterness (Peleg, Gacon, Schlich & Noble, 1999). Moreover, other families of phenolic compounds, such as flavonols and hydroxycinnamic acids, could also be related with bitterness (Preys et al., 2006).

Astringency and bitterness can also be modulated by the presence of other substances in the wine matrix. In that sense, it seems clear that compounds contributing to sweetness, such as sugars, glycerol and polysaccharides can smooth both attributes (Sáenz-Navajas, Avizcuri, Ferreira & Fernández-Zurbano, 2012).

Grape phenolics are not distributed homogeneously in the berry. Briefly, skins contain anthocyanin, flavonols, hydroxycinnamic acids and flavan-3-ols (monomers and polymers). Seeds contain mainly flavan-3-ols and finally pulp contains hydroxycinnamic acids (Adams, 2006). This distribution of

*Corresponding autor: Phone: + 34 977 55 87 96. Fax: + 34 977 55 86 86. E-mail: fernando.zamora@urv.cat

compounds among berry tissues can explain the differences of extraction kinetics for each family of compounds, as well as the influence of winemaking technique on wine composition.

According to one of the classical postulates of the viticulture, cultivars with smaller berries produce the best red wines. If we consider a berry like a perfect sphere, its surface (related to the skin amount) corresponds to the formula ($4\pi r^2$), while its volume (related to the flesh amount) corresponds to the formula ($\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3$). So then, the skin to flesh ratio corresponds to the formula ($\frac{3}{r}$), inversely correlated with the radius of the berry. Considering this idea, it can be accepted that the smaller the berry the biggest the skin to flesh ratio, which in turn mainly determines the proportion of skins to grape juice ratio during maceration (one of the main factors for phenolic enrichment of red wine). This argument could explain some of the differences observed between wines from different *Vitis vinifera* cultivars (with different average berry sizes).

It has been described the existence of a high level of grape heterogeneity at harvest, probably due to differences during the development of the fruit. This heterogeneity leads to a wide maturity range among grapes (Kontoudakis, Esteruelas, Fort, Canals, De Freitas & Zamora, 2011). One of the obvious factors of heterogeneity at harvest is the diversity of berry sizes. It is generally accepted that berry size at harvest depends on the number of seeds per berry, which seems quite logical since the concentration of growth regulating substances during berry development is also proportionate to the number of seeds. Consequently, berry size can influence not only the skin to flesh ratio but the seed to flesh ratio as well (Roby & Matthews, 2004). It is therefore clear that different sized berries have different proportion of skins and seeds which will probably be reflected in wines with different composition in anthocyanin and proanthocyanidin.

According to all these arguments, it is quite logical consider the possibility of separating berries by size in the winery as a tool for better management of wine quality. Winemaking separately berries of smaller size would theoretically allow winemakers to obtain higher quality of premium red wines whereas the resting berries would be employed to obtain basic wines.

The aim of this paper was to study the real influence of berry size on wine composition, selecting berries from a single harvest by its size. Three different sizes, big, medium and small (figure 1), as well as unselected control grapes were employed for winemaking separately in this study.



Figure 1. Picture of a grape berry for each selected berry size. From left to right picture shows small, medium and big berry sizes.

2. Methods and Materials

2.1 Chemicals and equipments. Methanol, acetonitrile, formic acid and acetic acid were of HPLC grade (>99%) and purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Acetaldehyde, poly(vinylpyrrolidone), phloroglucinol, ascorbic acid, sodium acetate and ammonium formate were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). The commercial standards were from Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany): malvidin 3-glucoside, *trans*-caftaric acid, caffeic and *p*-coumaric acids, *trans*-resveratrol, and *trans*-piceid. Absolute ethanol and hydrochloric acid were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Commercial standards of kaempferol, quercetin, isorhamnetin, myricetin and syringetin, and the 3-glucosides of kaempferol, quercetin, isorhamnetin, syringetin, proanthocyanidin dimer B2, (+)-catechin,

(-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin and (-)-epicatechin-3-*O*-gallate were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Other non commercial flavonol standards (myricetin 3-glucoside and quercetin 3-glucuronide) were kindly supplied by Dr. Ullrich Engelhardt (Institute of Food Chemistry, Technical University of Braunschweig, Germany). The *trans* isomers of resveratrol and piceid (resveratrol 3-glucoside) were transformed into their respective *cis* isomers by UV-irradiation (366 nm light for 5 min in quartz vials) of 25% MeOH solutions of the *trans* isomers. Vitisin A (10-carboxy-pyranomalvidin-3-glucoside) and 10-*p*-monohydroxyphenyl-pyranomalvidin-3-glucoside (MHP-pymv-3-glc) were quantified using previously obtained standards (Blanco-Vega, López-Bellido, Alía-Robledo & Hermosín-Gutiérrez, 2011). A pullulan calibration kit Shodex P-82 (P-5, Mw=5.9 kDa; P-10, Mw=11.8 kDa; P-20, Mw=22.8 kDa; P-50, Mw=47.5 kDa; P-100, Mw=112 kDa; P-200, Mw=212 kDa; P-400, Mw=404 kDa; P-800, Mw=788 kDa) was obtained from Waters (Barcelona, Spain), while a pullulan 1.3 kDa and four dextrans BioChemika (12, 25, 50 and 80 kDa) were obtained from Fluka (St. Louis, Missouri). The polysaccharides used as external standards for quantification were pectins from citrus fruit and dextrans synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). The HPLC analysis for proanthocyanidins and polysaccharides was performed using an Agilent 1200 Series liquid chromatograph equipped with a G1362A refractive index detector (RID), a G1315D diode array detector (DAD), a G1311A quaternary pump, a G1316A column oven, and a G1329A autosampler (Agilent Technologies, Santa Clara, California). Low molecular weight wine phenolic compounds (namely, anthocyanin and non-anthocyanin phenolics) were HPLC separated, identified and quantified on an Agilent 1100 Series system (Agilent, Germany), equipped with DAD (G1315B) and LC/MSD Trap VL (G2445C VL) electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MSⁿ), and coupled to an Agilent Chem Station (version B.01.03) data-processing station. The mass spectra data were processed with the Agilent LC/MS Trap software (version 5.3). All the spectrophotometric measurements were performed using a Helios Alpha UV-vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, Massachusetts).

2.2 Grapes and wines. The experiment was carried out with *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon cultivar from the experimental winery of the Enology Faculty of the Rovira i Virgili University in Constantí (AOC Tarragona; 41°8'54.17" (N) and 1°11'53.89" (E)) during of the 2012 vintage. The vineyard is located at an altitude of 87 meters above sea level. Grapes were harvested manually on September 27 when they had around 12.5% of average potential ethanol content. About 100 kg of grapes were carefully destemmed (Delta V2, Bucher Vaslin SA, Chalonnes sur Loire, France). Subsequently, the berries were selected in function of their size by employing two sieves with different holes size (11.5 ± 0.5 and 14.5 ± 0.5 mm respectively). Berries were dropped onto the sieve with smaller holes with an inclination of about 30 degrees whilst two operators gently agitated it to facilitate the fall of the smaller berries. This operation was repeated three times and the sieved berries were considered as small berries. Subsequently, the resting berries were sieved again using the sieve with higher hole in a similar way. The sieved berries were considered as medium berries whereas the non-sieved berries were considered as big berries. Berries of each size (small, medium and big) as well as non selected berries (Control) were randomly distributed in 3 groups of 4 kg each one. After that, berries were crushed with a manual crusher, sulfited (100 mg K₂S₂O₅/kg), and placed in 6 L tanks equipped with a submerged cap system according to the winemaking method previously described (Sampaio, Kennedy & Vasconcelos, 2007). All tanks were immediately inoculated with 200 mg/kg of selected yeast (EC1118, Lallemand Inc., Montreal, Canada) and maintained at a room temperature of 25 ± 1 °C. All of these micro-scale vinifications were controlled daily by measuring the temperature and the density of the juice. One mechanical punchdown of the cap were made around 1040 density units to improve color extraction. After 2 weeks of maceration, the wines from three of the tanks were racked (racking wine) and the wet solids were pressed (pressing wine). All the wines were sulfited (100 mg K₂S₂O₅/L) and kept at 4 °C for 1 month for tartaric stabilization. Malolactic fermentation was inhibited to prevent any possible variations in the rhythm of this transformation that could affect each wine differently. Finally, wines were bottled and stored in a dark cellar at 15 °C until analysis. The analyses started 2 months after bottling.

2.3 Grapes characterization. For each selected berry size group of grapes, a triplicate of 100 berries was used to allow the physical grapes characterization. The weight of one hundred grapes was established by

using an analytical scale. The volume of one hundred grapes was established by the displacement of a known volume of water into a graduated cylinder. The theoretical surface (S) of skins was calculated from the previously measured berry volume and assuming that the berries were perfect spheres ($S = 4 \cdot \pi \cdot [3 \cdot v / 4 \cdot \pi]^{2/3}$, where v corresponds to the measured average volume per berry). The ratio between berry surface and berry weight was calculated by dividing the theoretical surface of 100 berries by the average berry mass of 100 berries. The seeds from the same triplicates of 100 berries were extracted manually, and used to count the number of seeds contained in every single berry and the weight and volume of seeds from 100 berries, data useful to calculate the proportion of seeds expressed in (w/w) and in (v/v).

2.4 Standard grape juice and wine analysis. The titratable acidity was measured by titrimetry using NaOH 0.1N and bromothymol blue as indicator. pH values were determined by a pH meter Basic-20 (CRISON, Barcelona, Spain). Potential ethanol of grape juice was determined by refractrometry and the ethanol content of wine was determined by ebullimetry (GAB system, Barcelona Spain). The total polyphenol index (TPI) was analyzed by measuring the 280 nm absorbance of a 1:100 dilution of wine or grape juice with a spectrophotometer after a centrifugation (8500 rpm during 20 minutes) using a 10 mm quartz cuvette as previously described (Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean & Dubordieu, 2006).

2.5 Spectrophotometric characterization of anthocyanidins. The total anthocyanin content was determined by spectrophotometry using the method described by Niketic-Aleksic & Hrazdina (1972). The PVPP Index analysis proposed by Glories (1984) was made as follows: 1 mL of wine was adsorbed to a PVPP column previously packed into a 10 mL syringe. After that, 10 mL of water was passed through the column to clean up the sample and avoid non-phenolic compounds. Free anthocyanins were eluted using an eluent made of Ethanol, Water and Hydrochloric Acid (70: 30: 1); The non-colored eluent was discarded, and colored eluent was recovered from first drop till get 20 mL of solvent containing free anthocyanins. The solution containing free anthocyanins was used to determine free anthocyanins by the same method used for total anthocyanins (Niketic-Aleksic & Hrazdina, 1972). The PVPP Index (%) was determined by the expression: $PVPP(\%) = \frac{\text{Total Anthocyanin} - \text{Free Anthocyanin}}{\text{Total Anthocyanin}} \cdot 100$ and corresponds to the proportion of combined anthocyanins. *Ionization Index* was determined by the method proposed by Glories (1984)

2.6 Color parameters. Ten μL of a 10% (v/v) acetaldehyde solution was added to 1 mL of wine sample 20 min before color measurement to avoid sulfite interferences. The color intensity (CI) and hue was estimated using the method described by Glories (1984). The complete spectra of wines from 400 to 650 nm of wavelength were registered by using the scanning mode of the Helios Alpha UV-vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) used for all the spectrophotometric measurements. The CIELAB coordinates, lightness (L^*), chroma (C^*), hue (h^*), red-greenness (a^*), and yellow-blueness (b^*), were determined according to the method of Ayala, Echavarri & Negueruela (1997) and data processing was performed with MSCV® software (Ayala, Echavarri & Negueruela, 2013). The total colour differences (ΔE_{ab}^*) between wines was obtained using the expression: $\Delta E_{ab}^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ extracted from the work of Pérez-Magariño & González-Sanjosé (2003).

2.7 Analysis of low molecular weight phenolic compounds. The low molecular weight phenolic compounds of wines with the exception of flavan-3-ols were analyzed following a previously described method (Gil et al., 2013), by using a solid phase extraction to the sample preparation and a chromatographic analysis using a HPLC-DAD-ESI-MSⁿ method.

2.8 Analysis of monomeric and dimeric flavan-3-ols. All solvents were of HPLC quality, and all chemicals were analytical grade (> 99 %). Water was of Milli-Q quality. The following commercial standards were used: (–)-epigallocatechin and (–)-gallocatechin from Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany); procyanidins B1 and B2 from Extrasynthese (Genay, France); (+)-catechin, (–)-epicatechin, and (–)-epicatechin 3-gallate Sigma (Tres Cantos, Madrid, Spain). Finally, a non-commercial sample of

procyanidin B4 was kindly supplied by Prof. Victor de Freitas (Centro de Investigação em Química, Departamento de Química do Porto, Portugal).

With regards to flavan-3-ols (monomers and B-type procyanidins), their HPLC separation, identification and quantification were performed on an Agilent 1200 Series system equipped with DAD (Agilent, Germany), and coupled to an AB Sciex 3200 Q TRAP (Applied Biosystems) electrospray ionization mass spectrometry system (ESI-MS). The chromatographic system was managed by Agilent Chem Station (version B.01.03) data-processing station. The mass spectra data were processed with the Analyst MDS software (Applied Biosystems, version 1.5). The samples (0.25 mL of wine diluted with 4.75 mL of water: formic acid, 98.5:1.5) were injected (100 μ L) after filtration (0.20 μ m, polyester membrane, Chromafil PET 20/25, Machery-Nagel, Düren, Germany) on a reversed-phase column Ascentis Express C18 de Supelco (4.6 $\times$ 150 mm; 2.7 μ m particle), thermostated at 16 °C. The solvents were water/methanol/formic acid (89:10:1, v/v/v, solvent A) and methanol (solvent B), and the flow rate was 0.5 mL/min. The linear gradient for solvent B was: zero min, 1%; 2 min, 1%; 60 min, 23%; 75 min, 70%; 80 min, 95%; 90 min, 95%; 95 min, 1%; 100, 1%. Two MS scan types were used: Enhanced MS (EMS) for compound identification; and Multiple Reaction Monitoring (MRM) for quantification. MS conditions for both scan types were: ion spray voltage, -4000; ion source temperature, 450 °C; collision gas, high; curtain gas, 15; ion source gas 1, 70; ion source gas 2, 50; declustering potential, -35; entrance potential, -10; collision energy, -30; collision cell exit potential, -3. The selected mass transitions (m/z pairs) for MRM scan and quantification were: (+)-catechin and (-)-epicatechin (289-245); procyanidins B1, B2, and B4 (577-425 and 577-407); (-)-epigallocatechin and (-)-gallocatechin (305-221 and 305-219); and (-)-epicatechin 3-gallate (441-289). Quantification was made using external calibration curves of (+)-catechin together with previously obtained response factors for each of the other compounds. Two injections of (+)-catechin standard solution, one at the beginning and the second at the end of every injection series, were done for updating the response factors before quantification. The analyses were made in duplicate.

2.9 Proanthocyanidin analysis. Acid-catalysed depolymerisation of proanthocyanidins in the presence of an excess of phloroglucinol was used to analyze the proanthocyanidin content and composition, by using a previously described method (Gil et al., 2013).

2.10 Polysaccharide analysis. Wine polysaccharides were analyzed by HRSEC-RID after precipitation with cold acidified ethanol, as previously described (Gil et al., 2013).

2.11 Statistics. All data are expressed as the arithmetic average $\pm$ standard deviation of three replicates. One-factor ANOVA tests ($p < 0.05$) were carried out with SPSS software, and multiple comparisons were performed by the employing the Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc test. The same software (SPSS) was used to perform the Principal Component Analysis (PCA).

3. Results and Discussion

With the aim of evaluating the effectiveness of the berry size selection method by using two different sieves, a triplicate of 100 berries for each berry size (big, medium and small, figure 1) was used to characterize grapes from each group. The data obtained for grape characterization is shown in the table 1. As expected, the values of mass and volume of 100 berries increase with berry size, while the control group shows a similar behavior than medium size grapes. These results confirm that the selection method is useful to separate grapes according to their size, since data show statistical differences between the three selected groups of berries in mass (m_{100}) and volume (V_{100}). The average number of seeds contained in 100 berries also tend to increase with berry size, which is quite logical considering that berry single growth are related with its number of seeds. In this sense, figure 2 shows the distribution of seeds per berry, reinforcing the idea that small berries contain a minor number of seeds (mostly a single one), and that the number of seeds per berry increases with berry size. The minor number of seeds contained in the small berries implies a minor proportion of seeds referred to the weight. This behavior was similar when

the proportion was referred to volume although there were not statistical differences between big and medium grapes.

Since the heterogeneous distribution of phenolic compounds among berry tissues, the quantity of skins and seeds per grape mass were calculated. These results are shown in table 1 and correspond to the skin surface per gram of berry and the number of seeds per gram of berry. As expected, the skin surface per gram of berry shows a clear trend, in which the quantity of skins increased when the berry size decreased. On the other hand, the number of seeds per gram of berry seems to follow the opposite way, in which the number of seeds per gram of berry decreases with the berry size. So, taking in consideration all these results, it seems that small berries contain a higher proportion of skins and lower proportion of seeds, while big berries do the opposite. The results showed in table 1 are, in general, agree with previously published data (Barbagallo, Guidoni & Hunter, 2011, Poni & Libelli, 2008).

Table 1. Physical characterization of grape berries. Different letters in a row indicates statistical differences ($p < 0.05$).

	BIG	MEDIUM	SMALL	CONTROL
$m_{100}^{(a)}$	184.1 ± 0.9, c	142.9 ± 7.2, b	100.6 ± 0.2, a	144.2 ± 3.3, b
$V_{100}^{(b)}$	166.0 ± 1.0, c	129.0 ± 6.2, b	92.5 ± 0.5, a	130.2 ± 2.3, b
$seed_{100}^{(c)}$	244 ± 8, c	173 ± 15, b	116 ± 3, a	179 ± 6, b
%seed (w/w) ^(d)	5.72 ± 0.25, c	5.15 ± 0.23, b	4.39 ± 0.13, a	4.92 ± 0.03, b
%seed (v/v) ^(e)	5.5 ± 0.3, b	5.3 ± 0.4, b	4.4 ± 0.1, a	4.6 ± 0.1, a
Skin _r ^(f)	3.68 ± 0.01, a	4.01 ± 0.07, b	4.56 ± 0.02, c	4.00 ± 0.05, b
Seed _r ^(g)	1.33 ± 0.04, c	1.21 ± 0.04, ab	1.15 ± 0.02, a	1.24 ± 0.01, b

^a Mass of 100 berries expressed in g. | ^b Volume of 100 berries expressed in mL. | ^c Number of seeds contained in 100 berries. | ^d Seed contribution to berry weight expressed as a percentage | ^e Seed contribution to berry volume expressed as a percentage. | ^f Berry's surface per gram of berry, expressed in cm²/g. | ^g Seed's number per gram of berry.

Once the berries were characterized, the analysis of grape juice from crushed grapes for winemaking was performed. The data corresponding to potential ethanol, pH and titratable acidity (TA), shown in table 2, could give us an idea about the pulp maturity level of grapes. Broadly grape juices from big and medium berry sizes don't show statistical differences in TA, potential ethanol nor pH. In contrast, juices from small berries show statistically higher TA and lower pH, which seems to indicate that the smaller berries reach a higher acidity and, consequently, lower pH. The pH and TA trend observed in our assay was previously reported by Poni & Libelli (2008), in an assay performed with Syrah. However other assay performed (also with Syrah) by Barbagallo, Guidoni & Hunter (2011) shows a trend in which TA increases with berry size. Regarding the potential ethanol values, it seems that sugar concentration

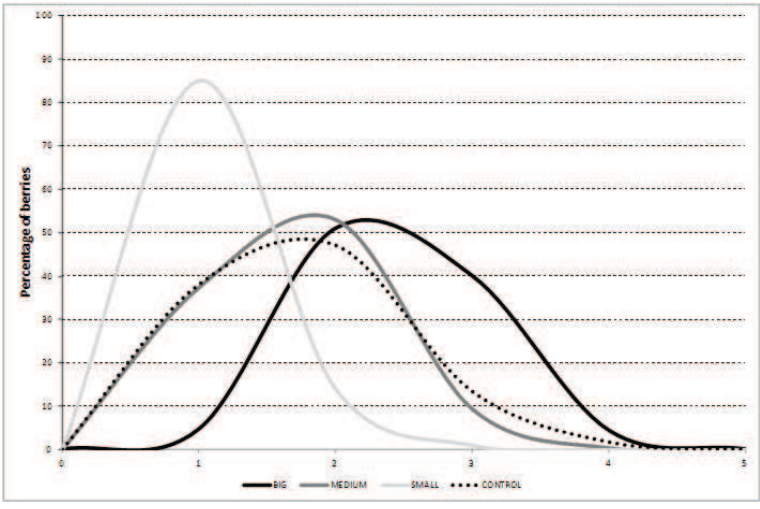


Figure 2. Average number of seeds per berry distribution among berry sizes.

increases when berry size decreases although only statistical differences were found between big and small grapes. The Barbagallo's assay aforementioned shows a similar trend, in which the soluble solids of grapes (°Brix) decrease when berry size increases. However, not clear trend about soluble solids was found in the assay of Poni et al. Despite the existence of some disagreement of the cited assays (probably related with differences in growth

conditions), our data seems to indicate that small berries have a better potential to elaborate high quality red wines, since they have more skin proportion, less seed proportion, higher sugar content and TA, and lower pH value.

Table 2. Grape juice characterization. Different letters in a column indicates statistical differences ($p < 0.05$) among berry sizes.

	Potential Ethanol ^(a)	pH	TA ^(b)	TPI ^(c)
BIG	12.56 ± 0.00, a	3.68 ± 0.03, c	5.69 ± 0.06, a	8.8 ± 0.7, a
MEDIUM	12.63 ± 0.06, ab	3.67 ± 0.01, c	5.69 ± 0.01, a	9.2 ± 0.4, ab
SMALL	12.80 ± 0.16, b	3.56 ± 0.01, a	6.47 ± 0.15, c	10.5 ± 0.9, b
CONTROL	12.73 ± 0.06, ab	3.59 ± 0.01, b	6.19 ± 0.04, b	10.3 ± 0.6, ab

^a Potential Ethanol by considering a fermentation yield of 17 g/L of sugar leads to a 1 %vol of Ethanol. | ^b Titratable acidity of grape juice expressed as g/L of Tartaric acid. | ^c Total Polyphenolic Index of grape juice

Once alcoholic fermentation was finished, when the maceration time was over, the free-run wine was racked (racking wines), and the wet solids were pressed leading to a new fraction of wines (pressing wines). Not statistical differences were found in neither racking yield nor pressing yield nor mass of solids after pressing (data not shown). Both racked wines and pressed wines were analyzed, but a global value for each parameter was estimated by using the proportion of racked wine and pressed wine, in order to evaluate the impact of berry size in wine composition without consider the wine origin from the pressing process point of view.

Table 3. General parameters of wines obtained from grapes of different berry size (bleed wine, press wine and its average). Different letters in a row indicates statistical differences ($p < 0.05$) among berry sizes for each studied parameter. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.05$) between racking and pressing wines for each condition and parameter.

	Wine	BIG	MEDIUM	SMALL	CONTROL
% vol^(a)	<i>Racking wine</i>	12.8 ± 0.1, a	12.8 ± 0.1, a	12.8 ± 0.1, a	12.7 ± 0.0, a
	<i>Pressing wine</i>	12.7 ± 0.0, ab	12.7 ± 0.0, ab	12.8 ± 0.1, b	12.5 ± 0.2, a
	<i>Global</i>	12.8 ± 0.1, a	12.8 ± 0.1, a	12.7 ± 0.1, a	12.7 ± 0.1, a
pH	<i>Racking wine</i>	4.02 ± 0.01, d *	3.98 ± 0.01, c *	3.89 ± 0.01, a *	3.96 ± 0.01, b *
	<i>Pressing wine</i>	4.13 ± 0.00, c **	4.08 ± 0.00, b **	3.95 ± 0.01, a **	4.10 ± 0.03, b **
	<i>Global</i>	4.06 ± 0.01, c	4.01 ± 0.01, b	3.91 ± 0.01, a	4.01 ± 0.01, b
TA^(b)	<i>Racking wine</i>	5.36 ± 0.10, a	5.38 ± 0.04, a **	5.70 ± 0.16, b	5.41 ± 0.13, a
	<i>Pressing wine</i>	5.22 ± 0.04, a	5.28 ± 0.04, a *	5.54 ± 0.18, b	5.26 ± 0.09, a
	<i>Global</i>	5.31 ± 0.06, a	5.34 ± 0.01, a	5.64 ± 0.17, b	5.35 ± 0.08, a
TPI^(c)	<i>Racking wine</i>	55.4 ± 4.4, a	60.3 ± 2.6, ab	73.0 ± 1.3, c	65.1 ± 2.5, b
	<i>Pressing wine</i>	54.2 ± 3.1, a	58.1 ± 2.1, a	71.6 ± 2.6, b	61.9 ± 4.9, a
	<i>Global</i>	55.0 ± 3.8, a	59.6 ± 2.4, ab	72.5 ± 1.5, c	64.0 ± 3.2, b
A_{TOT}^(d)	<i>Racking wine</i>	530.0 ± 42.9, a	579.3 ± 20.0, a	772.6 ± 96.3, b	650.1 ± 25.5, a **
	<i>Pressing wine</i>	509.3 ± 31.8, a	561 ± 40.3, ab	617.8 ± 31.8, b	544.3 ± 29.2, ab *
	<i>Global</i>	522.6 ± 38.9, a	572.5 ± 22.7, ab	716.1 ± 57.7, c	613.0 ± 10.3, b
PVPP^(e)	<i>Racking wine</i>	56.6 ± 4.3, a	56.9 ± 3.8, a	60.6 ± 0.3, a *	56.2 ± 4.3, a
	<i>Pressing wine</i>	63.0 ± 4.0, a	62.8 ± 4.7, a	64.0 ± 1.6, a **	61.9 ± 3.0, a
	<i>Global</i>	58.9 ± 3.7, a	58.9 ± 3.1, a	61.8 ± 0.4, a	58.2 ± 4.0, a
II^(f)	<i>Racking wine</i>	22.6 ± 3.0, a	25.4 ± 1.9, a **	29.1 ± 1.8, a	24.3 ± 3.7, a
	<i>Pressing wine</i>	19.6 ± 0.9, a	19.8 ± 0.5, a *	26.8 ± 0.3, b	24.7 ± 3.4, b
	<i>Global</i>	21.5 ± 1.9, a	23.4 ± 1.3, a	28.3 ± 1.0, b	24.5 ± 2.7, a

^a Ethanol content of wines expressed. | ^b Titratable acidity expressed as g/L of tartaric acid. | ^c Total polyphenol Index of wines. | ^d Spectrophotometric measurements of total anthocyanins. | ^e PVPP Index, expressed as a percentage of polymerized anthocyanins. | ^f Ionization Index, expressed as a percentage of anthocyanins colored at wine pH

Table 3 shows the general parameters for wine characterization. Regarding the ethanol content of wines, not statistical tendency was observed among berry sizes, so the slight but significant trend observed in the potential ethanol of grape juice has disappeared during the winemaking process. On the contrary, pH differences have been enhanced during the winemaking process, since wine pH shows a clear statistical

trend: the smaller the berry the lower the wine pH. The statistical differences between pH values of grape juice and wine, and also those found between racked and pressed wines, could be easily explained by the solubilization of potassium during de maceration and pressing processes. The titratable acidity (TA) of wines from small berries was statistically higher, as happened with grape juice TA. However, the observed differences between control and the big and medium selected berry sizes observed in grape juice have disappeared during the winemaking process. The total phenolic index (TPI) of grape juices (table 2) and wines (table 3) follows a similar trend, in which the TPI increases when the berry size decreases, although in grape juice just the small and the big berry sizes shows statistical differences. Poni & Libelli did not found differences in TPI among two wines elaborated with different berry sizes (Poni & Libelli, 2008). However, in our experiment, the TPI of wines from small grapes are statistically higher than any other condition (control wine, medium and big sizes), which indicate a higher phenolic content of wines from small grapes. Regarding the Spectrophotometric characterization of anthocyanins, it seems that total anthocyanins of wines increases when the berry size decreases. This result is quite logical since anthocyanin pigments are located only in grape skins. Not statistical differences were found in the PVPP index (which indicates the proportion of polymerized pigments) among wine samples, indicating that berry size has not influence on pigment polymerization. In contrast, some differences were found in the ionization index (which indicates the proportion of red colored anthocyanins at wine pH) that is higher in wines from small berry size, probably because its lower pH.

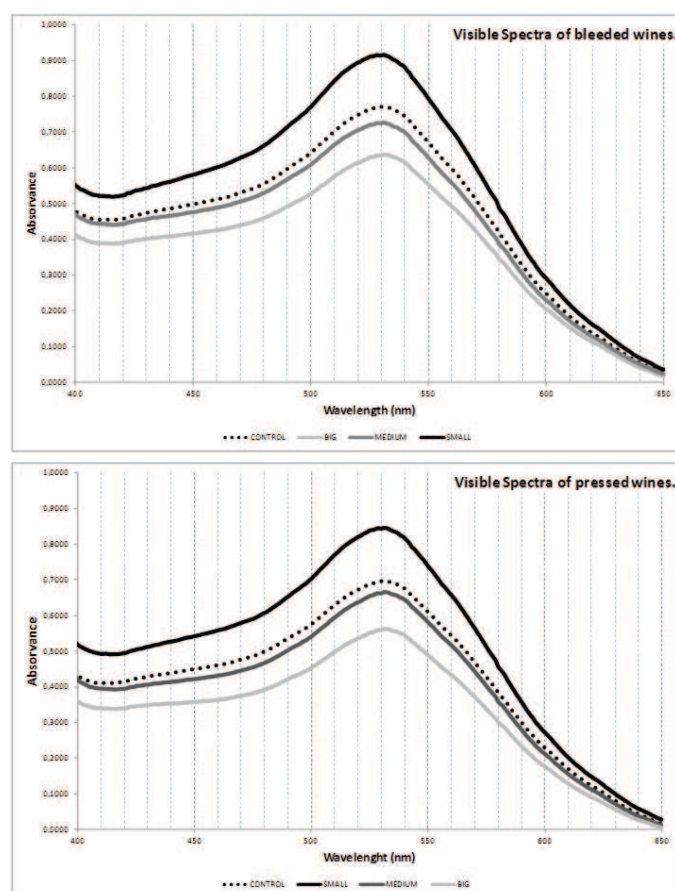


Figure 3. Visible spectra of wines made from each berry size. Racking wines and Pressing wines.

Glories, Maujean & Dubordieu, 2006), as well as the CIELab coordinates are shown in table 4. Wine CI statistically increases when berry size decreases. Control wine has again a similar behavior than middle grape wines. The Glories hue value (referred to the yellow to red ratio) is statistically lower in wine from small berries, which indicates a lower proportion of the yellow component to the color intensity. Focusing on CIELab coordinates the Chroma (C^*) and the green-red component (a^*) statistically increased when the

Color is one of the most important attributes of red wine, and for that reason the complete characterization of wine color was performed for each wine, in order to evaluate the influence of berry size on wine color. Figure 3 shows the average visible spectra of wines from different berry sizes as well as the control wines, in which we can observe, at a glance, that the wines from small berries have a deeper color, since its absorbance value is higher for every wavelength recorded in the spectra. By the same way, the spectrum shows that wines from big grapes show the poorer color, while control wines and wines from medium berry size remain in the middle. The area under the spectrum curve was calculated to evaluate the differences in spectra (table 4) and the results confirm the described trend among berry sizes is statistically significant, while control wines have a similar behavior than medium berry wines.

The classical parameters proposed by Glories, color intensity (CI) and hue (Glories, 1984, Ribéreau-Gayon,

berry size decreased, while the lightness (L^*) did the opposite. The hue (h^*) and blue-yellow component (b^*), seems to be higher in the small berry wines, while not clear statistical differences were found between the big and medium berry wines.

Table 4. Color characterization of wines obtained from grapes of different berry size (bleed wine, press wine and its average). Different letters in a row indicates statistical differences ($p < 0.05$) between berry sizes for each studied parameter. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.05$) between racking and pressing wines for each condition and parameter.

Parameter	Wine	BIG	MEDIUM	SMALL	CONTROL
CI ^(a)	<i>Racking wine</i>	$11.6 \pm 0.7, a$	$13.1 \pm 0.5, b^{**}$	$16.1 \pm 0.8, c^{**}$	$13.8 \pm 1.1, b$
	<i>Pressing wine</i>	$10.5 \pm 0.3, a$	$11.8 \pm 0.1, ab^*$	$14.4 \pm 0.3, c^*$	$12.4 \pm 1.5, b$
	<i>Global</i>	$11.2 \pm 0.5, a$	$12.7 \pm 0.4, b$	$15.5 \pm 0.6, c$	$13.3 \pm 1.2, b$
Hue ^(b)	<i>Racking wine</i>	$61.1 \pm 0.9, b$	$60.7 \pm 0.8, b$	$57.2 \pm 0.5, a$	$59.5 \pm 0.8, b$
	<i>Pressing wine</i>	$63.6 \pm 4.2, a$	$60.9 \pm 0.5, a$	$59.0 \pm 1.5, a$	$60.0 \pm 0.6, a$
	<i>Global</i>	$61.9 \pm 1.7, b$	$60.8 \pm 0.6, b$	$57.8 \pm 0.8, a$	$60.0 \pm 0.6, b$
Vis-Spectrum Area ^(c)	<i>Racking wine</i>	$87 \pm 5, a^{**}$	$100 \pm 3, b^{**}$	$125 \pm 6, c$	$106 \pm 9, b$
	<i>Pressing wine</i>	$76 \pm 4, a^*$	$90 \pm 1, b^*$	$115 \pm 3, c$	$95 \pm 10, b$
	<i>Global</i>	$83 \pm 4, a$	$96 \pm 3, b$	$121 \pm 5, c$	$102 \pm 9, b$
L* ^(d)	<i>Racking wine</i>	$48.0 \pm 2.0, c$	$44.5 \pm 0.6, b^*$	$38.6 \pm 1.1, a^*$	$42.6 \pm 2.4, b$
	<i>Pressing wine</i>	$50.2 \pm 1.6, c$	$46.3 \pm 0.3, b^{**}$	$41.1 \pm 0.7, a^{**}$	$45.5 \pm 3.1, b$
	<i>Global</i>	$48.8 \pm 1.9, c$	$45.1 \pm 0.5, b$	$39.5 \pm 0.9, a$	$43.6 \pm 2.6, b$
C* ^(e)	<i>Racking wine</i>	$50.0 \pm 1.2, a$	$53.2 \pm 1.2, b^{**}$	$57.4 \pm 0.9, c$	$54.1 \pm 2.0, b$
	<i>Pressing wine</i>	$47.4 \pm 1.6, a$	$50.7 \pm 0.5, b^*$	$56.1 \pm 1.0, c$	$51.7 \pm 2.2, b$
	<i>Global</i>	$49.2 \pm 1.3, a$	$52.3 \pm 1.0, b$	$56.9 \pm 0.9, c$	$53.3 \pm 2.0, b$
h* ^(f)	<i>Racking wine</i>	$8.2 \pm 1.2, a$	$11.2 \pm 2.1, b$	$14.0 \pm 1.6, c$	$10.9 \pm 1.0, b$
	<i>Pressing wine</i>	$6.5 \pm 1.0, a$	$8.4 \pm 0.7, ab$	$13.3 \pm 1.2, c$	$9.4 \pm 1.7, b$
	<i>Global</i>	$7.6 \pm 1.1, a$	$10.2 \pm 1.7, a$	$13.7 \pm 1.2, b$	$10.3 \pm 1.2, a$
a* ^(g)	<i>Racking wine</i>	$49.5 \pm 1.1, a$	$52.1 \pm 0.8, b^{**}$	$55.7 \pm 0.5, c$	$53.1 \pm 1.8, b$
	<i>Pressing wine</i>	$47.4 \pm 1.5, a$	$50.2 \pm 0.6, b^*$	$54.6 \pm 0.8, c$	$51.0 \pm 1.9, b$
	<i>Global</i>	$48.7 \pm 1.2, a$	$51.4 \pm 0.8, b$	$55.3 \pm 0.6, c$	$52.4 \pm 1.8, b$
b* ^(h)	<i>Racking wine</i>	$7.1 \pm 1.1, a$	$10.3 \pm 2.2, ab$	$13.9 \pm 1.8, b$	$10.2 \pm 1.3, ab$
	<i>Pressing wine</i>	$5.4 \pm 0.9, a$	$7.4 \pm 0.6, ab$	$12.9 \pm 1.3, c$	$8.4 \pm 1.9, b$
	<i>Global</i>	$6.5 \pm 1.0, a$	$9.3 \pm 1.7, a$	$13.5 \pm 1.4, b$	$9.6 \pm 1.5, a$

^a Color Intensity of wines. | ^b Hue expressed as a percentage of OD_{420nm} to OD_{520nm} ratio. | ^c Area surface under the visible spectrum (between 420 nm and 620 nm) of wines. | ^d Lightness values (CIELab coordinates). | ^e Chroma values (CIELab coordinates). | ^f Hue values (CIELab coordinates) | ^g Green/red component (CIELab coordinates). | ^h Blue/yellow component (CIELab coordinates).

Table 5. Color differences (ΔE_{ab}^*) between wines obtained from grapes of different berry size. Values above the diagonal correspond to differences between racking wines. Values below the diagonal correspond to differences between pressing wines

	SMALL	MEDIUM	BIG	CONTROL
SMALL	-	8.0 ± 2.0	13.2 ± 2.5	6.1 ± 3.2
MEDIUM	8.9 ± 1.1	-	5.6 ± 2.5	3.7 ± 1.6
BIG	13.9 ± 2.2	5.3 ± 2.0	-	7.3 ± 3.4
CONTROL	7.3 ± 3.6	3.7 ± 0.9	6.8 ± 3.9	-

All this information about wine color confirms that small berry wines have statistically deeper color than control ones. So the berry size selection in wineries could be a good tool to improve wine color. In general terms, the clear upward tendencies in CI and C*, together with the downward tendency of L*, seem to indicate that exists a relation between berry size and wine color: the smaller the berry the deeper the color of wine. In spite of these results, human eye are much less sensible to color changes than a spectrophotometer, and for that reason it could be interesting to evaluate if these differences are appreciable by the human eye. Total color differences between wines (ΔE_{ab}^*) are shown in table 5. It is accepted that the human eye can usually distinguish two colors when $\Delta E_{ab}^* \geq 1$ (Pérez-Magariño & González-Sanjosé, 2003). Although it is also generally accepted that tasters can only distinguish the color

of two wines through the glass when $\Delta E_{ab}^* \geq 5$ (Pérez-Magariño & González-Sanjosé, 2003). Looking at table 5, it can be asserted that the color differences among these wines were greater enough to be distinguished by the human eye, since the ΔE_{ab}^* was higher than 5 units in almost all the cases, with the only exception of differences between middle grape wines and control ones. These results confirm that different berry size led to wines which were perfectly distinguishable by tasters, whereas control and middle grape wines were indistinguishable by its color.

Table 6. Anthocyanin analyses of wines made for each berry size by RP-HPLC-MSⁿ. Different letters in a row indicates statistical differences ($p < 0.05$) between berry sizes for each studied parameter. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.05$) between racking and pressing wines for each condition and anthocyanin. Each anthocyanin data is expressed as molar percentage. The total amount of anthocyanins is expressed as mg/L of malvidine-3-glucoside

Parameter ^(a)	Wine	BIG	MEDIUM	SMALL	CONTROL
dp3glc	Racking wine	0.93 ± 0.04, a	1.17 ± 0.17, a	2.60 ± 0.33, c	1.73 ± 0.06, b **
	Pressing wine	0.86 ± 0.04, a	1.04 ± 0.09, a	2.34 ± 0.29, c	1.57 ± 0.05, b *
	Global	0.90 ± 0.04, a	1.12 ± 0.14, a	2.50 ± 0.31, c	1.67 ± 0.05, b
cy3glc	Racking wine	0.00 ± 0.00, a	0.00 ± 0.00, a	0.28 ± 0.07, b	0.00 ± 0.00, a
	Pressing wine	0.00 ± 0.00, a	0.00 ± 0.00, a	0.33 ± 0.06, b	0.00 ± 0.00, a
	Global	0.00 ± 0.00, a	0.00 ± 0.00, a	0.30 ± 0.06, b	0.00 ± 0.00, a
pt3glc	Racking wine	2.28 ± 0.04, a **	2.55 ± 0.08, b **	3.61 ± 0.21, d	2.94 ± 0.05, c
	Pressing wine	2.09 ± 0.01, a *	2.31 ± 0.09, b *	3.43 ± 0.20, c	2.84 ± 0.07, c
	Global	2.21 ± 0.03, a	2.47 ± 0.07, b	3.55 ± 0.21, d	2.91 ± 0.06, c
pn3glc	Racking wine	2.11 ± 0.07, a	2.49 ± 0.11, ab	3.45 ± 0.41, c	2.88 ± 0.10, b
	Pressing wine	2.13 ± 0.04, a	2.44 ± 0.05, a	3.49 ± 0.36, c	2.85 ± 0.10, b
	Global	2.12 ± 0.06, a	2.48 ± 0.09, a	3.47 ± 0.39, c	2.87 ± 0.08, b
mv3glc	Racking wine	60.35 ± 0.76, b	60.19 ± 0.34, b *	57.27 ± 1.24, a	58.89 ± 0.38, b *
	Pressing wine	61.23 ± 0.87, b	61.28 ± 0.38, b **	58.35 ± 1.11, a	60.09 ± 0.39, b **
	Global	60.66 ± 0.79, b	60.57 ± 0.34, b	57.66 ± 1.18, a	59.30 ± 0.38, b
dp3acglc	Racking wine	0.76 ± 0.10, a	0.83 ± 0.07, a	0.93 ± 0.07, a	0.88 ± 0.24, a
	Pressing wine	0.74 ± 0.04, a	0.76 ± 0.01, a	0.95 ± 0.02, c	0.87 ± 0.02, b
	Global	0.75 ± 0.05, a	0.80 ± 0.04, a	0.93 ± 0.05, a	0.88 ± 0.15, a
pt3acglc	Racking wine	2.01 ± 0.48, a	1.82 ± 0.19, a	2.33 ± 0.18, a **	2.02 ± 0.13, a
	Pressing wine	1.59 ± 0.28, a	1.58 ± 0.12, a	2.00 ± 0.09, a *	1.91 ± 0.10, a
	Global	1.86 ± 0.41, a	1.74 ± 0.15, a	2.21 ± 0.11, a	1.98 ± 0.05, a
dp3cmglc	Racking wine	0.00 ± 0.00, a	0.00 ± 0.00, a	0.09 ± 0.00, b	0.00 ± 0.00, a
	Pressing wine	0.00 ± 0.00, a	0.00 ± 0.00, a	0.11 ± 0.03, b	0.00 ± 0.00, a
	Global	0.00 ± 0.00, a	0.00 ± 0.00, a	0.10 ± 0.01, b	0.00 ± 0.00, a
pn3acglc	Racking wine	0.79 ± 0.01, a	0.82 ± 0.03, a	1.04 ± 0.08, b	0.95 ± 0.07, b
	Pressing wine	0.74 ± 0.01, a	0.76 ± 0.01, a	0.97 ± 0.08, c	0.88 ± 0.02, b
	Global	0.77 ± 0.00, a	0.80 ± 0.02, a	1.01 ± 0.08, b	0.93 ± 0.05, b
mv3acglc	Racking wine	26.16 ± 0.52, c	25.07 ± 0.48, b	22.95 ± 0.37, a	24.55 ± 0.05, b **
	Pressing wine	25.72 ± 0.54, c	24.58 ± 0.55, b	22.46 ± 0.17, a	23.95 ± 0.08, b *
	Global	26.00 ± 0.52, c	24.90 ± 0.49, b	22.77 ± 0.29, a	24.34 ± 0.02, b
pt3cmglc	Racking wine	0.11 ± 0.02, a	0.11 ± 0.02, a	0.20 ± 0.05, b	0.14 ± 0.02, a
	Pressing wine	0.11 ± 0.02, a	0.11 ± 0.02, a	0.21 ± 0.01, b	0.13 ± 0.02, a
	Global	0.11 ± 0.01, a	0.12 ± 0.03, a	0.20 ± 0.03, b	0.14 ± 0.02, a
cis-mv3cmglc	Racking wine	0.17 ± 0.03, a	0.20 ± 0.04, a	0.21 ± 0.05, a	0.17 ± 0.04, a
	Pressing wine	0.18 ± 0.04, a	0.17 ± 0.01, a	0.24 ± 0.04, a	0.22 ± 0.03, a
	Global	0.17 ± 0.03, a	0.19 ± 0.03, a	0.22 ± 0.02, a	0.19 ± 0.02, a
pn3cmglc	Racking wine	0.17 ± 0.02, a *	0.22 ± 0.02, b	0.34 ± 0.02, d	0.27 ± 0.01, c
	Pressing wine	0.22 ± 0.02, a **	0.22 ± 0.01, a	0.34 ± 0.04, b	0.27 ± 0.01, a
	Global	0.19 ± 0.01, a	0.22 ± 0.02, b	0.34 ± 0.03, d	0.27 ± 0.00, c
trans-mv3cmglc	Racking wine	3.95 ± 0.31, a	4.29 ± 0.30, a	4.50 ± 0.21, a	4.39 ± 0.16, a
	Pressing wine	4.12 ± 0.27, a	4.51 ± 0.29, a	4.57 ± 0.14, a	4.20 ± 0.06, a
	Global	4.01 ± 0.29, a	4.36 ± 0.29, a	4.52 ± 0.09, a	4.32 ± 0.13, a
mv3cfglc	Racking wine	0.21 ± 0.04, a	0.23 ± 0.04, a	0.19 ± 0.03, a	0.19 ± 0.03, a
	Pressing wine	0.26 ± 0.04, a	0.24 ± 0.04, a	0.20 ± 0.05, a	0.23 ± 0.03, a
	Global	0.23 ± 0.04, a	0.23 ± 0.03, a	0.20 ± 0.02, a	0.20 ± 0.02, a
TOTAL	Racking wine	153.47 ± 26.31, a	174.73 ± 12.87, a	189.87 ± 18.17, a	185.01 ± 24.82, a
	Pressing wine	171.18 ± 19.91, a	190.30 ± 13.92, a	194.45 ± 8.86, a	172.89 ± 6.47, a
	Global	159.84 ± 23.63, a	180.10 ± 11.64, a	191.34 ± 8.92, a	180.88 ± 18.69, a

^a Abbreviations used for anthocyanin nomenclature corresponds to: delphinidin (dp), cyanidin (cy), petunidin (pt), peonidin (pn), malvidin (mv), acetylated (ac), *p*-coumarylated (cm), cafeoylated (cf) and glucoside (glc).

Anthocyanins are the main responsible of young wine color, so its characterization was performed by HPLC. The results are shown in table 6. By considering that small berry wines have deeper color and higher total anthocyanin concentration (spectrophotometric measurement, table 3), it could be expected that small berry wines contain a higher amount of monomeric anthocyanins. Nevertheless, it does not happen, as shown in table 6. Despite of this result about total amount of anthocyanins, some slight but statistical differences were observed in the anthocyanin profiles. Specifically, petunidin-3-*O*-glucoside and peonidin-3-*O*-coumaroilglucoside increased when berry size decreased, while malvidin-3-*O*-acetylglucoside did the opposite (increases with berry size). Moreover, delphinidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-glucoside and petunidin-3-*O*-coumaroilglucoside showed higher amounts in small grape wines, and delphinidin-3-*O*-coumaroilglucoside was only detected in the wines from small grapes. Finally, malvidin-3-*O*-glucoside shows a statistically lower amount in small grape wines. These differences lead to a different profile of small grape wine, consisting in a higher proportion of anthocyanidin monoglucosides and lower proportion of acylated anthocyanins, although wines from small berries have a higher proportion of coumarylated anthocyanins than the other wines. Regarding the B ring structure of antocyanins, small berries contain a lower proportion of trioxylated anthocyanins, and a lower methylation degree.

These differences in anthocyanin profiles are really a very curious data, since the anthocyanin profile of wines seems to be cultivar dependent. In fact, anthocyanin profile has been proposed as cultivar fingerprint during the last years (Mattivi, Guzzon, Vrhovsek, Stefanini & Velasco, 2006), although grape maturity also seems to play a significant role in anthocyanin profiles (Gil et al., 2012, Guidoni & Hunter, 2012). All the analyzed wines in this study come from the same harvest and, obviously from the same cultivar (cabernet sauvignon), so the observed differences within wine anthocyanin profiles are almost surprising. It is well accepted nowadays that acylated (in the position 6 of the glucose molecule) and trioxylated anthocyanins (in the B ring of anthocyanin) are more difficult to extract from skins to wine, but they are also more stable (Guidoni & Hunter, 2012). In that sense, it seems that the profile of small grape wines have lower amounts of the less easily extractable anthocyanins. It is therefore possible that small berry had a lower anthocyanin extractability, but the higher skin proportion compensates it, since not statistical differences was observed in the total amount of anthocyanins.

Table 7. Pyranoanthocyanin analysis of wines made with each berry size by RP-HPLC-MSⁿ. Different letters in a row indicates statistical differences ($p < 0.05$) between berry sizes for each studied compound. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.05$) between racking and pressing wines for each condition and anthocyanin. Each pyranoanthocyanin is expressed as mg/L of vitisin A.

Compound	Wine	BIG	MEDIUM	SMALL	CONTROL
vitisin A	<i>Racking wine</i>	5.87 ± 0.26, a **	7.63 ± 1.82, a	8.48 ± 2.12, a	6.56 ± 1.25, a
	<i>Pressing wine</i>	5.04 ± 0.38, a *	5.90 ± 0.79, a	6.95 ± 1.41, a	5.47 ± 1.14, a
	<i>Global</i>	5.57 ± 0.30, a	7.05 ± 1.50, a	7.94 ± 1.82, a	6.18 ± 1.19, a
ac-vitisin A	<i>Racking wine</i>	3.95 ± 0.12, a **	4.64 ± 0.74, a	4.84 ± 0.88, a	3.88 ± 0.56, a
	<i>Pressing wine</i>	3.15 ± 0.17, a *	3.46 ± 0.31, a	3.81 ± 0.56, a	3.25 ± 0.57, a
	<i>Global</i>	3.66 ± 0.10, a	4.23 ± 0.61, a	4.47 ± 0.74, a	3.66 ± 0.54, a
cm-vitisin A	<i>Racking wine</i>	0.58 ± 0.04, a **	0.76 ± 0.31, a	0.94 ± 0.25, a	0.63 ± 0.26, a
	<i>Pressing wine</i>	0.40 ± 0.05, a *	0.52 ± 0.13, a	0.73 ± 0.25, a	0.45 ± 0.08, a
	<i>Global</i>	0.52 ± 0.04, a	0.68 ± 0.25, a	0.87 ± 0.25, a	0.57 ± 0.20, a
vitisin B	<i>Racking wine</i>	2.90 ± 0.23, a **	3.14 ± 0.58, a	3.20 ± 0.05, a	3.07 ± 0.64, a
	<i>Pressing wine</i>	2.46 ± 0.02, a *	2.67 ± 0.19, a	2.87 ± 0.22, a	3.02 ± 0.40, a
	<i>Global</i>	2.74 ± 0.15, a	2.97 ± 0.43, a	3.09 ± 0.04, a	3.05 ± 0.39, a
ac-vitisin B	<i>Racking wine</i>	1.15 ± 0.27, a	1.27 ± 0.27, a	1.43 ± 0.20, a	1.26 ± 0.13, a
	<i>Pressing wine</i>	0.88 ± 0.06, a	0.97 ± 0.15, a	1.07 ± 0.23, a	1.22 ± 0.22, a
	<i>Global</i>	1.05 ± 0.19, a	1.16 ± 0.21, a	1.31 ± 0.06, a	1.24 ± 0.09, a
10-MPH-pymv3glc	<i>Racking wine</i>	0.25 ± 0.01, a *	0.43 ± 0.02, b	0.73 ± 0.08, d	0.62 ± 0.03, c
	<i>Pressing wine</i>	0.36 ± 0.05, a **	0.37 ± 0.12, a	0.63 ± 0.09, b	0.55 ± 0.12, ab
	<i>Global</i>	0.29 ± 0.02, a	0.41 ± 0.05, b	0.69 ± 0.08, d	0.59 ± 0.04, c
TOTAL	<i>Racking wine</i>	14.7 ± 0.2, a **	17.9 ± 2.2, a **	19.6 ± 3.6, a	16.0 ± 2.1, a
	<i>Pressing wine</i>	12.3 ± 0.5, a *	13.9 ± 1.0, a *	16.1 ± 2.0, a	14.0 ± 2.4, a
	<i>Global</i>	13.8 ± 0.2, a	16.5 ± 1.9, a	18.4 ± 2.9, a	15.3 ± 2.1, a

During winemaking and wine ageing, anthocyanin derived pigments are formed, and their influence in wine color is increasing over time. One of the main anthocyanin family derived pigments is pyranoanthocyanins. The pyranoanthocyanin content of wines (table 7) do not show statistical differences in total amount nor in individual analyzed pyranoanthocyanin, with the only exception of 10-MPH (a pyranoanthocyanin formed by the condensation of malvidine-3-*O*-glucoside and *p*-coumaric acid), which increases when the berry size decreases. However its concentration is too low to have an effect on wine color.

Table 8. Flavonol profile and quantification of wines made with each grape berry size. Total amounts are expressed as mg/L of quercetin-3-*O*-glucoside. Flavonols are classified by their aglycone backbone and the data of each aglycone-type are expressed as molar ratios (%). Different letters in a row indicates statistical differences ($p < 0.05$) between berry size for each studied parameter. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.05$) between racking and pressing wines for each condition and parameter.

Parameter	Wine	BIG	MEDIUM	SMALL	CONTROL
M-Type^(a)	<i>Racking wine</i>	32.23 ± 0.95, a	32.31 ± 1.39, a	28.48 ± 1.68, a	3.30 ± 1.95, a
	<i>Pressing wine</i>	32.68 ± 0.30, b	32.61 ± 0.37, b	28.79 ± 2.10, a	29.46 ± 1.73, ab
	<i>Global</i>	32.39 ± 0.70, b	32.43 ± 1.03, b	28.58 ± 1.64, a	30.01 ± 1.70, ab
Q-Type^(b)	<i>Racking wine</i>	36.79 ± 0.67, ab	36.54 ± 1.26, ab	40.46 ± 2.16, b	34.09 ± 3.26, a
	<i>Pressing wine</i>	35.55 ± 0.49, a	36.10 ± 0.46, a	39.50 ± 2.55, b	35.28 ± 1.54, a
	<i>Global</i>	36.34 ± 0.58, ab	36.37 ± 0.96, ab	40.14 ± 2.02, b	34.47 ± 2.61, a
L-Type^(c)	<i>Racking wine</i>	12.04 ± 0.15, a	12.15 ± 0.34, a	12.89 ± 0.93, a	15.60 ± 1.02, b
	<i>Pressing wine</i>	11.84 ± 0.72, a	12.20 ± 0.64, a	13.19 ± 0.58, ab	14.40 ± 0.90, b
	<i>Global</i>	11.97 ± 0.18, a	12.16 ± 0.33, a	13.00 ± 0.77, a	15.21 ± 0.63, b
K-Type^(d)	<i>Racking wine</i>	1.42 ± 0.20, b	1.28 ± 0.18, b	0.98 ± 0.54, ab	0.52 ± 0.15, a
	<i>Pressing wine</i>	1.29 ± 0.16, b	1.47 ± 0.12, b	0.69 ± 0.05, a	0.76 ± 0.15, a
	<i>Global</i>	1.37 ± 0.18, b	1.35 ± 0.17, b	0.87 ± 0.35, ab	0.60 ± 0.14, a
I-Type^(e)	<i>Racking wine</i>	4.14 ± 0.23, b	4.51 ± 0.02, b *	3.55 ± 0.06, a	3.45 ± 0.37, a
	<i>Pressing wine</i>	4.20 ± 0.14, b	4.13 ± 0.20, b *	3.43 ± 0.22, a	3.81 ± 0.22, b
	<i>Global</i>	4.16 ± 0.17, b	4.38 ± 0.06, b	3.51 ± 0.08, a	3.57 ± 0.24, a
S-Type^(f)	<i>Racking wine</i>	13.39 ± 0.72, a	13.20 ± 0.36, a	13.63 ± 0.21, a	16.04 ± 0.94, b
	<i>Pressing wine</i>	14.44 ± 0.64, a	13.49 ± 0.47, a	14.40 ± 0.52, a	16.29 ± 0.85, b
	<i>Global</i>	13.76 ± 0.69, a	13.31 ± 0.34, a	13.90 ± 0.12, a	16.14 ± 0.86, b
TOTAL	<i>Racking wine</i>	51.26 ± 4.04, ab	56.58 ± 2.91, b	54.28 ± 0.92, b	45.56 ± 4.89, a
	<i>Pressing wine</i>	46.22 ± 2.92, ab	54.45 ± 3.94, c	51.35 ± 2.37, bc	42.69 ± 4.41, a
	<i>Global</i>	49.46 ± 3.63, ab	55.81 ± 3.30, b	53.22 ± 0.49, b	44.53 ± 4.59, a
% Aglycones^(g)	<i>Racking wine</i>	19.25 ± 1.31, a	19.00 ± 1.53, a	40.91 ± 4.67, b	25.83 ± 5.38, a
	<i>Pressing wine</i>	18.17 ± 0.95, a	18.94 ± 0.86, a	39.34 ± 3.43, c	26.44 ± 2.13, b
	<i>Global</i>	18.87 ± 1.03, a	18.96 ± 1.21, a	40.35 ± 4.12, b	25.98 ± 4.20, a

^a Myricetin glycosides group. | ^b Quercetin glycosides group. | ^c Laricitrin glycosides group. | ^d Kaempferol glycosides group. | ^e Isorhamnetin glycosides group. | ^f Syringetin glycosides group. | ^g Percent ratio of non glycosilated flavonols

The data about wine pigments do not seems to explain the observed great differences in wine color, since the total amount of HPLC analyzed pigments is statistically similar in all the wines. Nevertheless, the total anthocyanin measured by spectrophotometry is statistically higher (table 3) in small berry wines. Considering these data, it could be postulated that some non analyzed anthocyanin derived pigments could be responsible of the higher amount of anthocyanins analyzed by spectrophotometry, and, in turn, responsible of part of the higher color intensity of small berry wines. The pH trend observed in wines among berry sizes could also explain partially the color differences, because a great proportion of anthocyanins are colored at more acidic pHs, although only small grape wines shows a statistically higher ionization index. Another possible explanation for color differences can be found in the copigmentation phenomenon, by which anthocyanins interact with other planar phenolic compounds (such as phenolic acids, flavonols, flavanols or another anthocyanins) enhancing and stabilizing the wine color. This kind of interaction could be intermolecular (when the anthocyanin and the copigment are different molecules) or intramolecular (when the copigment is a substituent of the anthocyanin, such as *p*-coumaric acid of coumarylated anthocyanins). Since big grape wines have lower proportion of coumarylated anthocyanins than small grape wines, it is possible that intramolecular copigmentation phenomenon explains some of

the observed color differences. The possible contribution of intermolecular copigmentation will be evaluated below; when we will discuss the results about low molecular weight phenolic compounds (those can act as copigments).

Table 9. Molar profile (%) of individual flavonols. Different letters in a row indicates statistical differences ($p < 0.05$) between berry sizes for each studied flavonol. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.05$) between racking and pressing wines for each condition and flavonol.

Flavonol ^(a)	Wine	BIG	MEDIUM	SMALL	CONTROL
M-3-glcU	<i>Racking wine</i>	3.37 ± 0.03, a	3.50 ± 0.02, a	3.79 ± 0.19, ab	4.09 ± 0.32, b
	<i>Pressing wine</i>	3.36 ± 0.03, a	3.48 ± 0.07, a	3.77 ± 0.16, b	3.96 ± 0.15, b
M-3-gal	<i>Racking wine</i>	0.44 ± 0.05, a	0.53 ± 0.09, a	0.56 ± 0.09, a	0.50 ± 0.03, a
	<i>Pressing wine</i>	0.51 ± 0.02, a	0.48 ± 0.05, a	0.60 ± 0.19, a	0.53 ± 0.09, a
M-3-glc	<i>Racking wine</i>	24.38 ± 0.52, c	24.62 ± 1.18, c	11.79 ± 1.68, a	17.96 ± 1.51, b
	<i>Pressing wine</i>	25.35 ± 0.68, c	24.99 ± 0.42, c	12.06 ± 1.44, a	18.01 ± 0.85, b
Q-3-gal	<i>Racking wine</i>	1.08 ± 0.09, b	1.06 ± 0.06, b	0.67 ± 0.09, a	0.73 ± 0.08, a
	<i>Pressing wine</i>	0.95 ± 0.07, bc	1.05 ± 0.07, c	0.57 ± 0.09, a	0.81 ± 0.11, b
Q-3-glcU	<i>Racking wine</i>	11.84 ± 0.28, a	11.80 ± 0.34, a	14.62 ± 0.99, b	15.03 ± 0.98, b
	<i>Pressing wine</i>	11.39 ± 0.27, a	11.45 ± 0.15, a	14.67 ± 0.68, b	14.86 ± 0.56, b
Q-3-glc	<i>Racking wine</i>	11.12 ± 0.51, c	10.82 ± 0.43, c	1.88 ± 0.62, a	4.20 ± 0.51, b
	<i>Pressing wine</i>	11.11 ± 0.44, c	10.89 ± 0.07, c	2.06 ± 0.63, a	4.24 ± 0.36, b
Q-3-rut	<i>Racking wine</i>	0.82 ± 0.11, c *	0.67 ± 0.03, b	0.08 ± 0.07, a	0.00 ± 0.00, a
	<i>Pressing wine</i>	0.53 ± 0.12, b *	0.56 ± 0.12, b	0.13 ± 0.07, a	0.13 ± 0.11, a
L-3-glc	<i>Racking wine</i>	11.09 ± 0.13, a	11.35 ± 0.29, a	11.84 ± 1.37, a	13.88 ± 1.06, b
	<i>Pressing wine</i>	11.06 ± 0.64, a	11.44 ± 0.63, a	11.25 ± 0.63, a	12.76 ± 0.68, b
K-3-glc	<i>Racking wine</i>	0.81 ± 0.19, b	0.64 ± 0.10, b	0.18 ± 0.07, a	0.27 ± 0.21, a
	<i>Pressing wine</i>	0.65 ± 0.05, b	0.81 ± 0.09, c	0.26 ± 0.09, a	0.38 ± 0.04, a
I-3-glc	<i>Racking wine</i>	2.97 ± 0.21, c	3.34 ± 0.17, c *	1.34 ± 0.23, a	2.01 ± 0.20, b
	<i>Pressing wine</i>	3.04 ± 0.11, c	2.93 ± 0.12, c *	1.34 ± 0.22, a	2.13 ± 0.28, b
S-3-glc	<i>Racking wine</i>	12.84 ± 0.66, a	12.67 ± 0.39, a	13.15 ± 0.17, a	15.50 ± 0.96, b
	<i>Pressing wine</i>	13.89 ± 0.61, a	12.98 ± 0.45, a	13.94 ± 0.47, a	15.75 ± 0.87, b
M	<i>Racking wine</i>	4.04 ± 0.54, a	3.66 ± 0.17, a	12.35 ± 0.29, c	7.75 ± 0.49, b
	<i>Pressing wine</i>	3.45 ± 0.54, a	3.67 ± 0.32, a	12.36 ± 1.19, c	6.96 ± 0.97, b
Q	<i>Racking wine</i>	11.93 ± 0.88, a	12.20 ± 1.20, a	23.22 ± 3.70, b	14.14 ± 4.65, a
	<i>Pressing wine</i>	11.57 ± 0.78, a	12.15 ± 0.37, a	22.07 ± 3.53, b	15.24 ± 2.12, a
L	<i>Racking wine</i>	0.95 ± 0.08, b	0.80 ± 0.05, a	1.85 ± 0.08, c	1.72 ± 0.09, c
	<i>Pressing wine</i>	0.79 ± 0.10, a	0.76 ± 0.02, a	1.93 ± 0.08, c	1.64 ± 0.25, b
K	<i>Racking wine</i>	0.61 ± 0.03, a	0.64 ± .29, a	0.81 ± 0.53, a	0.25 ± 0.16, a
	<i>Pressing wine</i>	0.64 ± 0.11, a	0.66 ± 0.14, a	0.42 ± 0.14, a	0.38 ± 0.18, a
I	<i>Racking wine</i>	1.17 ± 0.02, a	1.17 ± 0.17, a	2.21 ± 0.28, b	1.44 ± 0.56, a
	<i>Pressing wine</i>	1.16 ± 0.20, b	1.20 ± 0.10, a	2.09 ± 0.30, c	1.67 ± 0.20, b
S	<i>Racking wine</i>	0.55 ± 0.07, a	0.54 ± 0.05, a	0.047 ± 0.07, a	0.55 ± 0.02, a
	<i>Pressing wine</i>	0.55 ± 0.04, a	0.51 ± 0.05, a	0.47 ± 0.07, a	0.54 ± 0.02, a

^a Abbreviations used for flavonol aglycones nomenclature corresponds to: myricetin (M), quercetin (Q), laricitrin (L), kaempferol (K), isorhamnetin (I) and syringetin (S). Abbreviations used for glycosilation corresponds to: glucuronide (glcU), galactoside (gal), glucoside (glc) and rhamnosylglucoside (rut).

Flavonol profile and content of wines is shown in table 8. Not statistical differences were found in flavonol amount among grape berry sizes, although the total amount of flavonols of control wine seems to be lower than medium and small grape wines. Flavonol profiles of wines according to their aglycone molar ratio are quite similar among grape berry sizes; just the myricetin and the isorhamnetin glycosides shows a lower proportion in small grape wines. The main differences in flavonol profiles were found in control wines, which had a lower proportion of quercetin and kaempferol than grape selected wines, while the proportions of laricitrin and syringetin did the opposite. In the light of these results, it seems that flavonol profile are not affected by the berry size, since the results don't show any clear trend among the berry selected wines. Regarding the molar profile of each analyzed flavonol molecule (table 9) it seems that exists deeper differences between the small grape wines and the big and medium grape wines, but these differences do not show a clear trend, since the individual flavonol proportion of small berry wines is higher in some molecules (M-3-glcU, Q-3-glcU, M, Q, L and I), and lower in other cases (M-3-glc, Q-

3-gal, Q-3-glc, Q-3-rut, K-3-glc, I-3-glc). The most awesome result concerning flavonols is the great content of flavonol aglycones (table 8) showed by the small grape wine. It is well accepted nowadays that all the flavonols present in grapes are glycosylated molecules, but during winemaking a hydrolysis process occurs which releases flavonol aglycones. These aglycones are less soluble than its glycosides and they may precipitate (Hermosín-Gutiérrez, Castillo-Muñoz, Gómez-Alonso & García-Romero, 2011). On the other hand, the aglycones have antioxidant activity, while their glycosides are not antioxidants (Bravo, 1998), so it is possible that small grape wines have a higher antioxidant power. Little is known about factors affecting the hydrolysis ratio of flavonols, but it seems that small berry wines stimulate critically this process.

Since not statistical differences were found in monomeric anthocyanin content nor total flavonol content, the deeper color of small berry wines may be related to the higher proportion of flavonol aglycones given that flavonol aglycones seem to be best copigments than the glycosilated ones, as noted by Boulton (2001).

Table 10. Monomeric flavan-3-ol and major flavan-3-ol dimers composition of wines made for each berry size grapes. Different letters in a row indicates statistical differences ($p < 0.05$) between berry sizes for each studied molecule. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.05$) between racking and pressing wines for each condition and flavanol.

Parameter ^(a)	Wine	BIG	MEDIUM	SMALL	CONTROL
C	<i>Racking wine</i>	70.54 ± 1.59, ab	61.07 ± 6.67, a	82.19 ± 7.80, b	78.21 ± 4.86, b **
	<i>Pressing wine</i>	63.05 ± 8.54, b	70.63 ± 5.99, ab	77.78 ± 6.92, a	52.71 ± 13.99, ab *
	<i>Global</i>	67.82 ± 2.81, a	64.20 ± 2.40, a	80.55 ± 6.85, b	69.53 ± 1.27, a
EC	<i>Racking wine</i>	33.24 ± 1.05, a	32.37 ± 3.15, a	40.52 ± 4.13, ab	41.77 ± 4.60, b **
	<i>Pressing wine</i>	30.88 ± 5.39, a	35.52 ± 3.53, a	37.16 ± 4.64, a	26.67 ± 6.74, a *
	<i>Global</i>	32.37 ± 2.01, a	33.34 ± 1.01, a	39.28 ± 3.73, b	36.61 ± 0.98, ab
GC	<i>Racking wine</i>	4.48 ± 0.32, a	4.73 ± 0.43, a	8.84 ± 0.73, b	8.50 ± 0.73, b
	<i>Pressing wine</i>	4.40 ± 0.40, a	5.34 ± 1.11, a	8.93 ± 1.95, a	6.55 ± 2.89, a
	<i>Global</i>	4.45 ± 0.34, a	4.93 ± 0.63, a	8.87 ± 1.14, b	7.86 ± 1.43, b
EGC	<i>Racking wine</i>	2.00 ± 0.26, a	2.21 ± 0.22, a	3.03 ± 0.47, b	2.91 ± 0.39, b
	<i>Pressing wine</i>	1.83 ± 0.41, a	2.16 ± 0.27, a	2.55 ± 0.21, a	2.04 ± 0.46, a
	<i>Global</i>	1.94 ± 0.31, a	2.19 ± 0.22, ab	2.85 ± 0.27, b	2.61 ± 0.40, ab
ECg	<i>Racking wine</i>	0.21 ± 0.02, b	0.18 ± 0.07, b	0.04 ± 0.04, a	0.05 ± 0.02, a
	<i>Pressing wine</i>	0.27 ± 0.10, b	0.27 ± 0.08, b	0.09 ± 0.03, a	0.07 ± 0.03, a
	<i>Global</i>	0.23 ± 0.04, b	0.21 ± 0.04, b	0.06 ± 0.02, a	0.06 ± 0.01, a
TOTAL monomers	<i>Racking wine</i>	110.5 ± 0.7, a	100.6 ± 9.1, a	134.6 ± 13.0, b	131.4 ± 8.3, b
	<i>Pressing wine</i>	100.4 ± 14.8, a	113.9 ± 10.8, a	126.5 ± 13.6, a	88.05 ± 24.1, a
	<i>Global</i>	107.1 ± 12.5, a	105.0 ± 2.6, a	131.9 ± 11.9, b	116.9 ± 2.6, a
PB1	<i>Racking wine</i>	12.56 ± 0.72, b	10.13 ± 1.09, a *	18.17 ± 1.11, c	17.07 ± 1.26, c
	<i>Pressing wine</i>	12.39 ± 2.45, a	13.11 ± 0.90, a **	19.55 ± 2.82, a	13.01 ± 5.41, a
	<i>Global</i>	12.49 ± 0.70, a	11.13 ± 0.48, a	18.66 ± 1.64, b	15.71 ± 2.62, b
PB2	<i>Racking wine</i>	13.95 ± 0.28, b	11.49 ± 1.05, a *	18.56 ± 1.98, c	17.58 ± 1.08, c
	<i>Pressing wine</i>	14.00 ± 2.96, a	15.45 ± 1.98, a **	19.66 ± 2.76, a	12.32 ± 4.19, a
	<i>Global</i>	13.96 ± 0.94, ab	12.82 ± 0.12, a	18.95 ± 2.23, c	15.80 ± 0.69, b
PB4	<i>Racking wine</i>	6.35 ± 0.42, a	5.05 ± 0.44, a *	7.25 ± 1.32, a	7.10 ± 0.92, a
	<i>Pressing wine</i>	2.14 ± 3.71, a	6.20 ± 0.31, ab **	7.47 ± 0.64, b	4.96 ± 1.39, ab
	<i>Global</i>	4.83 ± 1.15, a	5.44 ± 0.20, a	7.31 ± 0.86, b	6.37 ± 0.23, ab

^a Abbreviations used for flavan-3-ol monomeric nomenclature corresponds to: catechin (C), epicatechin (EC), galocatechin (GC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECg). Abbreviations used for flavan-3-ol major dimers nomenclature corresponds to: procyanidin B1 (PB1), procyanidin B2 (PB2), and procyanidin B4 (PB4).

After anthocyanins and flavonols, the last family of main monomeric flavonoids in wine is the flavan-3-ols family, whose results are shown in table 10. Only the epigallocatechin shows a clear statistical trend, in which the epigallocatechin (EGC) content decreases when berry size increases. On the other hand, small berry wines seems to have a higher amount of catechin (C), epicatechin (EC) and galocatechin (GC) than big grape and medium grape wines, while epicatechin gallate (ECg) did the opposite (since small berry wine contains less ECg than the other selected grape wines). Monomeric flavan-3-ols come from skins and seeds of grape berries, but some differences in monomeric composition between both

tissues are described; namely seeds contain a higher proportion of galloylated units (ECg), while the B ring trioxylated units (GC and EGC) are found mainly in skins. Taking in account this information, the results of our study seem quite logical, since in general terms the small berry wines contain higher proportion of GC and EGC, while lower proportion of ECg, indicating a higher contribution of skins and a lower contribution of seeds. Moreover, small berry wines had the highest amount of total flavan-3-ols although these differences were not significant when it was compared with control wine.

Table 10 also shows the amount of the main detected dimmers of flavan-3-ols: Proanthocyanidin B1 (PB1: epicatechin-(C4→C8)-catechin), Proanthocyanidin B2 (PB2: epicatechin-(C4→C8)-epicatechin) and Proanthocyanidin B4 (PB4: catechin-(C4→C8)-catechin). Once again, small grape wines contained higher amounts of these compounds than big and medium grape wines, although the pressed wines do not show statistical differences among berry size in PB1 nor PB2. In a similar way that occurs with monomeric flavanols, the content of dimmeric procyanidins do not show statistical differences between small berry and control wines, with the exception of the global content of PB2 (higher in small grape wines).

Polymeric proanthocyanidins were quantified and characterized by acid depolymerization in the presence of an excess of phloroglucinol, followed by a RP-HPLC-DAD analysis of flavanol adducts. Those results are shown in table 11. The small berry wines contained the highest proanthocyanidin concentration and these differences were statistically significant when were compared with medium and bigger berry wines. Hence, the general trend seem to indicate that selection of small berries seems to lead to more tannic wines although, once again small berry wines were not statistically different of control wines.

Table 11. Proanthocyanidin characterization. Different letters in a row indicates statistical differences ($p < 0.05$) between berry sizes for each studied parameter. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.05$) between racking and pressing wines for each condition and parameter.

Parameter	Wine	BIG	MEDIUM	SMALL	CONTROL
PA^(a)	<i>Racking wine</i>	1414 ± 183, ab	1336 ± 55, a	1702 ± 157, b	1534 ± 128, ab
	<i>Pressing wine</i>	1192 ± 65, a	1348 ± 102, a	1460 ± 206, a	1337 ± 53, a
	<i>Global</i>	1336 ± 103, a	1342 ± 50, a	1615 ± 142, b	1465 ± 87, ab
mDP^(b)	<i>Racking wine</i>	6.06 ± 0.18, b **	5.45 ± 0.07, a	6.08 ± 0.07, b	6.07 ± 0.16, b **
	<i>Pressing wine</i>	5.39 ± 0.02, a *	5.42 ± 0.50, a	5.70 ± 0.27, a	5.67 ± 0.14, a *
	<i>Global</i>	5.82 ± 0.13, b	5.45 ± 0.21, a	5.94 ± 0.14, b	5.93 ± 0.09, b
% PD^(c)	<i>Racking wine</i>	20.10 ± 0.69, a	21.14 ± 0.38, ab	22.81 ± 0.26, b	22.45 ± 1.41, b
	<i>Pressing wine</i>	19.82 ± 0.35, a	21.30 ± 0.87, b	22.32 ± 1.02, b	21.83 ± 0.08, b
	<i>Global</i>	20.00 ± 0.54, a	21.22 ± 0.32, b	22.64 ± 0.38, c	22.22 ± 0.96, bc
% Gal^(d)	<i>Racking wine</i>	8.15 ± 0.45, b	8.19 ± 0.30, b	6.40 ± 0.15, a	6.63 ± 0.25, a *
	<i>Pressing wine</i>	8.91 ± 0.29, c	8.37 ± 0.25, b	6.86 ± 0.37, a	7.31 ± 0.12, a **
	<i>Global</i>	8.42 ± 0.24, b	8.25 ± 0.26, b	6.56 ± 0.12, a	6.87 ± 0.18, a

^a Concentration of Proanthocyanidins expressed as mg/L. | ^b Mean degree of polymerization of wine proanthocyanidins. | ^c Prodelphinidin ratio of proanthocyanidins expressed as a percentage. | ^d Galloylation degree of proanthocyanidins expressed as a percentage.

The lowest values of mean degree of polymerization (mDP) corresponded to the medium berry wines, while not statistical differences were found among all the other wines. Since skin proanthocyanidins have a higher mDP than seed proanthocyanidins, and small berries have higher proportion of skins and lower proportion of seeds, a higher mDP in small berry wines could be expected. However, this trend was not observed. Both results, proanthocyanidin content and mDP, do not show statistical differences among berry sizes for pressing wines, so it seems that the pressing process diminish these differences. The ratio of prodelphinidins (trioxylated monomeric subunits) shows a general trend in which the bigger the berry, the lower the prodelphinidin ratio. Since prodelphinidins are only present in skins, the observed trend is quite logical inasmuch as the proportion of skins increase when the berries are smaller.

The last information about proanthocyanidins shown in table 11, is the galloylation degree of proanthocyanidins. The galloylation degree of proanthocyanidins from small berry wines was significant

lower than in medium and bigger berry wines. However, once again small berry wines were not statistically different of control wines. The seed proanthocyanidins contains higher amount of galloylated subunits, and it is well accepted that the higher the content of galloylated subunits, the higher the wine astringency perception. Because of the lower contribution of seeds in small grape berries, the lower proportion of galloylated subunits could be expected, and this may lead to think that small berry wines are less astringents than big and middle grape wines. Nevertheless, the galloylation degree of small berry wines was quite similar to galloylation degree of control wines. Consequently, the selection of grapes did not allow decreasing the galloylation degree in respect to control (non selected grape) wines at least in our experimental conditions.

Table 12. Non flavanoid phenolics of wines made with different grape berry size. Different letters in a row indicates statistical differences ($p < 0.05$) between berry sizes for each studied compound. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.05$) between racking and pressing wines for each condition and compound.

Compound ^(a)	Wine	BIG	MEDIUM	SMALL	CONTROL
Caftaric Acid	<i>Racking wine</i>	23.83 ± 3.15, a	23.19 ± 1.84, a	26.10 ± 1.46, a	25.27 ± 1.12, a **
	<i>Pressing wine</i>	21.25 ± 2.51, a	22.60 ± 1.87, a	25.23 ± 1.34, a	22.44 ± 0.95, a *
	<i>Global</i>	22.91 ± 2.92, a	22.98 ± 1.86, a	25.78 ± 1.40, a	24.28 ± 1.10, a
Caffeic Acid	<i>Racking wine</i>	1.12 ± 0.10, a	1.41 ± 0.16, b	3.06 ± 0.08, d	1.90 ± 0.09, c
	<i>Pressing wine</i>	1.06 ± 0.13, a	1.42 ± 0.20, b	2.89 ± 0.15, d	1.73 ± 0.15, c
	<i>Global</i>	1.10 ± 0.11, a	1.41 ± 0.18, b	3.00 ± 0.10, d	1.84 ± 0.09, c
Ethyl Caffeate	<i>Racking wine</i>	0.29 ± 0.10, a	0.24 ± 0.03, a *	0.70 ± 0.09, c	0.49 ± 0.05, b **
	<i>Pressing wine</i>	0.26 ± 0.11, a	0.39 ± 0.07, a **	0.72 ± 0.10, b	0.39 ± 0.01, a *
	<i>Global</i>	0.28 ± 0.10, a	0.29 ± 0.02, a	0.71 ± 0.09, c	0.41 ± 0.03, b
Total caffeic	<i>Racking wine</i>	25.24 ± 3.25, a	24.84 ± 2.02, a	29.86 ± 1.56, a	27.66 ± 1.19, a
	<i>Pressing wine</i>	22.58 ± 2.61, a	24.40 ± 2.00, a	28.83 ± 1.54, b	24.55 ± 0.92, a
	<i>Global</i>	24.29 ± 3.03, a	24.69 ± 2.02, a	29.49 ± 1.53, a	26.57 ± 1.13, a
Coutaric Acid	<i>Racking wine</i>	9.26 ± 1.29, a	9.35 ± 1.24, a	11.17 ± 0.74, a	10.41 ± 0.64, a **
	<i>Pressing wine</i>	8.09 ± 0.90, a	9.00 ± 1.08, ab	10.75 ± 0.85, b	8.99 ± 0.57, ab *
	<i>Global</i>	8.84 ± 1.15, a	9.23 ± 1.19, a	11.01 ± 0.77, a	9.92 ± 0.63, a
glc-Coumaric Acid	<i>Racking wine</i>	2.23 ± 0.13, a	2.47 ± 0.17, ab	2.54 ± 0.04, b	2.37 ± 0.06, ab
	<i>Pressing wine</i>	2.22 ± 0.14, a	2.52 ± 0.08, a	2.47 ± 0.10, a	2.46 ± 0.22, a
	<i>Global</i>	2.23 ± 0.13, a	2.49 ± 0.14, b	2.52 ± 0.01, b	2.40 ± 0.11, ab
Ethyl Coumarate	<i>Racking wine</i>	0.23 ± 0.05, a	0.27 ± 0.05, a *	0.94 ± 0.03, c	0.48 ± 0.07, b
	<i>Pressing wine</i>	0.32 ± 0.15, a	0.39 ± 0.05, a **	0.89 ± 0.03, b	0.50 ± 0.13, a
	<i>Global</i>	0.27 ± 0.06, a	0.31 ± 0.04, a	0.92 ± 0.03, c	0.49 ± 0.09, b
Total coumaric	<i>Racking wine</i>	11.72 ± 1.47, a	12.09 ± 1.35, ab	14.65 ± 0.72, b	13.26 ± 0.69, ab
	<i>Pressing wine</i>	10.64 ± 1.04, a	11.91 ± 1.14, ab	14.11 ± 0.93, b	11.96 ± 0.70, ab
	<i>Global</i>	11.33 ± 1.32, a	12.03 ± 1.28, ab	14.45 ± 0.80, b	12.81 ± 0.68, ab
t-piceid	<i>Racking wine</i>	0.48 ± 0.06, a	0.66 ± 0.08, a	1.18 ± 0.20, b	0.80 ± 0.18, a
	<i>Pressing wine</i>	0.51 ± 0.03, a	0.66 ± 0.12, ab	1.19 ± 0.13, c	0.80 ± 0.09, b
	<i>Global</i>	0.49 ± 0.05, a	0.66 ± 0.09, ab	1.18 ± 0.18, c	0.80 ± 0.15, b
t-resveratrol	<i>Racking wine</i>	0.55 ± 0.10, a **	0.62 ± 0.11, a	1.30 ± 0.6, c	0.93 ± 0.27, b
	<i>Pressing wine</i>	0.36 ± 0.04, a *	0.74 ± 0.18, b	1.31 ± 0.20, c	0.67 ± 0.14, b
	<i>Global</i>	0.49 ± 0.08, a	0.66 ± 0.13, ab	1.30 ± 0.08, c	0.84 ± 0.22, b
Total stilbene	<i>Racking wine</i>	1.01 ± 0.14, a	1.28 ± 0.18, ab	2.48 ± 0.14, c	1.73 ± 0.45, b
	<i>Pressing wine</i>	0.87 ± 0.05, a	1.40 ± 0.28, b	2.51 ± 0.29, c	1.47 ± 0.22, b
	<i>Global</i>	0.97 ± 0.11, a	1.32 ± 0.21, ab	2.49 ± 0.18, c	1.64 ± 0.37, b

^a Hydroxycinnamic acids and derivatives are expressed as mg/L of caffeic acid. Stilbenes are expressed as mg/L of *t*-resveratrol.

Table 12 shows hydroxycinnamic acids and stilbene concentration of the different wines. No statistical differences were found in caftaric acid nor total caffeic acid. However, the free caffeic acid shows a clear statistical trend in which the smaller the berry the higher the content of free caffeic acid, while control wine value falls between the small and the middle berry wines. Ethyl caffeate showed a similar pattern although no significant differences between medium and bigger berry wines were observed.

Looking upon the higher content of free caffeic acid and ethyl caffeate, it seems that a higher hydrolysis of caftaric acid occurred in small grape wines. The free caffeic acid released during the ester hydrolysis

reaction obviously increases the amount of caffeic acid, but also allows the formation of derivatives as ethyl caffeate (by an esterification reaction with the ethanol presents in the media). The total content of coumaric acid and its derivatives also shows a statistical trend in which the smaller the berry the higher the coumaric content. Despite free coumaric acid was not detected, their derivatives seem to indicate a similar behavior than in the case of caffeic acid. Coutaric acid seems to increase when berry size decreases, although just the pressing wine shows a statistical trend. Glucosilated coumaric acid follows a similar behavior than coutaric acid, since small grape wines contains statistically higher amounts than big grape wines. As occurring with ethyl caffeate, small grape wines contains higher amount of ethyl coumarate, which indicates that a higher amount of coutaric acid was hydrolyzed previously to the reaction with ethanol contained in the medium. This data is in consonance with the greatest content of 10-MHP-pymv3glc (table 7) that comes from the reaction between coumaric acid and malvidin. Considering the overall results from hydroxycinnamic acids, it seems that small grape wines contain higher amounts of these compounds, which is quite logical since grape skins contains higher amounts of hydroxycinnamates than grape pulp. Hydroxycinnamic acids and derivatives are described as good copigments, so the higher amount of these compounds in small grape wines could explain partially the deeper color of small grape wines, due to the intermolecular copigmentation effect. On the other hand, the higher amount of non-tartaric derivatives seems to indicate a higher hydrolysis ratio in small grape wines, which is in consonance with flavonol results. The hydrolysis reactions can occur through two different pathways, the first one occurs by an acidic hydrolysis and the second one occurs enzymatically (Hermosín-Gutiérrez, Castillo-Muñoz, Gómez-Alonso & García-Romero, 2011). The most acidic pH of small berry wines, could lead us to think that chemical acidic hydrolysis is the responsible of the great hydrolysis ratio of small berry wines, although enzymatic activity measurements were not taken and, therefore, further studies to clarify the winemaking and ageing hydrolysis processes will be necessary.

Regarding stilbene (*t*-piceid, *t*-resveratrol, and total content) concentration of wines showed in table 12, a clear trend among berry sizes was observed: the biggest the grapes, the lower the stilbene content. Stilbenes are phytoalexins biosynthetized by vines as a response to fungal diseases and stress conditions (Adams, 2006). Since stilbenes were found mainly in grape skin, it seems quite logical that small berry wines contain a higher amount of them. Stilbenes are healthy compounds with antioxidant activity (Atanackovic, Petrovic, Jovic, Bukarica, Bursac & Cvejic, 2012) and also can act as copigments because of its structure. The content of stilbenes of small berry wines was statistically higher than those of control wines, so the selection of grapes by berry size seems to be able to enhance the stilbene content of wines.

Table 13. Polysaccharide content of wines made with different grape berry size. Different letters in a row indicates statistical differences ($p < 0.05$) taking the berry size as a factor. Asterisks indicate statistical differences ($p < 0.05$) between racking and pressing wines for each condition and fraction.

	Wine	BIG	MEDIUM	SMALL	CONTROL
HMW^(a)	<i>Racking wine</i>	197 ± 12, b	192 ± 29, b	141 ± 14, a	141 ± 14, a
	<i>Pressing wine</i>	179 ± 10, b	176 ± 18, b	136 ± 5, a	134 ± 3, a
	<i>Global</i>	191 ± 11, b	186 ± 25, b	139 ± 10, a	136 ± 4, a
MMW^(b)	<i>Racking wine</i>	646 ± 46, a	664 ± 9, a *	662 ± 46, a *	705 ± 70, a
	<i>Pressing wine</i>	694 ± 58, a	768 ± 36, a **	804 ± 76, a **	689 ± 45, a
	<i>Global</i>	663 ± 49, a	700 ± 15, a	714 ± 48, a	699 ± 61, a
LMW^(c)	<i>Racking wine</i>	141 ± 2, a	143 ± 7, a *	189 ± 6, b *	180 ± 12, b
	<i>Pressing wine</i>	156 ± 17, a	185 ± 14, b **	219 ± 9, c **	172 ± 4, ab
	<i>Global</i>	144 ± 5, a	158 ± 8, a	200 ± 7, c	177 ± 8, b
TOTAL^(d)	<i>Racking wine</i>	1002 ± 65, a	1000 ± 16, a *	992 ± 62, a	1023 ± 85, a
	<i>Pressing wine</i>	1029 ± 73, a	1129 ± 33, a **	1158 ± 85, a	994 ± 46, a
	<i>Global</i>	1012 ± 64, a	1044 ± 9, a	1052 ± 61, a	1013 ± 71, a

^a High molecular weight fraction (higher than 150 KDa) expressed as mg/L. | ^b Medium molecular weight fraction (between 150 KDa and 5 KDa) expressed as mg/L. | ^c Low molecular weight fraction (between 5 KDa and 1.5 KDa) expressed as mg/L. | ^d Total amount of polysaccharides expressed as mg/L.

Finally, polysaccharide quantification was performed by HRSEC-RID and results are shown in table 13. Regarding total polysaccharide concentration, statistical differences were not found among berry sizes

neither between selected grape wines and control ones. In contrast, when we focus on the molecular weight distribution of polysaccharides some statistical differences were found among berry sizes. Small grape wines show the lower amount of high molecular weight polysaccharides (HMW) and the greatest amount of low molecular weight polysaccharides (LMW), while big and middle grape wines did the opposite. In general terms, the behavior of small grape wines is quite similar than control ones, although the LMW fraction was higher in small grape wines. Polysaccharides come from cell walls of grapes and yeasts, and because of those heterogeneous origin, it is difficult to ascribe these differences to a specific factor, although the yeast inoculation was performed by the same way for all wines. Previous published studies had reported a protective effect of LMW polysaccharides front the tannin aggregation, which protect them from the formation of large aggregates that tend to precipitate (Poncet-Legendre, Doco, Williams & Vernhet, 2007). This argue is agree with our data, considering the higher amount of proanthocyanidin in small grape wines and control wines, as well as their higher amount of LMW polysaccharides for both wines.

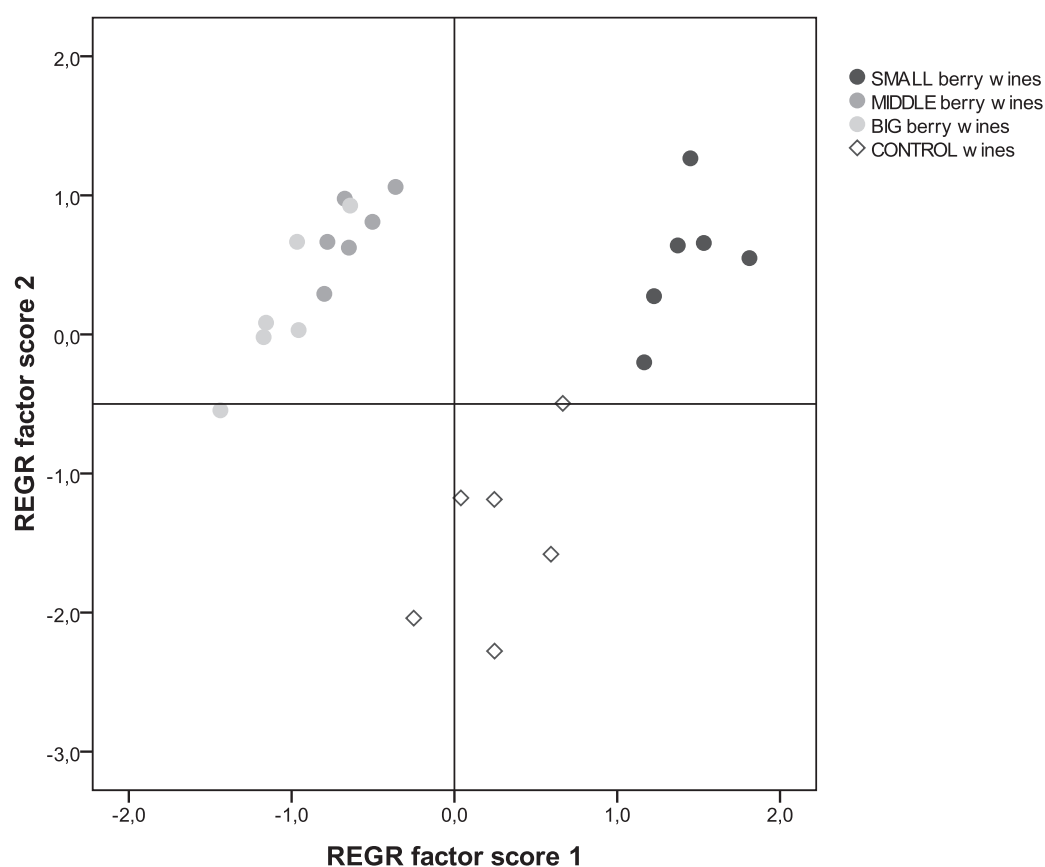


Figure 4. Principal Component Analysis (PCA) Scores for each wine sample.

Owing to the huge amount of chemical data, a Principal Component Analysis (PCA) was performed. 72 variables were preselected to perform the PCA analysis, and the obtained wine scores are shown in figure 4. The first component explains 63.37 % of the variance, and the second one explains 11.52 % of the variance (so, the accumulated explained variance by the two first components was 74.89 %). Regarding to the loadings (data not shown), all variables seem to have similar influence in the Component 1, since all loading values are roughly distributed between 0.5 and 1 (in absolute values) with the only exception of some flavonol data (specifically, the total flavonol content, and the profiles of L3glc, S3glc, S-algylcone, L-type and S-type) with a loading values lower than 0.5. Almost 40 variables show loadings higher than 0.8 (in absolute values), as shown in table 14. Component 2, in contrast, seem to use flavonol data to explain variance, since just six flavonol variables (specifically total flavonol content and profiles of S-

Table 14. Contribution of the most important variables of the PCA for each Component.

Variable	Component	
	1	2
<i>pt3glc</i>	,984	
<i>dp3glc</i>	,980	
<i>Caffeic acid</i>	,977	
<i>TPI</i>	,963	
Σ <i>resveratrol</i>	,952	
<i>pn3glc</i>	,950	
<i>M aglycone</i>	,946	
<i>t-piceid</i>	,944	
<i>M-3-glc</i>	-,936	
<i>Spectrum Area</i>	,934	
<i>L *</i>	-,924	
<i>Ehyl coumarate</i>	,923	
<i>Q-3-glc</i>	-,922	
<i>C *</i>	,921	
<i>pn3acglc</i>	,918	
<i>a *</i>	,917	
<i>t-resveratrol</i>	,917	
<i>% hidrólisis</i>	,914	
<i>pn3cmglc</i>	,913	
<i>Cl</i>	,912	
<i>I-3-glc</i>	-,911	
<i>GAL ratio</i>	-,911	
<i>L aglycone</i>	,905	
<i>mv3glc</i>	-,901	
<i>Ethyl caffeate</i>	,894	
<i>b *</i>	,889	
Σ <i>coumaric acid</i>	,873	
<i>h *</i>	,870	
<i>10-MHP-pymv3glc</i>	,868	
<i>mv3acglc</i>	-,864	
<i>pt3cmglc</i>	,846	
Σ <i>caffeic acid</i>	,844	
<i>galocatechin</i>	,842	
<i>Q aglycone</i>	,839	
<i>K-3-glc</i>	-,835	
<i>Q-3-gal</i>	-,832	
<i>cy3glc</i>	,831	
<i>I aglycone</i>	,812	
<i>dp3cmglc</i>	,809	
<i>Coutaric Acid</i>	,805	
<i>S-type</i>		-,975
<i>S-3-glc</i>		-,970
<i>Total Flavonols</i>		,897
<i>L-3-glc</i>		-,775
<i>L-type</i>		-,745
<i>M-3-glcU</i>		-,723

type, L-type, S3glc, L3gl, M3glcU, and Total flavonols) have loadings exceeding 0.7 (in absolute values) as shown in table 14. Focusing on wine scores (figure 4) for Component 1, it seems that small grape wines are enough different of middle and big grape wines, since they are well distributed among component 1 axis. In contrast, middle and big grape wines seem to be quite similar, since they are grouped in the same scores range. Control wine scores falls between the two aforementioned groups (small grape wines on one hand and big and middle grape wines on the other hand), which is quite logical taking in account the discussed results about wine chemical data. Surprisingly, Component 2 seems to separate the control wines from the grape selected ones. In contrast, the variance explained in the PCA does not seem to be able to differentiate big grape wine and the middle grape ones, since their scores are quite similar (and fall in the same zone of the chart). PCA results reinforced the idea that small berry wines are quite different from the other two selected berry wines (big and middle grape wines), those, in turn, are quite similar and seem undistinguishable by the performed PCA. Finally, it seems that flavonol profiles (with a high contribution of Component 2) are an important factor to differentiate selected berry wines from control ones.

4. Conclusions.

In this study, a grape selection by berry size (by using two different sieves) was performed successfully, since the selected grape groups show different berry mass and berry volume. Small berry grapes have a higher proportion of skins and a lower contribution of seeds. Additionally, small berry grapes show a higher titratable acidity and

soluble solids, but a lower pH. Wines obtained for each grape selected group was characterized and shows some interesting differences among berry sizes. The clearest trend among wines from different berry sizes is related with wine color: The smaller the berry the deeper the wine color. Moreover pH, TPI, total anthocyanins (Spectrophotometric measurement), total amount of coumaric acid and derivatives, as well as stilbene concentration also increases when berry size decreases. In contrast, total anthocyanins (HPLC quantification), pyranoanthocyanins, total flavonols and total polysaccharides of wines don't show any trend among berry sizes. In general, small grape wines contain higher amounts of ionized anthocyanins and higher amount of flavanols (in its monomeric, dimeric and polymeric forms). Finally, it seems that hydrolysis processes (affecting glycosidic linkage of flavonol glycosides and the ester bond of hydroxycinnamates) occurring during winemaking are highly favored in the case of small grape wines. Further studies will be necessary to a better understand of this hydrolysis processes.

According to all these results it can be asserted that selection of grapes by berry size could be an interesting tool for management of wine quality in wineries. Nowadays, berry size selection is not easy to carry out at industrial winemaking level. For that reason, further studies directed to the design of an equipment that allows to mechanically separation of grapes by size are needed to scale up this procedure to the industry.

References.

- Adams, D. O. (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 249-256.
- Atanackovic, M., Petrovic, A., Jovic, S., Bukarica, L. G., Bursac, M., & Cvejic, J. (2012). Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chemistry*, 131(2), 513-518.
- Ayala, F., Echavarri, J. F., & Negueruela, A. I. (1997). A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rose wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3), 357-363.
- Ayala, F., Echavarri, J. F., & Negueruela, A. I. ® MSCVes.zip, downloaded from <http://www.unirioja.es/color/descargas.shtml>, 2013.
- Barbagallo, M. G., Guidoni, S., & Hunter, J. J. (2011). Berry size and qualitative characteristics of Vitis vinifera L. cv. Syrah. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 32(1), 129-136.
- Blanco-Vega, D., López-Bellido, F. J., Alía-Robledo, J. M., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2011). HPLC-DAD-ESI-MS/MS characterization of pyranoanthocyanins pigments formed in model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9523-9531.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67-87.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Cerpa-Calderon, F. K., & Kennedy, J. A. (2008). Berry integrity and extraction of skin and seed proanthocyanidins during red wine fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9006-9014.
- Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry*, 126(4), 1971-1977.
- Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S., & Teissedre, P. (2009). Grape Variety Effect on Proanthocyanidin Composition and Sensory Perception of Skin and Seed Tannin Extracts from Bordeaux Wine Grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for Two Consecutive Vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 545-553.
- De Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 940-945.

- Gil, M., Esteruelas, M., González, E., Kontoudakis, N., Jiménez, J., Fort, F., Canals, J. M., Hermosín-Gutiérrez, I., & Zamora, F. (2013). Effect of two different treatments for reducing grape yield in *Vitis vinifera* cv Syrah on wine composition and quality: Berry thinning versus cluster thinning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4968-4978.
- Gil, M., Kontoudakis, N., González, E., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2012). Influence of Grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7988-8001.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2ème partie: Mesure, Origine et Interpretation. *Connaissane de la Vigne et du Vin*, 18(4), 253-271.
- Guidoni, S., & Hunter, J. J. (2012). Anthocyanin profile in berry skins and fermenting must/wine, as affected by grape ripeness level of *Vitis vinifera* cv. Shiraz/R99. *European Food Research and Technology*, 235(3), 397-408.
- He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17(2), 1571-1601.
- Hermosín-Gutiérrez, I., Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., & García-Romero, E. (2011). Chapter 8. Flavonol Profiles for Grape and Wine Authentication. In S. E. Ebeler, G. R. Takeoka, & P. Winterhalter (Eds.), *Progress in Authentication of Food and Wine* (pp. 113-129). Washington, DC: ACS Symposium Series; American Chemical Society.
- Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., De Freitas, V., & Zamora, F. (2011). Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chemistry*, 124(3), 767-774.
- Lesschaeve, I., & Noble, A. C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 330S-335S.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., & Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7692-7702.
- Niketic-Aleksic, G. K., & Hrazdina, G. (1972). Quantitative Analysis of the Anthocyanin Content in Grape Juices and Wines. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 5(5), 163-165.
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., & Noble, A. C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(8), 1123-1128.
- Pérez-Magariño, S., & González-Sanjosé, M. L. (2003). Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. *Food Chemistry*, 81(2), 301-306.
- Poncet-Legrand, C., Doco, T., Williams, P., & Vernhet, A. (2007). Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: Effect of polysaccharide molecular weight. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(1), 87-91.
- Poni, S., & Libelli, N. (2008). Dimensione dell'acino e qualità dell'uva: una relazione non scontata. *L'Informatore Agrario*, 17, 20-25.
- Preys, S., Mazerolles, G., Courcoux, P., Samson, A., Fischer, U., Hanafi, M., Bertrand, D., & Cheynier, V. (2006). Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 126-136.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubordieu, D. (2006). Chapter 6: Phenolic Compounds. In P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, & D. Dubordieu (Eds.), *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments*, vol. 2 (pp. 141-203). Chinchester: John Wiley & Sons.
- Roby, G., & Matthews, M. A. (2004). Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(1), 74-82.
- Sáenz-Navajas, M. P., Avizcuri, J. M., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2012). Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chemistry*, 134(3), 1484-1493.
- Sampaio, T. L., Kennedy, J. A., & Vasconcelos, M. C. (2007). Use of Microscale Fermentations in Grape and Wine Research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(4), 534-539

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

4. DISCUSIÓN GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

Para poder entrar a realizar una discusión general de los resultados presentados en esta tesis doctoral, es necesario contextualizarla dentro de la línea de madurez fenólica que se desarrolla desde hace años en el grupo de tecnología enológica (TECNENOL) del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili, cuya trayectoria está avalada por varias publicaciones científicas e intervenciones en congresos nacionales e internacionales. El objetivo fundamental de ésta línea de investigación es generar información científica que permita relacionar el nivel de madurez de la uva con la calidad del vino tinto que con ella se elabora, con el fin de generar conocimiento que pueda resultar útil tanto para el mundo académico como para los profesionales del sector.

El avance de las técnicas analíticas y la generalización de las técnicas instrumentales de análisis, ha permitido ir mejorando la calidad de la información científica generada alrededor de la relación entre la composición química y la calidad del vino tinto. En todos los ensayos plasmados en esta memoria, se caracterizan los vinos de tal modo que se incluyen los parámetros utilizados tradicionalmente en el mundo de la enología (tales como la intensidad colorante, el índice de polifenoles totales, o los antocianos totales determinados mediante espectrofotometría), junto con datos mucho más precisos obtenidos mediante técnicas actuales (como la caracterización del color mediante el uso del espacio CIELab o la caracterización de la composición química de ciertas familias de compuestos mediante HPLC). Esta dualidad permite que la información científica generada resulte útil tanto desde el punto de vista de la ciencia básica (debido a la gran cantidad de datos aportados) como desde el punto de vista del productor, mucho más familiarizado con los parámetros tradicionales.

A lo largo de siglos de experiencia acumulada, el sector ha podido comprobar que la madurez de la uva condiciona severamente la calidad del vino. Aunque éste es un hecho contrastado, todavía quedan muchos conceptos para esclarecer los mecanismos mediante los cuales la madurez de la uva actúa sobre la composición química del vino tinto, y cómo dicha composición química afecta a sus propiedades organolépticas. Con la vocación de aportar datos científicos que contribuyan a la comprensión de dichos mecanismos se planteó el ensayo del capítulo I, en donde se pudo comprobar las principales diferencias en cuanto a color y composición química de los vinos elaborados con uvas cosechadas a distinto nivel de madurez, aportando datos sobre el contenido de antocianos, proantocianidinas y polisacáridos, lo que permite tener una idea global del contenido de los compuestos mayoritarios del vino y con mayor impacto sobre sus atributos sensoriales. Aunque a nivel académico pueda resultar más o menos interesante caracterizar qué compuestos presentes en el vino son marcadores o

indicativos de un correcto nivel de madurez de la uva, a nivel profesional dicha información sólo resultará de utilidad si acaba sirviendo para mejorar la calidad final de los vinos elaborados.

El hecho que la madurez juegue un papel fundamental en la composición química y los atributos sensoriales del vino tinto, tiene una serie de implicaciones que no se deben menospreciar. Si la vid está bien adaptada a su entorno, el ciclo anual se desarrolla con normalidad y las condiciones meteorológicas durante el proceso de desarrollo y madurez del fruto son las adecuadas, la uva alcanzará un buen nivel de madurez, tanto desde el punto de vista fenólico como desde el punto de vista industrial, y elaborar vinos tintos de alta gama será relativamente sencillo siempre que en bodega se utilicen las prácticas adecuadas. Lo que sucede en realidad es que éste escenario favorable en el que la uva madura correctamente no se da de forma tan habitual como nos gustaría, de tal modo que el enólogo ha de enfrentarse al reto de intentar paliar el efecto que una madurez inadecuada ejerce sobre la calidad y la composición del vino tinto.

Los problemas de una madurez inadecuada con los que se puede encontrar un enólogo hoy en día son muchos y muy variables, de modo que resulta francamente difícil estudiarlos en su conjunto. Por ello, para la elaboración de esta tesis doctoral, se intenta evaluar el impacto de algunas prácticas vitivinícolas utilizadas por los profesionales del sector para paliar algunos de los problemas de madurez más habituales hoy en día.

Uno de los problemas con los que se puede encontrar el productor de vinos tintos es la necesidad de vendimiar antes de que la uva alcance su grado óptimo de madurez, debido a que ataques fúngicos o inclemencias meteorológicas puedan echar a perder la cosecha, con el perjuicio económico que esto supone. En estos casos, la herramienta básica y más accesible que tiene el enólogo para modular las características del vino es el control del tiempo de maceración, que termina cuando se produce el descube y se separa el líquido de las partes sólidas. Cuando las uvas están bien maduras, el enólogo puede ir a maceraciones largas con el fin de obtener vinos carnosos y estructurados, con una tanicidad agradable, aromas afrutados y una gran intensidad colorante: atributos muy cotizados en el mercado actual del vino. Cuando las uvas no están bien maduras, en cambio, el enólogo tiende a ir a maceraciones más cortas, ya que aunque esto vaya en detrimento de la intensidad colorante del vino, las maceraciones largas pueden originar vinos rudos, herbáceos y agresivos con aromas vegetales: atributos más bien considerados como defectos en el mercado actual. Por estos motivos, se decidió incluir el factor del tiempo de maceración en el ensayo del capítulo I, con el fin de

tener una instantánea de cómo influye el tiempo de maceración sobre la composición química de vinos tintos elaborados con uvas cosechadas a distintos niveles de madurez. Así pues, mediante el ensayo del capítulo I se ha podido describir las diferencias de composición química entre los vinos elaborados con uvas de distinto nivel de madurez y distinto tiempo de maceración, aportando algo de luz sobre cuáles pueden ser los motivos de sus diferencias organolépticas. Aunque existe mucha literatura científica relacionada con el impacto de la madurez de la uva o el impacto del tiempo de maceración sobre la composición en ciertas familias de compuestos del vino tinto, no existía ninguno (al menos en nuestro conocimiento) que contemplara ambos factores conjuntamente, estudiando su efecto sobre el color y la composición del vino tinto. Así pues, las principales aportaciones del capítulo I recaen sobre el hecho de haber realizado una caracterización completa del color, los antocianos y las proantocianidinas del vino en función del nivel de madurez de la uva y del tiempo de maceración, además de aportar, por primera vez, información acerca de cómo influyen estos dos factores en el contenido de polisacáridos del vino.

Al plantear los distintos problemas de madurez con los que se puede enfrentar el sector hoy en día, se consideró el problema de la madurez insuficiente de la uva como consecuencia de un vigor excesivo de la cepa, que conduce a sobreproducciones en las que la vid es incapaz de madurar correctamente toda la uva. Para afrontar este problema, durante años se han aplicado técnicas de reducción del rendimiento mediante el aclareo de frutos. Ésta técnica consiste en realizar una corrección de la cantidad de fruto que tiene que alimentar la cepa, eliminando una parte de la uva antes de que empiece la fase de maduración. Al regular la producción, se persigue conseguir que la cepa alimente tan solo aquella producción que es capaz de madurar correctamente. La práctica más habitual de aclareo de frutos es el aclareo de racimos, que consiste en eliminar un porcentaje concreto de racimos enteros, práctica que, por otro lado, ha sido ampliamente estudiada y sobre la que se dispone de una gran cantidad de literatura científica. A pesar de ello, hay otras prácticas de aclareo de frutos menos populares, como el aclareo de bayas mediante la aplicación de productos químicos sobre la cepa o el aclareo de bayas mediante la eliminación de una parte concreta del racimo. Considerando toda esta información, se decidió realizar un ensayo aplicando a una plantación con vigor excesivo dos prácticas distintas de aclareo de frutos: un aclareo del 50 % de los racimos y un aclareo de bayas mediante la eliminación de las puntas de todos los racimos. Los resultados de dicho ensayo, presentados en el capítulo II del presente manuscrito, muestran que ambas prácticas vitícolas resultan eficaces para mejorar el nivel de madurez de la uva y, por consiguiente, la composición fenólica del vino. A pesar de que ambos tratamientos

resulten eficaces para solventar el problema de vigor excesivo y mejorar la calidad del vino, la práctica de aclareo de bayas aplicada, descrita durante la década de 1930 pero prácticamente ignorada por la comunidad científica desde entonces, muestra unos resultados prometedores, ya que mejora significativamente la calidad del vino sacrificando una proporción menor de la cosecha, con el consecuente beneficio económico que esto supone para el productor.

Otro de los problemas de madurez considerados durante la elaboración de la presente tesis doctoral, recoge una inquietud creciente en el sector debido fundamentalmente al impacto que el cambio climático está ejerciendo sobre la viticultura en climas templados, relacionado con el incremento de las temperaturas medias, que avanza la madurez industrial del fruto. Este avance de la madurez industrial provoca un desfase entre esta y la madurez fenólica, más tardía, lo que provoca que si el productor espera hasta alcanzar un buen nivel de madurez fenólica para cosechar el fruto, se dispara el contenido de azúcar de la uva, de tal manera que los vinos elaborados contienen un nivel de alcohol excesivo. El hecho que los vinos tengan un grado alcohólico muy elevado, resulta perjudicial para el productor por diferentes motivos. En primer lugar, y debido a que el etanol participa de la percepción sensorial de los vinos, el exceso de etanol puede conducir a vinos desequilibrados poco valorados por los consumidores. Además, no hay que olvidar que las políticas sanitarias de la mayoría de países consumidores de vino hacen que el sector esté interesado en elaborar vinos con un grado alcohólico moderado, especialmente los que han abierto mercado en países que graban con tasas e impuestos las bebidas con un elevado contenido de alcohol. Todos estos argumentos han contribuido a que el sector se dote de herramientas para la desalcoholización parcial de los vinos, entre las que destaca la ósmosis inversa, protagonista del ensayo del capítulo III, en el que se pone de manifiesto la utilidad de la ósmosis inversa para reducir el contenido en etanol del vino sin alterar significativamente su composición fenólica.

Aunque hasta el momento se ha hablado de la madurez fenólica y la madurez industrial como si de puntos discretos en el tiempo se tratara, hay que considerar que la enorme heterogeneidad de la uva dificulta en gran medida poder evaluar la madurez global de una cosecha y utilizar las prácticas vitícolas más adecuadas de vinificación en función del potencial fenólico de la uva. La principal herramienta para paliar los efectos negativos de la heterogeneidad de la uva consiste en una selección de la uva previa a su vinificación, que habitualmente se realiza de forma manual o semiautomatizada mediante el uso de mesas de selección, que permiten desechar las uvas verdes, las pasas o la uva que se halla en mal estado sanitario. Esta selección que se realiza en bodega resulta efectiva para asegurar unos mínimos

de calidad en vinos tintos de alta gamma, pero considerando la enorme heterogeneidad de las cosechas, resulta evidente que hallar un modo de seleccionar la uva antes de la vinificación podría resultar muy útil para elaborar vinos con distintas calidades. En este sentido, durante los últimos años se han realizado estudios de seleccionar la uva en función de su densidad, o en función de la parte del racimo de la que procede, aunque este tipo de prácticas no se han instalado en las bodegas. Considerando la idea generalizada que las mejores variedades de uva para la vinificación son aquellas que tienen un tamaño de grano pequeño (puesto que ello incrementa la proporción pieles/pulpa y, por lo tanto la proporción sólido/líquido durante la maceración), en el ensayo del capítulo IV se planteó la idea de seleccionar la uva en función de su diámetro y vinificar cada tamaño por separado, con el fin de evaluar si la selección de la uva por tamaño de grano puede resultar una técnica interesante para su futura aplicación en bodega. Los resultados significativos de dicho ensayo, en el que se aporta una descripción completa de la composición fenólica del vino, resultan un buen punto de partida para plantear la perspectiva de la aplicación de la selección de la uva mediante el tamaño de baya a escala industrial.

Así pues, de acuerdo con los resultados presentados en esta memoria, se ha confirmado la hipótesis planteada, ya que se ha podido observar la gran influencia que la madurez de la uva ejerce sobre la composición química del vino, y que se pueden utilizar distintas técnicas vitivinícolas como herramientas para modular la composición química del vino en aquellos compuestos de interés enológico responsables de atributos tan importantes como el color, el amargor y la astringencia del vino tinto.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

5. CONCLUSIONES GENERALES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

Considerando los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. La madurez de la uva condiciona la composición química del vino tinto. Los vinos elaborados con uva madura muestran, en general, una mayor intensidad del color y una mayor concentración de polisacáridos de origen vegetal, antocianos y proantocianidinas. Asimismo, las proantocianidinas de los vinos procedentes de uvas más maduras presentan un mayor grado medio de polimerización, una mayor proporción de prodelfinidinas y un menor porcentaje de galoilización. Estos datos sugieren que las uvas de mayor madurez aportan una mayor proporción de taninos de piel y una menor proporción de taninos de semilla.
2. Mediante el control del tiempo de maceración se puede modular la composición química del vino. Al aumentar el tiempo de maceración decrecen la intensidad del color y la concentración de antocianos, mientras que se incrementan la concentración de polisacáridos y proantocianidinas. Por otra parte al aumentar el tiempo de maceración se disminuye el grado medio de polimerización de las proantocianidinas y la proporción de prodelfinidinas mientras que aumenta el porcentaje de galoilización. Estos datos confirman que los taninos de la piel se liberan rápidamente y que al alargar la maceración se favorece la extracción de taninos de semilla.
3. Las técnicas de aclareo de racimos y aclareo de bayas permiten que las uvas alcancen un mayor nivel de madurez, incrementando el contenido de compuestos fenólicos y polisacáridos del vino final. Las dos técnicas de aclareo aplicadas parecen ser útiles para mejorar la calidad del vino, aunque el aclareo de bayas lo consigue con un rendimiento superior al del aclareo de racimos, lo que supone un beneficio económico para la bodega puesto que la disminución de la producción es mucho menor.

CONCLUSIONES GENERALES

4. La desalcoholización parcial de vinos tintos mediante ósmosis inversa permite reducir el contenido alcohólico de vinos con un grado alcohólico excesivo sin alterar significativamente la intensidad de color ni la concentración de antocianos, proantocianidinas y polisacáridos.
5. El tamaño del grano de uva ejerce una gran influencia en la composición del vino debido a que las bayas pequeñas presentan un menor número de semillas y una mayor relación entre la *superficie de piel* y el *volumen de baya*. Los vinos elaborados con bayas de tamaño pequeño presentan una mayor intensidad de color y, en general, una mayor concentración en compuestos fenólicos. Además, los taninos liberados por las bayas pequeñas presentan una mayor proporción de prodelphinidinas y un menor porcentaje de galoilización lo que confirma una mayor proporción de tanino de piel.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS
Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO
Mariona Gil Cortiella
Dipòsit Legal: T.183-2014

La madurez de la uva ejerce una gran influencia sobre la composición química del vino tinto, lo que a su vez condiciona severamente propiedades organolépticas como el color, la astringencia y el amargor. La enorme heterogeneidad de la uva, así como la variabilidad de los factores que condicionan el proceso de maduración y que pueden conducir a una madurez inadecuada, van en detrimento de la calidad de los vinos tintos de alta gama. Con el fin de paliar los efectos de dicha madurez inadecuada, se ha ensayado el potencial de ciertas técnicas vitivinícolas para incidir positivamente en la composición química del vino tinto. Las cuatro prácticas vitivinícolas testadas durante la elaboración de esta tesis doctoral (control del tiempo de maceración, aclareo de frutos, desalcoholización parcial y selección de bayas en función de su tamaño) se han revelado como herramientas eficaces para modular la composición química del vino tinto en compuestos fenólicos y polisacáridos, mejorando así atributos sensoriales tan importantes como el color, la astringencia y el amargor del vino.





INFLUENCIA DE LA MADUREZ DE LA UVA Y DE CIERTAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS SOBRE EL COLOR, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LOS POLISACÁRIDOS DEL VINO TINTO

Mariona Gil Cortiella

Dipòsit Legal: T.183-2014

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.