

**TÍTULO DEL PROYECTO:** INNOVACIONES EN EL ESTUDIO DE LA ASTRINGENCIA DEL VINO RELACIONADAS CON LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS, LA COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS TANINOS, Y LOS POLISACÁRIDOS

**Entidades participantes:** Universidad Rovira i Virgili (URV), Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM), Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha (IVICAM)

**Investigador Coordinador (OPI al que pertenece):** Fernando Zamora Marín (URV)

**TÍTULO DEL SUBPROYECTO PARTICIPADO POR EL IRIAF:** Innovaciones en el estudio de la astringencia del vino relacionadas con los métodos de análisis, la composición y estructura de los taninos, y los polisacáridos - B

**Organismo Financiador:** Ministerio de Economía, Industria y Competitividad

**Duración:** desde: 2015 hasta: 2017

**Nº de Proyecto:** AGL2014-56594-C2-2-R

**Financiación:** Subproyecto IRIAF: 78.650 €

#### PERSONAL INVESTIGADOR DEL SUBPROYECTO PARTICIPADO POR EL IRIAF:

EQUIPO PARTICIPANTE	SITUACIÓN ADMINIST. (*)	DEDICACIÓN (UNICA O COMPARTIDA)	CENTRO
<b>INVESTIGADOR PRINCIPAL:</b> Isidro Hermosín Gutiérrez	Funcionario	Única	UCLM
<b>PERSONAL INVESTIGADOR:</b> Sergio Gómez Alonso	Contratado temporal	Compartida	UCLM
José María Alía Robledo	Funcionario	Compartida	UCLM
Francisco Javier López-Bellido Garrido		Compartida	UCLM
Esteban García Romero	Funcionario	Compartida	IVICAM

(\*) Funcionario, Contratado o Becario. (En el caso de Contratado o Becario, indicar la duración del Contrato o Beca)

#### OBJETIVOS

La estimación objetiva de la astringencia se realiza usualmente mediante degustación. No obstante, la percepción de la astringencia varía entre individuos, y al ser una sensación acumulativa, su apreciación objetiva es muy complicada. Por ello es necesario disponer de catadores expertos y planificar protocolos de degustación muy rigurosos. Aun así, los resultados están siempre sujetos a un cierto grado de subjetividad lo que dificulta mucho la obtención de conclusiones sólidas.

Se deduce por tanto la necesidad de disponer de métodos objetivos para medir la astringencia del vino de forma precisa y reproducible. Se han descrito numerosas metodologías para su

determinación que en ocasiones generan discrepancias entre los resultados analíticos y los sensoriales, lo que dificulta enormemente la obtención de conclusiones válidas. Un posible motivo de estas discrepancias sería que todos estos métodos se fundamentan en las interacciones entre proteínas y sustancias astringentes en medios muy diferentes a la cavidad bucal. Por otra parte, la mayor parte de estos métodos requiere cantidades de muestra relativamente altas, lo que complica el estudio de interacción entre ciertos compuestos fenólicos de difícil disposición y las proteínas de la saliva. Todo ello hace inabordable el estudio de las interacciones entre las proteínas salivares y muchas sustancias astringentes.

Por todo ello continúa siendo necesario el desarrollo de métodos cuantitativos para el análisis de la astringencia que reflejen mejor lo que ocurre en la cavidad bucal y que permitan trabajar con cantidades de muestra mucho más pequeñas.

Este proyecto se plantea en primer lugar desarrollar técnicas analíticas novedosas para mejorar la medida de la astringencia y luego emplear dichas técnicas para evaluar cómo afecta la composición y estructura de los taninos, así como otros componentes de la matriz vínica, especialmente los polisacáridos, a la astringencia del vino. Para ello se pretende desarrollar las posibilidades de la microscopía de fuerzas atómicas (Atomic Force Microscopy – AFM) y de la resonancia en superficie de plasmones (Surface Plasmon Resonance – SPR). Ambas técnicas determinan la topografía de una superficie y también su grosor a la escala de nanómetros. La idea sería por tanto fijar sobre una superficie adecuada proteínas salivares o mucina para luego hacer reaccionar con diversas sustancias astringentes e incluso con vinos. El incremento del grosor, su distribución topográfica y las constantes de afinidad serían los índices que deberían poder relacionarse con la astringencia determinada por un panel de cata entrenado. Al trabajar sobre una superficie y no en disolución, estas técnicas deberían reproducir mejor, en teoría, lo que ocurre en la cavidad bucal y por tanto aproximarse más a la realidad. Además, ambas técnicas permiten trabajar con cantidad muy pequeñas de muestra. Esto facilitaría, una vez validadas las metodologías, el estudio de las interacciones entre compuestos fenólicos de los que difícilmente se dispone de cantidades apreciables y las proteínas de la saliva.

De forma paralela el presente proyecto se plantea también el desarrollo de procedimientos de purificación de taninos de semillas y pieles de uva de diferente grado de polimerización, así como de polisacáridos de la piel de la uva para evaluar su influencia sobre el color, la astringencia y la calidad global del vino para su posible utilización más específica como aditivos en enología.

## Objetivos específicos

1. Desarrollo de nuevas metodologías para la determinación de la astringencia basadas en la reactividad de los taninos con las proteínas de la saliva y con mucina comercial y la posterior determinación de la intensidad de dicha interacción mediante dos técnicas alternativas: microscopio de fuerzas atómicas (Atomic Force Microscope – AFM) y la resonancia en superficie de plasmones (Surface Plasmon Resonance – SPR). Ambas tecnologías permiten determinar la topografía de una superficie (y por tanto su grosor) a la escala de nanómetros. La idea sería por tanto fijar sobre una superficie adecuada proteínas de la saliva o mucina para luego hacerlas reaccionar con diversos taninos e incluso con vinos. La determinación posterior del incremento del grosor así como su

distribución topográfica sería el índice que debería poder relacionarse con la astringencia determinada por un panel de cata entrenado.

2. Desarrollar procedimientos de aislamiento y purificación de taninos de semillas y pieles de uva con diferente grado de polimerización. Este objetivo se desarrollaría primero a escala de laboratorio y posteriormente a escala industrial. Para ello se cuenta con la colaboración de la empresa OUTPUT TRADE SL que proporcionaría tanto semillas como pieles secadas industrialmente, así como sus instalaciones para el desarrollo industrial del procedimiento. Naturalmente, los diferentes taninos serían caracterizados químicamente y también se determinaría su astringencia mediante las técnicas analíticas mencionadas en el objetivo 1. Los resultados obtenidos se compararían con algunos de los taninos comerciales.

3. Desarrollar procedimientos de aislamiento y purificación de polisacáridos de piel de uva. Este objetivo se desarrollaría en paralelo con el objetivo 2 y en colaboración con la empresa OUTPUT TRADE SL que proporcionaría las pieles de uva secadas industrialmente, así como sus instalaciones para el desarrollo industrial del procedimiento. Los polisacáridos obtenidos serían caracterizados químicamente y también de forma sensorial mediante adiciones estándar a soluciones modelo y a vinos. De forma paralela se realizaría pruebas similares con polisacáridos comerciales procedentes de levaduras.

4. Realización de microvinificaciones con adiciones controladas de los diferentes taninos obtenidos de acuerdo con el objetivo 2 y polisacáridos obtenidos de acuerdo con el objetivo 3. Las adiciones se realizarían con uvas de diferente potencialidad fenólica justo al inicio de las vinificaciones y también en vinos de diferente contenido fenólico en diversos momentos de la vinificación (antes de la fermentación maloláctica, después de la fermentación maloláctica). También se emplearían taninos y polisacáridos comerciales a fin de comparar su eficacia con la de los productos desarrollados. Estas pruebas se realizarían inicialmente en pequeño volumen y una vez seleccionados las condiciones más adecuadas (tipo de tanino, tipo de polisacárido, dosis) se plantearía la realización de ensayos a escala real de bodega tanto en vinificación como en crianza en barrica.

## RESULTADOS FINALES

El principal avance de este proyecto ha sido el desarrollo de una metodología basada en la resonancia en superficie de plasmones (Surface Plasmon Resonance - SPR) para el estudio de las interacciones entre la proteína más abundante en la saliva, la mucina, y los diferentes tipos de taninos (proantocianidinas, galtaninos y elagitaninos). La aplicación de esta técnica, así como el desarrollo y aplicación de técnicas analíticas más precisas de los diversos taninos, ha permitido determinar las constantes de asociación y disociación cinéticas y termodinámicas entre los diferentes taninos y la mucina, así como establecer que existe una correlación altamente significativa entre la astringencia sensorial y analítica (índice de ovoalbúmina) con las constantes de disociación cinética y termodinámica. Estos resultados abren la posibilidad de aplicar esta técnica al estudio destinado a determinar cuáles son los principales compuestos que condicionan la astringencia de los vinos tintos (y otros alimentos) y a utilizar dicho conocimiento para mejorar los procesos de elaboración.

De forma paralela se ha desarrollado procedimientos de aislamiento y purificación de taninos de semillas y de pieles de uva, así como de polisacáridos de pieles de uva lo que permitiría disponer de procedimientos para la producción de estos compuestos que podrían utilizarse como aditivos en los

procesos de vinificación. En ese sentido se han desarrollado también microvinificaciones microvinificaciones con adiciones controladas de diferentes taninos, tanto comerciales como obtenidos mediante los procedimientos desarrollados en este proyecto. También se han realizado microvinificaciones con adiciones de polisacáridos procedentes de derivados de levadura así como los extraídos de las pieles de la uva. Los vinos obtenidos fueron analizados y se verificó que la adición de taninos mejoraba la concentración fenólica de los vinos, y en ocasiones de su color, y que la adición de polisacáridos permitía suavizar ligeramente la astringencia de los vinos.

## Objetivo 1.

Los esfuerzos dentro de este objetivo 1 se han centrado en la aplicación de la Resonancia en Superficie de Plasmones (SPR) a la determinación de las interacciones entre proteínas salivares y taninos. Se ha conseguido fijar covalentemente mucina a la superficie de medida y se ha conseguido medir con éxito la interacción con proantocianidinas de semilla de uva, con galotaninos y con elagitaninos. Se ha corroborado que existe una relación lineal entre la señal SPR y la concentración de los diferentes taninos. Se han determinado las constantes de asociación y disociación cinéticas y termodinámicas entre los diferentes taninos y a la mucina. Se ha establecido que existe una correlación altamente significativa entre la astringencia sensorial y analítica (índice de ovoalbúmina) y las constantes de disociación cinéticas y termodinámicas.

En principio, la interacción de estos taninos con la mucina, fijada covalentemente en el equipo SPR, debe estar directamente relacionada con la composición cuantitativa y cualitativa de éstos. La capacidad astringente está en principio relacionada con el contenido y tipo de taninos (condensados o proantocianidinas; hidrolizables, de tipo elagitanino o/y galotanino) presentes, pero podría verse afectada por la presencia de otros compuestos de naturaleza fenólica distinta.

Se ha estudiado la medida de astringencia mediante resonancia en superficie de plasmones (SPR) con diversos tipos de taninos comerciales: proantocianidinas (de semilla y de piel de uva), profisetinidinas (de quebracho) elagitaninos (de roble), galotaninos (de agallas de roble).

En principio, la interacción de estos taninos con la mucina, fijada covalentemente en el equipo SPR, esta directamente relacionada con la composición cuantitativa y cualitativa de éstos. La capacidad astringente está en principio relacionada con el contenido y tipo de taninos (condensados o proantocianidinas; hidrolizables, de tipo elagitanino o/y galotanino) presentes, pero podría verse afectada por la presencia de otros compuestos de naturaleza fenólica distinta.

Todos los taninos comerciales se han analizando para conocer su composición en: flavan-3-oles monómeros y dímeros; el contenido total en proantocianidinas y sus principales características estructurales (grado medio de polimerización, mDP; % de galoilación, %Gal; y % de prodelfinidinas, %Prodef); contenido en taninos hidrolizables (elagitaninos y galotaninos); y contenido en compuestos fenólicos de bajo peso molecular (flavonoles, derivados hidroxicinámicos,...).

## Objetivo 2.

Se ha conseguido extraer procianidinas de semilla de uva con diferente mDP y %Gal

Se ha conseguido extraer proantocianidinas (procianidinas y prodelfinidinas) de piel de uva con diferente mDP y %Gal

De forma similar a lo realizado con los taninos comerciales en el objetivo anterior, los taninos condensados (o proantocianidinas) extraídos de la piel y la semilla de uva se ha analizado de forma detallada su composición fenólica: flavan-3-oles monómeros y dímeros; el contenido total en proantocianidinas y sus principales características estructurales (grado medio de polimerización, % de galoilación y % de prodelfinidinas); contenido en compuestos fenólicos de bajo peso molecular (flavonoles, derivados hidroxicinámicos,...).

El conocimiento más detallado de la composición fenólica de estos taninos condensado nos permitirá establecer qué características estructurales de las proantocianidinas están más relacionadas con su interacción con la mucina en el equipo SPR, así como si existe algún tipo de interferencia en dicha interacción debida a la presencia de otros compuestos fenólicos. En ese sentido, se han desarrollado dos nuevas metodologías LC-MS para conocer de forma más detallada:

Galotaninos: se ha puesto a punto un método por HPLC-DAD-ESI-Q-ToF, cuya aplicación ha permitido incluir en uno de los artículos en que enviados y en revisión.

Flavan-3-oles de acuerdo a su grado de polimerización: empleando cromatografía en fase normal con una columna Diol y detección por fluorescencia. Para el desarrollo nos basamos en un método usado para analizar flavan-3-oles de cacao. El método da buenos resultados para el análisis de los flavan-3-oles de las semillas, pero en el caso de los hollejos no funciona tan bien porque su composición es más compleja. Se confirmado el grado de polimerización de los compuestos que eluyen en cada pico empleando el QToF.

### Objetivo 3.

Se ha realizado extracciones de polisacáridos de piel de uva mediante maceraciones a diferentes concentraciones de etanol y a diferentes temperaturas. Se ha realizado en análisis de los polisacáridos obtenidos

### Objetivo 4.

Se han realizado diversas microvinificaciones durante las vendimias 2015, 2016 y 2017 con suplementaciones de diferentes taninos y polisacáridos comerciales (derivados de levadura) y con los aislados y purificados en este proyecto. Mayoritariamente las microvinificaciones se realizaron en tinto pero también se realizaron algunos ensayos en blanco y en rosado.

Se han realizado una experiencia con 4 variedades tintas (Garnacha, Tempranillo, Cabernet sauvignon y Merlot), a tres niveles de madurez para de este modo determinar específicamente que aportan semillas y raspones tanto a la composición química del vino como a su astringencia.

Para todas estas actividades, la tarea asignada a este subproyecto es la determinación de la composición fenólica detallada de los vinos elaborados, para así poder evaluar el impacto de la adición de taninos o/y polisacáridos en las diferentes condiciones planteadas.

El análisis, comprende las siguientes familias de compuestos fenólicos: antocianos libres (nativos de la uva); pigmentos antociánicos (aductos flavan-3-ol con antocianos, piranoantocianos); flavonoles;

derivados hidroxicinámicos; Estilbenos; flavan-3-oles monómeros y dímeros; proantocianidinas totales y características estructurales de éstas (mDP, %Gal y %Prodef).

## FORMACIÓN DE PERSONAL EN RELACIÓN AL PROYECTO.

En caso de tesis doctorales indicar para cada una de ellas: título, nombre del doctorando, director de tesis, universidad y facultad o escuela, fechas de comienzo y de lectura, y calificación obtenida.

**Nombre:** María Navarro Fernández

**Director:** Fernando Zamora, Juan Miguel Canals e Isidro Hermosín

**Título:** Influencia de la especie botánica, del grado de tostado y del uso de las barricas de roble sobre los elagitaninos; Consecuencias enológicas y sensoriales

**Organismo:** Universidad Rovira i Virgili

**Año de lectura:** 2017

**Nombre:** Jordi Gombau

**Director:** Fernando Zamora, Juan Miguel Canals e Isidro Hermosín

**Título:** Aplicación de la resonancia en superficie de plasmones a la determinación de las interacciones entre mucina y taninos.

**Organismo:** Universidad Rovira i Virgili

**En desarrollo**

## INFORMACIÓN CIENTÍFICA Y TÉCNICA PROPORCIONADA POR EL PROYECTO.

Artículos científicos y divulgativos, patentes, capítulos de libros, trabajos presentados a congresos, otros trabajos de difusión

### Artículos científicos.

Navarro, M., Kontoudakis, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J.M., Hermosín-Gutiérrez, I., Zamora, F. (2018) Influence of the volatile substances released by oak barrels into a Cabernet Sauvignon red wine and a discolored Macabeo white wine on sensory appreciation by a trained panel. *European Food Research and Technology*, 244, 245-258.

Pascual, O., Vignault, A., Gombau, J., Navarro, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J.M., Hermosín-Gutiérrez, I., Teissedre, P.L., Zamora, F. (2017) Oxygen consumption rates by different oenological tannins in a model wine solution. *Food Chemistry*, 234, 26-32.

Navarro, M., Kontoudakis, N., Canals, J.M., García-Romero, E., Gómez-Alonso, S., Zamora, F., Hermosín-Gutiérrez, I., (2017) Improved method for the extraction and chromatographic analysis on fused-core columns of occurring ellagitannins in oak-aged wine. *Food Chemistry*, 226, 23–31

Pascual, O., Ortiz, J., Roel, M., Kontoudakis, N., Gil, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J.M., Hermosín-Gutiérrez, I., Zamora, F. (2016) Influence of grape maturity and prefermentative cluster treatment of the Grenache cultivar on wine composition and quality. *Oeno One*, 50, 169-181

Navarro, M., Kontoudakis, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J.M., Hermosín-Gutiérrez, I., Zamora, F. (2016) Influence of the botanical origin and toasting level on the ellagitannin content of wines aged in new and used oak barrels. *Food Research International*, 87, 197–203

Pascual, O., González-Royo, E., Gil, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J.M., Hermosín-Gutiérrez, I., Zamora, F. (2016) Influence of grape seeds and stems on wine composition and astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 6555–6566

Navarro, M., Kontoudakis, N., Giordanengo, T., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Fort, F., Canals, J.M., Hermosín-Gutiérrez, I., Zamora, F. (2016) Oxygen consumption by oak chips in a model wine solution; Influence of the botanical origin, toast level and ellagitannin content. *Food Chemistry*, 199, 822–827.

### Divulgativos.

Navarro, M., Kontoudakis, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J.M., Hermosín-Gutiérrez, I., Zamora, F. (2016) Comparison between the contribution of ellagitannins of new oak barrels and one-year-used barrels. *BIO Web of Conferences* 7, 02016 (2016) DOI: 10.1051/bioconf/20160702016

### Congresos.

Nombre del congreso/conferencia/ workshop: Gienol 2015, Tarragona

Tipo de comunicación: Poster

Autores\*: Pascual, O., Medina, L., Fort, F., Canals, J.M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I., Zamora, F.

Año: 2015

Nombre del congreso/conferencia/workshop: 9° SYMPOSIUM IN VINO ANALYTICA SCIENTIA – IVAS2015, Trento (Italia)

Tipo de comunicación: Poster

Autores\*: Pascual, O., Medina, L., Gil, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J.M., Hermosín-Gutiérrez, I., Zamora, F.

Año: 2015

Nombre del congreso/conferencia/workshop: 9° SYMPOSIUM IN VINO ANALYTICA SCIENTIA – IVAS2015, Trento (Italia)

Tipo de comunicación: Poster

Autores\*: Navarro, M., Kountoudakis, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J.M., Hermosín-Gutiérrez, I., Zamora, F.

Año: 2015

Nombre del congreso/conferencia/workshop: 9º SYMPOSIUM IN VINO ANALYTICA SCIENTIA – IVAS2015, Trento (Italia)

Tipo de comunicación: Poster

Autores\*: Navarro, M., Canals, J.M., García-Romero, E., Gómez-Alonso, S., Zamora, F., Hermosín-Gutiérrez, I.

Año: 2015

Nombre del congreso/conferencia/workshop: Macrowine 2016. Changins (Suiza)

Tipo de comunicación: Poster

Autores\*: Zamora, F., Pascual, O., Gombau, J., Navarro, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Fort, F., Canals, J.M., Hermosín-Gutiérrez, I.

Año: 2016

Nombre del congreso/conferencia/workshop: Macrowine 2016. Changins (Suiza)

Tipo de comunicación: Poster

Autores\*: Zamora, F., Pascual, O., Gombau, J., Navarro, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Fort, F., Canals, J.M., Hermosín-Gutiérrez, I.

Año: 2016

Nombre del congreso/conferencia/workshop: 39 Congreso Mundial de la Viña y el Vino (OIV)

Tipo de comunicación: Comunicación oral

Autores\*: Navarro, M., Kontoudakis, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J.M., Hermosín-Gutiérrez, I., Zamora, F.

Año: 2016

Nombre del congreso/conferencia/workshop: 10th In Vino Analytica Scientia Symposium. Salamanca (España)

Tipo de comunicación: Poster

Autores\*: Gombau, J., Pascual, O., Vignaut, A., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I., Canals, J.M., Teissedre, P.L., Zamora, F.

Año: 2017

Nombre del congreso/conferencia/workshop: 10th In Vino Analytica Scientia Symposium. Salamanca (España)

Tipo de comunicación: Poster

Autores\*: Gombau, J., Nadal, P., Canela, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I., Canals, J.M., Teissedre, P.L., Zamora, F.

Año: 2017