



Universitat Rovira i Virgili
FACULTAT D'ENOLOGIA
Departament de Bioquímica i Biotecnologia



**COMPOSICIÓ FENÒLICA
EN VARIETATS NEGRES
DE
VITIS VINIFERA.
INFLUÈNCIA DE DIFERENTS
FACTORS**

Josep Valls Fonayet

TESI DOCTORAL, 2004

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA
FACULTAT D'ENOLOGIA

COMPOSICIÓ FENÒLICA
EN VARIETATS NEGRES DE *VITIS VINIFERA*.
ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA
DE DIFERENTS FACTORS

Memòria presentada per
Josep Valls Fonayet
Per optar al grau de Doctor en Bioquímica
Tarragona, 2004

*Als meus pares,
i a la memòria de la meva àvia*



**UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI**

La sotasignant, Montse
Biologia Vegetal, adscrita a
Universitat Rovira i Virgili,

Dept. Bioquímica i Biotecnologia
FACULTAT d'ENOLOGIA DE TARRAGONA
Av Ramón y Cajal, 70
43005- Tarragona
Tel. 977 250355
E-mail: mnrj@astor.urv.es

tular de l'àrea de
tecnologia de la

FA CONSTAR

Que el present treball, amb títol “Composició fenòlica en varietats negres de *Vitis vinifera*. Estudi de la influència de diferents factors”, que presenta en Josep Valls Fonayet, per optar al grau de Doctor en Bioquímica per la Universitat Rovira i Virgili, ha estat realitzat sota les meves direccions, i que tots els resultats obtinguts són fruit dels experiments duts a terme per l'esmentat doctorand.

I perquè se'n prengui coneixement i tingui els efectes que correspongui, signa aquesta certificació.

Dra. Montse Nadal Roquet-Jalmar

Tarragona, 20 de gener de 2004

AGRAÏ MENTS

Here comes the sun.

Això sembla que s'acaba. Per fi. Als membres de l'àrea de Biologia Vegetal, grup minoritzat, però que quan ens hi posem.... Desitjo agrair a la Montse la confiança que ha dipositat en mi des del primer dia fins al darrer, i que m'hagi recolzat en tot moment en les meves iniciatives i defensat

amb vehemència quan ha fet falta. A la sister Miriam, que va ser la pionera, li agraeixo que hagi acceptat ser membre del tribunal, tota l'ajuda que m'ha prestat en la discussió de resultats quan jo no hi veia clar i, sobretot, l'amistat que m'ha demostrat tan sovint durant tots aquests anys. A la Sumpta, li agraeixo la seva efervescència, i tots els estius que m'ha ajudat a conquerir els congeladors de la Facultat. A Marta, que viniste a dar un empujón y porque durante un tiempo fuimos los amos. A la Francesca, perquè sempre m'ha tingut en consideració. I a tants d'altres que han vingut a col.laborar durant tots aquests estius.

A tots els membres del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la URV, i especialment al Dr Nicolas Rozès, per preocupar-se desinteressadament del meu demà i involucrar-s'hi. Pel mateix motiu, al Dr. Gerard Pujadas. A la Dra Montse Poblet li agraeixo la seva accessibilitat i els seus ànims. Al Dr Fernando Zamora, tot i que no sigui de Reus, per l'enfoc i les correccions del bloc 2. Al Dr Joami Canals, pels mapes de la finca, que em va prestar amb tanta celeritat, i pel tracte del dia a dia. A la Dra Isa Baiges, per tota l'ajuda amb els temes de Biologia Molecular i de laboratori (i pels kuchen). A la Mireia i la Cristina, per tanta tinta tunta. I al Santiago Moreno, perquè li demanem de tot i ell sempre respon.

A tot el personal de la Facultat d'Enologia. A l'Elena, per tantes nits sortint tard; al Joan, sempre atent amb el fax i el menjador, i a l'altre Joan, que no me n'oblido. A la Tere i la Maria, por su trato afable todos estos años. A la gent de la Biblioteca, especialment a la Inma, que aquests darrers mesos s'ha hagut de regirar tots els armaris, gràcies per la paciència i l'eficiència; i a la Xose, que sempre m'ha aconseguit el que necessitava; i a tots els altres, que han hagut de jugar-se el físic per arribar a segons quins articles. I a la Marisol, el Rafael, el Jordi i l'Àngel, per tractar tan bé el noi aquell que estàen hores intempestives a Enologia.

Al Pepe Escalona i al Dr Hipólito Medrano, per les atencions prestades en la meua breu estança a Mallorca. Y a la Dra Puri Fernández, Rubén Saenz y, muy especialmente, a Ernesto Garrido, por toda la ayuda y atención con el HPLC-MS en La Rioja.

I a la cara B, com no, als doctorands, per tot el vostre suport, sobretot en aquest final boig. Comencem per la vella guàrdia – sí, nois, tots tenim una edat. De nou a la Miriam. Al Pep Llauradó, un Peppouet de ciència i de camaraderia, sempre disposat a donar un cop de mà i preocupar-se de servir; al Ramon (hooombre), per la paciència que té quan un es posa mordaç; a la Judit, que ofereix la seva amistat marçalenca; a la Cristina, que o m'afanyo o ja haurà acabat de fer les Amèriques; a la Marta, que al principi és la que em va integrar al cotarro, i a la Blanca, oink...

Las tres ángeles. A la Maite, que em va assessorar per tirar endavant el capítol 3, per tot el seu proï sme, i per tantes i tantes coses més. Limpié la poyata, pero hay okupas. Como las balas... A Chus, porque es el modelo a seguir de rigor científico, de buena compañera y de esponja. A la Gemma, per totes les coses bones que té, que són moltes (però que no inclouen la tria cinematogràfica, sens dubte).

Al Ton, pel pacte i per saber sobreviure en un món de taurons...A Àngel, aunque ... las menos, por las conversaciones, la ayuda con la redacción, y por saber cuándo uno necesita ánimos. A Rosana, por todo el apoyo que me ha ido brindando con B en esta etapa final, y por sus

aportaciones con la PCR cuantitativa. A la Núria, per tot LO bon rotllo que desprèn, encara que qui em cau realment bé és..... A Carmen, sirena cubana que fue en busca del artículo perdido. A la Roser, per oferir-me ajuda bibliogràfica, bons aliments... i els massatges!! A la Mireia, que sap que la vida és aigua. I als de la Facultat gran... I a tots els antics. I a tots els nous (Eli, Víctor, Marian, Yunuen, Javier, Loubna, Salvador)... ni se us ocorreixi llençar-me les mostres!!!!

Als companys d'Analítica, especialment a la Pili, que amb tota dedicació m'ha fet piruetejar en l'anàlisi de components principals. A la Montse Mestres, que deu estar al caure. Al Marc, que ja ha caigut. I a la resta de noies (bé, i també algun noi) que s'han deixat caure per allà

Igualment, als meus amics dels altres límits. Al Txiki, que se vino una vez a traerme el método de la vainillina, y desde entonces ha ido acudiendo puntualmente, gracias por contarme tantas cosas y contar conmigo, y suerte en esta nueva etapa. A l'Eva, per tots aquells anys dinant junts, i perquè, malgrat la internacionalització, sempre sap quan és 19, i al Fernando, encara que treballa massa. A la Mònica i el Francesc, perquè sempre s'ofereixen i perquè ens entenem i riem la mar de bé. Igual que la Coia, que a més va tenir la consideració de no fer-se professora (uuffff). Si fa no fa com l'Alexis, el puigpelatí més trempat que conec. A la Núria i el Xavier, i l'Oriol, la Maria Pilar i l'Anna, una gran família en què sempre em trobo ben acollit. A Inma y Santi, que ya llevan un timepo doctoreando. I a la Coia i l'Elena, que ja les veig massa poc. A veure si quedem, que no és només culpa meva. A Carmen, Isabel, Inma, Joan, und so weiter. I al Marià que per culpa d'aquesta tesi fa temps que tinc abandonat....

Al Francesc, tot i que es treurà el carnet abans que jo. A la Núria, que tanta companyia em fa i tant m'ha ajudat en aquests anys sota el mateix sostre, i que m'ha aportat suport informàtic i logístic. Moltes gràcies. I sobretot, als meus pares, que són els qui més han patit per aquesta tesi, gràcies per tanta profusió d'estima, per permetre'm fer-ho a la meua manera, i per tot, tot i tot. Només perquè la tingueu en les vostres mans, ja ha valgut la pena.

I bé, si m'he oblidat d'algú...disculpeu, però tranquils... véu a saber, potser aquesta tampoc és encara la definitiva.... ;:-)

ÍNDIX

Justificació i objectius	1
--------------------------------	---

BLOC I: COMPOSICIÓ FENÒLICA EN RAÏM **7**

Introducció general.....	9
1. Els compostos fenòlics	11
2. Bioquímica de maduració del raï m	17
Referències bibliogràfiques	29
Disseny de camp.....	35

Capítol 1: Composició antociànica en les pells **39**

1.1. Introducció	41
1.1.1. Estructura química.....	42
1.1.2. Perfil d'antocians en <i>Vitis</i>	43
1.1.3. Evolució dels antocians al llarg de la maduració.....	46
1.2. Objectius.....	48
1.3. Metodologia.....	49
1.4. Resultats i discussió.....	54
1.4.1. Perfil antociànic de diferents varietats en el moment de la collita	54
1.4.2. Antocians en data de verema i relació amb la mida de la baia.....	60
1.4.3. Antocians individuals en data de collita segons l'anyada.....	63
1.4.4. Evolució dels antocians durant la maduració.....	66
1.4.5. Variacions dels antocians individuals al llarg de la maduració.....	74
1.4.6. Efecte del reg en el contingut i natura dels antocians d'ull de llebre i cabernet ...	77
1.4.6.1. Irrigació i anyada.....	77
1.4.6.2. Irrigació i varietat	86
1.4.6.3. Efectes de la irrigació sobre els antocians individuals.....	91
1.5. Conclusions.....	93
1.6. Referències bibliogràfiques.....	94

Capítol 2: Catequines i proantocianidines en pinyols **101**

2.1. Introducció	103
2.1.1. Estructura química	103
2.1.2. Localització i evolució durant la maduració	105
2.1.3. Propietats que confereixen als vins	107
2.2. Objectius	108
2.3. Materials i mètodes	109
2.3.1. Reacció amb aldehids	110
2.3.1.1. Assaigs colorimètrics: vainillina i DMACH	110
2.3.1.2. Anàlisi de catequines mitjançant cromatografia en capa fina	111
2.3.2. Anàlisi de catequines per HPLC	113
2.3.3. Estimació del grau de polimerització mitjà per determinació dels productes de trencament	115
2.4. Resultats i discussió	118
2.4.1. Anàlisi del contingut en catequines dels pinyols de les diferents varietats	118
2.4.2. Procianidines oligòmeres per HPLC	121
2.4.2.1. Comparació situacions reg i no reg	132
2.4.3. Determinació dels graus de polimerització	135
2.5. Conclusions	141
2.6. Referències bibliogràfiques	142

BLOC II: COMPOSICIÓ FENÒLICA EN VI **147**

Capítol 3: Extracció dels antocians al llarg de la maceració **151**

3.1. Introducció	153
3.1.1. Difusió dels compostos fenòlic al most	154
3.1.2. Procés de maceració en negres	156
3.2. Objectius	159
3.3. Materials i mètodes	160
3.4. Resultats i discussió	160
3.4.1. Discussió general	166
3.4.1.1. Evolució de l'extracció	166
3.4.1.2. Capacitat extractiva segons les varietats	167
3.4.1.3. Extractabilitat segons la natura química	169
3.5. Conclusions	171
3.6. Referències bibliogràfiques	172

Capítol 4: Efecte de la composició fenòlica **i la seva evolució sobre el color del vi** **175**

4.1. Introducció	177
4.1.1. Efecte del pH	177
4.1.2. Efecte del sulfurós	178
4.1.3. Fenòmens de copigmentació	178
4.1.4. Reaccions de condensació	181
4.1.4.1. Condensació directa entre antocians i flavanols	182
4.1.4.2. Condensacions mitjançades per acetaldehid	184
4.1.5. Condensacions mitjançades per àcid pirúvic o àcids fenòls: Formació de vitisines o piranoantocians	186
4.2. Objectius	188
4.3. Materials i mètodes	189
4.4. Resultats i discussió	192
4.4.1. Reaccions de condensació mitjançades per acetaldehid en solucions model	192
4.4.1.b. Determinació de les constants de velocitat	195
4.4.2. Reaccions de condensació mitjançades per acetaldehid en vins monovarietals	199
4.4.3. Fenòmens de copigmentació en solucions model	202
4.5. Conclusions	206
4.6. Referències bibliogràfiques	207

BLOC III: SÍNTESI D'ANTOCIANS EN CULTIUS IN VITRO **211**

Introducció general	213
Materials i mètodes	218
Referències bibliogràfiques	220

Capítol 5: Influència de diferents factors en la síntesi d'antocians **en cultius *in vitro*** **221**

5.1. Introducció	223
5.2. Objectius	226
5.3. Materials i mètodes	226
5.4. Resultats i discussió	227
I. Factors que influeixen en la síntesi d'antocians totals	227
5.4.1 Efecte de l'estrès osmòtic	227
5.4.2. Efectes de l'estrès nitrogenat	232
5.4.3. Efecte del pH	236
5.4.4. Efecte de l'inòcul	242
5.4.5. Efecte de la font de carboni	245
II. Determinació dels antocians individuals	252

5.4.6. Efectes dels estressos.....	252
5.4.6.b.Reaccions de biotransformació per produir antocians acilats.....	255
5.4.7. Efecte de fitohormones	258
5.5. Conclusions.....	264
5.6. Referències bibliogràfiques.....	265

Capítol 6. Activitat de la fenilalanina amonio liasa *in vitro* **271**

6.1. Introducció	273
6.1.1. PAL.....	273
6.1.2. Expressió gènica	277
6.2. Objectius.....	280
6.3. Materials i mètodes.....	281
6.3.1. Extracció del RNA total.....	281
6.3.2. Extracció de DNA.....	282
6.3.3. Retrotranscripció	283
6.3.4. Realització de la PCR.....	283
6.3.5. Realització de la PCR quantitativa del DNA.....	285
6.4. Resultats i discussió.....	286
6.4.1. Disseny de primers.....	286
6.4.2. Determinació de l'expressió gènica.....	290
6.5. Conclusions.....	296
6.6. Referències bibliogràfiques.....	297



*Justificació
i objectius*

El raï m representa la collita fruitera més important a nivell mundial, amb aproximadament 60 milions de tones produïdes anualment¹. Un 80% d'aquesta collita es destina a l'elaboració del vi, un 13% és venut com a raï m de taula, i la resta es destina a la producció de suc i altres productes. La majoria de vinyes són conreades a Europa, i a Itàlia, França i Espanya s'hi cultiven aproximadament un 40% dels 7,5 milions d'hectàrees de vinya. A Catalunya, la vinya ocupa al voltant d'un 7'5% de la superfície agrícola, amb una producció de vi als darrers anys d'aproximadament 3 milions d'hectòlitres, que representen més del 9% del total de l'Estat Espanyol.

Actualment, la tendència del mercat s'orienta cap al consum de vins negres, amb molt de color, estructura i grau. A causa de l'impacte econòmic d'aquest producte, es fa necessari un millor coneixement dels factors que determinen el que es coneixen com a paràmetres de qualitat d'un vi, entre els quals té un pes relatiu preponderant el color; així com dels factors que incideixen sobre aquests paràmetres.

Al grup de recerca en Biologia Vegetal del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la URV s'havien efectuat extensos estudis previs sobre l'adaptabilitat de

¹ FAO Statistical Data, 1990-2002

varietats al clima del Priorat,² i sobre les repercussions de l'alimentació hídrica en la qualitat del raï m³. En aquests s'havia fet palesa la influència que tenia el dèficit hídric sobre la síntesi de compostos fenòlics, i especialment, sobre els antocians totals. En el present treball, es proposa aprofundir en aquests aspectes estudiats, incidint en el contingut i acumulació de compostos fenòlics en diferents varietats per una banda, i estudiant-ne la biosíntesi a nivell cel·lular per l'altra.

Per efectuar aquest estudi, es va considerar necessari treballar en 2 vessants.

A) A nivell de camp, es van escollir diferents varietats negres que es cultiven en els camps experimentals de la Facultat d'Enologia en el terme de Constantí. L'objectiu en aquest estudi fou la determinació dels antocians individuals en el raï m de varietats negres en diferents anyades, per comprovar la incidència dels elements climàtics en la seva acumulació. Aquest estudi es va fer posteriorment extensiu a altres compostos fenòlics, concretament les proantocianidines dels pinyols, que també tenen un efecte important en la qualitat final dels vins. Apart, es van triar dues varietats negres per realitzar un assaig amb la variable irrigació, establint els tractaments de ceps regats i no irrigats, per tal de relacionar les diferències entre els tractaments a nivell de contingut en antocians totals observades en altres treballs³ amb aquelles que es presentessin a nivell individual.

D'aquest primer objectiu se'n derivaren uns altres, que contemplaven com es traduí a el contingut en antocians del raï m en el vi elaborat després de la vinificació. Així, es va decidir estudiar l'extractibilitat dels antocians en el període de maceració, previ o simultani a la fermentació alcohòlica, i la reactivitat en el vi dels antocians procedents del raï m.

B) En segon lloc, es van establir uns cultius *in vitro* de *Vitis vinifera* per tal de poder efectuar l'estudi dels factors que influeixen en la biosíntesi d'antocians, com l'estrès osmòtic i l'estrès nitrogenat. A més, aprofitant que són un mitjà ideal per a efectuar estudis bioquímics i moleculars, es va decidir d'abordar l'estudi d'expressió gènica de les vies que determinen la biosíntesi dels compostos fenòlics. En concret, es va decidir estudiar un enzim, la fenilalanina amonio liasa (PAL), que resulta clau en aquestes vies, ja que determina el predomini del metabolisme primari o del secundari.

² Nadal, M. (1993). "Estudi dels factors ecològics i de les condicions de maduració del Cabernet Sauvignon per obtenir vins de qualitat al Priorat"; *Tesi doctoral*, Dep. Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili (URV)

³ Lampreave, M. (2002). "Fisiologia de l'absorció en l'ecosistema vitícola sòl-planta-atmosfera i repercussions en la qualitat del raïm". *Tesi doctoral*, Dep Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili (URV)

Per què l'estudi de la composició fenòlica?

Els compostos fenòlics presenten un interès enològic, per assolir vins de qualitat; i un interès nutricional, pel seu possible efecte terapèutic. Els polifenols del vi constitueixen un dels principals factors de qualitat en vins negres. Malgrat que el vi ha estat un aliment present des de temps immemorials en la dieta de la cultura mediterrània, en les darreres dècades ha esdevingut un producte industrial de gran projecció, la qual cosa ha comportat una tendència a l'elaboració de vins de qualitat, per als quals resulta essencial el seu contingut fenòlic, que aporta color i cos al vi. Això justifica l'interès que té l'estudi d'aquests compostos en l'àmbit de la Viticultura i de l'Enologia. Per altra banda, nombrosos estudis epidemiològics han establert la correlació negativa entre el consum moderat del vi i el risc d'incidència de malalties cardíaco-vasculars. Molts d'aquests estudis atribueixen als compostos fenòlics aquests efectes positius.

Per què l'estudi dels antocians?

Els antocians són les molècules responsables del color de les pells de les baies i, per tant, la base del color dels vins negres. El color és un dels principals paràmetres de qualitat d'aquests tipus de vins, cosa que justifica l'interès que té l'anàlisi cromàtica dels vins. Per això esdevé primordial conèixer el contingut d'aquestes molècules responsables del color.

Per què l'estudi de les proantocianidines?

Les proantocianidines també incideixen en la qualitat del vi, al qual aporten la tanicitat. Però, a més, mitjançant les seves reaccions amb els antocians, juguen un paper decisiu en l'estabilització del color del vi, que resulta especialment important en els vins de cria.

Per què treballar amb diferents varietats?

La composició fenòlica del raï està influïda per diversos factors. El més determinant d'ells és la varietat, ja que marca fenotípicament la composició fenòlica del fruit. No obstant això, aquesta potencialitat no resulta absoluta, sinó que hi ha altres factors que hi incideixen.

A la finca experimental es treballa amb diferents varietats negres per vinificació. Es va considerar d'interès caracteritzar la composició fenòlica d'aquestes varietats per assignar-ne les particularitats i poder així conèixer després la seva incidència a nivell de qualitat dels vins.

Per què en diferents anyades?

En el nostre grup ja s'havia posat de manifest que l'anyada influeix a significativament en el contingut de compostos fenòlics totals. Quedava per veure quin era el seu efecte de manera més concreta, és a dir, a nivell de les molècules individuals. Per això el treball s'abordà en diferents campanyes, per tal de poder assignar després també la influència de les característiques climàtiques de l'any sobre els continguts en polifenols.

Per què en condicions d'irrigació?

La irrigació, des que ha estat permesa per la legislació en el nostre país, ha representat una millora de la qualitat global del raï m, encara que pugui comportar una disminució dels compostos fenòlics. Per tot això resulta interessant analitzar els efectes que pot tenir l'estrès hídric i la situació d'irrigació sobre la seva biosíntesi.

Per què l'estudi en les vinificacions?

Els compostos fenòlics presents en el raï m són extrets en diferent mesura al llarg del procés maceratiu, en funció de la seva estructura química i de la seva localització en el raï m. La matèria colorant del vi dependrà, doncs, del grau d'extracció que s'hagi assolit durant aquest procés.

Per altra banda, el vi és una matriu complexa en què la matèria colorant experimenta una sèrie d'interaccions i de transformacions que modifiquen les seves propietats cromàtiques i que també cal conèixer per entendre el color del vi.

Per què treballs *in vitro*?

El problema dels treballs amb plantes en el camp és que estan sotmeses a una periodificació dependent del seu cicle vital. A més, a causa de la dificultat de controlar totes les variables implicades, els possibles tractaments i efectes resulten molt més difícils de dur a terme i d'interpretar. Per això es va decidir d'iniciar en la nostra línia de recerca el treball amb cultius *in vitro*, que permeten una disponibilitat contínua de material de partida i que poden ser sotmesos ràpidament a l'acció controlada d'agents exògens per tal d'avaluar-ne la influència.

Per què l'estudi de l'expressió gènica de la fenilalanina amonio liasa (PAL)?

Les tècniques de Biologia Molecular han suposat un gran avenç científic en l'àmbit de la Bioquímica, ja que permeten de manera ràpida conèixer quines vies poden estar funcionant en unes condicions determinades. La PAL és un enzim clau en el metabolisme dels compostos fenòlics, ja que catalitza la formació dels seus precursors. Per tant, es pensà que era una bona eina de partida per establir coneixements a nivell molecular de la regulació d'aquestes vies.



BLOC I

*Composició
fenòlica
en
raïm*

—

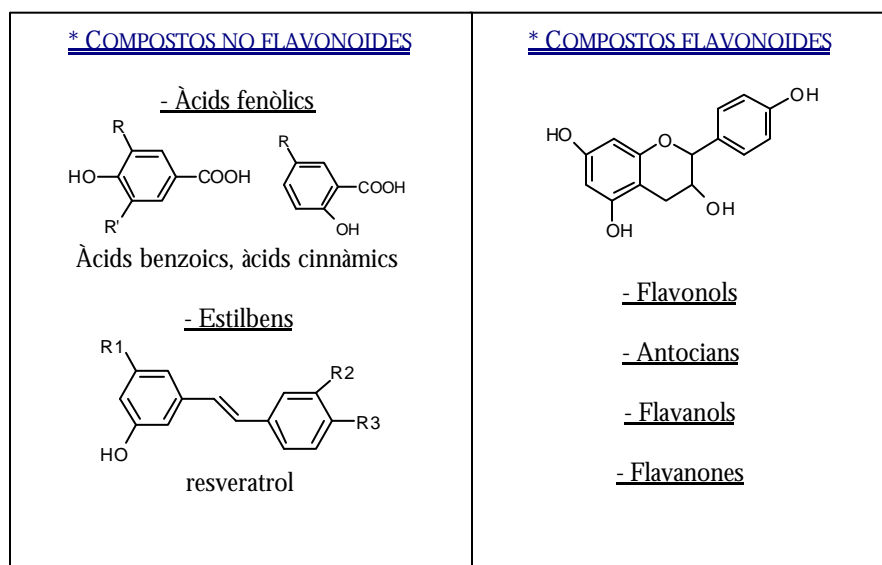


1. Els compostos fenòlics

Els compostos fenòlics són metabòlits secundaris fonamentals en la Bioquímica vegetal, on tenen funcions diverses: des de la coloració de flors i fruits fins a la impregnació de lignina de les parets pecto-cel·lulòsiques ⁴. En Viticultura, la seva importància és capital no només a causa del seu paper en la coloració dels fruits, sinó també perquè confereixen al vi gran part de les seves propietats organolèptiques específiques. En les varietats negres, són substàncies de gran importància per la seva influència en el color (antocians), en l'estructura i en la capacitat d'envelliment dels vins. En varietats blanques el contingut de fenols totals és menor i no s'hi sintetitzen els antocians, i el color és degut a la presència de carotens, xantofiles i flavonols com la quercitina.

1.1 Estructura – principals tipus

Des d'un punt de vista químic, els compostos fenòlics consten d'un anell benzènic substituït amb un o diversos grups hidroxil. Una classificació dels compostos fenòlics segons la seva estructura química es recull a la taula 1:



Taula 1. *Compostos fenòlics en Vitis*

⁴ Champagnol, F. (1984). "Les composés phénoliques"; a "Elements de physiologie de la vigne et de viticulture generale". Ed. Déhan

⁵ Souquet, JM; Cheynier, V; Sarni-Manchado, P; Moutounet, M. (1996). "Les composés phénoliques du raisin". *J. Int. Sci. Vigne et Vin, Hors série*, 99-107

1.1.1. COMPOSTOS NO FLAVONOIDES

* Àcids fenòlics

Els àcids fenòlics (benzoics i cinnàmics; Figura 1) es troben al raïm en forma d'ester d'un sucre o d'un àcid orgànic (principalment, tartàric).

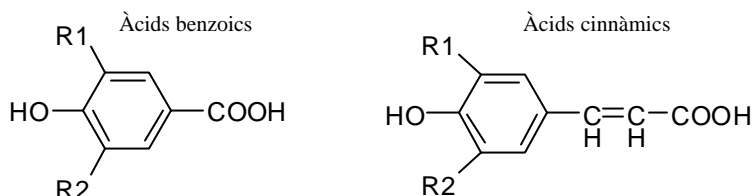


Figura 1. Estructura general dels àcids fenòlics

Els àcids benzoics són constituents de les lignines, i encara que el contingut en àcids benzoics lliures en el raïm és baix, poden aparèixer al vi procedents de les barriques de roure, sovint com a productes d'oxidació dels corresponents aldehyds. L'àcid gàl·lic apareix també esterificant els flavan-3-ols i les proantocianidines.

Els àcids cinnàmics són constitutivament més importants, i a més poden formar esters amb els residus glicosídics de les molècules d'antocians.

Els principals àcids benzoics i cinnàmics es recullen a la Figura 2.

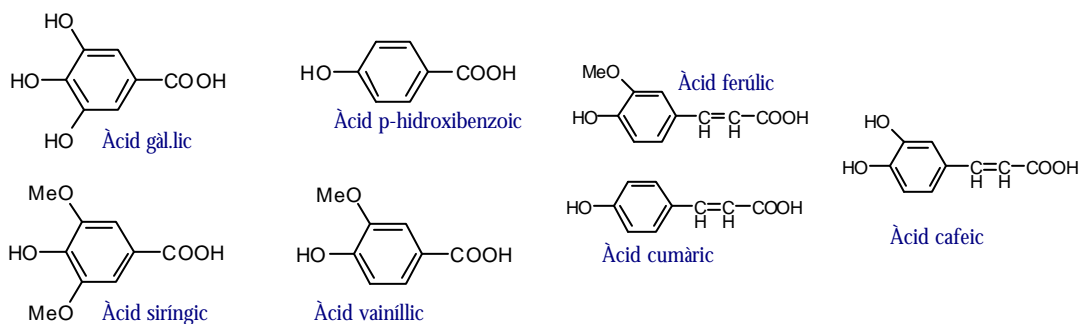


Figura 2. Estructura química dels principals àcids fenòlics del raïm

Entre els esters de l'àcid hidroxicinnàmic, el més abundant en *Vitis vinifera* és el tartrat de cafeoil i en menors quantitats es distribueixen el cumaroil i feruoil.

Els àcids fenòlics participen en els fenòmens d'oxidació que resulten en l'empardiment de les fulles. Malgrat que no semblen tenir un efecte sobre el gust, estan implicats en l'aparició de fenols volàtils, cosa que implica modificacions en l'aroma.

* Estilbens

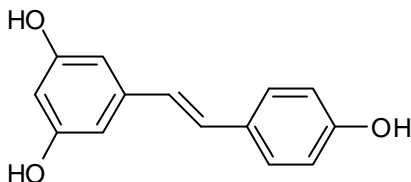


Figura 3. Estructura química del resveratrol

Els estilbens són una altra família de compostos fenòlics, caracteritzats estructuralment per la unió de 2 anells aromàtics mitjançant una cadena carbonada amb insaturació. La presència d'aquests compostos fenòlics com el resveratrol (Figura 3) en forma trans en les pells del raï m també és destacable,

malgrat que no superi els 20 µg/g pes fresc⁶. La presència d'aquest estilbè permet explicar la resistència de certes baies a atacs fúngics.

Malgrat que organolèpticament no atribueixen propietats als vins, recentment ha anat creixent l'interès per aquests compostos, ja que se'ls atribueixen bona part dels efectes cardioprotectors dels vins negres⁷.

1.1.2. COMPOSTOS FLAVONOIDES

El terme "flavonoides" engloba una gran família de compostos que consten d'un esquelet de 2 anells benzènics units per una cadena de 3 àtoms de carboni ciclada en un heterocicle oxigenat (cicle pirònic en el cas dels flavonols; cicle pirànic en el cas dels antocianidols i els flavanols). Aquesta estructura bàsica (C6-C3-C6) correspon a la molècula de fluoroglucinol (figura 4)⁵.

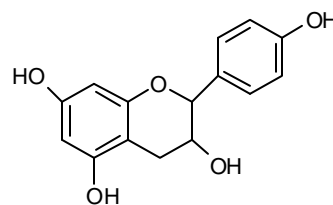


Figura 4. Estructura del fluoroglucinol

⁶ Jeandet, P; Bessis, R; Gautheron, B. (1991). "The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different development stages". *Am J Enol Vitic.* 42: 41-46

⁷ Lamuela-Raventos, R.M; Waterhouse, AL. (1999). "Resveratrol and piceid in wine". *Oxidants and antioxidants*, pt A, 299, 184-190

* Antocians

L'estructura i propietats dels antocians seran discutits més àmpliament en el capítol 1 de la present tesi.

* Proantocianidines i tanins

L'estructura i propietats dels flavan-3-ols i els seus oligòmers i polímers, els tanins, són l'objecte del capítol 2 de la present tesi.

* Flavonols

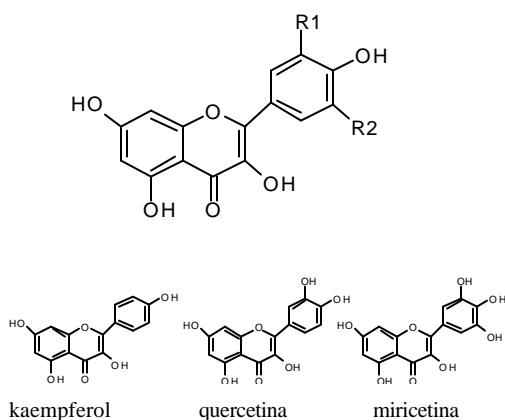


Figura 5. Estructura general i principals flavonols

Els flavonols es caracteritzen per la presència d'un carbonil en posició 4. Els flavonols (Figura 5) es troben en les pells generalment glicosilats amb glucosa, ramnosa i àcid glucurònic. El predominant en *V. vinifera* és el kamferol

Són les molècules responsables del color de les pells de les varietats blanques i, en conseqüència, de part de la coloració groguenca dels vins blancs, però també es troben a les pells de les varietats negres⁸.

* Flavanonols i flavones

Els flavanonols tenen una estructura similar als flavonols, amb pèrdua del doble enllaç de l'anell (figura 6). Han estat identificats a les pells de les varietats blanques. Són l'astilbina (3-ramnòsid del dehidroquercetol) i l'engelatina (3-ramnòsid del dihidrokaempferol), i representarien el 5% del total dels compostos fenòlics totals de les pells d'aquestes varietats⁹.

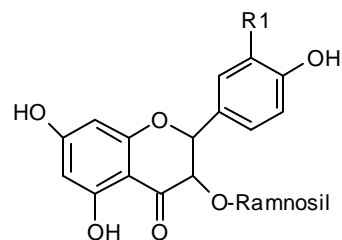


Figura 6. Estructura química dels flavanonols

⁸ Ribéreau-Gayon, P. (1964). "Les composés phénoliques du raisin et du vin II. Les flavonosides et les anthocyanosides". *Ann Physiol Veg* 6, 211-242

⁹ Cheynier, V.; Moutounet, M.; Sarni-Manchado, P. (2003). "Los compuestos fenólicos". A "Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos". Coord. Claude Fanzi, EMV Ediciones.

1.2. Localització dels compostos fenòlics

Segons la localització, són les cèl·lules de la pell les que acumulen més compostos fenòlics, gairebé la major part en la primera capa de la hipodermis. Aquí és on es localitzen els antocians, encara que se'n poden trobar també a la polpa en el cas de les varietats tintoreres (ex. *Vitis vinifera* varietat Alicante Bouchet o Garnatxa Tintorera, o *Vitis vinifera* Gamay Fréaux). A nivell subcel·lular, els antocians es troben en vacúols, on es poden trobar fins i tot en orgànuls especialitzats (antocianoplasts) ¹⁰.

Els estilbens i els flavonols es troben únicament a la pell de les baies⁹.

Els àcids fenòlics es troben en forma d'ester tartàric a les vacuoles de les cèl·lules de la polpa i de la pell⁵.

Els flavanols i els tanins són abundants en els pinyols, i en menor grau, a les pells, on subcel·lularment es localitzen en vacúols, lligats a la membrana vacuolar o lligats a la paret cel·lular ¹⁰. En les llavors predominen els tanins monòmers, que al llarg de la maduració es van polimeritzant.

1.3. Propietats dels compostos fenòlics

* Propietats espectrals: Els àcids fenòlics no tenen color en l'espectre visible, però poden patir processos d'oxidació que condueixen a l'embruniment del most i del vi¹¹. A més, poden participar indirectament en el color vermell pels fenòmens de copigmentació, que comentarem més endavant. Els flavonoides, i principalment els antocians, absorbeixen la llum i això els dona un paper preponderant en la coloració de baies, fulles i vi. El color està influït pel pH, ja que varia la ressonància electrònica de la molècula. En medi fortament àcid, donen un color vermell-violaci, però en medi lleugerament àcid, no hi ha absorció en el visible. En medi bàsic, en canvi, donen una coloració blava-verda¹².

¹⁰ Joutei, KA; Glories, Y. (1995). "Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction". *Rev Française d'Oenologie*, 153, 28-31

¹¹ Singleton, V. (1987). "Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems: observations and practical implications". *Am J Enol Vitic*, 38, 69-76

¹² Glories, Y. (1984). "La couleur des vins rouges. 1ère partie. Les équilibres des anthocyanes et des tanins". *Conn. Vigne Vin*, 18, 195-217

* Propietats oxidoreductores: Les funcions fenol s'oxiden fàcilment a quinona. Entre els compostos fenòlics més fàcilment oxidables es troben tres àcid fenols (protocatèquic, gàl·lic i cafèic), dos flavonols (quercetol, mircetol), tres antocianidols (cianidol, delfinidol, petunidol) i els flavanols que formen els tanins⁴. L'oxidació controlada participa en la maduració del vi, però una oxidació massa ràpida o massa completa compromet la qualitat del producte: visualment, per l'embruniment i la turbulència, i gustativament i olfactiva, per l'aparició de gusts i olors indesitjables.

* Propietats gustatives: Són sobretot atribuïbles als tanins, segons la seva naturalesa i el seu grau de polimerització, que proporcionen un equilibri òptim que evoluciona en el temps entre diferents formes amb diferents graus de condensació. El conjunt de compostos fenòlics participa en aquest equilibri¹³.

* Propietats higièniques

- acció bactericida d'àcids fenòlics i també de flavonoides en general
- acció antiviral, resultant de la combinació de tanins i proteïnes
- acció contra l'aterosclerosi, deguda a les proantocianidines, que reforcen la paret arterial, acceleren l'eliminació de colesterol i s'oposen a la producció d'histamina¹⁴.

¹³ Glories, Y. (1999). "Substances responsables for astringency, bitterness and wine colour". *J Internat Sci Vigne Vin*, 33, 107-110

¹⁴ Burns, J; Gardner, PT; O'Neil, J; Crawford, S; Morecroft, I; McPhail, D; Lyster, C; Matthews, D; Mac Lean, MR; Lean, MEJ; Duthie, G; Crozier, A. (2000). "Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines". *J Agric Food Chem*, 48 : 220-230

2. Bioquímica de maduració del raïm

En el cicle biològic de *Vitis vinifera* es poden distingir dues etapes fisiològicament ben diferenciades, una primera en què destaquen els processos de creixement i desenvolupament dels òrgans vegetatius i una segona on són predominants els processos d'acumulació de midó en l'agostejament i de sucres en la maduració del raïm¹⁵.

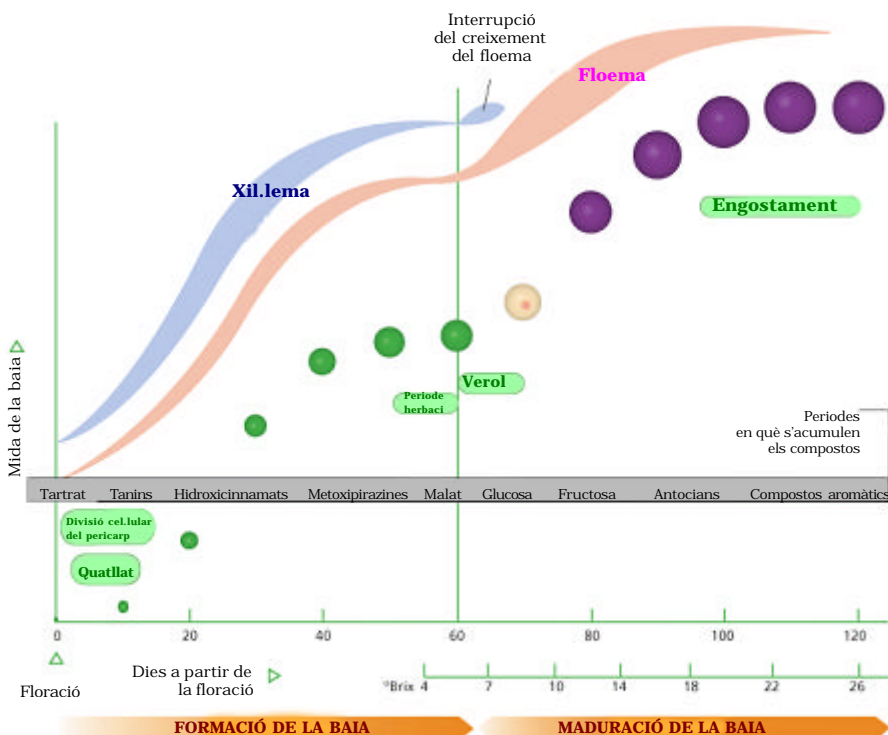


Figura 7. Etapes en la maduració del raïm (extret de Kennedy¹⁶). El diagrama mostra la mida relativa i el color de les baies en intervals de 10 dies a partir de la floració, i passant per les principals etapes de desenvolupament. Es mostra també la periodificació d'acumulació de components, els nivells de °Brix del most, i la realció del flux del xilema i el floema cap a la baia.

El desenvolupament de les baies comprèn tres fases amb dos períodes de creixement sigmoide (figura 7): el creixement del gra verd; el verol o latència, on s'inicia la síntesi de polifenols amb el consegüent canvi de color de la pell de les baies, i la darrera

¹⁵ Nadal, M., (2000). capítol "Fisiologia de la maduració i factors que incideixen en la formació dels principals components del raïm" en Paràmetres qualitius de la verema i el vi, CFEA, Centre de Formació i Estudis Agrorurals Mas Sedó, DARP, Reus, Tarragona

fase, la maduració del raï m, on les baies incrementen el seu volum degut principalment a l'aigua i sucres que s'acumulen en les seves cèl·lules¹⁶.

El primer període de creixement del gra verd dura des de la floració fins a uns 60 dies després. En aquest període, es forma la baia i els embrions de les llavors. En les primeres setmanes té lloc una ràpida divisió cel·lular, i es sintetitzen àcids màlic i tartàric de forma majoritària, fins al verolament, en el qual assoleixen els valors màxims. La síntesi de tartàric com a metabòlit secundari a la baia derivaria de l'àcid galacturònic. L'àcid màlic, en canvi, és un important intermediari del cicle dels àcids tricarboxílics (TCA) i es sintetitza via glicòlisi i cicle TCA o bé per fixació de CO₂ pel fosfoenolpiruvat (PEP)¹⁷.

També s'acumulen els àcids hidroxicinàmics i els tanins de les llavors i les pells^{18,19}. Per altra banda, també hi ha una acumulació de compostos que tenen importància en la qualitat del vi, com són minerals, aminoàcids²⁰ i precursors de l'aroma com les metoxipirazines, que aporten caràcters vegetals a certs vins²¹.

Durant el verolament, els canvis físics comporten una adquisició en l'epidermis del fruit de ceres en la prau, una disminució de la transpiració, la ruptura dels vasos del xilema i un flux més important del potassi respecte d'altres ions²². Després del verol, els vasos funcionals són els del floema, vehicle de transport de la sacarosa cap a la baia. A partir de les fulles adultes s'importen els sucres, però a més a més, el midó dels parènquimes corticals reserva es metabolitza per suplir les elevades necessitats fisiològiques que esdevenen en el verol²³; la finalització del procés de formació de la llavor, la síntesi de polifenols i la migració dels sucres a la baia. El creixement s'atura en aquests moments i la translocació dels sucres es dirigeix cap al raï m.

El començament de la segona fase de creixement o fase de maduració del raï m es caracteritza per la coloració i la pèrdua de duresa de la baia. El volum de la baia acabarà per

¹⁶ Kennedy, J. (2002). "Understanding grape berry development". *Practical winery & vineyard*, jul/ago 2002, 14-23

¹⁷ Ruffner, HP. (1982). "Metabolism of tartaric and malic acids in Vitis: a review", *Vitis* 21, 247-259

¹⁸ Kennedy, J.A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E.J., Jones, G.P. (2001) "Composition of Grape Skin Proanthocyanidins at Different Stages of Berry Development." *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 49: 5348-5355.

¹⁹ Kennedy, J.A., Troup, G.J., Pilbrow, J.R., Hutton, D.R., Hewitt, D., Hunter, C.A., Ristic, R., Iland, P.G., Jones, G.P. (2000) "Development of seed polyphenols in berries from Vitis vinifera L. cv. Shiraz." *Australian Jour. of Grape & Wine Research* 6: 244-254

²⁰ Stines, A.P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P.A., Høj, P.B., van Heeswijk, R. (2000) "Proline and arginine accumulation in developing berries of Vitis vinifera L. in Australian vineyards: influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type." *Australian Jour. of Grape & Wine Research* 6:150-158

²¹ Hashizume, K; Samuta, T. (1999). "Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration quality"; *Am J Enol Vitic* 50: 194-198

²² Creasy G.-L., Price S. I., Lombard P. B. (1993). "Evidence for xylem discontinuity in Pinot noir and merlot grapes: Dye uptake during berry maturation". *Am J Enol Vitic*, 44, 187-192.

²³ Kliewer W. M. y Antcliff, A. J. (1970) "Influence of defoliation, leaf darkening, and cluster shading on the growth and composition of Sultana grapes". *Am. J. Enol, Vitic*, 21, 21-26

haver-se duplicat, de manera que molts dels soluts presents a l'inici veuen reduïda la seva concentració malgrat que no siguin metabolitzats²⁴.

Altres compostos, com el màlic, veuen reduïda la seva concentració no només per l'efecte de dilució. L'àcid màlic disminueix de forma ràpida durant la maduració, ja que s'utilitza com a substracte en la respiració o es descarboxila via oxalacetat (OAA) a PEP en la gluconeogènesi. En canvi, l'àcid tartàric roman més estable²⁵.

Això també els ocorre als tanins de les llavors. La seva reducció sembla deguda a processos d'oxidació²⁶. En les pells, els tanins disminueixen o romanen constants, i són modificats de manera que augmenta la seva mida.

Però el principal procés que té lloc en la segona fase de creixement és que comencen a acumular-se sucres (principalment glucosa i fructosa) provinents de la hidròlisi de la sacarosa obtinguda en la biosíntesi. La sacarosa en la baia es desdobla en glucosa i fructosa, que arriben a trobar-se en parts iguals a la verema encara que en la primera etapa predomini la glucosa²⁷. L'acumulació de sucres en la baia està en relació directa amb la funció superfície foliar/pes del fruit. El transport d'assimilats té lloc majoritàriament des de les fulles del mateix costat del raïm i s'estima en $10\text{cm}^2/\text{g}$ la superfície foliar que es requereix per a la maduració del raïm²⁸.

Per altra banda, en aquesta etapa també es comencen a acumular metabòlits secundaris que determinen la qualitat del vi. Els més obvis són els antocians en les pells dels raïms de les varietats negres, però també s'acumulen la majoria de components responsables de l'aroma, ja sigui directament o via precursors que no arriben a ser volàtils fins que el vi ha envellit. D'entre ells, els més estudiats són els terpens, que tenen una elevada presència en les varietats aromàtiques, sobretot els moscatells. S'hi troben els monoterpens volàtils i les formes combinades, diglucòsids, les quals sota l'acció de les β -glucosidases alliberen el terpè aromàtic. Malgrat que els compostos aromàtics augmenten al llarg de la maduració, de les baies més madures s'obtenen vins menys aromàtics, a causa de la seva conversió a formes no volàtils. En moscatell, a l'inici de la maduració la concentració de geraniol és molt elevada i progressivament disminueix el terpè lliure i apareix el diglucòsid. A mida que avança la maduració, és el linalol el terpè que arriba a concentracions més elevades²⁹. Altres substàncies com els fenols volàtils (vainillina, metil

²⁴ Coombe, B.G. (1992). "Research on development and ripening of the grape berry". *Am J Enol Vitic* 43, 101-110

²⁵ Winkler, A.J.; Cook, J.A.; Kliewer, W.M.; Lider, L.A. (1974). "General Viticulture". Univ of California Press, Berkeley

²⁶ Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L. (2000) "Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening." *Phytochemistry* 55: 77-85

²⁷ Kliewer, W.M. (1967). "The glucose-fructose ratio of *Vitis vinifera* grapes". *Am J Enol Vitic* 18, 33-41

²⁸ Smart, R. E. (1982). "Vine manipulation to improve grape wine quality", in Grape Wine Centennial Symposium of 1980, 362.375, U of California, Davis

²⁹ Wilson, B; Straus, C.R; Williams, P.J. (1986). "The distribution of free and glycosidically-bound monoterpenes among skin, juice and pulp fractions of some white grape varieties"; *Am. J. Enol. Vitic*, 37, 107-114

vanillat, zingerone) i alcohols fenòlics (feniletanol) també es glicosilen durant la maduració i s'han determinat en sauvignon blanc i chardonnay ³⁰. Altres aromes produïts en la fermentació, alcohols superiors i esters, poden dependre del contingut en sucres i precursors en el raïm.

Saber quan els diversos components s'acumulen en la baia és important per entendre com les pràctiques culturals poden modificar les característiques del vi. La clau roman a determinar el moment òptim de maduresa per veremar el raïm.

2.1. Evolució dels compostos fenòlics

No és fins arribar al verol que la producció de fenols augmenta significativament, ja que durant el desenvolupament de la baia verda la seva síntesi té lloc en molt poca quantitat. La clau en la síntesi dels fenols es troba en el pas de la fenilalanina a l'àcid cinnàmic regulada per la fenilalanina-amonioliàsa. A partir de l'àcid es generen per una banda diversos no-flavonoides i per l'altra s'incorpora a un precursor procedent de la via del malonil-CoA que donarà lloc al primer antocian, la cianidina-3-glucòsid, de la qual deriven els altres antocians. L'elevada correlació de les concentracions dels sucres amb les d'antocians ens suggereix la seva implicació en el procés, tant perquè a partir dels sucres es formarà el substrat de la síntesi com per a la possible incidència de l'augment de potencial osmòtic que n'induiria la síntesi ³¹.

Dues o tres setmanes abans de la verema s'assoleix el màxim contingut de fenols, declinant lleugerament el seu nivell en funció de les condicions climàtiques que tenen lloc en acostar-se a la verema. Les catequines i els esters de l'àcid hidroxicinnàmic disminueixen en la segona fase de la maduració degut al creixement de la baia. Això també els ocorre als tanins de les llavors, en una disminució que sembla atribuïble a processos d'oxidació²⁶, i que contribueix a suavitzar l'astringència global. En varietats blanques, on són menors les concentracions, les catequines no tendeixen a la polimerització.

Entre els factors que influeixen en la síntesi i que determinen el contingut final de fenols a la verema cal esmentar les característiques genètiques, la translocació i acumulació dels sucres a les baies, la disponibilitat d'aigua i la temperatura.

2.2 Factors que influeixen en la maduració del raïm

³⁰ Strauss, CR; Wilson,B; Anderson,R; Williams, PJ. (1987) "Development of precursors of C13 nor-isoprenoids flavorants in Riesling grapes". *Am.J.Enol.Vitic* 38, 23-27 (1987)

Qualsevol factor que influeixi en el creixement de la planta incideix de manera directa o indirecta en la capacitat del cep de nodrir i madurar el seu fruit. Conseqüentment, la major part de les pràctiques vitícoles s'encaminen a regular aquests factors per tal d'aconseguir un màxim rendiment, consistent amb la qualitat i la productivitat posterior del cep.

La qualitat del raï m depèn de la varietat i de la interacció que estableix el cep amb el medi que l'envolta. Els factors edafoclimàtics condicionen l'adaptació de les varietats a un ecosistema determinat. L'ecosistema constituït pel clima-sòl i la interacció d'aquest amb la planta juguen un paper fonamental en l'adaptació i en el desenvolupament de les varietats viníferes, així com en el període de maduració de les baies, incidint directament en la composició del raï m i en conseqüència en la qualitat del vi final³².

El contingut en compostos fenòlics depèn en primera instància de la varietat; així, per exemple, mentre que cabernet sauvignon i merlot tenen un potencial fenòlic alt, en la garnatxa i el pinot les concentracions són baixes. Les condicions climàtiques també influeixen decisivament en els processos fisiològics, en estimular el creixement primari o secundari i, per tant, conduir a un increment de la producció o a l'activació de la síntesi de fenols, respectivament. Per altra banda, els ceps han d'assolir un nivell d'estrès hídric determinat després del verolament, imprescindible per aconseguir un contingut òptim de compostos fenòlics en la baia.

2.2.1. FACTORS CLIMÀTICS

La temperatura i la pluviometria són els paràmetres climàtics habitualment considerats per establir classificacions bioclimàtiques i agrupar les varietats viníferes segons l'adaptació a una zona climàtica determinada³³.

³¹ Do, C.B.; Cormier, J.F. (1991). "Accumulation of peonidin-3-glucoide enhanced by osmotic stress in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension". *Plant Cell Organ Cult.* 24, 49-54

³² Rankine, B.; Fornachon, J.; Boehm, E.; Cellier, K. (1971). "Influence of grape variety, climate and soil on grape composition and quality of table wines"; *Vitis*, vol 10, 33-50

2.2.1.1. Temperatura

La temperatura té efectes en la fisiologia de les plantes, el creixement i el desenvolupament, ja que incideix en el procés fotosintètic. A més, la temperatura activa els enzims i contribueix a la permeabilitat de membrana.

En climes càlids, durant la maduració disminueix la síntesi d'àcid màlic i es consumeix ràpidament en resposta a les altes temperatures que activen els enzims responsables de la seva metabolització, de manera que les altes temperatures provoquen que els àcids disminueixin de forma més acusada i la pèrdua d'acidesa es fa evident³⁴.

L'increment de temperatures facilita l'acumulació de sucres, excepte quan s'arriba a 32-35°C, per la seva repercussió en la disminució de la fotosíntesi³⁵. En la sobremaduració augmenten els sucres per deshidratació.

La temperatura també té un efecte molt important en la síntesi dels antocians. En general, en augmentar la temperatura incrementa la síntesi d'antocians, excepte quan s'excedeixen els 35°C ³⁶. En moltes varietats s'estimula aquesta síntesi mitjançant les variacions de temperatures entre dia càlid/nit fresca.

Els aminoàcids incrementen amb la temperatura, sobretot prolina i arginina. En el potassi també s'observa un augment. Malgrat hom considera que les zones on les temperatures són més fredes té lloc una síntesi més elevada d'aromes (com per exemple en pinot noir) cal esmentar que en aquestes condicions i en altres varietats com cabernet sauvignon, es desenvolupen aromes vegetals no desitjables ³⁷.

2.2.1.2. Pluviometria

La pluviometria és un paràmetre climàtic que juga un paper essencial en el desenvolupament de la vinya, ja que la disponibilitat d'aigua condiciona el creixement i desenvolupament de la planta, incidint en la síntesi i acumulació de substàncies a les baies durant el període de maduració del raï m³⁸. En aquest període, l'existència d'un estrès hídric es tradueix en qualitat.

³³ Winkler, A. (1984). "Viticultura". Ed. Continental, México.

³⁴ Chirivella, C., Haba, M., Pérez, A. (1992) "Evolución de los ácidos orgánicos durante el período de maduración de la uva". *Vitivinicultura*, 7-8: 52-55.

³⁵ Chaves, M., Rodríguez, M. (1987). "Photosynthesis and water relations of grapevines growing in Portugal -response to environmental factors". Eds J. D. Tenhunen, F. M. Catarino, O. L. Lange and W. C. Oechel. Spring-Berlag, Berlin, 379-390.

³⁶ Kliewer, W.M. (1977). "Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor grapes". *Am J Enol Vitic.*, 28, 96-103

³⁷ Heyman, H; Noble, A.C. (1987) "Descriptive analysis of Pinot noir wines from Carneros, Napa and Sonoma". *Am. J. Enol. Vitic.* (38), 41-44

³⁸ Hidalgo, L.. (1980). "La viticulture dans les pays semi-arides". *Bulletin OIV*, vol 598, 945-971

La importància de les precipitacions radica en el seu repartiment al llarg del cicle vegetatiu de la vinya. A les zones vitícoles mediterrànies són característiques les pluges de primavera i tardor, per la qual cosa en funció de la capacitat de retenció d'aigua en el sòl i la seva profunditat, el dèficit hídric estival variarà³⁹. La vinya és una planta considerada adaptada a la sequera, i per tant les precipitacions d'hivern són aprofitades per la planta per al seu desenvolupament i creixement, mentre que a l'estiu l'element regulador que condicionarà la fisiologia del cep serà la capacitat de retenció de l'aigua del sòl i el nivell de la capa freàtica⁴⁰.

2.2.1.3. Consideracions sobre l'anyada

Els registres dels elements climàtics varien lleugerament d'un any a l'altre. Segons el moment fisiològic en què es trobi la planta, l'efecte de la variació pot tenir una influència decisiva en la qualitat de l'anyada.

En la nostra zona climàtica, les precipitacions al llarg del cicle presenten força oscil·lacions segons l'anyada i els seus efectes seran molt més importants que la temperatura. Algunes anyades registren una pluviometria anual elevada, però un terç o gairebé la meitat de les precipitacions es donen a la tardor⁴¹, període en què el seu efecte resulta més moderat. És si les precipitacions i la humitat són abundants durant el període final de maduració quan poden comprometre la qualitat perquè comporten una disminució de concentració dels components de la baia i dels compostos fenòlics en particular, a més del risc d'afavorir el desenvolupament de la botritis. La freqüència de precipitacions en vinyes situades prop de la costa va en detriment de la qualitat del raï m, ja que provoca una disminució en les concentracions de sucres i compostos fenòlics⁴².

La distribució de temperatures durant el període vegetatiu és més homogènia. Temperatures continuades que assoleixen els 40°C van en detriment de la síntesi de fenols, doncs inhibeixen l'actuació de la fenilalanina amonio liasa (PAL)⁴³. Aquesta situació

³⁹ Fregoni, M. (1977). "Irrigation des vignobles. Problèmes de physiologie, de biochimie, de génétique, d'agronomie, de technologie et d'économie", *Bulletin OIV*, vol 551, 1-19

⁴⁰ Nadal, M. (1993). "Estudi dels factors ecològics i de les condicions de maduració del Cabernet Sauvignon per obtenir vins de qualitat al Priorat"; *Tesi doctoral*, Dep. Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili (URV)

⁴¹ Nadal, M. (2002). "Els vins del Priorat", Ed. Cossetània, Valls, Tarragona.

⁴² Nadal M.; Lampreave, M; Valls, J. (2000). "Estrategias de riego en el cultivo de la vid y repercusiones en la calidad del mosto y vino". *Viticultura y Enología profesional*, n° extraordinario 2000, Nutri-fitos, pp 37-45

⁴³ Roubelakis, K.; Kliewer, M. (1986). "Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grape berries". *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 4: 275-281.

s'accentua en les varietats de baix potencial fenòlic, en les quals dificulta el complet verolament de les baies.

2.2.1.4. Radiació

De l'energia que arriba a la superfície terrestre, només una petita part del visible és la utilitzada per les clorofil·les i pigments en la fotosíntesi. S'ha apuntat el paper del fitocrom també en la síntesi d'antocians. Les proporcions del fitocrom fisiològicament actiu que arriben a canòpies amb microclima adient són de 60% en front el 20% en condicions d'ombreament. S'ha de precisar que no depèn el color del raïm tan sols de l'exposició a la llum, sinó també de la interacció amb altres factors dels quals depèn el metabolisme secundari. Els efectes de la llum són més importants en les varietats de contingut mitjà o baix en polifenols ⁴⁴.

Els raïms ben exposats presenten una acidesa total més elevada que els que es troben a l'ombra. Cal remarcar el que succeeix en les regions meridionals, on es suma a l'efecte de la llum el de la temperatura per la intensitat de radiació més alta i en conseqüència, els raïms en què toca el sol, presenten menors continguts en àcid màlic a causa de l'activació de l'enzim màlic⁴⁵. En canvi, el contingut en sucres és menor en les baies ombrejades, efecte que pot ser causat per l'augment del seu volum, que implica una dilució dels seus components.

En relació a les aromes, les baies exposades mostren menors nivells d'aromes herbacis en sauvignon blanc, mentre que el contingut de norisoprenoides en altres varietats en resulta augmentat.

2.2.3. FACTORS EDÀFICS

La fertilitat del sòl i la seva capacitat d'emmagatzemar aigua determinen el creixement, el vigor de la planta i en conseqüència afecten indirectament a la maduració del raïm i a la relació vegetació/collita.

⁴⁴ Morrison, JC; Noble, AC. (1990). "The effects of leaf and cluster shading on the composition of Cabernet Sauvignon grapes and on fruit and wine sensory properties"; *Am J Enol Vitic.* 41, 193-200 (1990)

⁴⁵ Smart, R. and Robinson, M. (1991). "Sunlight into wine". Ministry of Agric and F, New Zealand

En particular, juguen un paper determinant en l'absorció dels elements per part de la planta la textura i estructura del sòl, la profunditat, la composició química, i el pH²⁵.

La disponibilitat de l'aigua en el sòl és el factor més important vers la qualitat. La maduració s'inicia en el verol en condicions en què s'atura el creixement, i llavors el metabolisme secundari predomina al primari. La manca d'aigua lligada a les altes temperatures és imprescindible perquè es produeixi l'estrès hídric que desencadena tot el procés del verol. En cas contrari, els vins obtinguts disminueixen la seva concentració, fet que és notablement més acusat en el cas d'antocians.

2.2.4. FACTORS CULTURALS

Les pràctiques culturals afecten directament el creixement del cep i el desenvolupament del raï m, i per tant indirectament també afecten la seva maduració i l'acumulació dels components de qualitat a la baia. L'increment de la collita comporta un esgotament dels ceps i no permet de madurar bé tot el raï m alhora que disminueix el potencial productiu pels anys vinents. S'ha d'aconseguir l'equilibri entre producció i qualitat i analitzar els factors que incideixen en la qualitat. El sistema de conducció, la poda, els tractaments, la fertilització i la irrigació determinen el vigor i el desenvolupament de la canòpia, apropiats per obtenir un raï m de maduració òptima en el moment de la verema ⁴⁶

Les collites excessives comporten un retard en la maduració, augment de l'acidesa, menor acumulació de sucres i de síntesi d'antocians i alhora menor concentració en aromes. No sempre els baixos rendiments d'una vinya són indicadors d'un augment de qualitat si no estan equilibrats la superfície foliar exposada i els raï ms a madurar. Un excés de vegetació pot conduir a un augment del sombrejament en la canòpia i a l'augment de la mida de les baies, disminuint la qualitat del raï m⁴⁷. El vigor de les vinyes es presenta com un factor negatiu pel desequilibri que suposa en el microclima de la planta; per aquest motiu en vinyes poc vigoroses s'aconsegueix una millor relació vegetació/raï m que permet una maduració lenta, arribant d'aquesta manera als màxims continguts de sucres, polifenols, i nivell d'acidesa propis de la varietat.

⁴⁶ Argilier, J.P., (1989) "Interdépendance des facteurs de la qualité", Chambre Agric. Hérault, Montpellier

⁴⁷ Schneider, A; Mannini, F; Gerbi, V; Zeppa, G. (1990). "Effect of vine vigour of *Vitis vinifera* cv Nebbiolo clones on wine acidity and quality". A "Proceedings of the 5th International Symposium of Grape Breeding", 525-531

2.2.4.1. Fertilització

La quantitat total de nutrients en el sòl a disposició dels ceps prové majoritàriament de la roca mare i de les aportacions realitzades en l'adob de preplantació. L'adob de manteniment representa unes aportacions addicionals suplementàries mínimes de matèria orgànica o adob químic, i es realitza en funció de les característiques del sòl.

El nitrogen estimula el desenvolupament vegetatiu i en les vinyes que gaudeixen de canòpies més denses, de manera que el raïm acumula menys sucres i color. La fertilització amb nitrats comporta una tendència a la basicitat del pH a la cèl·lula, que es compensa amb la síntesi de màlic⁴⁸.

El potassi té un paper essencialment osmoregulador, determinant l'estat de turgència cel·lular i controlant l'economia de l'aigua a la planta a nivell estomàtic. Però alts nivells de potassi causen un increment en la síntesi d'àcids màlic i tartàtic. Els dos àcids (màlic i tartàtic) estan implicats en el manteniment de l'equilibri osmòtic cel·lular, acumulant-se en el vacúol per evitar una acidificació del citoplasma. A causa al transport del potassi dins la cèl·lula, per aconseguir l'equilibri osmòtic i la regulació del pH cel·lular, s'estimula la síntesi d'àcids. Tanmateix, el potassi causa un increment del pH, ja que forma sals amb els àcids⁴⁹.

2.2.4.2 Irrigació

L'objectiu que es pretén amb el reg és satisfer les necessitats hídriques dels cultius quan aquestes no poden ser cobertes mitjançant l'acció combinada de les pluges i les reserves del sòl, per tal d'aconseguir maximitzar el rendiment, tant en quantitat com en qualitat, de la collita.^{50, 51}

La vinya és una planta que es considera tradicionalment de secà, ja que precisa de relativament poques quantitats d'aigua per al seu cultiu, a causa de la seva gran capacitat d'adaptació, tant pel seu potent sistema reticular com per la resistència protectora consistent a reduir les pèrdues d'aigua per transpiració^{40,52}. Naturalment, una abundant disponibilitat d'aigua afavoreix la producció, però també presenta una acció directa en la

⁴⁸ Jackson, RS. (2000). "Grapevine structure and function". A "Wine Science: Principles, Practice, Perception" 2nd Ed, Academic Press

⁴⁹ Hand, PG; Coombe, BG. (1988). "Malate, tartrate, potassium, and sodium in flesh and skin of Shiraz grapes during ripening: Concentration and compartmentation". *Am J Enol Vitic.* 39, 71-76

⁵⁰ Martín de Santa Olalla Mañas, F; Juan Valero, J.A. (1992). "Agronomía del riego"; Ediciones Mundi-Prensa.

⁵¹ Urbano Terrón, P. (2002). "Fitotecnía. Ingeniería de la Producción Vegetal". Ediciones Mundi-Prensa

⁵² Lampreave, M. (2002). "Fisiología de l'absorció en l'ecosistema vitícola sòl-planta-atmosfera i repercussions en la qualitat del raïm", Tesi doctoral

qualitat.⁵³ La irrigació de la vinya incideix en la seva fisiologia, que a la vegada pot afectar directament o indirecta el rendiment i la composició del raï m, dos aspectes que també influeixen la qualitat del most i del vi.⁵⁴

Els efectes del reg en la vinya han estat objecte de nombrosos estudis en els darrers anys, estudis que aporten resultats molt diversos i a vegades contradictoris. En general, es pot establir que el reg proporciona uns majors rendiments^{55,56,57,58,59,60,61}. Quant als paràmetres de composició del raï m, el reg provoca un augment del pes de les baies⁶², un increment dels sòlids solubles (^oBrix)⁶³, i un increment de l'acidesa total⁵⁸. Tanmateix, sovint els resultats no aporten diferències significatives^{60, 64}, i fins i tot poden donar valors contraris⁵⁷.

Un dels aspectes més estudiats respecte la influència del reg en la qualitat del raï m és el seu efecte sobre els compostos fenòlics, ja que aquests són un dels paràmetres fonamentals que determinen la qualitat del raï m. Novament es troben resultats diversos. En general, les concentracions d'antocians i compostos fenòlics en les baies decreix quan augmenta l'aplicació d'aigua en la vinya, a causa principalment d'un increment en el pes de la baia⁶⁰, mentre que les situacions de dèficit d'aigua condueixen a una major concentració de compostos fenòlics^{65,66}. No obstant això, no sempre s'arriba a aquestes conclusions⁶⁷. A més, alguns autors observen l'increment d'alguns compostos fenòlics i la disminució d'uns altres⁶⁸; la qual cosa sembla confirmar dos tipus de resposta del raï m davant del dèficit d'aigua: per una banda, un efecte indirecte i sempre positiu de concentració dels compostos

⁵³ Hidalgo, L. (1993). "Tratado de viticultura general", Ediciones Mundi-Prensa.

⁵⁴ Esteban, M.A.; Villanueva, M.J.; Lissarrague, J.R. (2002). "Relationships between different berry components in Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grapes from irrigated and non-irrigated vines during ripening"; *J Sci Food Agric* 82:1136-1146

⁵⁵ Nadal, M.; Arola, L. (1995). "Effects of limited irrigation on the composition of must and wine of Cabernet Sauvignon under semi-arid conditions". *Vitis*, 34(3) 151-154

⁵⁶ Maltabar, L. M.; Skobel'tsyn, Yu. A.; Chausov, V. M. (1996). "Different methods of irrigation and their influence on the crop of table grape Moldova", *Vinograd i Vno* (2) 2-5

⁵⁷ Oliveira, M. (1995). "Effect of soil water availability on the production of the variety Touriga Francesa in the demarcated region of Douro (Cima-Corgo)"; *Ciencia e Técnica Vitivinícola*; 12 (2) 59-71

⁵⁸ Dettori S. (1993). "Influence of irrigation on growth and ripening of the berries of grapevine variety Nuragus"; *Vignevini*, 20 (5) 77-81

⁵⁹ Matthews, M.A.; Anderson, M.M. (1989). "Reproductive development in grape, *Vitis vinifera* L.: responses to seasonal water deficits"; *Am J Enol and Vitic*; 40, 52-60

⁶⁰ Ginestar, C.; Eastham, J.; Gray, S.; Iland, P. (1998). "Use of sap-flow sensors to schedule vineyard irrigation. I. Effects of post-veraison water deficits on water relations, vine growth, and yield of Shiraz grapevines"; *Am J Enol and Vitic*; 49 (4) 413-420

⁶¹ Mihalache L.; Stan M.; Scripcariu C.; Mustata P.; Vasiliu M.; Tomoiu A.; Miscu P.; Tudorache A.; Onciu C. (1989). "The influence of irrigation upon the vine plantations, cultivated with wine grape varieties, under conditions of drought in the years 1986 and 1987"; *Anal Inst Cerc Pent Vitic si Vinif Valea Calug*; 12, 165-180

⁶² Ojeda, H.; Andary, C.; Kraeva, E.; Carbonneau, A.; Deloire, A. (2002). "Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz"; *Am. J. Enol. And Vitic.*, 53 (4) 261-267

⁶³ Sipiara, M.J.; Gutiérrez Granda, M.J. (1998). "Effects of pre-veraison irrigation cutoff and skin contact time on the composition, color, and phenolic content of young Cabernet Sauvignon wines in Spain"; *Am. J. Enol and Vitic.*, 49(2) 152-162

⁶⁴ Osorio U., A.; Rodríguez V., A.; Alfaro P., R. (1998). "Efecto de dos regímenes de humedad del suelo en postcosecha sobre comportamiento de vid cv. Sultanina"; *Agricultura Tecnica*; 58 (2) 123-132;

⁶⁵ Matthews, M. A.; Anderson, M. M. (1988). "Fruit ripening in **Vitis vinifera** L.: Responses to seasonal water deficits"; *Am J Enol and Vitic*; 39 (4) 313-320

⁶⁶ Freeman B.M. (1983). "Effects of irrigation and pruning of Shiraz grapevines on subsequent red wine pigments"; *Am J Enol and Vitic*; 34, 23-26

⁶⁷ Esteban, M. A.; Villanueva, M. J.; Lissarrague, J. R. (2001). "Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening"; *J Sci Food Agric*; 81 (4) 409-420

⁶⁸ Kennedy, J. A.; Matthews, M. A.; Waterhouse, A. L. (2002). "Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids"; *Am J Enol and Vitic*; 53 (4) 268-274

fenòlics a causa de la reducció de la mida de la baia; i per altra, un efecte que serà positiu o negatiu segons el cas, i que dependrà del tipus de compost, del període d'aplicació i de la severitat del dèficit d'aigua⁶². A més, la irrigació també sembla provocar una major extractabilitat dels antocians durant els inicis de la fermentació, que condueix a un major color en el vi⁶³.

La irrigació també incideix en altres compostos del raïm com són els sucres, els aminoàcids, els àcids grassos o els alcohols⁶⁹.

Sembla ser, doncs, que la resposta a la irrigació dependrà de diversos factors, entre els quals cal esmentar la varietat, l'estadi de maduresa de pell i polpa en el moment de la collita, la disponibilitat de l'aigua en el sòl, el mesoclima, les precipitacions i temperatura, la salinitat del sòl⁷⁰, la poda⁷¹, o el sistema de reg^{52,72,73}.

2.2.4.3. Sistema de conducció

El sistema de conducció té una clara incidència en el microclima del cep, ja que determina l'alçada i la disposició de la cobertura vegetal i, en conseqüència, de l'aprofitament de la llum per a la fotosíntesi.⁴⁰

⁶⁹ Boubals D; Meriaux S; Rollin H; Panine M; Potier J-M; Lessut J; Guiraud J-L. (1984). "Results of an experiment with localised and flood irrigation on seven varieties in the south of France". *Bulletin de l'O.I.V.*;57, 597-605

⁷⁰ Walker, R. R.; Blackmore, D. H.; Clingeffer, P. R.; Iacono, F. (1997). "Effect of salinity and Ramsey rootstock on ion concentrations and carbon dioxide assimilation in leaves of drip-irrigated, field-grown grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Sultana)". *Aust J of Grape and Wine Research*; 3 (2) 66-74

⁷¹ Bravdo B; Naor A. (1995). "Effect of water regime on productivity and quality of fruit and wine". *Acta Horticulturae* (427) 15-26

⁷² Sanderson G; Fitzgerald D. (1996). "The effects of rootstock and irrigation on Sultana berry maturity". *Australian Grapegrower & Winemaker*, (390a) 119-120

⁷³ Araujo F; Williams LE; Matthews MA. (1995). "A comparative study of young 'Thompson Seedless' grapevines, *Vitis vinifera* L., under drip and furrow irrigation. II. Growth, water use efficiency and nitrogen partitioning". *Scientia Horticulturae*, 60 (3-4) 251-265

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. **Champagnol, F.** (1984). “Les composés phénoliques”; a “Elements de physiologie de la vigne et de viticulture generale”. Ed. Déhan
2. **Souquet, JM; Cheynier, V; Sarni-Manchado, P; Moutounet, M** (1996). “Les composés phénoliques du raisin”. *J. Int. Sci. Vigne et Vin, Hors série*, 99-107
3. **Jeandet, P; Bessis, R; Gautheron, B.** (1991). “The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different development stages”. *Am J Enol Vitic.* 42: 41-46
4. **Lamuela-Raventos, R;M; Waterhouse, AL.** (1999). “Resveratrol and piceid in wine”. *Oxidants and antioxidants*, pt A, 299, 184-190
5. **Ribéreau-Gayon, P.** (1964). “Les composés phénoliques du raisin et du vin II. Les flavonosides et les anthocyanosides”. *Ann Physiol Veg* 6, 211-242
6. **Cheynier, V; Moutounet, M; Sarni-Manchado, P.** (2003). “Los compuestos fenólicos”. A “Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos”. Coord. Claude Fanzi, EMV Ediciones.
7. **Joutei, KA; Glories, Y.** (1995). “Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction”. *Rev Française d'Oenologie*, 153, 28-31
8. **Singleton, V.** (1987). “Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems: observations and practical implications”. *Am J Enol Vitic*, 38, 69-76
9. **Glories, Y.** (1984). “La couleur des vins rouges. 1ère partie Les equilibres des anthocyanes et des tannins”. *Conn. Vigne Vin*, 18, 195-217
10. **Glories, Y.** (1999). “Substances responsables for astringency, bitterness and wine colour”. *J Internat Sci Vigne Vin*, 33, 107-110
11. **Burns, J; Gardner, PT; O'Neil, J; Crawford, S; Morecroft, I; McPhail, D; Lyster, C; Matthews, D; Mac Lean, MR; Lean, MEJ; Duthie, G; Crozier, A.** (2000). “Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines”. *J Agric Food Chem*, 48 : 220-230
12. **Nadal, M.** (2000). capítol “Fisiologia de la maduració i factors que incideixen en la formació dels principals components del raïm” en Paràmetres qualitius de la verema i el vi, CFEA, Centre de Formació i Estudis Agrorurals Mas Sedó, DARP, Reus, Tarragona
13. **Kennedy, J.** (2002). “Understanding grape berry development”. *Practical winery & vineyard*, jul/aug 2002, 14-23
14. **Ruffner, HP.** (1982). “Metabolism of tartaric and malic acids in Vitis: a review”, *Vitis* 21, 247-259
15. **Kennedy, J.A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E.J., Jones, G.P.** (2001) “Composition of Grape Skin Proanthocyanidins at Different Stages of Berry Development.” *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 49: 5348-5355.

16. **Kennedy, J.A., Troup, G.J., Pilbrow, J.R., Hutton, D.R., Hewitt, D., Hunter, C.A., Ristic, R., Iland, P.G., Jones, G.P.** (2000) "Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz." *Australian Jour. of Grape & Wine Research* 6: 244-254
17. **Stines, A.P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P.A., Høj, P.B., van Heeswijk, R.** (2000) "Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type," *Australian Jour. of Grape & Wine Research* 6:150-158
18. **Hashizume, K; Samuta, T.** (1999). "Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration quality"; *Am J Enol Vitic* 50: 194-198
19. **Creasy G.-L., Price S. f., Lombard P. B.** (1993). "Evidence for xylem discontinuity in Pinot noir and merlot grapes: Dye uptake during berry maturation". *Am J Enol Vitic*, 44, 187-192.
20. **Kliewer W. M. y Antcliff, A. J.** (1970) "Influence of defoliation, leaf darkening, and cluster shading on the growth and composition of Sultana grapes". *Am J Enol Vitic*, 21, 21-26
21. **Coombe, BG.** (1992). "Research on development and ripening of the grape berry". *Am J Enol Vitic* 43, 101-110
22. **Winkler, AJ; Cook, JA; Kliewer, WM; Lider, LA.** (1974). "General Viticulture". Univ of California Press, Berkeley
23. **Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L.** (2000) "Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening." *Phytochemistry* 55: 77-85
24. **Kliewer, WM.** (1967). "The glucose-fructose ratio of *Vitis vinifera* grapes". *Am J Enol Vitic.* 18, 33-41
25. **Smart, R. E.** (1982). "Vine manipulation to improve grape wine quality", in Grape Wine Centennial Symposium of 1980, 362.375, U of California, Davis
26. **Wilson, B; Straus, CR; Williams, PJ.** (1986). "The distribution of free and glycosidically-bound monoterpenes among skin, juice and pulp fractions of some white grape varieties"; *Am. J. Enol. Vitic*, 37, 107-114
27. **Strauss, CR; Wilson,B; Anderson,R; Williams, PJ.** (1987) "Development of precursors of C13 nor-isoprenoids flavorants in Riesling grapes". *Am.J.Enol.Vitic* 38, 23-27 (1987)
28. **Do,CB; Cormier, F** (1991)"Accumulation of peonidin-3-glucoside enhanced by osmotic stress in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension". *Plant Cell Organ Cult.* 24, 49-54
29. **Rankine, B; Fornachon, J; Boehm, E; Cellier, K.** (1971). "Influence of grape variety, climate and soil on grape composition and quality of table wines"; *Vitis*, vol 10, 33-50
30. **Winkler, A.** (1984). "Viticultura". Ed. Continental, México.
31. **Chirivella, C., Haba, M., Pérez, A.** (1992) "Evolución de los ácidos orgánicos durante el período de maduración de la uva". *Vitivinicultura*, 7-8: 52-55.

32. **Chaves, M., Rodrigues, M** (1987). "Photosynthesis and water relations of grapevines growing in Portugal -response to environmental factors". Eds J. D. Tenhunen, F. M. Catarino, O. L. Lange and W. C. Oechel. Spring-Berlag, Berlin, 379-390.
33. **Kliewer, WM.** (1977). "Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor grapes". *Am J Enol Vitic*, 28, 96-103
34. **Heyman, H; Noble, AC.** (1987) "Descriptive analysis of Pinot noir wines from Carneros, Napa and Sonoma". *Am. J. Enol. Vitic.* (38), 41-44
35. **Hidalgo, L..** (1980). "La viticulture dans les pays semi-arides". *Bulletin OIV*, vol 598, 945-971
36. **Fregoni, M.** (1977). "Irrigation des vignobles. Problèmes de physiologie, de biochemie, de génétique, d'agronomie, de technologie et d'économie", *Bulletin OIV*, vol 551, 1-19
37. **Nadal, M.** (1993). "Estudi dels factors ecològics i de les condicions de maduració del Cabernet Sauvignon per obtenir vins de qualitat al Priorat"; *Tesi doctoral*, Dep. Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili (URV)
38. **Nadal, M.** (2002). "Els vins del Priorat", Ed. Cossetània, Valls, Tarragona.
39. **Nadal M.; Lampreave, M; Valls, J.** (2000). "Estrategias de riego en el cultivo de la vid y repercusiones en la calidad del mosto y vino". *Viticultura y Enologia profesional*, nº extraordinario 2000, Nutri-fitos, pp 37-45
40. **Roubelakis, K.; Kliewer, M** (1986). "Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grape berries". *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 4: 275-281.
41. **Morrison, JC; Noble, AC.** (1990). "The effects of leaf and cluster shading on the composition of Cabernet Sauvignon grapes and on fruit and wine sensory properties"; *Am J Enol Vitic.* 41, 193-200
42. **Smart, R. and Robinson, M** (1991). "Sunlight into wine". Ministry of Agric and F, New Zealand
43. **Argilier, J.P.,** (1989) "Interdépendance des facteurs de la qualité", Chambre Agric. Herault, Montpellier
44. **Schneider, A; Mannini, F; Gerbi, V; Zeppa, G** (1990). "Effect of vine vigour of Vitis vinifera cv Nebbiolo clones on wine acidity and quality". A "Proceedings of the 5th International Symposium of Grape Breeding", 525-531 (1990)
45. **Jackson, RS.** (2000). "Grapevine structure and function". A "Wine Science: Principles, Practice, Perception" 2nd Ed, Academic Press
46. **Iland, PG; Coombe, BG.** (1988). "Malate, tartrate, potassium, and sodium in flesh and skin of Shiraz grapes during ripening: Concentration and compartmentation". *Am J Enol Vitic.* 39, 71-76
47. **Martín de Santa Olalla Mañas, F; Juan Valero, J.A.** (1992). "Agronomía del riego"; Ediciones Mundi-Prensa.

48. **Urbano Terrón, P.** (2002). “Fitotecnia. Ingeniería de la Producción Vegetal”. Ediciones Mundi-Prensa
49. **Lampreave, M.** (2002). “Fisiologia de l’absorció en l’ecosistema vitícola sòl-planta-atmosfera i repercussions en la qualitat del raïm”, Tesi doctoral
50. **Hidalgo, L.** (1993). “Tratado de viticultura general”, Ediciones Mundi-Prensa.
51. **Esteban, M.A.; Villanueva, M.J.; Lissarrague, J.R.** (2002). “Relationships between different berry components in Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grapes from irrigated and non-irrigated vines during ripening”; *J Sci Food Agric* 82:1136-1146
52. **Nadal, M.; Arola, L.** (1995). “Effects of limited irrigation on the composition of must and wine of Cabernet Sauvignon under semi-arid conditions”. *Vitis*, 34(3) 151-154
53. **Maltabar, L. M.; Skobel'tsyn, Yu. A; Chausov, V. M.** (1996). “Different methods of irrigation and their influence on the crop of table grape Moldova”, *Vinograd i Vino* (2) 2-5
54. **Oliveira, M.** (1995). “Effect of soil water availability on the production of the variety Touriga Francesa in the demarcated region of Douro (Cima-Corgo)”; *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*; 12 (2) 59-71
55. **Dettori S.** (1993). “ Influence of irrigation on growth and ripening of the berries of grapevine variety Nuragus”; *Vignevini*, 20 (5) 77-81
56. **Matthews, MA; Anderson, MM.** (1989). “Reproductive development in grape, *Vitis vinifera* L.: responses to seasonal water deficits”; *Am J Enol and Vitic*; 40, 52-60
57. **Ginestar, C.; Eastham, J.; Gray, S.; Iland, P.** (1998). “Use of sap-flow sensors to schedule vineyard irrigation. I. Effects of post-veraison water deficits on water relations, vine growth, and yield of Shiraz grapevines”; *Am J Enol and Vitic*; 49 (4) 413-420
58. **Mihalache L; Stan M Scripcariu C; Mustata P; Vasiloiu M; Tomoiu A; Miscu P; Tudorache A; Onciu C** (1989). “The influence of irrigation upon the vine plantations, cultivated with wine grape varieties, under conditions of drought in the years 1986 and 1987”; *Anal Inst Cerc Pent Vitic si Vinif Valea Calug*; 12, 165-180
59. **Ojeda, H; Andary, C.; Kraeva, E.; Carbonneau, A.; Deloire, A.** (2002). “Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz”; *Am. J. Enol. And Vitic.*, 53 (4) 261-267
60. **Sipiora, M.J., Gutiérrez Granda, M.J.** (1998). “Effects of pre-veraison irrigation cutoff and skin contact time on the composition, color, and phenolic content of young Cabernet Sauvignon wines in Spain”; *Am. J. Enol and Vitic.*, 49(2) 152-162
61. **Osorio U., A.; Rodriguez V., A.; Alfaro P., R.** (1998). “Efecto de dos regímenes de humedad del suelo en postcosecha sobre comportamiento de vid cv. Sultanina”; *Agricultura Tecnica*; 58 (2) 123-132;
62. **Matthews, M. A.; Anderson, M. M.** (1988).” Fruit ripening in **Vitis vinifera** L.: Responses to seasonal water deficits”; *Am J Enol and Vitic*; 39 (4) 313-320
63. **Freeman BM.** (1983). “Effects of irrigation and pruning of Shiraz grapevines on subsequent red wine pigments”; *Am J Enol and Vitic*; 34, 23-26

64. **Esteban, M. A.; Villanueva, M. J.; Lissarrague, J. R.** (2001). "Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening"; *J Sci Food Agric*; 81 (4) 409-420
65. **Kennedy, J. A.; Matthews, M. A.; Waterhouse, A. L.** (2002). "Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids"; *Am J Enol and Vitic*;53 (4) 268-274
66. **Boubals D; Meriaux S; Rollin H; Panine M; Potier J-M; Lessut J; Guiraud J-L.** (1984)."Results of an experiment with localised and flood irrigation on seven varieties in the south of France". *Bulletin de l'O.I.V.*;57, 597-605
67. **Walker, R. R.; Blackmore, D. H.;Clingleffer, P. R.;Iacono, F.** (1997). "Effect of salinity and Ramsey rootstock on ion concentrations and carbon dioxide assimilation in leaves of drip-irrigated, field-grown grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Sultana)". *Aust J of Grape and Wine Research*; 3 (2) 66-74
68. **Bravdo B; Naor A.** (1995). "Effect of water regime on productivity and quality of fruit and wine". *Acta Horticulturae* (427) 15-26
69. **Sanderson G; Fitzgerald D.** (1996). "The effects of rootstock and irrigation on Sultana berry maturity"; *Australian Grapegrower & Winemaker*, (390a) 119-120
70. **Araujo F; Williams LE; Matthews MA.** (1995). "A comparative study of young 'Thompson Seedless' grapevines, *Vitis vinifera* L., under drip and furrow irrigation. II. Growth, water use efficiency and nitrogen partitioning". *Scientia Horticulturae*, 60 (3-4) 251-265

Disseny de camp



El present estudi es va realitzar als terrenys “Mas dels Freres”, instal·lacions de què disposa la Facultat d’Enologia en el terme municipal de Constantí (Tarragona) (figura 7)⁷⁴.

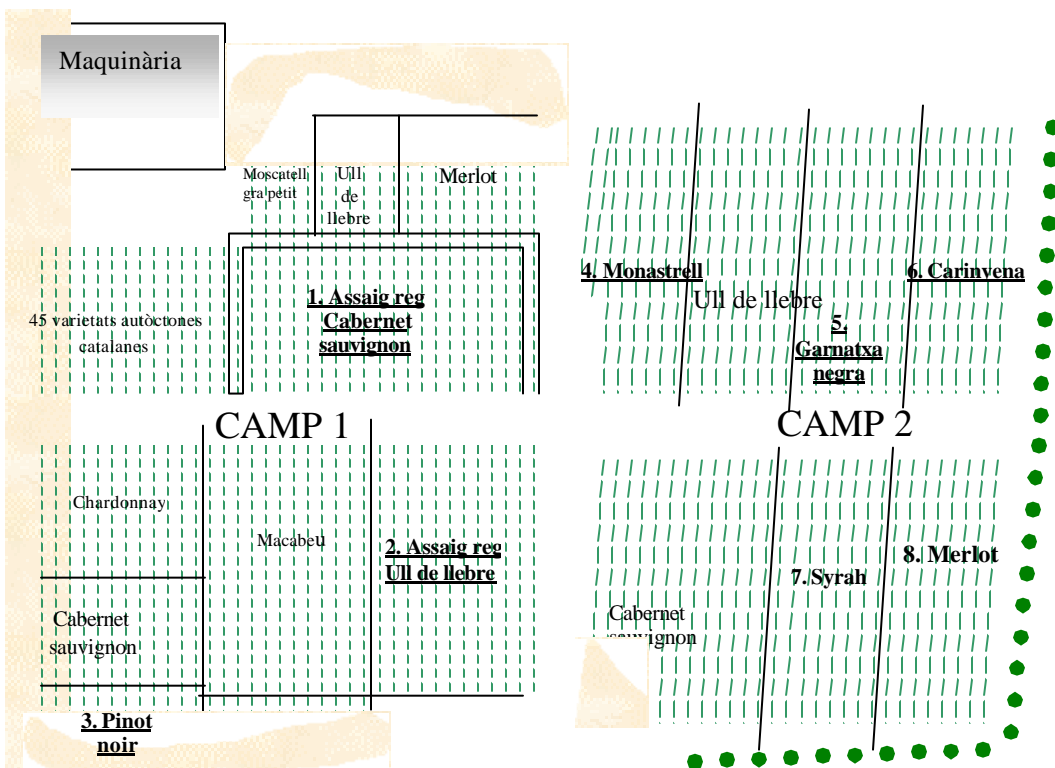


Figura 7. Mapa de la finca Mas dels Freres. En numeració i negreta, varietats estudiades en la present tesi. Adaptat de Canals (1997)

Es van estudiar 8 varietats negres: Cabernet Sauvignon, Carinyena, Garnatxa, Merlot, Monastrell, Pinot noir, Syrah i Ull de llebre.

El portaempelt comú a totes les varietats és el Richter-110 i el marc de plantació és de 2,80 m entre fileres i de 1,2 m entre plantes. El sistema de conducció és vertical simple, constituït per 3 nivells de fils, el dels braços a 60 cm d'alçada i dos més tipus telègraf que determinen una distància de 70 cm d'alçada de vegetació. La poda és royat, deixant 3 o 4 caps per braç.

El sòl és de textura franc argilosa amb una capacitat de retenció hídrica mitjana. El percentatge de matèria orgànica es troba als voltants de 1,2 i consta d'una calcària activa del 10%.

⁷⁴ Canals, JM. (1997). “Aplicació de tècniques de Cromatografia Líquida de Proteïnes (FPLC) a l'estudi de vins blancs”; Tesi Doctoral. Dept. Bioquímica i Biotecnologia, URV

Es procedí a la determinació i avaluació de la composició fenòlica de les 8 varietats durant diferents campanyes, principalment la 2000 i la 2002. Per a això, es van fer determinacions de compostos fenòlics totals, d'antocians per HPLC, i de proantocianidines en les pells; així com de proantocianidines en pinyols per a la campanya 2002. Les determinacions d'antocians es van fer per a les campanyes 1998, 1999, 2000 i 2002.

En el cas de Cabernet sauvignon i Ull de llebre, també es van fer els estudis de la influència del reg en el contingut de compostos fenòlics. El disseny de la plantació és del tipus split-plot amb una distribució a l'atzar en blocs de 4 repeticions per al Cabernet, i de 3 repeticions en el cas de l'Ull de llebre. Per cada repetició, en la parcel·la de Cabernet es va treballar amb 18 ceps per tractament de reg (6 ceps/filera) i en la d'Ull de llebre, amb 24 ceps/tractament (12 ceps/filera). En estudis previs efectuats en el nostre grup de recerca⁷⁵ es va realitzar un càlcul acurat de les necessitats hidriques del cultiu per determinar la dosi d'aigua a aplicar amb el reg, de manera que es van escollir les següents dosis:

cabernet sauvignon: 0% Etc, i 80% Etc

ull de llebre: 0 % Etc i 80% Etc

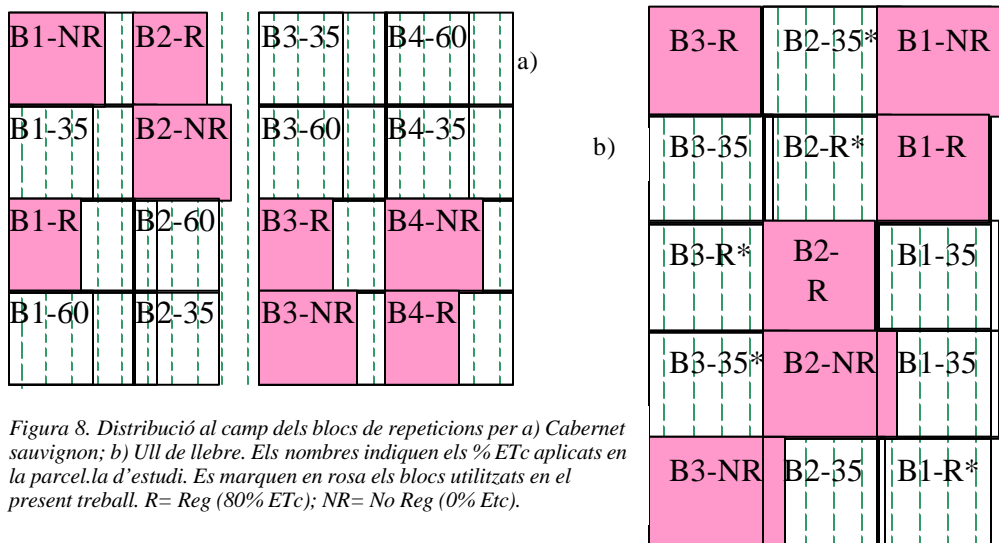


Figura 8. Distribució al camp dels blocs de repeticions per a) Cabernet sauvignon; b) Ull de llebre. Els nombres indiquen els % Etc aplicats en la parcel·la d'estudi. Es marquen en rosa els blocs utilitzats en el present treball. R= Reg (80% Etc); NR= No Reg (0% Etc).

La freqüència d'irrigació fou setmanal, i s'ajustava l'inici de la mateixa a finals de juny, tenint en consideració per fixar aquesta data el valor de l'ETP i el nivell de precipitacions de l'època. De la mateixa manera es va establir la data d'interrupció del reg, que es situà de manera general a partir de 2 setmanes del verolament.

⁷⁵ Lampreave, M. (2002). "Fisiologia de l'absorció en l'ecosistema vitícola sòl-planta-atmosfera i repercussions en la qualitat del raïm", Tesi doctoral

Capítol 1



COMPOSICIÓ ANTOCIÀNICA EN LES PELLS

1.1. INTRODUCCIÓ

Els antocians (del grec “anthos”, flor, i “kyanos”, blau) són colorants vegetals universals i les molècules responsables dels colors de tonalitat cian de pètals i fruits⁷⁶. A part, també poden trobar-se en arrels, tiges i fulles. A nivell cel·lular, els antocians són molècules hidrosolubles que es localitzen normalment en solució dins de vacuoles, on a vegades s'acumulen en unes vesícules esfèriques, anomenades “antocianoplasts” o “inclusions vacuolars antociàniques” (AVI); tot i que a vegades aquestes estructures es poden localitzar també al citoplasma.⁷⁷

Els antocians de les flors i dels fruits jugarien un paper essencial com a traïents visuals dels animals per a la pol·linització i dispersió dels fruits; però és més difícil explicar-ne la funció en altres òrgans de la planta. El fet que es promogui la seva síntesi en presència d'el·licitors i de radiacions UV fa creure que poden tenir una funció en la resposta a les infeccions microbianes, i també s'especula que poden actuar com a sensors o filtres de la llum⁷⁸.

En el cas del raï m, els antocians són les molècules responsables del color vermell blavós de les pells dels raï ms negres i, conseqüentment, participen en el color dels vins que se n'obtenen. D'aquí prové l'enorme interès enològic que comporta el seu estudi.

En el raï m, es localitzen a les pells i també a les 3 o 4 primeres capes cel·lulars de l'hipodermis; i també es troben en el si de la polpa en les varietats tintoreres (com per exemple en les varietats Alicante Bouschet o Gamay Fréaux)⁷⁹.

⁷⁶ Strack, D.; Wray, V. (1994). “The anthocyanins”, a “The flavonoids: Advances in research since 1986” Chapman & Hall

⁷⁷ Markham, K.R.; Gould, K.S.; Winefield, C.S.; Mitchell, K.A.; Bloor, S.J.; Boase, M.R. (2000). “Anthocyanic vacuolar inclusions – their nature and significance in flower colouration”. *Phytochemistry* 55: 327-336

⁷⁸ Chalker-Scott, L. (1999). “Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses”. *Photochemistry and Photobiology*. 70(1): 1-9

⁷⁹ Souquet, J.M.; Cheynier, V.; Sarni-Manchado, P.; Moutounet, M. (1996). “Les composés phénoliques du raisin”. *J. Int. Sci. Vigne et Vin, Hors série*, 99-107

1.1.1 Estructura química

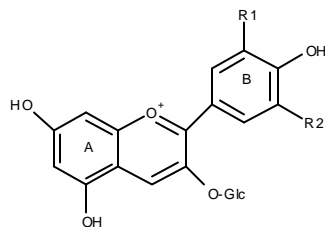


Figura 1.1.1. Estructura química dels antocians

Els antocians (figura 1.1.1) pertanyen a la classe química dels flavonoides, amb el sistema d'anells A (benzoil) i B (hidroxicinnamoil) característic d'aquesta família de compostos. Són heteròsids: glicòsids i acilglicòsids de la molècula d'antocianidina o antocianidol, que a la vegada deriva de l'estructura del catió flavilium (2-fenilbenzopirili).

Hi ha més de 300 estructures antocianiques descrites en la natura ⁷⁶. Aquesta gran variabilitat ve determinada per 3 factors:

1) Segons els nivells d'hidroxilació dels substituents en posició 3' i 5' de l'anell B, obtenim els 6 antocianidols més comuns, dels quals en el gènere *Vitis* se'n detecten 5 (figura 1.1.2).

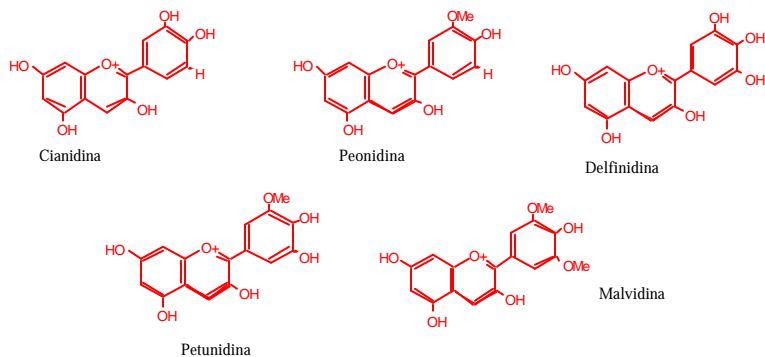


figura 1.1.2. Estructura dels 5 principals antocianidols en *Vitis*

No s'ha detectat la presència de l'altra antocianidina comuna, la pelargonidina, en *Vitis*. En altres plantes s'han detectat estructures més inusuals, caracteritzades per la variació (per desoxigenació, hidroxilació o metilació) en els substituents de l'anell A, de manera que s'han arribat a identificar fins a 17 estructures d'antocianidines en el regne vegetal⁷⁶.

Aquests antocianidols són els que aporten les característiques cromòfores de l'antocià, característiques que a la vegada poden estar modulades pels substituents que presenti la molècula.

2) L'antocianidol (aglicó) es combina amb un sucre per donar l'heteròsid, que és pròpiament la molècula d'antocià. Els antocians poden existir com a 3-monòsids, 3-diòsids, o 3-triòsids, així com a 3,5-diglicòsids i, més rarament, 3,7-diglicòsids, associats amb els sucres glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa i xilosa. En *Vitis*, el sucre és la glucosa, però pot variar la substitució segons l'espècie. En *Vitis vinifera* existeixen només els derivats 3-glucòsids; però en altres espècies presenten els derivats 3,5-diglicòsids⁷⁶.

3) Així mateix, el sucre pot estar acilat, és a dir, esterificat amb un àcid (figura 1.1.3). Normalment aquest àcid és l'àcid acètic o algun àcid-fenol com el cumàric, el cafeïc, o el ferúlic. Recentment també s'han trobat antocians acilats amb àcids dicarboxílics com el malònic, el succínic, el màlic o l'oxàlic.⁷⁶

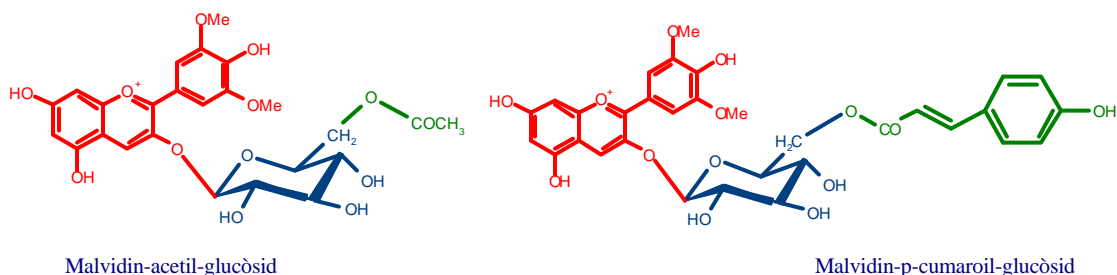


figura 1.1.3. Estructura química dels antocians acilats

Les estructures poden esdevenir més complexes, per la combinació de diferents sucres amb diferents agents acilants; així com per l'associació de diverses molècules d'antocians amb metalls per formar complexos, anomenats metaloantocians.

L'estructura química determina l'estabilitat i reactivitat d'aquestes molècules. Així, la peonidina i malvidina són els més estables i els acilats són menys oxidables.

L'estructura dels antocians presents en *Vitis* és de les més senzilles dintre del regne vegetal, però malgrat això la distribució de cada molècula difereix entre espècies i varietats.

1.1.2. Perfil d'antocians en *Vitis*

La composició d'antocians de la pell del raï m sembla ser específica de varietat^{80,81,82}, la qual cosa ha fet que diversos autors hagin establert estadísticament la classificació

⁸⁰ Climent D; Pardo T. (1993). "Study of the phenolic composition of Bobal, Grenache and Tempranillo grapes"; *Riv di Vitic e di Enol*, 46 (3) 35-44

⁸¹ Ortega Meder, M. D.; Rivas Gonzalo, J. C.; Vicente, J. L.; Santos Buelga, C. (1994). "Diferenciación de variedades de uvas tintas por su composición antociànica". *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 34 (4) 409-426

jeràrquica de les varietats d'acord amb el seu perfil antociànic^{83,84,85,86} i fa que es proposi aquesta característica fenotípica com a fingerprint per a testar les varietats utilitzades en l'elaboració d'un vi^{87,88,89,90,91,92}. D'aquesta manera, aplicant anàlisis estadístiques multivariants^{93,94} (components principals i anàlisi de clusters) s'aborda la identificació de les varietats, i s'han arribat a redefinir varietats en algunes zones amb casos d'homonímia (és a dir, en casos en què es donava el mateix nom a diferents varietats), o en casos de diferents noms en diferents zones per a una mateixa varietat^{95,96,97}.

De totes maneres, sovint aquesta identificació no queda prou establerta⁹⁸ i és necessària l'anàlisi d'altres factors fenotípics com les proteïnes dels pinyols, els isoenzims de la baia, la morfologia de llavors i fulles, etc.^{99,100}.

Actualment, la determinació del perfil antociànic s'utilitza per testar noves metodologies d'identificació varietal fonamentades en l'anàlisi per Biologia Molecular de microsatèl·lits^{101,102}.

En els diversos estudis que es troben a la Bibliografia referents a la caracterització varietal a partir de la composició antociànica, es constata que en les varietats de *Vitis*

⁸² Arozarena, I.; Casp, A.; Marín, R.; Navarro, M. (2000). "Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition". *European Food Research and Technology*, 212 (1) 108-112

⁸³ Eder R.;Wendelin S.;Barna J. (1994). "Klassifizierung von Rotweinsorten mittels Anthocyananalyse. 1. Mitteilung: Anwendung multivariater statistischer Methoden zur Differenzierung von Traubenproben". *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung*;44: 201-212

⁸⁴ Scienza A.;Piergiorganni L.;Visai C.;Conca E.;Romano F. (1986). "Il profilo antocianico delle uve quale mezzo tassonomico per il riconoscimento dei vitigni rossi". *Vignevini*, 13: 75-81

⁸⁵ Roggero JP.;Larice JL.;Rocheville-Divorne C.;Archier P.;Coen S. (1988). "Composition anthocyanique des cepages. I. Essai de classification par analyse en composantes principales et par analyse factorielle discriminante". *Revue Française d'Oenologie, Cahier Scientifique*, 28 (112): 41-48

⁸⁶ González-Neves, G.;Gómez-Cordovés, C.;Barreiro, L. (2001). "Anthocyanic composition of Tannat, Cabernet Sauvignon and Merlot young red wines from Uruguay". *Journal of Wine Research*;12 (2) 125-133

⁸⁷ Holbach, B.;Marx, R.;Ackermann, M. (1997). "Determination of anthocyanins composition of red wine by HPLC". *Lebensmittelchemie* . 51 (4) 78-80

⁸⁸ Gonzalez-San Jose ML.; Santa-Maria G.; Diez C. (1990). "Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region, and wine-making methods". *Journal of Food Composition and Analysis*;3: 54-66

⁸⁹ Hesford, F.;Schneider, K. (1997). "Anthocyanins, the natural red coloring matter of the wine". *Schw. Zeit. für Obst- und Weinbau*;133 (22): 559-561

⁹⁰ Katalinic, V.;Males, P. (1997). "Composition changes in grape polyphenols throughout maturation". *Journal of Wine Research* 8 (3): 169-177

⁹¹ Kallithraka, S.;Arvanitoyannis, I. S.;Kefalas, P.;El-Zajouli, A.;Soufleros, E.;Psarra, E. (2001). "Instrumental and sensory analysis of Greek wines: implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin". *Food Chemistry*;73 (4): 501-514

⁹² García-Beneytez, E.; Revilla, E.; Cabello, F. (2002). "Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them". *European Food Research and Technology*, 215 (1):32-37

⁹³ Scienza A.;Failla O.;Anzani R.;Mattivi F.;Villa PL.;Gianazza E.;Tedesco G.;Benetti U. (1990). "Possible similarities between the Lambrusco with cleft leaves and some cultivated and wild grapevines grown in southern Trentino, North Italy". *Vignevini*, 17 (9): 25-36

⁹⁴ Otteneder, H.;Holbach, B.;Marx, R.;Zimmer, M. (2002). "Identification of grape cultivars in red wine by means of their anthocyanin spectra". *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung*, 52 (5-6): 187-194

⁹⁵ Calo A.;Di Stefano R.;Costacurra A.;Calo G. (1991). "Characterization of Cabernet franc and Carmenere, *Vitis* sp., and explanations on their cultivation in Italy". *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 44 (3) 3-25

⁹⁶ Valentini, L.;Mastromauro, F.;Brancaadoro, L.;Bogoni, M.;Mattivi, F. (1997). "The description and evaluation of grapevine land races in Oltrepo Pavese, northern Italy". *Journal of Wine Research*, 8 (2) 87-102

⁹⁷ Crespan, M.;Caló, A.;Costacurra, A.;Milani, N.;Giust, M.;Carraro, R.;Di Stefano, R. (2002). "Cilieggiolo and Aglianicone: The only varieties with a direct relationship to Sangiovese". *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 255 (2-3): 3-14

⁹⁸ Burns, J.;Mullen, W.;Landraut, N.;Teissedre, P. L.;Lean, M. E. J.;Crozier, A. (2002). "Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (14) 4096-4102;

⁹⁹ Scienza A.;Mattivi F.;Villa P.;Gianazza E.;Tedesco G.;Failla O. (1994). "Genetic relationships between Teroldego and some wine grape genotypes of different geographic origin". *Bolletino dell'Istituto Agrario;Supplemento al 2* (3) 23-32

¹⁰⁰ Del Caro A.;Franco MA.;Sferlazzo G.;Mattivi F.;Versini G.;Monetti A.;Castia T. (1994). "Characterization of anthocyanic profiles of *Vitis vinifera* grown in Sardinia". *Vignevini*, 21 (11) 63-69

¹⁰¹ Rossoni, M.;Fasoli, V.;Labra, M.;Spinardi, A.;Failla, O.;Scienza, A.;Sala, F. (2001). "Exploration of elite grapevine germplasm of Oltrepò pavese (northern Italy) using genetic, chemotaxonomic and morphological markers". *Advances in Horticultural Science*, 15 (1-4):72-78

¹⁰² Costantini, L.;Malossini, U.;Roneador, I.;Mattivi, F.;Grando, M. S. (2001). "Cultivar identity control of Moscato rosa grapevines undergoing clonal selection". *Advances in Horticultural Science*, 15 (1-4): 56-60

vinifera només es trobaven els derivats monoglucòsids¹⁰³. En canvi, en les espècies americanes, en particular *Vitis riparia*, *Vitis rupestris* i *Vitis labrusca*, així com en els híbrids procedents dels seus respectius creuaments amb *Vitis vinifera*, es troben també els derivats diglucòsids¹⁰⁴. Aquesta distinció analítica va permetre descobrir la presència de vins procedents de raïms de varietats híbrides en vins comercialitzats amb denominació d'origen¹⁰⁵. Tanmateix, el desenvolupament de tècniques més sensibles i acurades d'identificació i quantificació han posat de manifest que es poden trobar antocians diglucosilats en *Vitis vinifera*, tot i que en molt baixos nivells¹⁰⁶.

En *Vitis vinifera* l'antocià majoritari és la malvidina; mentre que en *Vitis aestivalis*, *Vitis coriacea* i *Vitis lincencumii* és la cianidina.¹⁰⁷, i en altres espècies com Schiava o Groppello, pot arribar a ser la peonidina⁸⁴. En algunes varietats japoneses fins i tot es troba absència d'algun d'aquests antocians majoritaris; com pot ser absència de malvidina en les varietats Campbell Early i Ishihara, o de cianidina en les varietats Kokuho i Takao¹⁰⁸.

En tots els casos, els derivats majoritaris són els glucòsids no acilats. Segons la varietat canvien els nivells dels derivats acetilats o p-cumarilats, que són els principals derivats acilats dels antocianidin-3-monoglucòsids presents a *Vitis vinifera*. A més, en menors proporcions, també es troben en algunes varietats antocians en què l'agent acilant és l'àcid cafeic o l'àcid fumàric¹⁰⁹. Algunes varietats (com el Pinot Noir o el Noble) no presenten derivats acilats¹¹⁰, o en presenten en molt baixes quantitats, com el Sangiovese¹¹¹; mentre que en altres varietats com Syrah o Cabernet sauvignon els nivells d'acilació són força majors.

¹⁰³ Golodriga Pla; Doubovenko NP. (1978). "Anthocyanins and genotype in the vine" *Genet. Amelior. Vigne. IIe Symp. Intern.*, Bordeaux.INRA, 413-416

¹⁰⁴ Flamini, R.;Tomasi, D.. (2000). "The anthocyanin content in berries of the hybrid grape cultivars Clinton and Isabella"; *Vitis*, 39 (2) 79-81

¹⁰⁵ Blouin, J; Guimberteau, G. (2002). "Maduración y madurez de la uva"; Ed Mundi-Prensa

¹⁰⁶ Baldi, A; Romani, A; Mulinacci, N; Vincieri, FF; Casetta, B. (1995). "HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L.". *J Agric Food Chem* 43 (8):2104-2109

¹⁰⁷ Ribéreau-Gayon,P. (1964). "Les composés phenoliques du raisin et du vin". *Ann., Phytol. Vég INRA*

¹⁰⁸ Shiraishi Sh;Watanabe Y;Okubo H;Uemoto Sh. (1986). "Anthocyanin pigments of black-purple grapes related to variety Kyoho (*Vitis vinifera* L. * *V. labrusca* L.". *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 55 123-129

¹⁰⁹ Yokotsuka K; Nishino N; Singleton VL. (1988). "Unusual Koshu grape skin anthocyanins"; *American Journal of Enology and Viticulture*; 39: 288-292

¹¹⁰ Goldy RG;Ballinger WE;Maness EP. (1986). "Fruit anthocyanin content of some Euvitis * *Vitis rotundifolia* hybrids". *J Am Soc for Hort Sci*, 111: 955-960

¹¹¹ Baldi A; Romani A; Mulinacci N; Vincieri FF. (1993). "Polyphenolic compounds in Tuscan varieties of *Vitis vinifera* L.". *J Int Sci Vigne et du Vin*:27 201-215

La composició antociànica d'una varietat pot tenir importància en el procés d'elaboració dels vins negres, ja que s'ha descrit que en el cupatge amb vins, les varietats que presenten majors nivells de derivats acilats en milloren el color¹¹².

Encara que alguns estudis no sostenen aquesta tesi^{113,114,115}, sembla que nombrosos factors poden alterar aquesta composició antociànica, com són el sòl¹¹⁶, el clima, l'anyada^{117,118}, el terroir¹¹⁹; o les pràctiques vitícoles com el sistema de conducció¹²⁰, la fertilització¹²¹ o el reg¹²². Les variacions vindrien generalment donades en el sentit que aquests factors poden afectar l'estadi de maduració de les baies¹²³. Així, en condicions de maduració equivalents, el perfil antociànic es manté força comú per varietats cultivades en diferents zones^{120,124}, i fins i tot en el cas de secat natural de les baies¹²⁵. A més, també sembla que els canvis en resposta al clima poden ser específics de varietat¹¹⁷. De totes maneres, és comunament acceptat que els nivells d'antocians totals dependran més dels factors climàtics i de maduració del raïm que no pas de la varietat^{126,127}.

1.1.3 Evolució dels antocians al llarg de la maduració

Els diferents percentatges d'antocians i dels derivats acilats tenen una incidència en l'estabilitat del vi i poden variar durant la maduració i segons les varietats.

¹¹² Bucelli P; Faviere V; Giannetti F; Gigliotti A. (1991). "Analytical features and evaluation of the aptitude of Colorino grapes for improving the quality of Chianti wine". *Vignevini*, 18 (3): 57-62

¹¹³ Roson JP; Moutounet M. (1992). "Quantités d'anthocyanes et de tanins des raisins de quelques cépages du sud-ouest en 1988 et 1989". *Revue Française d'Oenologie*, 32 (135): 17-27

¹¹⁴ Bucelli P; Faviere V; Giannetti F; Gigliotti A. (1995). "Evaluation of phenolic components of some black grape varieties grown in Tuscany". *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 48 (1): 39-50

¹¹⁵ Aguilo F; Diez C. (1995). "Anthocyanins and watering in *Vitis vinifera* L." (in: Brouillard, R.; Jay, M.; Scalbert, A. (Eds.): *Polyphenols 94. 17th International Conference on Polyphenols*, Palma de Mallorca, Spain, May 23-27, 1994); *Colloques de l'INRA* (69) 231-232, 1995

¹¹⁶ Yokotsuka, K.; Nagao, A.; Nakazawa, K.; Sato, M. (1999). "Changes in anthocyanins in berry skins of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes grown in two soils modified with limestone or oyster shell versus a native soil over two years". *American Journal of Enology and Viticulture*, 50 (1) 1-12

¹¹⁷ Di Stefano, R.; Moriondo, G.; Borsari, D.; Gentilini, N.; Foti, S.. (1994). "Influenza di fattori climatici e culturali sul profilo antociano varietale"; *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*, 25 (1) 31-46

¹¹⁸ Arozarena, I.; Ayestarán, B.; Cantalejo, M. J.; Navarro, M.; Vera, M.; Abril, I.; Casp, A. (2002). "Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyards over two years". *European Food Research and Technology*, 214(4)303-309

¹¹⁹ Vivas de Gaujelac, N.; Nonier, MF; Guerra, C; Vivas, N. (2001). "Anthocyanins in grape skins during maturation of *Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet sauvignon and merlot noir from different Bordeaux terroirs"; *J Int Sci Vigne Vin*, 35 (3) 149-156

¹²⁰ Castia T; Franco MA; Mattivi F; Muggioli G; Sferlazzo G; Versini G. (1992). "Characterization of grapes cultivated in Sardinia: Chemometric methods applied to the anthocyanic fraction". *Sciences des Aliments*.12: 239-255

¹²¹ Keller, M; Hrazdina, G. (1998). "Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening". *Am J Enol Vitic*, 49 (3): 341-349

¹²² Sipiara, MJ; Gutiérrez Granda, MJ. (1998). "Effects of pre-veraison irrigation cutoff and skin contact time on the composition, color, and phenolic content of young Cabernet Sauvignon wines in Spain". *Am J Enol Vitic*, 49 (2): 152-162

¹²³ Moriondo G; Gentilini N. (1992). "Phenolic composition of some grape varieties grown in Valle d'Aosta". *Riv Vitic e di Enol*, 45 (3) 59-68

¹²⁴ Bucelli, P.; Giannetti, F.; Dodi, S.; Scalabrelli, G. (1997). "Preliminary results of anthocyanin and polyphenol studies with black grapes of Lunigiana, Italy". *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*, 27 (1996-97) 221-234

¹²⁵ Borsari, D.; Di Stefano, R. (2000). "Polyphenol changes in colored grapes during drying". *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 53 (4) 25-35

¹²⁶ Cacho J; Fernandez P; Ferreira V; Castells JE. (1992). "Evolution of five anthocyanidin-3-glucosides in the skin of the Tempranillo, Moristel, and Garnacha grape varieties and influence of climatological variables". *American Journal of Enology and Viticulture*; 43 244-248

¹²⁷ Mateus, N.; Machado, J. M.; De Freitas, V.. (2002). "Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera** grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 (14) 1689-1695

El contingut total d'antocians al llarg de la maduració va incrementant¹²⁸, però es poden trobar estancaments o fins i tot mínims poc abans de la maduresa^{129,130}. L'evolució dels antocians ha estat descrita en ocasions mitjançant un model polinomial¹³¹, en què es recull aquest mínim abans de la maduració, que sembla causat per un declivi i posterior increment dels derivats p-cumarilats i dels derivats acetilats i cafeoilats de la malvidina.

Alguns autors proposen la síntesi d'antocians com a índex de maduració de fruits¹³², aspecte que resulta particularment interessant a l'hora de definir el moment de la verema. Així, s'ha descrit una maduresa de la pell, i un moment òptim de maduració en què els continguts de sucre romandrien estables, just abans que comencin a créixer els nivells d'antocians¹³³.

A partir de l'evolució dels nivells d'antocians al llarg del verolament i la maduració, també s'intenta establir la correspondència d'activitats en la via enzimàtica. Així, els nivells alts de delfidina i cianidina indiquen unes altes activitats flavonoid hidroxilasa¹³⁴, que són els enzims que regulen el pas dels esquelets flavonoids cap a la síntesi d'antocians, que es distribueix en 2 branques. També resulta clau el paper de l'enzim calcona sintasa, ja que competeix amb l'estilben sintasa, responsable de la síntesi de resveratrol¹³⁵.

El model proposat per Roggero *et al*¹³⁶ contempla dues vies de síntesi dels antocians en *Vitis vinifera*, una que deriva en la cianidina, i una altra que ho fa en la delfinidina. Posteriorment, aquests antocians poden donar lloc als altres antocians per metilació dels grups hidroxil de l'anell. Així, de la cianidina es genera, per acció de metiltransferases, la peonidina;

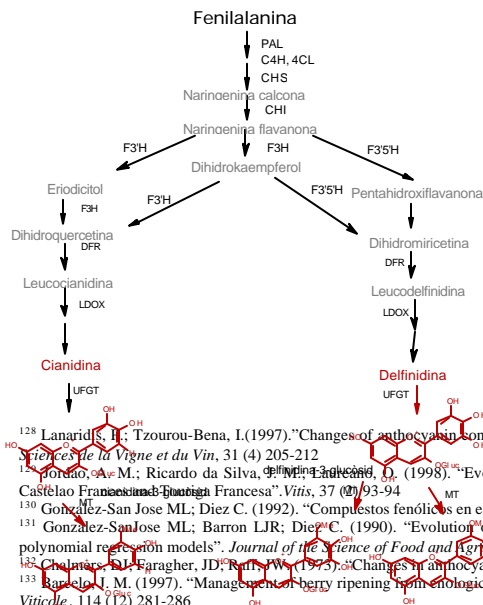


Fig 1.1.4. Vies biosintètiques dels antocians.

¹²⁸ Lanaridis, H.; Tzourou-Bena, I. (1997). "Changes of anthocyanin contents during berry ripening of five greek red wine cultivars". *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 31 (4) 205-212

¹²⁹ Fontado, A. M.; Ricardo da Silva, P. M. P.; Trnka, D. (1998). "Evolution of anthocyanins during grape maturation of two varieties (*Vitis vinifera* L.), Castélao Francesa i Pinot Noir". *Vitis*, 37 (02) 93-94

¹³⁰ González-San Jose ML; Diez C. (1992). "Compuestos fenólicos en el hollajo de uva tinta durante la maduración". *Agrochimica*; 36 63-70

¹³¹ Gonzalez-San Jose ML; Barron LJR; Diez C. (1990). "Evolution of anthocyanin content in grape berries during ripening: a comparison of polynomial regression models". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51 111-116

¹³² Chalmers, S.; Faragher, JD; Ruff, W. (1973). "Changes in anthocyanin synthesis during ripening of grape berries". *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 81 111-116

¹³³ Borel, J. M. (1997). "Management of berry ripening from an oenological point of view". *Viticul*, 114 (12) 281-286

¹³⁴ Lamikara O. "Development of anthocyanin pigments in muscadine grapes". *HortScience*, 23 597-599

¹³⁵ Jeandet P; Sbaghi M; Bessis R; Meunier P. (1995). "The potential relationship of stilbene, resveratrol, synthesis to anthocyanin content in grape berry skins". *Vitis*, 34 (2) 91-94

¹³⁶ Roggero, JP; Coen, S; Ragonnet, B. (1986). "High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism". *Am J Enol Vitic*, 37, 77-83

mentre que a partir de la delfinidina es generarien la petunidina i la malvidina¹³⁷, com es recull en la figura 1.1.4

No obstant això, el contingut de malvidina monoglucòsid pot decreïxer i el de delfinidina monoglucòsid augmentar al llarg de la maduració, la qual cosa aporta dubtes al model biosintètic d'origen dels antocians monoglucòsid presentat per Roggero *et al*¹¹⁷. En concret, observacions en la varietat "Nerello Mascalese", en què canviant les condicions d'entorn i culturals, hi ha canvis en els continguts de cianidina i malvidina, i fins i tot pot acabar sent la cianidina el pigment principal, discrepen d'aquest model biosintètic¹¹⁷.

També hi ha hagut nombrosos estudis centrats en el paper de la UFGT (UDPG-flavonoid-glicosil transferasa), que és un enzim que es localitza només a les pells¹³⁸ i que és el responsable de la glucosilació de les antocianidines, i que està per tant estrictament relacionat amb la síntesi d'antocians. El gen corresponent es troba també present en les varietats blanques, però no s'expressa. Això fa que aquestes varietats, en què sí hi són presents les proantocianidines, no presentin antocians¹³⁹; i que es formulï la hipòtesi que el canvi fenotípic de varietats blanques a varietats negres fos resultat d'una mutació en el gen regulador que controla l'expressió d'aquest gen UFGT⁴⁰.

1.2. OBJECTIUS

Els nostres objectius consisteixen a:

1. Abordar la diferenciació de les varietats negres cultivades en la finca Mas dels Frares a partir de l'anàlisi de la seva composició antocianica, tot establint-ne la mateixa.
2. Estudiar els efectes de l'anyada sobre el contingut d'antocians totals i sobre els antocians individuals, tot posant de manifest la influència climàtica sobre la mateixa.
3. Estudiar les variacions en la composició antocianica al llarg del procés de maduració del raïm, per tal de relacionar-les amb els models de biosíntesi.
4. Estudiar l'efecte de la variable irrigació sobre la composició antocianica en les varietats ull de llebre i Cabernet sauvignon.

¹³⁷ Fernández-López, JA; Almela, L; Muñoz, JA; Hidalgo, V; Carreño, J. (1998). "Dependence between colour and individual anthocyanin content in ripening grapes". *Food Research International*, vol 31 (9), 667-672

¹³⁸ Boss PK; Davies C; Robinson SP. (1996). "Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes". *Plant Mol Biol*, 32 (3) 565-569

¹³⁹ Boss PK; Davies C; Robinson SP. (1996). "Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour". *Australian Journal of Grape and Wine Research*; 2 (3) 163-170

¹⁴⁰ Kobayashi, S.; Ishimaru, M.; Ding, C. K.; Yakushiji, H.; Goto, N. (2001). "Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O*-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin". *Plant Science*, 160 (3) 543-550

1.3. **METODOLOGIA**

1.3.1. Extracció dels compostos fenòlics: 0.5 g de mostra congelada i pulveritzada en nitrogen líquid s'extreuen a l'ultrasons, controlant-ne la temperatura, 3 vegades amb un volum de 25 ml d'etanol absolut (Panreac, SA) acidulat amb un 1% d'àcid fòrmic (Panreac, SA). L'extracció no és possible amb metanol i àcid clorhídric, metodologia que a vegades s'utilitza en l'extracció d'antocians totals, ja que en aquestes condicions està descrit que es produeix hidròlisi dels derivats acetilats¹⁴¹.

L'extracte s'evapora fins a sequedat (aprox 20 minuts) en rotavapor a una temperatura inferior a 40 °C. El residu sec es redisol en una solució de metanol (Panreac, SA) 50% acidulat amb 1% d'àcid fòrmic, i s'enrasa a un volum de 10 ml. Es guarda fins a l'anàlisi dels antocians per HPLC en alíquotes a -20°C.

1.3.2) Determinació espectofotomètrica d'antocians totals: s'efectua mitjançant la mesura de la lectura d'absorbància a 535 nm. Pels càlculs, s'utilitza el valor d'absorbància que dona una solució patró de malvidina-3-glucòsid (Extrasynthese) 0,175 mg/ml.

1.3.3) Anàlisi d'antocians individuals

Històricament, l'anàlisi d'antocians de les pells del raï m s'ha abordat amb diferents metodologies. Els primers estudis mitjançant cromatografia en capa fina (TLC) permetien la detecció i la separació pels seus valors de R_f de derivats mono- i diglucòsids, i fins i tot separar els 3-glucòsids entre sí i diferenciar-los respecte els corresponents derivats acilats^{142,143}. El principal problema de la Cromatografia en Capa Fina és que permet la separació i identificació d'alguns antocians, però en fa difícil la quantificació, tot i que es poden recollir valors d'absorció que permeten per una banda fer una estimació i per l'altra establir les longituds d'ona d'absorció dels compostos¹⁴⁴.

¹⁴¹ Anderson, DW; Gueffroy, DE; Webb, AD; Kepner, RE. (1970). "Identification of acetic acid as an acylating agent of anthocyanin pigments in grapes"; *Phytochemistry*, vol 9 (7): 1579-83

¹⁴² Shiraishi S; Watanabe Y. (1988). "Anthocyanin pigments in the blue-black tetraploid grape cultivars 'Black Olympia', 'Pione' and 'Izunishiki', *Vitis vinifera* L. * *V. labrusca* L." *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*; 57 (1) 17-21

¹⁴³ Shiraishi SI; Watanabe Y. (1993). "Anthocyanin pigments in the grape skins of several red *Vitis vinifera* cultivars bred in Japan". *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*; 36 (1-2) 63-67

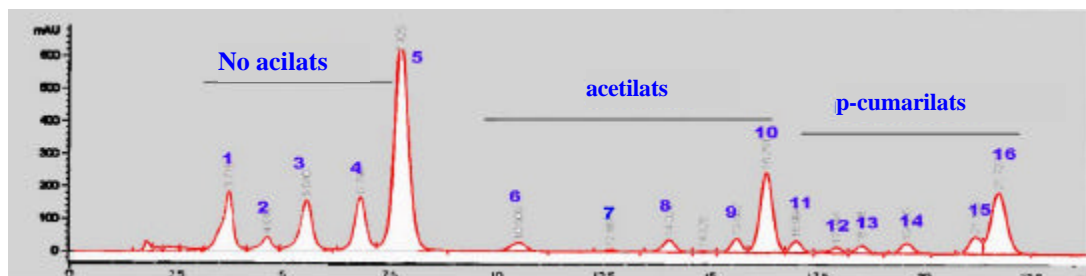
¹⁴⁴ Lay H; Draeger U. (1991). "Profiles of the pigments from different red wines". *Wein-Wissenschaft*, 46: 48-57

Les metodologies fonamentades en l'anàlisi per HPLC dels antocians han suposat un gran avenç en el seu estudi, ja que en permeten una separació més eficient. La columna acostuma a ser de fase reversa, i s'utilitza un sistema de bombes en què la fase mòbil va augmentant de polaritat, emprant-se com a solvent metanol o acetonitril, segons els casos; i amb un acidificador, que pot ser el fòrmic o l'àcid perclòric¹⁴⁵.

En el nostre cas, l'equip utilitzat és un sistema modular (Agilent) amb 4 bombes i equipat amb un detector de longitud d'ona múltiple. La separació s'efectua en una columna Waters Spherisorb ODS2 (4.6 x 250 mm) amb control de temperatura a 40°C.

Els solvents emprats són una solució A (àcid fòrmic: aigua, en relació 10:90) i una solució B (metanol: aigua : àcid fòrmic, en relació 45:45:10). Les condicions de gradient són: 0 minuts: 20%B, flux 1.5 ml/min; 15 minuts: 40%B, flux 1.5 ml/min; 25 minuts: 80%B, flux 2 ml/min; 30 minuts: 80%B, flux 2 ml/min; 33 minuts: 20%B, flux 1.5 ml/min.

Dintre del procediment experimental, el primer aspecte que exposarem en la present tesi és la identificació dels compostos antocianics mitjançant el mètode cromatogràfic proposat. La separació cromatogràfica dels antocians és un aspecte freqüentment abordat per la bibliografia, i l'assignació cromatogràfica dels pics s'efectua a partir dels temps de retenció. Així, un cromatograma típic donaria el perfil que es representa en el



cromatograma 1.3.1. Separació cromatogràfica dels antocians de les pells del raïm. 1: Dp-3-glu; 2: Cy-3-glu; 3: Pt-3-glu; 4: Pn-3-glu; 5: Mv-3-glu; 6: Dp-ac-glu; 7: Cy-ac-glu; 8: Pt-ac-glu; 9: Pn-ac-glu; 10: Mv-ac-glu; 11: Dp-pc-glu; 12: Mv-pc-glu; 13: Cy-pc-glu; 14: Pt-pc-glu; 15: Pn-pc-glu; 16: Mv-pc-glu. Dp=delfinidina; Cy=cianidina; Pt=petunidina; Pn=peonidina; Mv=malvidina; glu= glucòsid; ac = acetil; pc=p-cumaril

cromatograma 1.3.1.

¹⁴⁵ Revilla, E.; García-Beneytez, E.; Cabello, F.; Martín-Ortega, G.; Ryan, J. M. (2001). "Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them". *Journal of Chromatography A*, 915 (1-2) 53-60

Com es pot observar, primer elueixen els antocians lliures, i posteriorment apareixen successivament els derivats acetilats i els p-cumarilats. Tanmateix, sovint elueixen pics simultàniament als derivats acilats que dificulten l'assignació correcta dels compostos, de manera que es va emprar una tècnica d'identificació per assegurar-ne la correcció.

1.3.4) Sistema HPLC-MS

Per a assignar correctament els pics als compostos, es va proposar la utilització de l'acoblament HPLC-MS. En un primer moment, es va pensar a utilitzar-lo amb la interfase

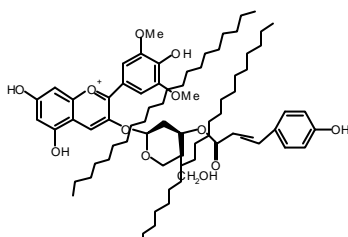


Figura 1.3.1. Llocs de trencament hipotètics de la molècula d'antocià

de particle beam, que s'havia mostrat efectiva a l'hora d'identificar dímers de catequina en altres treballs dintre del Departament¹⁴⁶. En aquesta metodologia, la molècula es fracciona donant diferents fragments, i la hipòtesi de partida fou que els trencaments es produïrien preferentment per les regions més làbils, corresponents als enllaços esters. D'aquesta manera, es podrien obtenir per una part l'antocianidina, d'una

altra el sucre, i finalment l'agent acilant (figura 1.3.1).

No obstant això, el trencament de la molècula en el nebulitzador no proporcionà en cap cas un fragment visible que correspongués a la mida de l'anell fenòlic, i només s'apreciaven en algunes ocasions els pics corresponents al sucre.

Això provocà que es decidís a canviar de tècnica. La metodologia emprada fou la de HPLC-ESI-MS. En aquest cas, la interfase d'electrospray provoca una ionització suau de la molècula, de manera que produeix els ions $[M]^+$ en alta abundància. Un aspecte limitant d'aquesta tècnica és que serveix per assignar la massa molecular, però no dona fragments que després puguin servir per a reconstruir i interpretar l'estructura de la molècula. De totes maneres, considerant que es disposava d'un coneixement previ força acurat de les molècules que podien trobar-se, s'acceptà que era una tècnica totalment vàlida per abordar el problema.

Un altre conflicte era la limitació del flux d'entrada al detector, que es va haver de reduir a 1 ml/minut. Això, encara que no afectava la resolució dels antocians per la columna, sí que provocava un retard dels temps de retenció, que després havien de tornar a ser reassignats per les condicions cromatogràfiques de treball rutinari.

¹⁴⁶ Bernardino García. (2000). *Treball de 12 crèdits*. URV.

Per poder recollir els ions en el detector de masses i que aquests donin un senyal prou quantitatiu, es va partir d'unes concentracions elevades dels compostos, de manera que es van efectuar extraccions dels antocians per les diferents varietats del raïm i després es van concentrar en el rotavapor fins arribar a uns nivells d'antocians, determinats pel mètode espectrofotomètric, de 10 mg/ml. Això era sobretot necessari per als antocians acilats, ja que s'havia observat que els seus nivells en les pells eren sempre inferiors als dels antocians lliures.

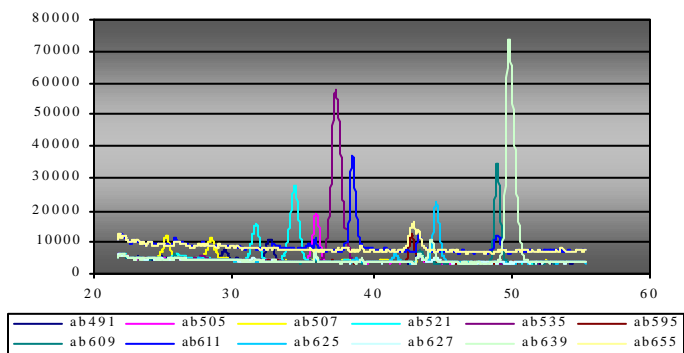
En la utilització d'aquesta tècnica s'obtenien millors resultats si s'efectuava una restricció de les masses a detectar. Així doncs, es van considerar només les masses moleculars dels antocians descrits a *Vitis*. En la Taula 1.3.1 es recullen els compostos que prèviament s'havien pogut identificar emprant aquesta metodologia:

<i>M</i> + ₁	compost	<i>M</i> + ₂	compost	<i>M</i> + ₃	compost	<i>M</i> + ₄	compost
449	Cy-3-glu	491	Cy-ac-glu	595	Cy-pc-glu	547	Pt-piruvilglucòsid
463	Pn-3-glu	505	Pn-ac-glu	609	Pn-pc-glu	655	Mv-cf-glu
465	Dp-3-glu	507	Dp-ac-glu	611	Dp-pc-glu	561	Mv-piruvilglucòsid
479	Pt-3-glu	521	Pt-ac-glu	625	Pt-pc-glu	517	Vitisina B
493	Mv-3-glu	535	Mv-ac-glu	639	Mv-pc-glu	625	Pn-cf-glu

Taula 1.3.1. Masses moleculars dels diferents antocians detectats per HPLC-MS

Com que de fet els dubtes provenien dels antocians en les regions acilades, i per tal de no saturar el detector, el que es va fer a la pràctica va ser injectar les mostres al HPLC sense acoblar-hi el masses fins al moment en què havien sortit els 5 pics corresponents als antocians lliures.

En el cromatograma 1.3.2 es recull l'ordre d'elució dels pics que donaven senyal per a una mostra de merlot.



Cromatograma 1.3. 2. Elució cromatogràfica dels pics. En la llegenda s'indica la massa molecular del ió *M*+.

A partir dels resultats obtinguts, es va poder establir la seqüència d'antocians que caracteritzava cadascuna de les varietats estudiades. L'ordre d'elució dels antocians, un cop adaptat al mètode de HPLC sense acoblament al espectròmetre de masses, era el següent:

tR (min)	compost	tR (min)	compost	tR (min)	compost
3.7	Dp-3-glu	10.5	Dp-ac-glu	16.9	Dp-pc-glu
4.6	Cy-3-glu	12.6	Cy-ac-glu	17.1	Mv-cf-glu
5.5	Pt-3-glu	14.0	Pt-ac-glu	18.0	Cy-pc-glu
6.1	Pn-3-glu	15.6	Pn-ac-glu	19.4	Pt-pc-glu
8.7	Mv-3-glu	13.2	Mv-ac-glu	21.3	Pn-pc-glu
				21.7	Mv-pc-glu

Taula 1.3.2. Temps de retenció dels diferents antocians detectats per HPLC-MS

Un cop establerts els temps de retenció dels principals antocians presents, es procedí a l'anàlisi dels antocians per a cada varietat en les diferents campanyes.

3.5) Anàlisi estadística

Els valors presentats corresponen a mitjanes de triplicats. Per tal d'obtenir-ne les mitjanes i desviacions i determinar-ne les diferències significatives per tractament i per data de mostreig es va aplicar l'anàlisi de la varianza i el test de Fisher, utilitzant un nivell de probabilitat $p \leq 0.05$ mitjançant el programari Statview.

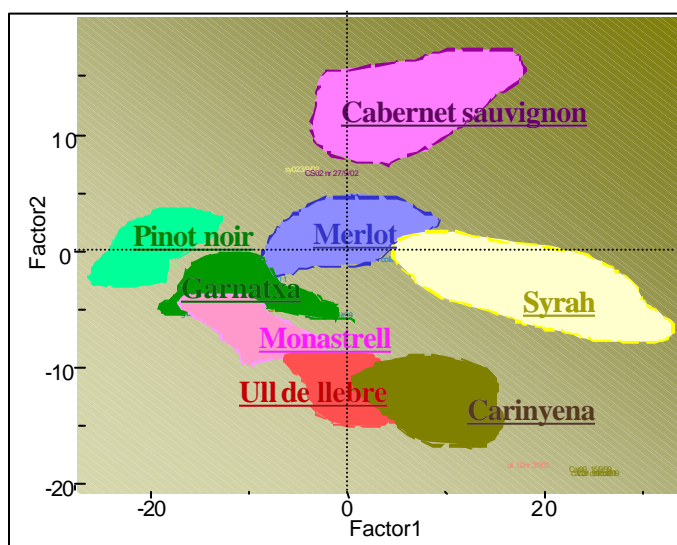
El software utilitzat en l'anàlisi multivariant és el Pirouette 2.6 (Infometrix, Inc. (Woodinville, WA).

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

1) Perfil antociànic de diferents varietats en el moment de la collita

L'anàlisi de la composició antociànica de les diferents varietats es va efectuar a partir de les mostres de la collita i les de dates pròximes, ja que, com es comentarà posteriorment en aquest capítol, el perfil resulta modificat al llarg de l'evolució. Per fer l'anàlisi de grups, es va treballar amb els resultats de 5 anys per a Cabernet sauvignon i ull de llebre; i els de tres campanyes per a la resta de varietats.

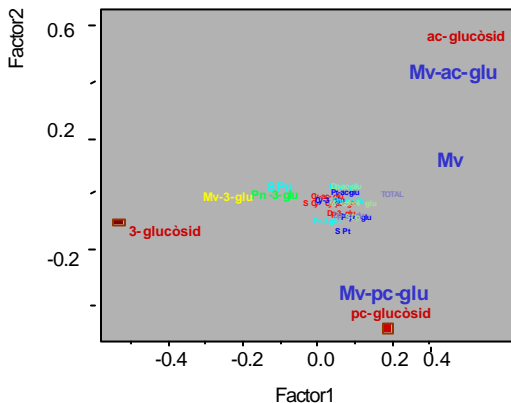
La gràfica 1.4.1.1 recull les agrupacions que resulten de l'anàlisi de components principals:



Gràfica 1.4.1.1. Agrupació de les varietats estudiades segons els seus scores en l'anàlisi discriminant

Tenint en compte el pes que té cada variable estudiada en els factors, hom pot observar que Cabernet sauvignon es diferencia clarament de la resta de varietats viníferes pel factor 2. En aquest factor hi participen majoritàriament, pel que es pot deduir de la representació dels loadings (Gràfica 1.4.1.2), que recull la participació de cada variable en el factor, les variables acetilació (participació positiva) i p-cumarilació (participació negativa). Per tant, Cabernet sauvignon s'ubica en una zona que correspon a uns alts nivells

d'acetilació, i baixos de p-cumarilació; mentre que en ull de llebre i carinyena succeeix el contrari.



Gràfica 1.4.1.2. Gràfica dels "loadings" de l'anàlisi de components principals.

Pinot noir, Merlot i Syrah es diferencien pel factor 1. En aquest cas, els loadings provenen de la proporció d'acilació (tant amb acètic com amb p-cumàric). Syrah seria la varietat a qui correspondrien els majors valors d'acetilació, encara que els seus valors són molt dispersos, seguida de Merlot. En garnatxa i monastrell hi ha un menor nivell d'acilació, però no diferirien gaire, encara que a Monastrell li correspondria una major proporció de derivats p-cumarilats,

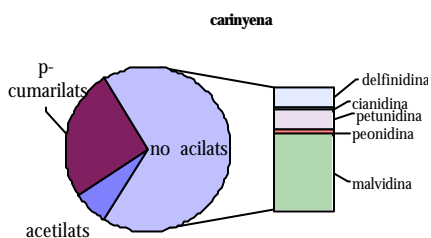
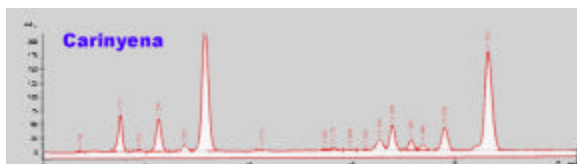
ja que els seus "scores" corresponen a valors més negatius del factor 1. Finalment, en el cas de Pinot noir correspondrien els valors més elevats de 3-glucòsids.

De la gràfica dels loadings hom pot apreciar que les variables que aporten més informació en els components principals (explicant-ne un 85% de la variància) són el sumatori d'acetilació (Σ ac-glucòsid), el sumatori de p-cumarilació (Σ pc-glucòsid), i el sumatori de no acilació (Σ 3-glucòsid). Dintre de les acilacions, també intervenen preponderantment els nivells en Malvidina acilada (Mv-ac-glu i Mv-pc-glu), cosa que concorda amb el fet que és la malvidina l'antocià majoritari en totes les varietats (i, per tant, hi ha una dependència clara entre el contingut de malvidina acilada i el contingut total d'acilació). En canvi, el percentage de variància que expliquen els antocianidin-3-monoglucòsid individuals és força baix i, per tant, no semblen ser el principal factor de diferenciació entre varietats.

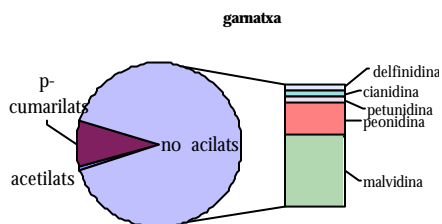
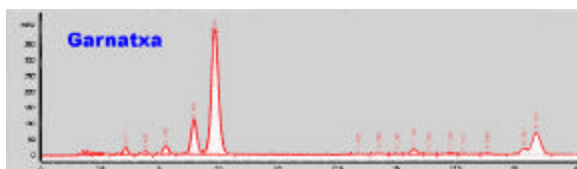
En resum, la quantitat d'antocians acetilats i p-cumarilats serien el principal criteri que permetria la separació de les varietats, d'acord amb l'anàlisi de components principals.

Per il·lustrar més clarament aquestes diferents perfils, presentem a continuació un cromatograma de separació per a cada varietat, acompanyat d'un gràfic sectorial de la proporció de cada antocià. Per simplificar la visualització, només s'han desglossat els antocians individuals no acilats, ja que són els majoritaris.

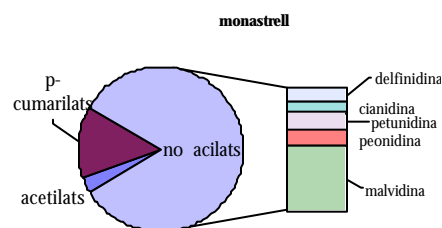
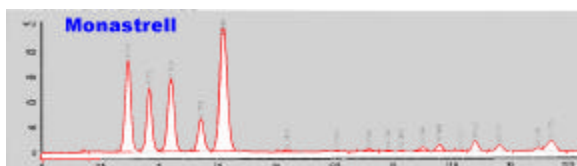
1) Carinyena.



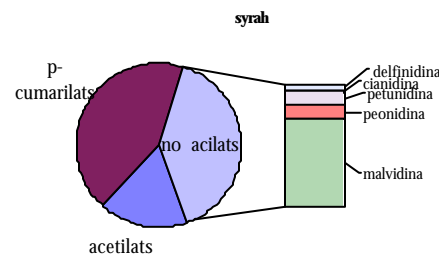
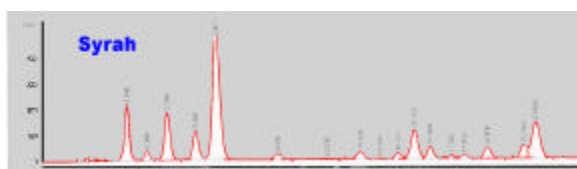
2) Garnatxa



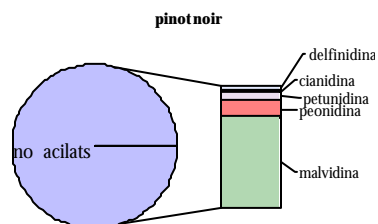
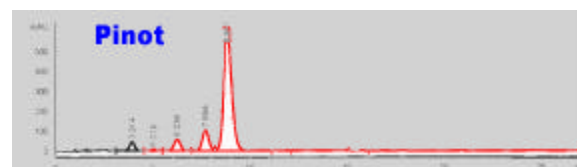
3) Monastrell



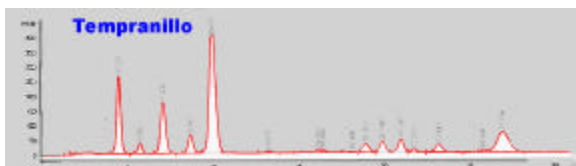
4) Syrah



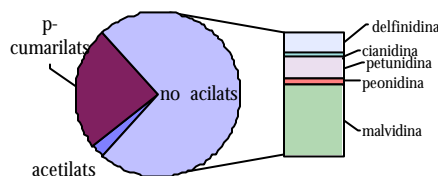
5) Pinot noir



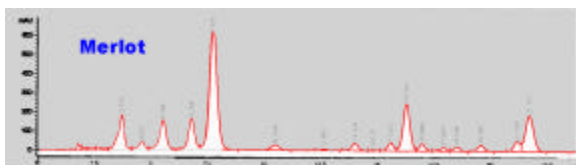
6) Ull de llebre



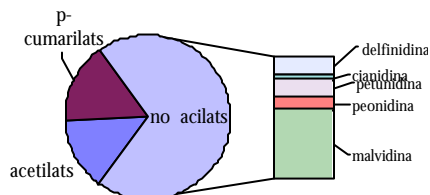
ull de llebre



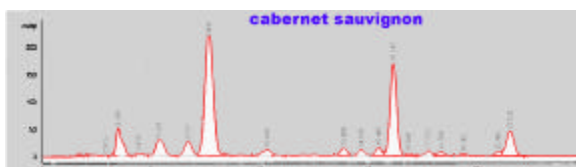
7) Merlot



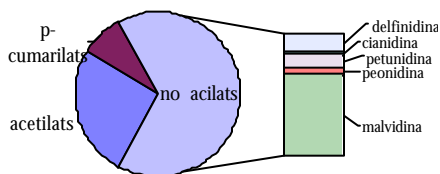
merlot



8) Cabernet sauvignon



cabernet sauvignon



Gràfica 1.4.1.3. Cromatograma i composició sectorial dels antocians no acilats, acetilats i p-cumarilats, així com dels 5 antocianidin-3-monoglucòsids, per cada una de les varietats estudiades.

El perfil antociànic de les varietats estudiades es caracteritza per la presència de 16 compostos principals, excepte en el cas del Pinot noir, que no presenta derivats acetilats, aspecte ja descrit en la bibliografia⁸¹. Les altres varietats sí presenten acilació, i aquesta difereix entre les varietats. Cabernet sauvignon es caracteritza per tenir major nivell d'acetilació, a diferència de les altres varietats, en què predominen els derivats p-cumarilats. En el cas de Cabernet sauvignon, la bibliografia recull discrepàncies en els valors. La proporció que hem trobat en aquest estudi (65% no acilats, 25% acetilats, 10% p-cumarilats) és comparable a la que troben García-Beneytez *et al.*⁹² (60:30:10) en les regions de Navarra i Aragó i als de Núñez *et al.*¹⁴⁷ també a Navarra, però s'allunyen dels que troben Castia *et al.*¹²⁰ (72:15:13) a Sardenya. Això suggereix que hi ha un efecte de la regió sobre la composició antociànica.

¹⁴⁷ Núñez, V; Monagas, M; Gómez-Cordovés, MC; Bartolomé, B. (2004). "Vitis vinifera L.cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile". *Postharvest Biol and Techn*, 31: 69-79

Les altres varietats presenten diferents percentatges en acetilació i p-cumarilació. Podem establir els següents grups:

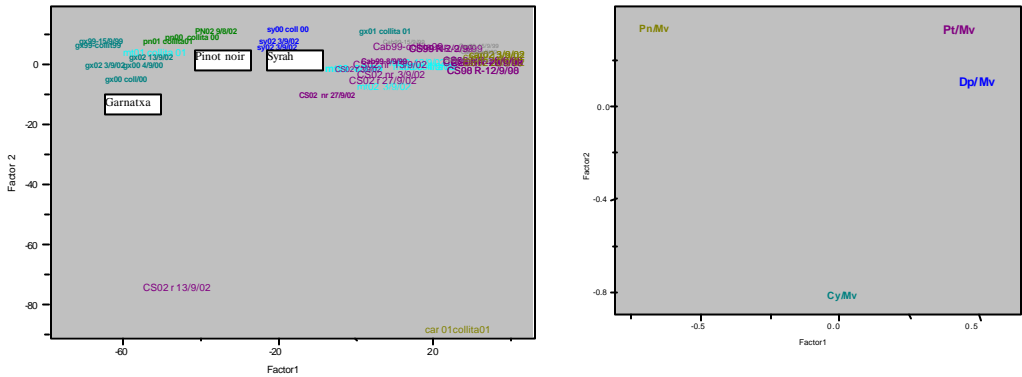
- a) Varietats amb alta p-cumarilació i baixa acetilació: Ull de llebre, Carinyena
- b) Varietats amb alta cumarilació i alta acetilació: Syrah, Merlot
- c) Varietats amb baixa p-cumarilació i baixa acetilació: Garnatxa, Monastrell
- d) Varietats amb baixa p-cumarilació i alta acetilació: Cabernet
- e) Varietats sense acilació: Pinot noir

Per tant, sembla que la proporció relativa entre els antocians acilats i els no acilats és el principal criteri que diferencia les varietats estudiades, i coincideix amb el criteri més utilitzat^{88, 81, 148} per emprar els antocians com a marcadors varietals. Aquestes relacions indicarien les activitats acetil i p-cumaroil transferasa del raïm, que serien per tant dependents de la varietat.

Alguns autors proposen també l'anàlisi de les relacions entre els antocians individuals, ja que aquestes respondrien a les activitats enzimàtiques implicades en la biosíntesi. Així, Roggero *et al.*⁸⁵ utilitzen la relació entre malvidina-3-glucòsid / peonidina-3-glucòsid, mentre que Ortega Meneder *et al.*⁸¹ calculen la relació entre malvidin-3-glucòsid/delfinidina-3-glucòsid. Baldi *et al.*¹¹¹ investiguen la relació de la suma de malvidina, petunidina i delfinidina respecte els de peonidina. Aquests paràmetres estarien relacionats amb les activitats enzimàtiques flavanoid-3'-hidroxilasa (que transforma la cianidina en delfinidina) i o-dihidroxifenil-o-metiltransferasa (responsable de la metilació que té lloc en posicions 3' i 5', que permet la transformació de cianidina en peonidina, de delfinidina a petunidina, i de petunidina a malvidina). En el cas dels treballs de Núñez *et al.*⁴⁷, aquestes relacions permeten diferenciar les varietats Graciano, Ull de llebre i Cabernet sauvignon.

De la gràfica dels loadings 1.4.1.2, podem observar que els nivells de les 5 antocianidines-monoglucòsid no juguen un paper important en la participació dels dos components principals que separen les varietats. Es va ampliar l'anàlisi estadística considerant les relacions entre aquests compostos, tal com proposa la bibliografia¹⁴⁷; de manera que es va analitzar el poder discriminant que tenien les relacions Cy/Mv; Dp/Mv, Pn/Mv, i Pt/Mv.

¹⁴⁸ Hmamouchi, M; Es-safi, N; Pellecuer, J; Essassi, EM. (1995). "Anthocyanic composition of grape skins of grape skins of four red grape varieties grown in Morocco"; *Bulletin de l'OIV*. 777-778, 907-919

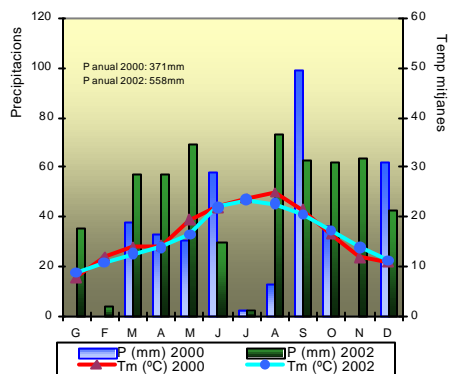


Gràfica 1.4.1.4. Gràfica dels scores i dels loadings de les varietats en la collita considerant com a variables les relacions Cy/Mv, Dp/Mv, Pt/Mv i Pn/Mv.

En el nostre cas (gràfica 1.4.1.4) , l'ús d'aquestes variable no provoca una discriminació dels 8 grups, encara que sí sembla classificar les varietats garnatxa, pinot noir i Syrah separades de la resta. De la gràfica de loadings podem extreure que en aquestes 3 varietats hi ha una relació PnG/MvG major que en les altres varietats.

En conclusió, podem establir que la utilització de mètodes quimiomètrics aplicats a l'estudi de la fracció antociànica permeten classificar les 8 varietats amb un baix percentatge de discrepàncies, malgrat que hi ha varietats que presenten certa dispersió dels valors a causa de l'efecte de l'anyada. Mancarien, doncs, estudis complementaris que permetessin establir de manera determinant aquestes classificacions.

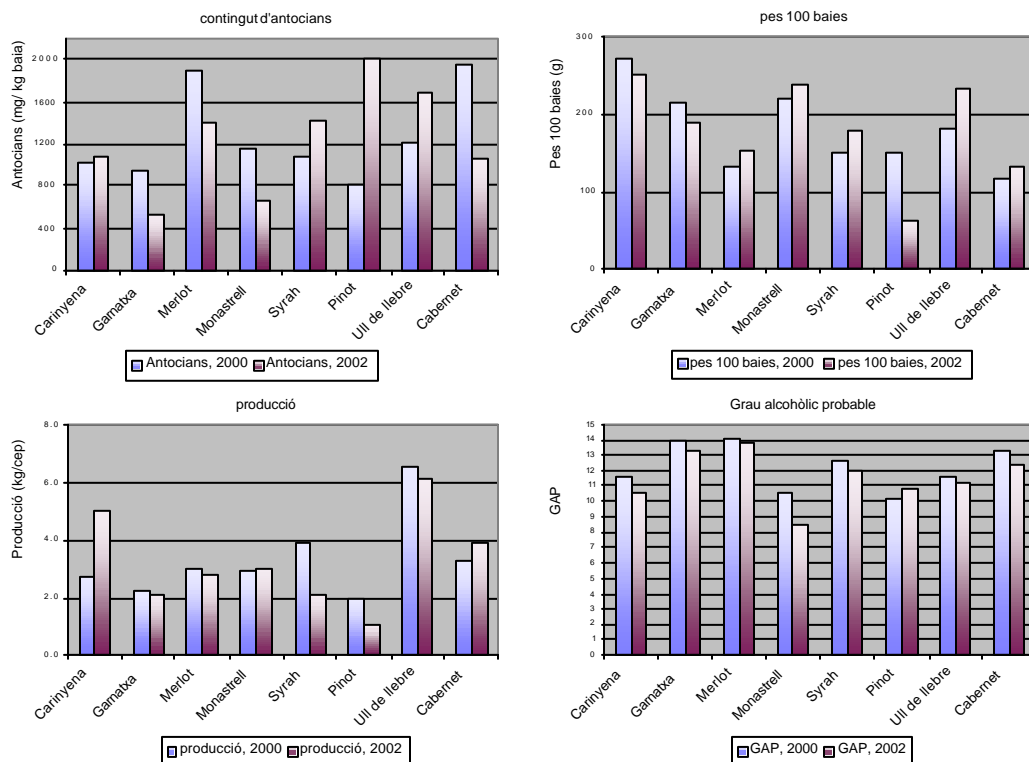
2) Antocians en data de verema i relació amb la mida de la baia



Gràfica 1.4.2.1. Diagrames climàtics dels anys 2000 i 2002

A continuació es discuteix la diferent resposta varietal en el contingut dels antocians. S'han comentat les dades de l'any 2000, un any d'estiu sec representatiu de la zona, i el 2002, que s'ha considerat molt atípic en les regions viticoles meridionals, ja que es va caracteritzar per un estiu molt temperat, en què es van enregistrar unes temperatures anormalment baixes per l'època. Igualment, hi va haver una manca d'insolació de forma continuada durant juny, juliol i agost, amb pluges consistents al llarg de tot el cicle i també al final del període de maduració (Gràfica 1.4.2.1).

En la gràfica 1.4.2.2. es recullen les dades de producció, pes de 100 baies, grau alcohòlic probable i concentració d'antocians per gram de baia.



Gràfica 1.4.2.2. Contingut d'antocians i pesos de baia per les diferents varietats en les veremes dels anys 2000 i 2002

Segons el contingut final en la verema i l'adaptació al mesoclima de Tarragona de les varietats estudiades, es poden distingir tres grups atenent la concentració d'antocians:

Grup 1: Cabernet sauvignon, Merlot i pinot, de contingut antociànic alt: varietats de baia petita que poden arribar als 1500-2000 µg antocians/ g baia. Mantenen la mida de la baia petita en les condicions de conreu i el clima de Tarragona, proporcionant valors elevats i semblants als trobats per altres autors^{95,126,128, 157}. Cabernet i Merlot mostren un nivell més elevats d'antocians en anys secs, però Pinot presenta els nivells més elevats l'any 2002 (més plujós), en el qual s'observa una mida de la baia molt petita -menys de la meitat de volum que el que presenta l'any 2000-, cosa que significa un increment de la productivitat d'antocians per baia.

Grup 2: Syrah i ull de llebre, de contingut antociànic mitjà, que es troben al voltant de 1500 µg antocians/ g baia; la primera en baies petites mitjanes, la segona, de mida de baies mitjanes grans. Presenten una resposta diferent a les altres varietats quant a la mida de la baia. L'any més plujós, malgrat augmentar la mida de la baia, contràriament al que seria d'esperar, s'afavoreix la síntesi d'antocians.

Grup 3: Garnatxa, carinyena i monastrell, de baix contingut antociànic, amb nivells que rarament superen els 1000 µg antocians/ g baia. Això contribueix tant una baixa síntesi com el fet que siguin varietats de baies grans. A més, Garnatxa qualla molt bé i la carinyena és molt fèrtil. Malgrat que es va realitzar un aclariment dels raïms de prop d'un 50%, no se n'aconsegueix millorar el grau ni el color. El mateix val a dir pel monastrell.

En general, les situacions d'estrès hídric causades per la sequera en l'any 2000 provoquen augments significatius en la quantitat d'antocians finals. La manca de disponibilitat d'aigua promou la maduració i la síntesi de compostos fenòlics^{149,150,151}. Tanmateix, per les varietats pinot noir, ull de llebre i Syrah, s'afavoreix la síntesi d'antocians l'any 2002, d'abundant nuvolositat, major i més freqüent precipitació anual i temperatures sensiblement menors que en altres anys, que indiquen un menor estrès del que és habitual

¹⁴⁹ Matthews, MA; Anderson, MM. (1988). "Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: responses to seasonal water deficits". Am J Enol Vitic 39, 313-320

¹⁵⁰ Jackson, DI; Lombard, PB. (1993). "Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality – a review". Am J Enol Vitic, vol 44, n°4, 409-429

¹⁵¹ Peterlunger, E; Sivilotti, P; Bonetto, C; Paladin, M. (2002). "Water stress induces changes in polyphenol concentration in Merlot grapes and wines". Riv Vitic. Enol. N°1: 51-66

durant els estius en la nostra zona d'estudi. (gràfica 1.4.2.1). Podríem inferir de la situació climàtica del 2000 que les condicions de sequera apuntarien a un detriment de la síntesi per les esmentades varietats.

Altres consideracions a fer són que Pinot es verema molt aviat i per tant, no està afectat per les precipitacions, però sí en canvi per les baixes temperatures durant el verolament, que podrien ser la causa de la mida de baia petita que comporta un augment de 800 µg/baia en el 2000 a 1500 µg/baia d'antocians en el 2002. Pinot noir és una varietat de cicle molt curt que es desenvolupa de forma adient en els mesoclims de la Champagne, característiques que són difícils de trobar en la viticultura meridional mediterrània.

Garnatxa, carinyena i monastrell són varietats de cicle llarg que en el sòl fèrtil i el mesoclima de Tarragona no tenen possibilitat d'arribar al seu òptim de maduració fisiològica. Monastrell gairebé sempre es podreix, raó per la qual es va optar el 2002 per destinar-la a produir vi per cava i veremar-la un mes abans de l'habitual.

Sembla clar, doncs, que hi ha un fort efecte de l'anyada i la climatologia en el contingut d'antocians final. Cacho *et al*¹²⁶ també remarquen aquest fort efecte, que implica diferents nivells finals d'antocians en verema, registrant-se entre un 50% i 100% de diferències en comparar dos anys en les varietats garnatxa, ull de llebre i monastrell. Sorprenentment, per a l'ull de llebre cultivat a Somontano s'obtenen concentracions menors d'antocians en l'anyada de més sequera, amb unes baies de volum molt menor. En el present estudi a Tarragona, s'observen uns resultats en el mateix sentit en ull de llebre. Molt més acusada - més del 100% d'antocians totals l'any menys sec - és la diferència que es produeix per la garnatxa a Calatayud¹²⁶, però al contrari que en ull de llebre, el pes de la baia disminueix lleugerament l'any més plujós. A Tarragona, també disminueix lleugerament el pes de la baia de garnatxa en any plujós, però el contingut d'antocians disminueix dràsticament, comportament que s'observa en la majoria de les varietats estudiades. Esteban *et al*¹⁵⁷, en ull de llebre plantat a Madrid observen resultats evidents d'una major síntesi d'antocians l'anyada de més sequera amb una mida de baies notablement menor en comparar-ho amb l'any més plujós, a l'inrevés de l'observat a Tarragona.

L'any més plujós implica en la majoria de les varietats una disminució del grau alcohòlic probable (gràfica 1.4.2.2), però tanmateix les produccions per cep són variables

segons les varietats i anys i no segueixen un patró comú. Diversos estudis senyalen una correlació entre el contingut en sucres i el contingut en antocians^{152,153}, i és observable en els nostres estudis, a excepció del cas de garnatxa i Syrah, a causa d'una disminució brusca final d'antocians producte de les precipitacions en el 2002 i en el 2000, respectivament.

A la vista d'aquests resultats, cal considerar l'efecte de l'ecosistema, la unitat de terrer bàsic (sòl + clima), que implica per una banda un comportament de les varietats diferent en funció de la zona vitícola (diferents contingut d'antocians en una mateixa varietat i diferent dinàmica de síntesi), i per l'altra, que la concentració final d'antocians es pot modificar acusadament d'un any a altre per a una mateixa varietat¹¹⁹.

3) Antocians individuals en data de collita segons l'anyada

L'observació que l'anyada canvia el contingut total d'antocians es completa en les següents taules, en què es recullen els canvis en el moment de la verema dels antocians individuals:

	Саргуепа 2000	Саргуепа 2002		Гарнатха 2000	Гарнатха 2002	
Делфи́дина	16.5	16.9		5.4	4.2	±
Сиа́рдина	2.2	1.6		5.0	2.5	±
Пету́сдина	15.4	14.9		6.6	5.2	±
Пе́сидина	4.2	4.1		24.7	15.9	±
Ма́лвина	61.6	62.5		58.3	72.3	±
Не а́целат	67.4	72.9	±	89.9	86.9	
А́целат	2.8	3.1		0.5	2.2	
p-cumáлат	29.8	23.9	±	9.7	10.1	

¹⁵² GonzalezSanJose, ML; Diez, C. (1992). "Relationship between anthocyanins and sugars during the ripening of grape berries". *Food Chemistry*, 43(3): 193-197

¹⁵³ Hrazdina, G; Parsons, GF; Mattick, LR. (1986). "Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries". *Am J Enol Vitic* 35 (4): 220-227

	Monastrell 2000	Monastrell 2002	
Delfinidina	11.5	12.6	
Cianidina	8.9	4.2	s
Fenilaceticidina	15.2	16.2	
Fenilaceticidina	11.8	6.4	s
Malvidina	52.5	60.6	s
No acilats	82.8	90.8	s
Acetilats	2.9	3.4	
p-cumarilats	14.3	5.8	s

	Medot 2000	Medot 2002	
Delfinidina	15.7	17.6	
Cianidina	4.1	3.9	
Fenilaceticidina	14.0	13.9	
Fenilaceticidina	10.3	11.6	
Malvidina	55.8	53.0	s
No acilats	69.6	69.9	
Acetilats	14.4	19.4	s
p-cumarilats	16.0	10.7	s

	Pinot 2000	Pinot 2002	
Delfinidina	4.4	6.1	s
Cianidina	1.4	2.8	s
Fenilaceticidina	6.8	7.9	s
Fenilaceticidina	14.0	22.4	s
Malvidina	73.4	60.9	s
No acilats			
Acetilats			
p-cumarilats			

	Syrah 2000	Syrah 2002	
Delfinidina	6.1	12.7	s
Cianidina	1.4	1.9	
Fenilaceticidina	10.0	13.6	s
Fenilaceticidina	11.1	11.5	
Malvidina	71.3	60.2	s
No acilats	39.5	55.9	s
Acetilats	17.2	14.6	s
p-cumarilats	43.3	29.5	s

	Ull de llebre 2000	Ull de llebre 2002	
Delfinidina	18.3	22.0	s
Cianidina	2.8	6.4	s
Fenilaceticidina	16.2	17.4	
Fenilaceticidina	5.3	10.8	s
Malvidina	57.4	43.4	s
No acilats	73.2	57.4	s
Acetilats	3.1	6.0	s
p-cumarilats	23.6	36.6	s

	Cabernet sauvignon 2000	Cabernet sauvignon 2002	
Delfinidina	16.2	16.4	
Cianidina	1.5	7.3	s
Fenilaceticidina	11.3	10.4	
Fenilaceticidina	5.2	17.1	s
Malvidina	65.8	48.7	s
No acilats	65.4	72.5	s
Acetilats	26.1	20.6	s
p-cumarilats	8.5	6.9	

Taules 1.4.2.1. Composició antocianica segons la varietat en el moment de verema. Es recull la composició percentual de les antocianidin-3-glucòsid respecte del total de no acilats; i dels antocians no acilats, acetilats i p-cumarilats en relació als antocians totals. "s" indica diferències significatives.

Com es pot observar, hi ha una variabilitat de la composició antociànica segons l'anyada. Això concorda també amb la informació que oferia l'anàlisi de components principals, en què es podia observar que les diferents mostres de collita abarcaven una zona àmplia de la representació dels scores, tot i que això no impedia la capacitat de dita anàlisi de separar les varietats.

En la majoria de casos, l'any sec (2000) ha promogut un increment dels nivells relatius d'acilació, que es manifesten en cada varietat segons quin sigui l'agent acilant majoritari. Les úniques excepcions a aquest fet són la garnatxa, en què no hi ha diferències significatives, i l'ull de llebre, que com ja hem comentat, en anys secs està especialment mal adaptat.

Aquestes observacions es corresponen amb les de Freeman i Kliewer¹⁵⁴ i les de Matthews *et al.*¹⁵⁵ o les d'Escalona¹⁵⁶ en el sentit que les situacions rigoreses de manca d'aigua promouen l'acilació dels antocians.

Quant a les 5 antocianidines, per a les quals també està descrit un canvi en l'acumulació segons la disponibilitat hídrica, els resultats no són tan determinants. En general, en un any sec hi ha major proporció de malvidina, tot i que en Garnatxa i monastrell s'observa el contrari. Aquest increment de la malvidina suposa una disminució dels altres antocians. Convé recordar que la major acumulació de malvidina correspondria a un ple funcionament de la via biosintètica, ja que aquest antocià n'és el producte final. En els treballs de Ryan *et al.*¹⁶⁰ també es comenta la disminució dels continguts en delfinidina i petunidina, que associen a les condicions climàtiques de l'any, en el sentit que en anys relativament frescos són superiors que en anys càlids. En els nostres resultats, es compleix aquesta afirmació a excepció de les varietats carinyena, Cabernet sauvignon i Merlot; però en no ser els únics antocians que veuen disminuïda la seva concentració, mancarien efectuar més estudis per assegurar que en aquesta regió es compleixi aquest comportament.

¹⁵⁴ Freeman, BM; Kliewer, WM. (1983). "Effect of irrigation, crop level and potassium fertilization on Carignan vines. II. Grape and wine quality"; *Am J Enol Vitic* 34: 197-207

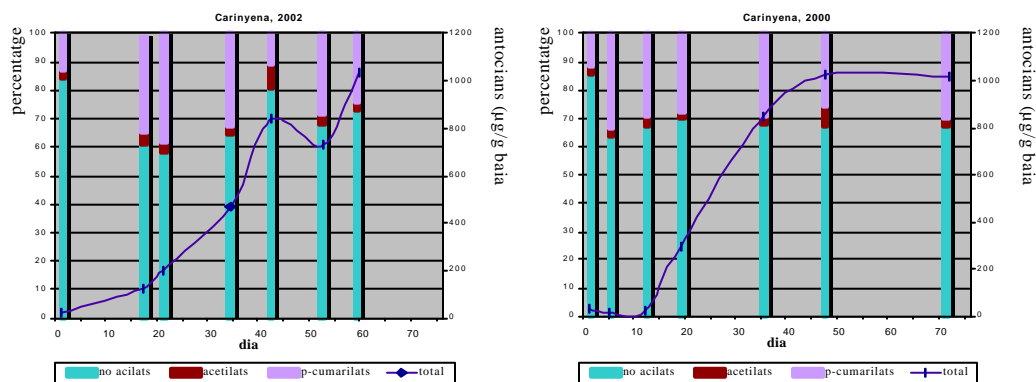
¹⁵⁵ Matthews MA; Anderson, M. (1989). "Reproductive development in grape (*Vitis vinifera* L.): responses to seasonal water deficits". *Am J Enol Vitic*. 40: 52-60

¹⁵⁶ Escalona, JM. (2003). "Respuestas de la vid frente al déficit hídrico: efectos sobre la fotosíntesis y la transpiración en hoja y en planta entera y su repercusión en la calidad del fruto"; *Tesi Doctoral*; Dep Biologia UIB

4) Evolució dels antocians durant la maduració

En les següents gràfiques presentarem l'evolució en el contingut d'antocians per a les 8 varietats negres estudiades durant dos anys d'estudi, el 2000 i el 2002; el primer correspon a un any sec mentre que el segon és un any plujós. Aquesta evolució es representa en un gràfic lineal que recull el contingut en antocians totals (eix secundari), i per cada punt d'anàlisi s'aporta un gràfic de barres (eix principal) on es mostren els percentatges d'antocians no acilats (els 3-monoglucòsids) i els antocians acetilats i p-cumarilats. En l'eix d'abscises es representa el dia a partir del primer mostreig, que correspon al moment del verolament. Així, per cada punt tenim recollit tant el contingut total com la composició. Posteriorment discutirem amb més detall la composició, ampliant l'estudi als diferents antocians individuals.

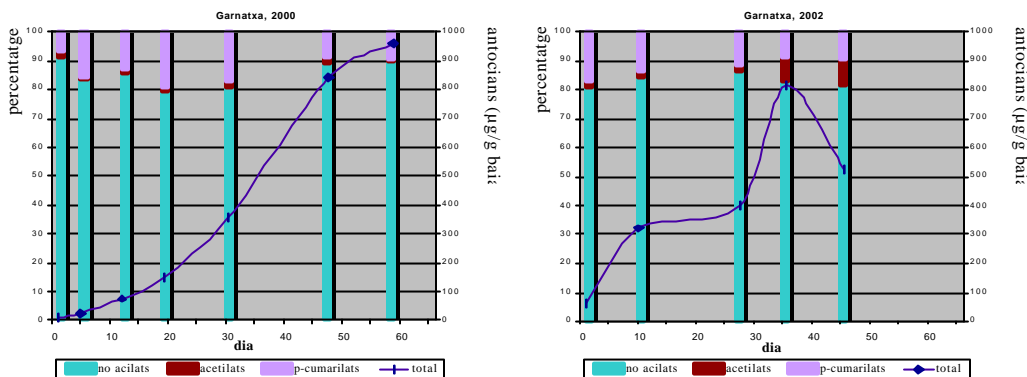
3.1. Carinyena.



Gràfica 1.4.4.1. Evolució en la varietat Carinyena dels antocians totals i desglossament en els percentatges d'antocians no acilats, acetilats i p-cumarilats al llarg de les campanyes 2000 i 2002

En carinyena, la data del primer mostreig correspon al 24 i 20 de juliol per a l'any 2000 i 2002, respectivament; i la de verema, al 20 de setembre i 14 de setembre. Quant a concentració d'antocians en baia, arriba a uns valors al voltant dels 1000 µg/g baia. Cal tenir en compte que aquesta varietat presenta un volum de baia gran, cosa que significa que els nivells per pell (sobre els 10 mg/g pes fresc de pell en data de verema) resulten relativament més elevats que per altres varietats amb menor volum de baia. Com es pot apreciar, l'any 2000 assoleix al cap de poc el seu màxim d'antocians, mentre que en el 2002 té un comportament més erràtic.

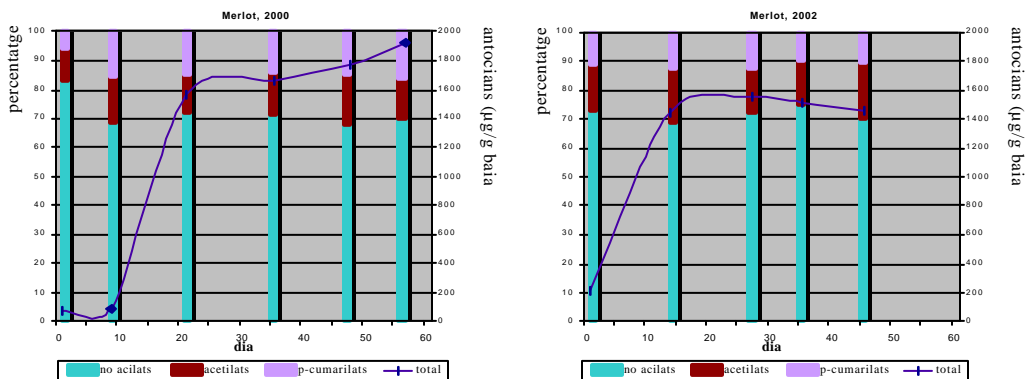
3.2. Garnatxa



Gràfica 1.4.4.2. Evolució en la varietat Garnatxa dels antocians totals i desglossament en els percentatges d'antocians no acilats, acetilats i p-cumarilats al llarg de les campanyes 2000 i 2002

La Garnatxa és una varietat de gra gran que presenta poca concentració d'antocians, malgrat que l'any 2000 va assolir uns nivells de 1000 $\mu\text{g/g}$ baia. En pells, és la varietat que presenta uns valors més baixos (6000 $\mu\text{g/g}$ pell en el 2000, i només 2500 $\mu\text{g/g}$ pell en el 2002). En el 2002, el primer mostreig es va fer quan ja estava avançat el verolament, el 31 de juliol, motiu pel qual s'escurça l'eix d'abscisses en la gràfica. El 2000, el primer mostreig es va efectuar el 20 de juliol, i no fou fins al moment de la collita que s'havia assolit el màxim en antocians. En canvi, en el 2002 hi va haver una davallada producte de les precipitacions dels mesos d'estiu, que van diluir el contingut.

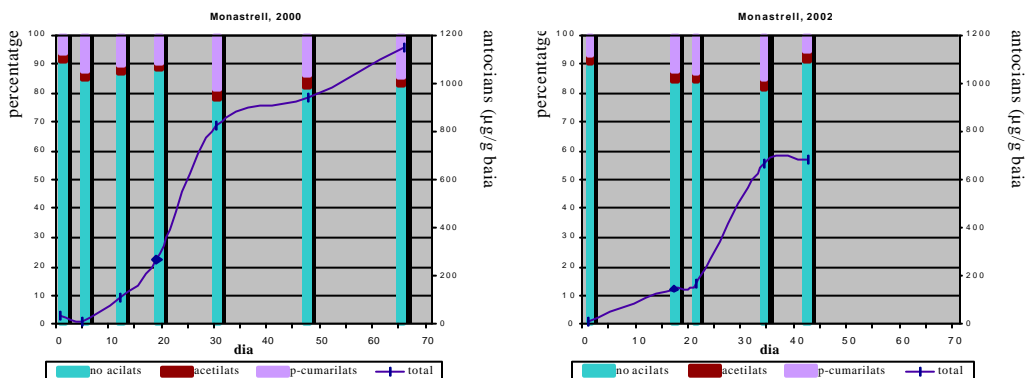
3.3. Merlot



Gràfica 1.4.4.3. Evolució en la varietat Merlot dels antocians totals i desglossament en els percentatges d'antocians no acilats, acetilats i p-cumarilats al llarg de les campanyes 2000 i 2002

Merlot és una varietat de gra petit que dóna uns valors elevats d'antocians per baia. En aquest cas, també les concentracions màximes es van assolir la campanya'2000 (al voltant de 2000 µg/ g baia. És, doncs, una varietat rica en contingut antociànic i, de fet, d'entre totes les estudiades, és la que dóna majors rendiments per pell (15 mg/g pes fresc). Com en el cas de la Garnatxa, el primer mostreig va resultar relativament tard, el 31 de juliol, en comparació amb el primer mostreig del 2000, que s'efectuà el 20 de juliol.

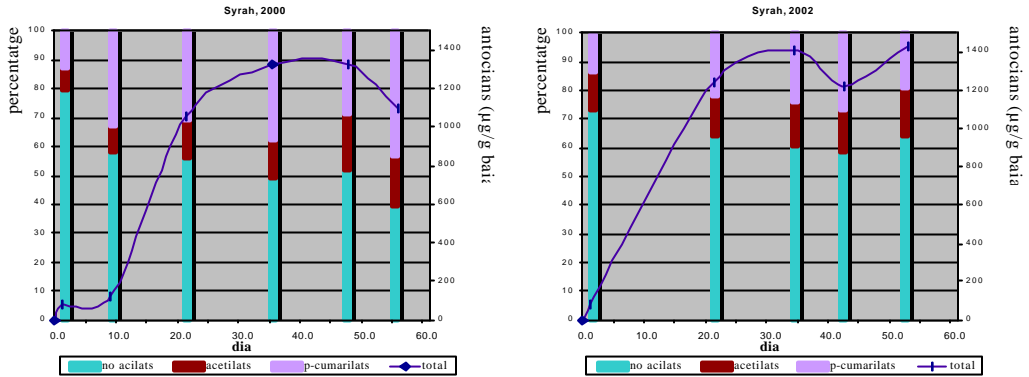
4. Monastrell



Gràfica 1.4.4.4. Evolució en la varietat Monastrell dels antocians totals i desglossament en els percentatges d'antocians no acilats, acetilats i p-cumarilats al llarg de les campanyes 2000 i 2002

Monastrell és una varietat de gra gran, de manera que els valors al voltant de 1000 µg/g baia signifiquen uns valors d'aproximadament 7000 µg/g pell. En l'any 2002, el seu contingut va augmentant gradualment i presenta un punt d'inflexió 15 dies abans de la seva verema. De fet, aquest any 2002 es va avançar la verema d'aquesta varietat per destinar-la a l'elaboració de blanc de noirs, per la qual cosa encara no havia assolit el seu màxim contingut antociànic.

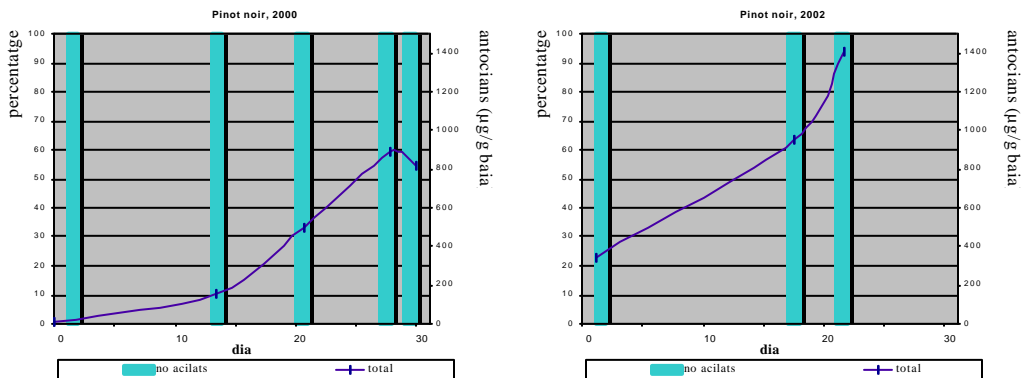
5. Syrah



Gràfica 1.4.4.5. Evolució en la varietat Syrah dels antociànics totals i desglossament en els percentatges d'antociànics no acilats, acetilats i p-cumarilats al llarg de les campanyes 2000 i 2002

Syrah és, amb Merlot, la varietat que majors quantitats d'antociànics acumula en la pell (sobre els 13000 µg/g pell), que en ser de gra petit, es manifesten en uns valors de sobre 1300 µg/g baia. En aquesta varietat, el contingut d'antociànics augmenta molt ràpidament en el primer mes (el primer mostreig correspon al 20- 24 de juliol), i després s'estabilitza i fins i tot pot patir lleugeres oscil·lacions segons la pluviometria.

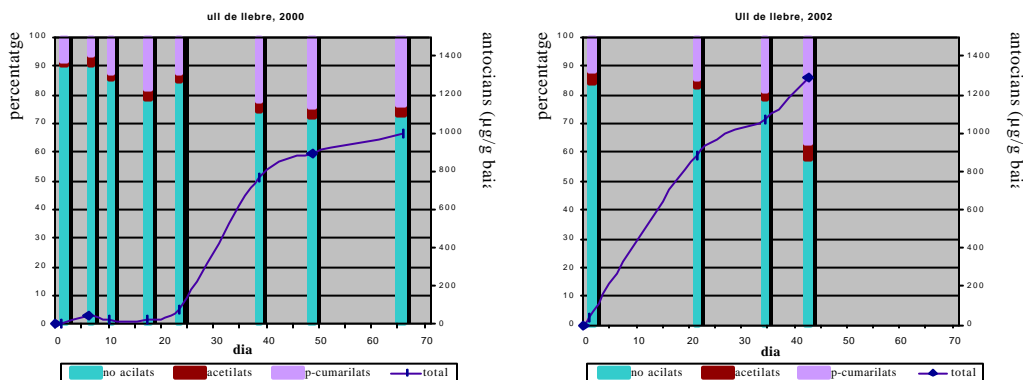
6) Pinot noir



Gràfica 1.4.4.6. Evolució en la varietat Pinot noir dels antociànics totals i desglossament en els percentatges d'antociànics no acilats, acetilats i p-cumarilats al llarg de les campanyes 2000 i 2002

Pinot noir és una varietat que es caracteritza per aportar poc color i no presentar acilació. Els valors anormalment alts de la campanya 2002 s'atribuïrien bàsicament a un baix pes de les baies en l'època de collita. Aquesta varietat es destina a la producció de vins escumosos, i per aquest motiu es verema precoçment, motiu pel qual la seva gràfica d'evolució resulta tan curta.

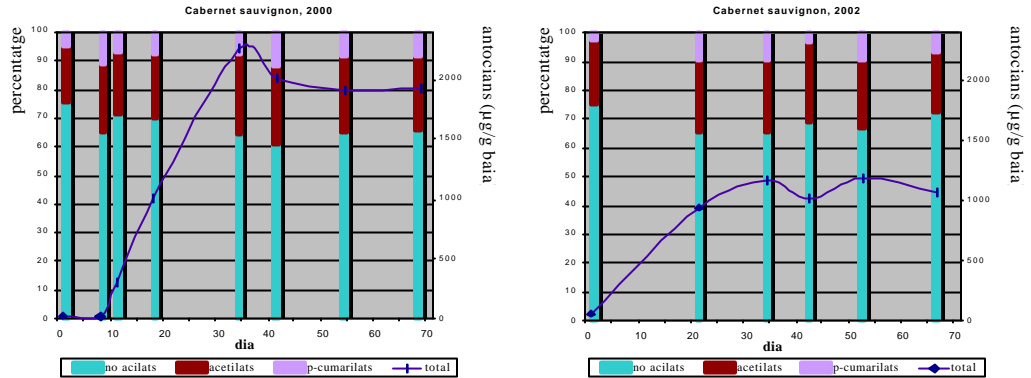
7. Ull de llebre



Gràfica 1.4.4.7. Evolució en la varietat Ull de llebre dels antocians totals i desglossament en els percentatges d'antocians no acilats, acetilats i p-cumarilats al llarg de les campanyes 2000 i 2002

En ull de llebre, la primera mostra del 2000 es va agafar amb molta anticipació (12 de juliol, en comparació al 24 de juliol del 2002, quan es realitzà el primer mostreig per a la campanya 2002), quan hi havia una molt petita proporció de baies verolades. Per aquest motiu, al llarg del primer mes no hi ha pràcticament increment d'antocians, ja que per aquesta varietat transcorre molt de temps fins que totes les baies estan verolades. Els nivells d'antocians en les pells són força elevats (13 mg/g pes fresc de pell), però en ser de baia gran, els continguts globals per baia la classificarien com una varietat de contingut antociànic mitjà, per sota de les de Syrah, Merlot o Cabernet sauvignon.

8. Cabernet sauvignon



Gràfica 1.4.4.8. Evolució en la varietat Cabernet sauvignon dels antocians totals i desglossament en els percentatges d'antocians no acilats, acetilats i p-cumarilats al llarg de les campanyes 2000 i 2002

Cabernet és la darrera varietat que es verema, a finals de setembre (dies 26 i 27 pels anys 2000 i 2002, respectivament). Com en altres varietats d'alta concentració (Merlot, Syrah), l'increment en el contingut d'antocians és ràpid en el primer mes, per després establir-se i sofrir lleugeres oscil·lacions i disminucions segons l'anyada.

Discussió general

La dinàmica d'acumulació dels antocians durant la maduració segueix en les 2 anyades un comportament en el qual es poden establir algunes similituds:

1- Després del verolament té lloc una breu etapa d'augment lent dels antocians totals, seguida d'un increment exponencial durant el primer mes, al final del qual s'han sintetitzat pràcticament el 75% del total d'antocians que es presenten en la verema. L'increment es dona a diferent velocitat segons les varietats:

a) en Merlot, Syrah, cabernet i pinot, augmenta ràpidament el contingut d'antocians totals un cop comencen a tintar els raï ms. A causa d'aquesta elevada velocitat de síntesi, s'assoleix el 75% del contingut final en només dues setmanes després del verolament.

b) en ull de llebre, carinyena, garnatxa i monastrell, la síntesi es produeix de forma més pausada i es perllonga durant un mes.

Aquesta velocitat està molt relacionada amb el temps que triga la varietat a assolir el 100% de baies verolades. En Merlot, Cabernet i Syrah aquest procés resulta més ràpid, i això fa que també augmenti més ràpidament el contingut en antocians, ja que aquests estan només presents en les baies verolades.

2- A meitat del període de maduració s'alenteix la síntesi i s'estabilitza el nivell d'antocians acumulats.

3- El comportament de la corba en l'etapa més propera a la verema és diferent segons les varietats i segons l'anyada:

L'any 2000:

- a) en monastrell i garnatxa, dues setmanes abans de la verema segueix augmentant lentament la concentració d'antocians.
- b) en carinyena, Merlot, i Cabernet, pràcticament s'estabilitzen les concentracions cap al final de la maduració
- c) en ull de llebre, Syrah i pinot s'observa certa disminució del contingut d'antocians totals, de manera que el màxim nivell d'antocians s'havia aconseguit una setmana i mitja abans de la verema.

L'any 2002:

En aquest any s'enregistren abundants precipitacions en primavera i també de més de 60 mm durant els mesos d'agost i setembre, que afecten el raï m en la darrera fase de maduració, la més propera a la verema, tant en les varietats més primerenques (ull de llebre, Syrah), com en les d'època mitjana de maduració (Merlot, garnatxa) o en les més tardanes (carinyena, Cabernet sauvignon). Ara bé, podem establir diferències en la resposta segons la varietat:

- a) en carinyena i Syrah, es dona una davallada de la concentració d'antocians de la qual es recuperen en data de verema
- b) en monastrell, Merlot, Cabernet sauvignon, i ull de llebre disminueix lleugerament la concentració final.
- c) en garnatxa, representa una disminució final molt notable.
- d) en pinot, en canvi, provoca un increment considerable.

La resposta de la varietat ull de llebre en el 2000 és la mateixa que l'observada per Cacho *et al.*¹²⁶: una setmana abans de la verema es concentren els nivells màxims d'antocians en els dos anys d'estudi, malgrat la diferència de clima evident entre les dues anyades. En canvi, en la varietat garnatxa s'obté un comportament d'increment continu en un any en què hi hagué pluges abundants abans de la verema, mentre que s'estanca en cas que les pluges primaverals eren més febles. I per monastrell, es pot donar o no una saturació poc abans de la verema malgrat que les condicions climàtiques siguin similars. Contràriament, en els resultats presentats per Gonzalez San José *et al.*⁸⁸, durant la maduració es produeix una acumulació continuada dels antocians lliures fins a la verema. El mateix augment progressiu fins el final de la maduració té lloc en el ull de llebre en dues anyades diferents i consecutives segons els estudis d' Esteban *et al.*¹⁵⁷. Jordao *et al.* també obtenen aquest comportament sense disminució en els nivells dels antocians en la varietat Touriga Francesa a Portugal¹²⁹.

De totes aquestes observacions es desprèn que el patró d'acumulació d'antocians totals difereix amb el cultiu i amb l'anyada, entre altres factors agroecològics. Segons aquestos, s'obtindrà una evolució en 3 fases (increment lent, ràpid augment, i estabilització), descrita per la majoria d'autors; però també es pot donar una situació d'increment constant abans d'arribar a la verema. Tenint en compte que el contingut d'antocians després de la verema disminueix, associat a la sobremaduració de les baies¹²⁹, indicaria que en aquelles varietats que encara presenten una corba d'increment en els nivells d'antocians en el moment de veremar estan en el punt de maduresa tecnològica, però no encara en el de maduresa fenòlica o, més concretament, en el d'antociànica. Per tant, podem inferir que l'efecte de l'anyada incidiria principalment en la maduració fenòlica del raï m.

¹⁵⁷ Esteban, M. A.; Villanueva, M. J.; Lissarrague, J. R. (2001). "Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening". *J Sci Food Agric* ; 81 (4) 409-420

5) Variacions dels antocians individuals al llarg de la maduració

Dels apartats 1.4.1 i 1.4.2 sembla observar-se una correspondència entre el percentatge d'acilació que presenta la varietat i el seu contingut antociànic. Així, varietats com Cabernet sauvignon, Syrah o Merlot, que tenen una elevada participació d'estructures antociàniques acilades, també tenen uns nivells alts d'antocians. En canvi, varietats com garnatxa o monastrell, amb molt poc grau d'acilació, tenen un contingut en antocians força més baix. Per Pinot noir també es compleix aquesta sentència, excepte en l'anòmalment elevat valor d'antocians registrat l'any 2002. Mancarien més estudis per tal d'arribar a establir si hi ha realment una connexió a nivell molecular que justifiqui aquest fenomen, i discernir si es tracta d'una casualitat, d'un efecte promotor dels antocians acilats de les vies de síntesi d'antocians - ja sigui per desaparició de producte o per activació enzimàtica- o d'un efecte d'increment de les activitats aciltransferases concomitant a la síntesi d'antocians.

Per altra banda, en les diferents varietats hi ha un canvi dels percentatges d'antocians acilats al llarg de la maduració. En la següent taula es representen aquestes variacions:

	Dp-3-glu	Cy-3-glu	Pt-3-glu	Pn-3-glu	Mv-3-glu	TOTAL 3-glucòsid	TOTAL ac-glu	TOTAL pc-glu
Carinyena 20/7	19.0±0.8	8.3±0.2	13.7±1.1	10.9±0.1	33.3±0.8	85.2± 0.9	3.3± 0.1	11.5± 1.0
Carinyena 31/7	10.2±0.7	2.1±0.2	9.2±0.7	3.6±0.9	42.2±1.8	67.3± 2.0	3.1± 0.7	29.6± 1.4
Carinyena 23/8	12.5±1.5	1.2±0.2	11.3±1.1	2.7±0.4	40.3±0.5	68.0± 3.4	2.6± 0.3	29.4± 3.1
Carinyena collita	11.1±0.2	1.5±0.1	10.4±0.3	2.8±0.1	41.5±1.3	67.4± 1.8	2.8± 0.3	29.8± 1.6
	Dp-3-glu	Cy-3-glu	Pt-3-glu	Pn-3-glu	Mv-3-glu	TOTAL 3-glucòsid	TOTAL ac-glu	TOTAL pc-glu
Merlot 20/7	23.0±0.4	16.2±0.7	12.9±0.1	12.2±0.7	19.0±1.0	83.3± 0.7	10.9± 0.1	5.8± 0.5
Merlot 9/8	14.9±0.4	3.7±0.5	11.5±0.2	6.4±0.4	35.6±1.1	72.0± 0.2	13.4± 0.2	14.5± 0.5
Merlot 23/8	13.4±1.8	3.8±1.0	10.9±1.0	8.1±1.7	35.2±2.5	71.5± 3.0	14.4± 0.8	14.1± 2.3
Merlot collita	10.9±1.2	2.8±0.2	9.8±0.8	7.2±0.5	38.8±1.0	69.6± 2.1	14.4± 0.3	16.0± 1.8
	Dp-3-glu	Cy-3-glu	Pt-3-glu	Pn-3-glu	Mv-3-glu	TOTAL 3-glucòsid	TOTAL ac-glu	TOTAL pc-glu
Syrah 20/7	15.5±1.0	3.7±0.3	13.9±0.4	8.9±1.4	37.3±2.4	79.3± 2.0	8.2± 0.4	12.5± 2.2
Syrah 9/8	6.0±0.8	0.8±0.2	7.7±0.8	3.8±0.7	37.8±1.7	56.1± 4.2	13.1± 0.6	30.8± 4.4
Syrah 23/8	4.1±0.4	0.8±0.2	5.7±0.5	3.5±0.7	35.2±1.2	49.3± 2.8	12.7± 0.3	38.0± 2.6
Syrah collita	2.4±0.6	0.5±0.4	4.0±0.8	4.4±1.5	28.2±4.4	39.5± 7.5	17.2± 1.3	43.3± 6.6
	Dp-3-glu	Cy-3-glu	Pt-3-glu	Pn-3-glu	Mv-3-glu	TOTAL 3-glucòsid	TOTAL ac-glu	TOTAL pc-glu
Pinot 24/7	5.9±0.6	1.7±0.1	8.2±0.7	12.2±0.7	71.9±0.7	100	0	0
Pinot 31/7	4.8±0.5	1.3±.3	7.1±0.5	12.1±2.4	74.7±3.5	100	0	0
Pinot 9/8	4.4±0.5	1.4±0.2	6.8±0.6	14.0±0.8	73.4±1.9	100	0	0

	Dp-3-glu	Cy-3-glu	Pt-3-glu	Pn-3-glu	Mv-3-glu	TOTAL 3-glucòsid	TOTAL ac-glu	TOTAL pc-glu
Monastrell 20/7	19.0±0.7	13.2±1.1	15.5±1.1	10.7±0.7	32.2±1.6	90.6±0.8	3.1±0.3	6.3±0.6
Monastrell 31/7	16.9±1.2	11.9±6.9	16.2±1.2	6.2±0.7	35.8±8.6	87.0±1.1	2.5±0.6	10.5±0.5
Monastrell 18/8	14.2±0.8	3.2±1.3	13.9±0.9	4.9±1.3	41.4±1.1	77.6±3.8	3.6±0.2	18.9±3.6
Monastrell collita	9.5±0.6	7.4±1.7	12.6±0.3	9.8±1.9	43.5±3.4	82.8±1.5	2.9±0.2	14.3±1.6

	Dp-3-glu	Cy-3-glu	Pt-3-glu	Pn-3-glu	Mv-3-glu	TOTAL 3-glucòsid	TOTAL ac-glu	TOTAL pc-glu
Garnatxa 20/7	7.1±0.1	6.1±0.3	7.3±0.1	29.2±1.4	41.5±1.5	91.2±1.2	2.0±0.1	6.8±0.1
Garnatxa 31/7	4.8±0.6	2.3±0.5	6.1±0.3	15.5±1.8	56.9±2.4	85.6±1.5	1.6±0.5	12.8±1.1
Garnatxa 18/8	3.6±0.3	1.4±0.1	4.6±0.3	12.2±0.2	58.5±0.4	80.3±0.8	2.7±0.1	17.0±0.8
Garnatxa collita	4.9±0.6	4.5±0.4	5.9±0.5	22.2±4.1	52.4±3.5	89.9±0.9	0.5±0.4	9.7±0.3

	Dp-3-glu	Cy-3-glu	Pt-3-glu	Pn-3-glu	Mv-3-glu	TOTAL 3-glucòsid	TOTAL ac-glu	TOTAL pc-glu
Ull 12/7	7.6±1.7	10.3±2.9	11.1±1.8	17.8±3.0	43.3±4.3	90.1±3.7	1.5±0.2	8.3±3.5
Ull 28/7	15.6±2.7	3.1±0.7	12.7±1.5	4.1±0.7	43.0±2.4	78.4±3.1	3.6±0.5	18.0±3.4
Ull 18/8	13.9±0.7	1.8±0.1	12.0±0.4	3.8±0.1	40.5±0.7	71.9±1.6	3.4±0.2	24.7±1.5
Ull 14/9	13.3±2.0	2.0±0.4	11.8±1.5	3.8±0.2	41.7±0.5	72.7±3.7	3.0±0.2	24.3±3.5

	Dp-3-glu	Cy-3-glu	Pt-3-glu	Pn-3-glu	Mv-3-glu	TOTAL 3-glucòsid	TOTAL ac-glu	TOTAL pc-glu
Cabernet 21/7	17.4±1.1	13.5±1.9	9.7±0.7	14.1±1.6	20.6±2.6	75.3±1.0	19.7±0.4	5.0±0.7
Cabernet 27/8	15.7±1.6	3.9±1.0	9.7±0.5	5.7±0.8	34.7±2.9	69.7±1.3	22.8±3.1	7.5±2.5
Cabernet 30/8	10.2±0.3	1.3±0.1	7.4±0.2	3.9±0.2	37.7±0.7	60.4±0.6	27.8±0.6	11.8±0.2
Cabernet 26/9	10.6±0.6	1.0±0.3	7.4±0.5	3.4±0.5	43.0±1.1	65.4±1.6	26.1±1.4	8.5±0.4

Taula 1.1.5.1. Comparació dels percentatges en els diferents antocians al llarg de la maduració

Com es pot apreciar, en totes les varietats hi ha un canvi en la composició en avançar la maduració. En totes elles hi ha un increment en el nivell dels antocians acilats (“Total ac-glu”, “Total pc-glu”) entre el dia del verol i el dia de la verema. Especialment marcat és aquest efecte en el cas de Syrah, en què es passa d’una proporció de 80% d’antocians sense acilar (“Total 3-glu”) a només un 40%. Altres autors, com Piergiovanni *et al.*¹⁵⁸ també indiquen aquest increment dels nivells d’antocians acilats des del verolament fins a la verema. Només en l’evolució de la varietat Castelao Francesa descrita per Jordao *et al.*¹²⁹ a Portugal s’aprecia una disminució dels nivells d’antocians acilats al llarg de la maduració.

L’increment generalitzat de la formació d’antocians acilats al llarg de la maduració confirma que la reacció d’acilació té lloc de manera posterior a les reaccions de formació dels antocians, i que l’esterificació sobre la glucosa té lloc quan aquesta ja està unida a l’antocià.

¹⁵⁸ Piergiovanni, L.; Volonteiro, G. (1983). “Studio della frazione antocinaica delle uva”. *Tecnol Aliment-Imbottigliamento*, 6: 22-28

Un altre argument a favor de la posterioritat de la reacció d'acilació prové de la constatació de la similitud en la distribució relativa de les 5 antocianidines tant entre els antocians monoglucòsids no acilats com entre els antocians acilats.

El fet que en algunes varietats (monastrell, garnatxa, i Cabernet) hi hagi una disminució de l'acilació en els darrers dies sembla corroborar aquesta hipòtesi, ja que podria indicar que continua la síntesi d'antocians malgrat no es disposi d'agent acilant. Aquest ampli declivi dels antocians acilats abans de la maduresa fisiològica el troben també altres autors com González-SanJosé *et al.*¹⁵⁸ i, en menor extensió, Fernández-López *et al.*¹⁵⁹.

L'acilació pot ser important per al color del vi, com ampliarem en un posterior capítol, ja que els antocians acilats determinen una major estabilitat i intensitat del color.

Quant a les antocianidines individuals, també s'observa que en totes les varietats hi ha un increment de malvidina en totes les fases de maduració, mentre que la resta disminueixen, especialment la delfinidina i la peonidina. L'increment en el contingut de malvidina està d'acord amb l'observat per altres autors com Roggero *et al.*¹³⁶ en Syrah, o Ryan *et al.*¹⁶⁰, en Ull de llebre i Cabernet sauvignon, o Fernández-López *et al.*¹⁵⁹ en Monastrell; i concorda amb el model biosintètic dels antocians, en què la malvidina resulta el darrer producte que es forma, a partir de les metilacions i hidroxilacions dels altres antocians. La disminució de cianidina i delfinidina al llarg de la maduració concorda amb el seu lloc en la biosíntesi, ja que són precursors de la resta d'antocians. Això justifica que al principi tinguin uns nivells alts i després vagin desapareixent perquè es van transformant. La disminució de peonidina i cianidina suposa una progressiva disminució de l'activitat de la seva branca de síntesi en comparació a la que genera els altres 3 antocians.

Budin¹⁶¹ indica que el primer antocià que es detecta és la petunidina, però Kampis *et al.*¹⁶² localitzen en el seu lloc malvidina i delfinidina; i Piergiovanni *et al.*¹⁵⁸ i González-SanJosé *et al.*⁸⁸ els detecten tots ja des de l'inici. Els nostres resultats coincideixen amb els d'aquests darrers autors, però cal considerar que el verol és un procés global, de manera que en el mostreig coincideixen baies verdes, baies verolant i baies ja totalment colorejades per tal d'aconseguir una mostra representativa, però individualment en les baies pot tenir lloc la síntesi ordenadament, seguint models com els proposats per Roggero⁸⁵ o d'altres.

¹⁵⁹ Fernández-López, JA; Hidalgo, V; Almela, L; López Roca, JM. (1992). "Quantitative changes in anthocyanin pigments of *Vitis vinifera* cv Monastrell during maturation". *J Sci Food Agric*, 58, 153-155

¹⁶⁰ Ryan, JM; Revilla, E. (2003). "Anthocyanin composition of cabernet sauvignon and tempranillo grapes at different stages of ripening". *J Agric Food Chem*. 51, 3372-3378

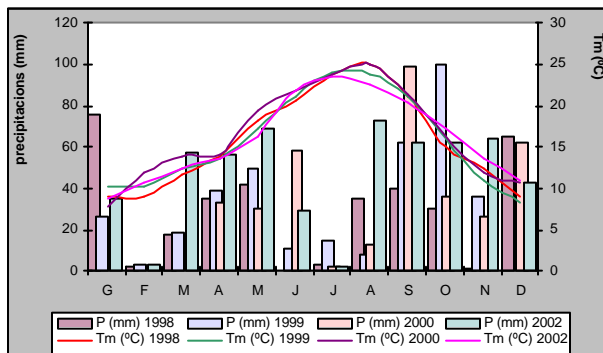
¹⁶¹ Budin, R. (1984). "Accumulation of anthocyanins, sugars and organic acids in grapes of the Blue Franconia and Saint Laurence varieties during ripening". *Kvansy Prum*, 30: 55-58

¹⁶² Kampis, A; Kerény, Z; Hoschke, A; Hajdu, F. (1986). "Evolution des pigments anthocyanins pendant la maturation des cépages rouges". *Bull Liaison Groupe* 13,

6) Efecte del reg en el contingut i natura dels antocians d'ull de llebre i Cabernet

6.1) Irrigació i anyada

Per poder discutir els comportaments de les varietats ull de llebre i Cabernet al llarg dels anys i en funció del reg i el no reg, és necessari ubicar els resultats en el context de les característiques climàtiques de la zona. Farem primer una anàlisi global a partir del diagrama de precipitacions i temperatures mitjanes registrats durant els 4 anys d'estudi (1998, 1999, 2000 i 2002), per després fer l'anàlisi separada per cada any.



Gràfica 1.4. 6.1. Diagrama de precipitacions i de temperatures mitjanes per a les campanyes objecte d'estudi

El diagrama ombrotèrmic (gràfica 1.4.6.1) mostra diferències entre els anys quant a precipitacions, però la temperatura mitjana es manté constant pràcticament tots els anys, a causa de l'efecte termoregulator que exerceix la proximitat del mar. En l'anàlisi de les pluges, són especialment importants aquelles que es registren els mesos entre

juny i la verema, ja que en aquests moments és quan poden afectar més l'evolució del raï m i, per tant, la qualitat.

* El 1998 tingué un estiu sec, especialment els mesos de juny i juliol, encara que els darrers dies d'agost i setembre van produir-se abundants precipitacions. En canvi, les precipitacions de primavera van ser discretes però suficients per al correcte desenvolupament de la planta. Les humitats relatives també van ser baixes.

* El 1999 tingué escasses pluges durant l'estiu, i a més estigueren repartides al llarg del període, excepte al mes de setembre en què, de manera similar al 98, ocorregueren abundants precipitacions. La constància en les precipitacions estiuenques va estar associada a unes humitats relatives superiors que en l'any anterior.

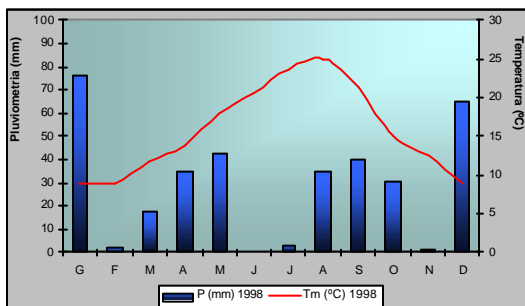
* L'any 2000 caigueren pluges abundants durant el mes de juny, que van compensar l'escassa precipitació dels mesos anteriors, abans de la brotada. En canvi, els mesos de juliol

i agost van ser els més secs dels considerats, i van ser els de més rigor de temperatures. Al setembre, en canvi, es van registrar novament precipitacions considerables.

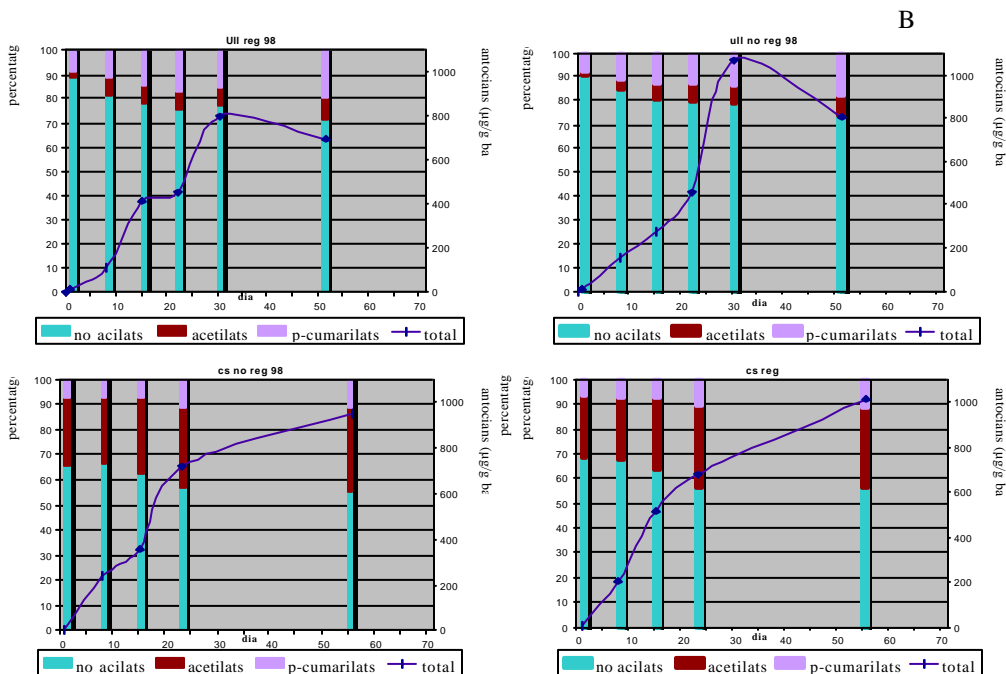
* L'any 2002 fou el més plujós, amb abundants pluges tant els mesos d'agost i setembre, com durant la primavera i, de fet, al llarg de tot el cicle. També cal remarcar que les temperatures mitjanes foren considerablement menors que en els altres anys i que en aquests mesos hi hagué força nuvolositat.

Comentarem seguidament les situacions particulars de l'any:

1) Campanya 1998



A



B

	Pes 100 baies (g)	Producció (kg/cep)	GAP	Antocians (mg/kg baia)
Ull, reg	300	5.0	11.0	698
Ull, no reg	307	4.4	11.2	802
CS, Reg	155	4.2	12.2	1014
CS, No Reg	157	4.0	11.9	948

C

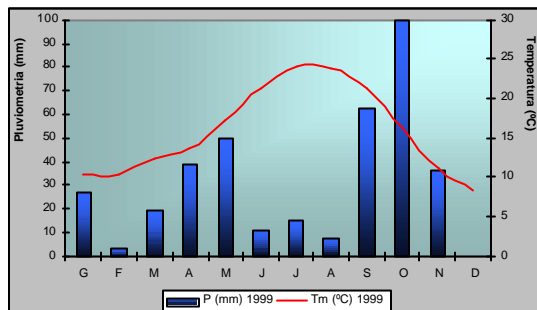
Gràfics i taules 1.4.6.2. Es representa (A) el diagrama ombrotèrmic, (B) l'evolució en antocians totals i en els percentatges d'acilació per les varietats Ull de llebre i Cabernet sauvignon, en condicions d'irrigació i de no irrigació, per la campanya 98. La taula (C) mostra els valors en el moment de la collita dels paràmetres pes de 100 baies, la producció, el grau alcohòlic probable i el contingut d'antocians (en mg/kg baia)

El 1998, després d'un desenvolupament vegetatiu normal, l'estiu, com ja hem comentat, fou molt sec, però amb unes precipitacions de 35 mm els darrers dies d'agost. Els antocians van augmentant lentament, però aquestes precipitacions 3 dies abans de veremar van afectar ull de llebre, com demostra la davallada de la concentració total d'antocians en el punt final del mostreig, corresponent al moment de la verema (fig B). De fet, la màxima concentració s'assoleix dues setmanes abans de veremar, i després disminueix notablement. Aquest efecte es produeix tant en el tractament de reg com en el de no reg, encara que fou més acusat en les vinyes no irrigades. Malgrat aquesta major dilució final, aquestes vinyes irrigades van tenir un contingut antociànic lleugerament inferior al del tractament de no reg (taula C). Aquest menor contingut significa una menor síntesi global, ja que la mida de la baia no difereix entre tractaments.

En Cabernet, en veremar-se més tard, al 16 de setembre, les tardanes pluges d'agost en el 1998 no afectaren la dinàmica de la maduració com en ull de llebre, ja que les baies encara estan a gairebé un mes del final de la maduració fisiològica (figura B). Els antocians van augmentant progressivament i tant les concentracions finals com el volum de la baia són similars entre les situacions de reg i no reg (taula C).

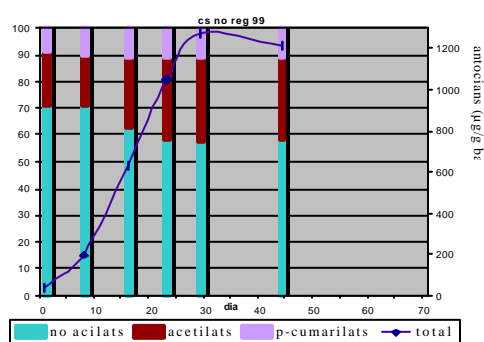
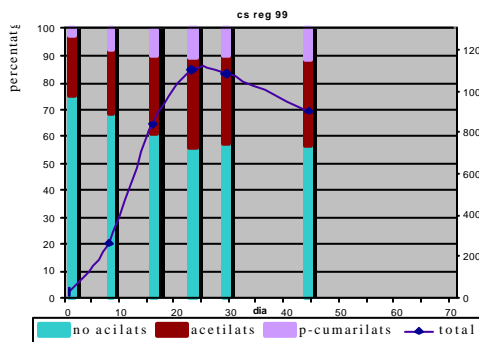
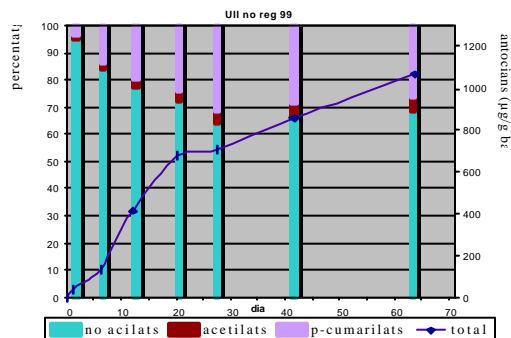
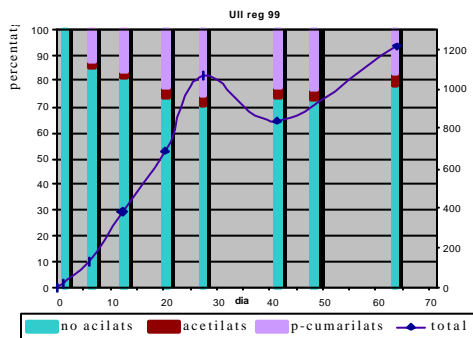
El grau alcohòlic probable, que sovint es correlaciona amb el nivell dels antocians, no presenta diferències significatives entre ambdós tractaments per a cada varietat, com tampoc ho fan els antocians. No obstant això, sembla apreciar-se una tendència a una major producció en el tractament de reg, especialment en el cas d'ull de llebre.

2) Campanya 1999



A

B



	Pes 100 baies (g)	Producció (kg/cep)	GAP	Antocians (mg/kg baia)
Ull, reg	251	7.2	10.3 ^b	1216
Ull, no reg	258	7.4	9.8 ^a	1067
CS, Reg	147	5.3	11.8 ^a	904
CS, No Reg	141	5.3	12.2 ^b	1212

C

Gràfics i taules 1.4.6.3. Es representa (A) el diagrama ombrotèrmic, (B) l'evolució en antocians totals i en els percentatges d'acilació per les varietats Ull de llebre i Cabernet sauvignon, en condicions d'irrigació i de no irrigació, per la campanya 99. La taula (C) mostra els valors en el moment de la collita dels paràmetres pes de 100 baies, la producció, el grau alcohòlic probable i el contingut d'antocians (en mg/kg baia)

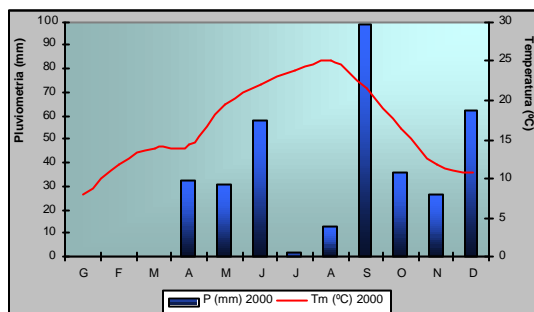
L'any 1999 presenta un pluviometria anual semblant al 98, però la repartició de les pluges té lloc al llarg del cicle i la humitat relativa és també més elevada que en el 1998.

L'any 1999 l'ull de llebre presenta un contingut final d'antocians més elevat en reg per un volum de baies similar. En aquest any, no s'observa una disminució final del contingut, sinó que aquest encara està augmentant en el moment de la verema.

En Cabernet, l'any 99 registra uns nivells d'antocians més elevats en la situació de no reg. La varietat rep una copiosa pluja el setembre que sembla perjudicar el tractament de reg front el de no reg, ja que en sumar-se l'aigua de reg amb la de la pluja s'arriba a un màxim abans de la verema que després canvia per disminuir cap al final. La concentració d'antocians a la collita respecte l'any anterior és més gran i les baies són quelcom més petites en no reg que en reg, contràriament al que succeï a en ull de llebre.

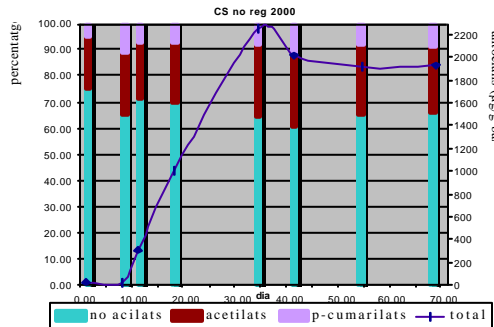
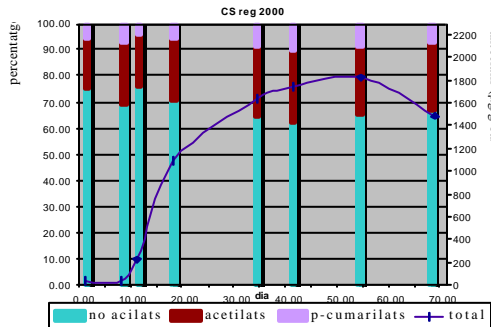
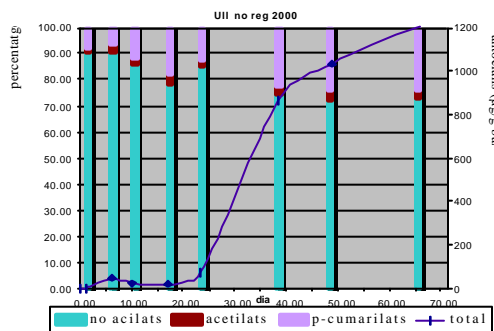
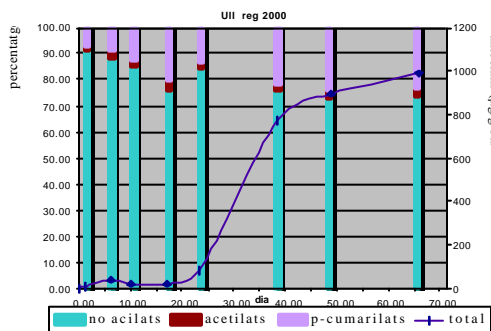
Els graus alcohòlics probables en ull de llebre disminueixen respecte els de l'any anterior, però això no es tradueix en una disminució en el contingut d'antocians. En Cabernet es manté un grau similar durant les anyades estudiades, malgrat que les produccions són més elevades en el 1999. Aquest any, s'observen diferències en el grau alcohòlic probable a favor del no reg. No obstant això, les produccions per cep no difereixen entre els dos tractaments.

3) Campanya 2000



A

B



	Pes 100 baies (g)	Producció (kg/cep)	GAP	Antocians (mg/kg baia)
Ull, reg	213 ^b	7.4 ^b	10.5	990 ^a
Ull, no reg	182 ^a	6.0 ^a	10.3	1208 ^b
CS, Reg	123	3.5	13.2	1484 ^a
CS, No Reg	117	3.7	13.5	1932 ^b

C

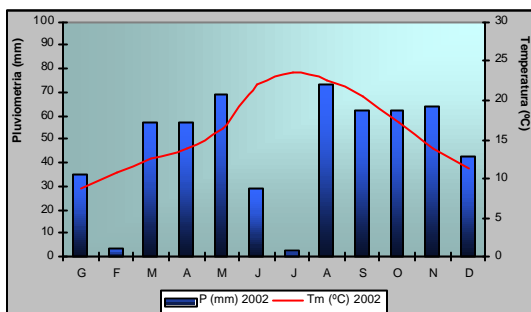
Gràfics i taules 1.4.6.4. Es representa (A) el diagrama ombrotèrmic, (B) l'evolució en antocians totals i en els percentatges d'acilació per les varietats Ull de llebre i Cabernet sauvignon, en condicions d'irrigació i de no irrigació, per la campanya 2000. La taula (C) mostra els valors en el moment de la collita dels paràmetres pes de 100 baies, la producció, el grau alcohòlic probable i el contingut d'antocians (en mg/kg baia)

L'estiu del 2000 també va ser sec, i amb unes humitats relatives molt baixes. Aquesta sequedat es manifesta en uns volums de baia que són els menors d'entre tots els anys d'estudi.

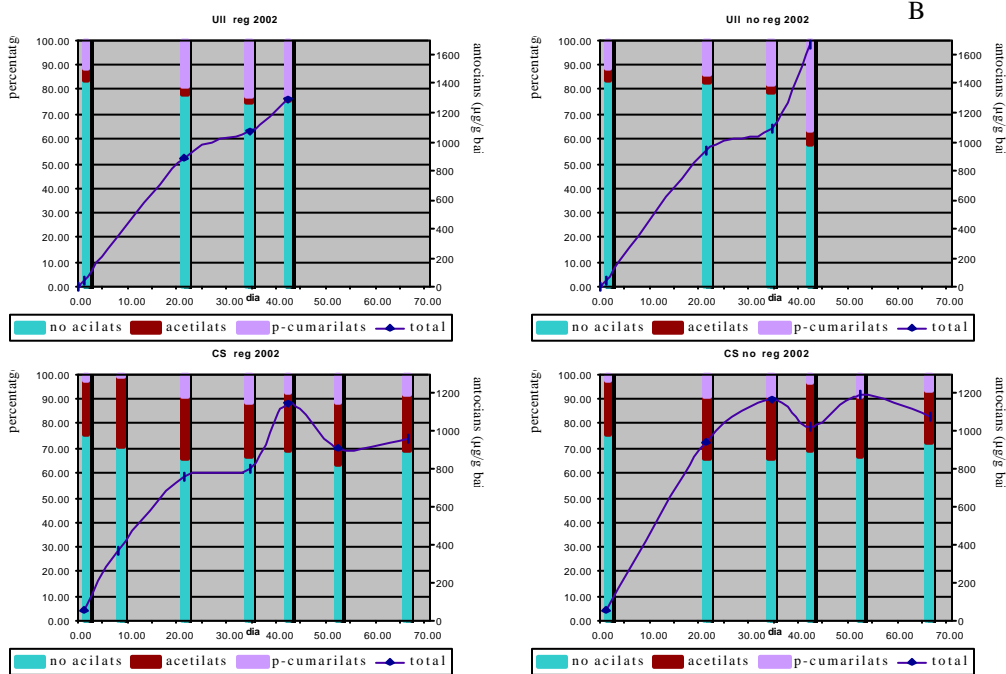
En Cabernet, hi ha una disminució final del contingut en antocians atribuïble a les pluges de setembre, efecte que és novament més pronunciat en la situació de reg, en què es suma l'efecte de l'irrigació al de les precipitacions. Aquesta situació és equivalent a la que es va produir l'any anterior, i de fet sembla que hi ha una relació entre el valor de les precipitacions i la disminució d'antocians, ja que aquestes pèrdues són més elevades en el 2000, en què les pluges de setembre foren de 100 mm, que en les del 1999, en què les precipitacions registrades eren de 60 mm. De totes maneres, aquest efecte no impedeix que s'assoleixin les concentracions més elevades d'antocians en aquest any sec. Quant a l'efecte de l'irrigació, són notablement superiors els valors en la situació de no reg que en la de reg, malgrat que els volums de baia són similars.

En ull de llebre la verema tingué lloc abans d'aquestes precipitacions, motiu pel qual no hi ha l'efecte de disminució de concentracions comentat, sinó que el contingut en antocians totals augmenta fins a la verema. En Ull de llebre també s'aconsegueixen uns valors més alts d'antocians, especialment si el comparem amb l'any anterior, el 99. Com en Cabernet, és la situació de no reg la que presenta superiors nivells d'antocians, cosa que va lligada a un menor volum de baia.

4) Campanya 2002



A



B

	Pes 100 baies (g)	Producció (kg/cep)	GAP	Antocians (mg/kg baia)
Ull, reg	208	6.8	11.6	1289
Ull, no reg	235	6.1	12.6	1670
CS, Reg	137	4.2	12.1	958
CS, No Reg	131	3.9	12.4	1074

C

Gràfics i taules 1.4.6.5. Es representa (A) el diagrama ombrotèrmic, (B) l'evolució en antocians totals i en els percentatges d'acilació per les varietats Ull de llebre i Cabernet sauvignon, en condicions d'irrigació i de no irrigació, per la campanya 2002. La taula (C) mostra els valors en el moment de la collita dels paràmetres pes de 100 baies, la producció, el grau alcohòlic probable i el contingut d'antocians (en mg/kg baia)

En oposició als altres anys, el 2002 va ser un any especialment plujós, i en aquest cas s'observa una resposta varietal diferent: l'Ull de llebre és capaç de sintetitzar uns nivells més elevats d'antocians en aquest any. Contràriament, en cabernet la síntesi resulta menor.

En Cabernet, s'obtenen unes concentracions notablement més elevades en situació de no reg, igual que en l'Ull de llebre.

Les pluges determinen un increment dels pesos de les baies respecte la situació de l'any 2000, però sense assolir-se els valors de l'any 98, en què va ploure després d'una abundant sequera.

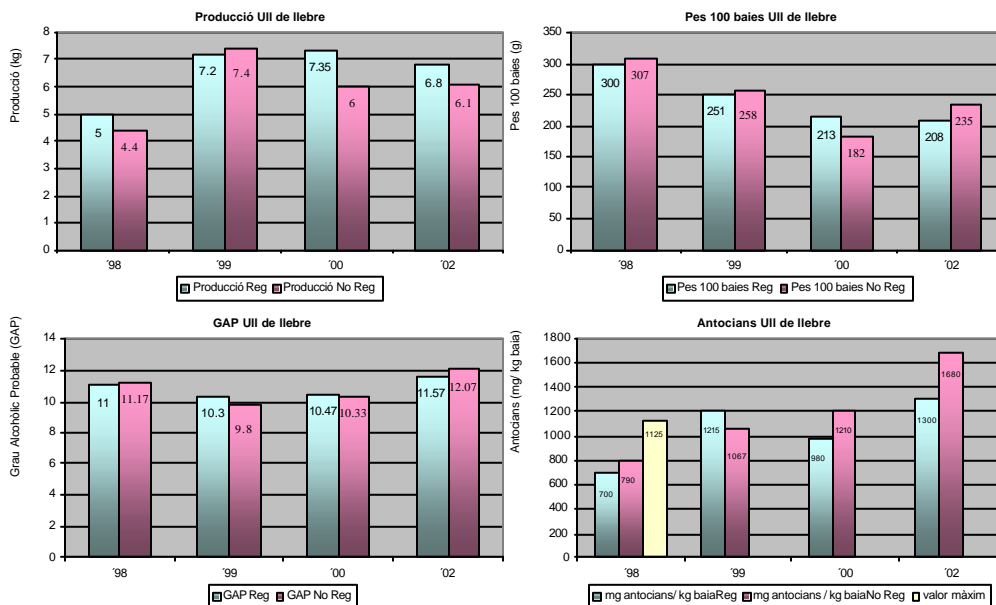
6.2) Irrigació i varietat

A continuació comparem les situacions entre els anys per a cada varietat:

a) Ull de llebre

Com es desprèn de les gràfiques d'acumulació d'antocians al llarg de la maduració, la dinàmica en Ull de llebre es caracteritza per un increment continu dels antocians fins a la data de verema. Només en l'any 1998 s'observa un valor màxim abans d'aquesta data, que correspon a un efecte de dilució causat per unes precipitacions poc abans de la verema.

Seguidament comentarem els valors finals (data de collita) de producció, pes de baia, grau alcohòlic probable i antocians (Gràfica 1.4.6.6).



Gràfics 1.4.6.6. Es representa, per a la varietat Ull de llebre, els valors de producció, de pes de 100 baies, de grau alcohòlic probable i de contingut d'antocians en mg/kg de baia, en les condicions de reg i no reg. En el cas dels antocians, es representa en groc el valor màxim que s'assolia abans de la verema en la situació de no reg.

* Excepte en la campanya '99, els valors d'antocians en la situació de no reg han estat sempre superiors als de les condicions irrigades. Aquest fenomen no sembla atribuïble a l'efecte dilució, ja que els pesos de les baies són similars en ambdós tractaments i, de fet,

excepte en la campanya'2000, lleugerament inferiors en el cas de la situació de reg. Per tant, la menor concentració d'antocians per un pes de baia similar sembla indicar que la situació d'irrigació inhibeix la síntesi dels antocians a nivell de baia.

Malgrat això, en un any plujós com el 2002 és quan Ull de llebre sintetitza més antocians. Cal tenir en compte que en aquest any han tingut lloc pluges repartides durant tot el cicle vegetatiu. Que en un any inusual d'estiu menys rigorós i primavera amb majors aportacions hídriques es pugui veure afavorit el desenvolupament i la fisiologia de la planta, ens indicaria que aquesta varietat presenta una mala adaptació a les característiques mesoclimàtiques seques habituals de la regió.

Els valors més baixos d'antocians corresponen a l'anyada 1998, encara que són atribuïbles, com ja s'ha indicat, a l'acció diluent de les pluges abans de la verema.

* Per cada anyada, es pot establir una correlació del contingut antociànic amb la producció, ja que en tots els casos, el tractament (reg o no reg) que ha generat menys kg de collita resulta ser el que produeix major contingut antociànic, fins i tot per la campanya'99, en què les vinyes no irrigades van produir més que les regades. De totes maneres, la magnitud d'aquesta relació depèn absolutament de l'anyada, ja que produccions similars però en diferents anys, com les registrades el 99 i el 2000, donen un contingut d'antocians en baia diferents. Això pot venir donat per la gran variabilitat de les produccions aconseguides en aquests anys d'estudi, que oscil·len entre els 4.5 i els 7.5 kg/cep.

* No es pot establir correlació, en canvi, entre la concentració d'antocians i el pes de les baies. Només en el 2000 s'observa en la situació de no reg uns menors volums de baia i uns majors nivells d'antocians. En canvi, en el 2002 el menor volum de les baies de l'Ull de llebre es correspon amb uns nivells d'antocians més baixos, especialment en els tractaments de no reg. En els anys 98 i 99 no s'observen diferències significatives en el pes, però sí divergeixen els valors d'antocians. Per tant, en Ull de llebre la mida de la baia no determina el contingut dels antocians.

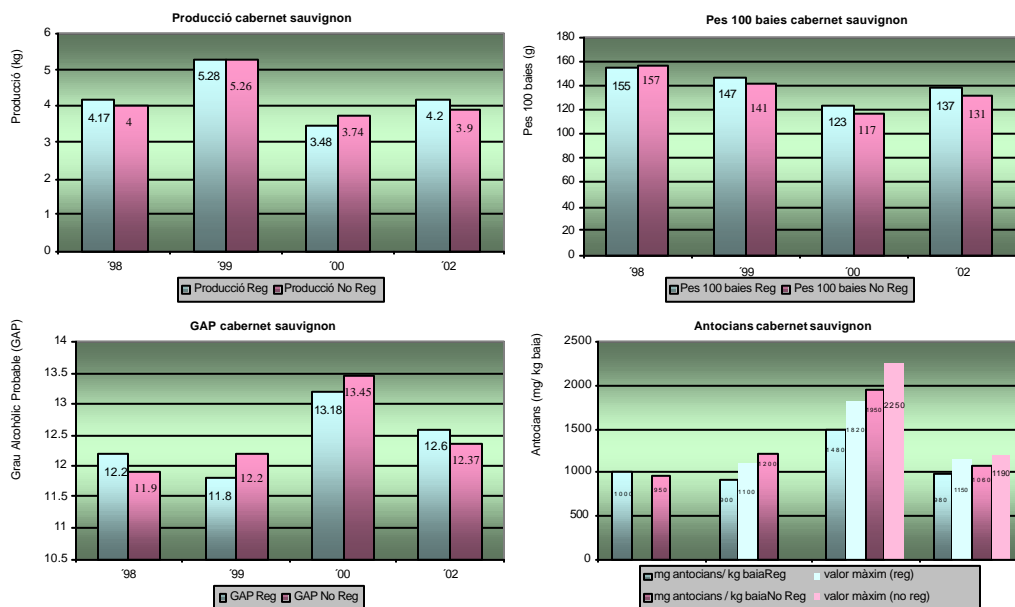
* Quant al grau alcohòlic probable, és a dir, el contingut en sucres de la baia, sembla correlacionar-se amb el nivell d'antocians, independentment de la variable irrigació, a excepció de l'any 2000. En els anys 1999 i 2002, a més, aquesta relació manté una proporcionalitat, però no succeeix el mateix en els anys d'estius secs com el 98 i 2000: en aquestes condicions els graus relativament elevats no proporcionen les quantitats d'antocians esperables, sinó uns valors més baixos.

Si observem els resultats sobre la composició del raïm pel que fa al grau alcohòlic probable i la relació amb la producció per cep, podem constatar la menor acumulació de sucres en Ull de llebre en produccions elevades, situació que es dona en el 1999 i en el 2000. No es troben diferències significatives si es comparen les tesis de reg i no reg en cap dels dos anys.

b) Cabernet Sauvignon

Un fet a ressaltar en Cabernet sauvignon és la dinàmica d'acumulació dels antocians durant la maduració, ja que tant en situació de reg com de no reg i independentment de l'anyada, s'assoleixen els nivells màxims d'antocians entre 10 i 20 dies abans de la verema.

En Cabernet, contràriament al que succeeix amb Ull de llebre, les concentracions més altes (quasi el doble) d'antocians per pes de baia s'atenyen en any sec (2000). A més, són notablement més elevades en no reg que en reg, cosa que també ocorre el 1999. En canvi, en un any plujós com el 2002 la concentració en antocians disminueix ostensiblement i les diferències entre regats i no regats són febles (gràfic 1.4.6.7).



Gràfics 1.4.6.7. Es representa, per a la varietat Cabernet sauvignon, els valors de producció, de pes de 100 baies, de grau alcohòlic probable i de contingut d'antocians en mg/kg de baia, en les condicions de reg i no reg. En el cas dels antocians, es representen també els valor màxims que s'assolien abans de la verema en els anys 2000 i 2002.

* L'any més sec (2000) també resulta ser el menys productiu, i es formen unes baies de mida menor. En les altres anyades, de produccions més elevades, augmenta el pes de baia.

* La concentració d'antocians també es relaciona amb el pes de les baies, de manera que en tots els anys, s'obtenen majors quantitats d'antocians en aquelles condicions en què hi ha un menor pes de baia, situació que es correspon generalment a les condicions de no irrigació, excepte en l'any 1998. De totes maneres, en el pes de baies es tracta de diferències no significatives, de manera que hauríem de parlar de tendències.

És destacable que, quant a anyades, en Cabernet sauvignon es manté molt més constant el pes de les baies que el que succeeix en Ull de llebre.

* Els valors d'antocians es correlacionen prou bé amb els de grau alcohòlic, a excepció de la campanya 2002, en què resulta major el GAP en el cas del reg. El grau alcohòlic probable de l'any sec (2000) resulta més elevat que el d'altres anys, i la seva correlació amb el contingut d'antocians es manifesta de forma clara per a aquesta campanya.

En els anys 99 i 2000 els valors més elevats de GAP tenen lloc en les vinyes no irrigades. Per contra, en el 1998 i en el 2002 es registra un nivell més elevat de sucres en la situació de reg. Per tant, no es pot establir una influència clara del reg sobre aquesta variable. En canvi, es pot establir un lligam entre els valors de producció i els de grau alcohòlic respecte les anyades, ja que en el 99 l'elevada producció origina baies amb menor contingut de sucres, mentre que en el 2002 la relació és inversa (baixa producció, elevat grau alcohòlic), i en el 2001 es situen els valors mitjans. La relació, però, no es compleix si es comparen les situacions de reg i no reg, o si es considera l'any 1998, en què s'obtenen uns continguts en sucres baixos.

Discussió general

En la nostra zona, l'efecte de l'anyada sobre la producció, el pes de les baies, el contingut en sucres i el contingut antociànic de la baia és molt més acusat que l'efecte dels tractaments de reg i no reg, que només originen diferències febles.

Sembla que el reg o les pluges afecten de forma diferent a les dues varietats. Existeix una forta interacció amb el clima, sobretot amb la pluviometria. Hom pot concloure que les diferències anuals que es donen en la zona d'influència mediterrània per la variabilitat del

moment en què es registren les pluges condicionen notablement la composició, producció i nivell d'antocians en la verema.

- Els anys més plujosos, temperats, amb pluges que sovintegen al llarg del cicle afavoreixen la síntesi d'antocians en Ull de llebre, com succeeix l'any 2002. En els altres anys, però, s'observa un comportament erràtic que dificulta la comparació de resultats. Però sembla evident que Ull de llebre és una varietat mal adaptada a la zona, ja que no assoleix el potencial fisiològic propi. Això ho posa de manifest el baix grau alcohòlic obtingut, que en altres zones arriba a ser de 13, així com el baix contingut en antocians.

- Els anys més secs afavoreixen la síntesi d'antocians en Cabernet sauvignon. Es pot establir una tendència a correlació entre la mida de la baia i el contingut en antocians. Per altra banda, les variacions de mida de baia i produccions són menors sota l'efecte d'anyada que en l'Ull de llebre.

Els resultats obtinguts en el cas de Cabernet sauvignon són consistents amb els que troben d'altres autors^{163,164,165} segons els quals el dèficit hídric incrementen la síntesi d'antocians.

La disminució de la mida de la baia, que en Cabernet es relaciona amb un augment d'antocians, sembla no guardar relació en la varietat Ull de llebre, doncs l'augment d'antocians en 2002 respecte del 2000 en situació tant en el tractament de reg com en el de no reg no va acompanyar d'una disminució del volum de la baia¹⁶⁶.

Contràriament als nostres resultats, el nivell final més elevat d'antocians en Ull de llebre registrats per Esteban *et al*¹⁵⁷ correspon a la tesi de no reg front la de reg durant les dues anyades estudiades. Si es considera l'efecte de l'anyada (amb unes precipitacions anuals semblants a les nostres pel 2000 i 2002) en l'any sec s'ateny el nivell més elevat, a l'inrevés que a Constantí. A part, en l'Ull de llebre de Madrid constaten diferències notables de pes de baia entre tractaments, és a dir, de menor pes de baia en no reg amb més elevats antocians, la qual cosa no s'observa a Constantí.

Escalona¹⁵⁶, en Ull de llebre a Mallorca, observa uns valors finals d'antocians en verema més elevats en la situació de reg a la vegada que la producció augmenta amb el reg considerablement. Cal esmentar que en el cas de no reg l'estrès és rigorós, ja que la producció per cep és de 0.5 kg, que augmenta a 2.5 kg en el tractament de reg.

¹⁶³ Bravdo, B; Hepner, Y; Loinger, C; Cohen, S; Tabacman, H. (1985). "Effect of irrigation and crop level on growth, yield and wine quality of Cabernet sauvignon". *Am J Enol Vitic* 36:132-139

¹⁶⁴ Hardie, WJ; Coinsidine, JA. (1976). "Response of grapes to water-deficit stress in particular stages of development". *Am J Enol Vitic* 27:55-61

¹⁶⁵ Pirie AJG; Mullins, MG. (1980). "Concentration of phenolics in skin of grape berries during fruit development and ripening". *Am J Enol Vitic* 31:34-36 (1980)

En conclusió, per a Cabernet es relacionen els paràmetres d'elevat contingut d'antocians, amb elevat grau i baia petita. En canvi, en Ull de llebre els continguts en antocians varien segons les anyades, són més sensibles als factors climàtics de l'any i sembla que el nivell màxim és independent de la mida de la baia.

6.3) Efectes de la irrigació sobre els antocians individuals

Com ja hem comentat, el contingut en antocians totals presenta valors diferents en situació de reg i no reg. En aquest sentit, resulta interessant determinar si aquest increment es manifesta especialment en algun grup d'antocians. Per a això, a continuació es presenten els resultats corresponents les proporcions dels antocians individuals durant 4 anys d'estudi:

	Ull R 98	Ull NR 98	Ull R 99	Ull NR 99	Ull R 2000	Ull NR 2000	Ull R 2002	Ull NR 2002
Dp-3-glu	11,4±1,8	13,4±0,7	18,5±4,8	12,3±2,6	13,9±2,0	13,3±2,0	15,2±2,4	13,2±1,8
Cy-3-glu	1,6±0,2	2,3±0,5	2,5±1,2	1,5±0,5	2,3±0,2	2,0±0,4	3,4±0,5	3,9±0,5
Pt-3-glu	11,6±0,9	12,7±0,4	14,1±2,1	10,9±1,5	12,2±0,3	11,8±1,5	12,5±1,1	10,4±1,1
Pn-3-glu	4,8±0,7	5,5±0,7	5,2±1,2	3,8±0,6	3,8±0,4	3,8±0,2	6,3±0,8	6,5±0,5
Mv-3-glu	41,2±2,5	39,9±1,8	38,2±3,3	40,0±1,8	41,1±0,1	41,7±0,5	36,5±1,9	26,1±1,4
TOTAL no acilats	70,6±5,3	73,7±1,9	78,4±5,8	68,6±3,8	73,2±1,2	72,7±3,7	73,8±4,1	60,1±3,1
Total acetilats	10,3±4,2	8,4±1,2	4,6±0,5	5,3±0,9	3,1±0,2	3,0±0,2	3,3±1,6	1,6±0,8
Total p-cumarilats	19,1±1,4	17,9±2,8	16,9±5,4	26,1±3,1	23,6±1,1	24,3±3,5	22,8±2,6	36,6±3,1

	CS R 98	CS NR 98	CS R 99	CS NR 99	CS R 2000	CS NR 2000	CS R 2002	CS NR 2002
Dp-3-glu	6,7±0,7	6,9±1,0	6,7±0,5	7,1±0,3	11,1±0,9	10,6±0,6	11,4±0,7	11,9±0,7
Cy-3-glu	1,0±0,2	0,9±0,2	0,7±0,1	0,9±0,2	1,1±0,7	1,0±0,3	3,6±0,3	5,3±0,2
Pt-3-glu	5,5±0,4	6,0±1,0	5,2±0,3	5,4±0,1	7,5±0,6	7,4±0,5	7,7±0,4	7,5±0,5
Pn-3-glu	4,8±0,4	5,3±1,2	4,0±0,1	4,1±0,5	4,1±1,0	3,4±0,5	9,2±0,5	12,45±0,7
Mv-3-glu	38,1±0,3	42,1±6,6	40,1±0,2	40,9±1,7	42,7±1,4	43,0±1,1	37,1±0,6	35,3±3,1
TOTAL no acilats	55,9±1,9	61,2±9,4	56,7±1,0	58,4±0,8	66,5±2,3	65,4±1,6	69,0±1,7	72,5±4,0
Total acetilats	32,5±2,0	26,0±12,0	31,5±0,5	30,4±0,8	25,7±2,2	26,1±1,4	23,1±1,5	20,6±4,7
Total p-cumarilats	11,6±0,5	12,8±2,6	11,8±1,0	11,2±0,4	7,7±0,1	8,5±0,4	8,0±0,5	6,9±1,1

Taula 1.4.6.6. Variació en la composició antocianica en les situacions de reg i no reg en verema per Ull de llebre i Cabernet sauvignon en les diferents campanyes. S'expressen els valors percentuals.

Les diferències en el moment de la verema en l'acilació entre les condicions de reg i no reg són molt febles, i en sentit contrari a les esperables. En la majoria de casos, els valors d'acilació no són significativament diferents o fins i tot són inferiors en les condicions de reg. Aquests resultats entren en conflicte amb els d'altres autors¹⁵⁶, en què les condicions de no irrigació produeixen uns majors nivells d'antocians acilats. De totes maneres, aquesta resposta d'increment de l'acilació en estats d'estrès depèn també de la varietat, i no sempre s'observen.

Les majors diferències es detecten per la varietat Ull de llebre, en les campanyes 99 i 2002. En aquests casos, la situació d'estrès hídric aconsegueix major proporció d'antocians acilats. Tanmateix, no està clar l'estrès hídric a què està sotmesa la planta, ja que en l'any 99 es sintetitzen més antocians en la situació de reg.

Cal considerar que els resultats obtinguts en la nostra zona no han manifestat una repercussió marcada de l'estrès hídric, en contrast amb els efectes que s'obtenen en altres treballs. En els casos que s'ha obtingut una major incidència de la manca de disponibilitat d'aigua sobre el contingut en antocians ha estat precisament en Cabernet per l'any 2000 i per Ull de llebre en l'any 2002.

Per tant, podem concloure que l'efecte del reg sobre la composició antociànica de les dues varietats estudiades en la nostra zona no resulta determinant.

5. CONCLUSIONS

1. Mitjançant l'anàlisi de components principals, es poden diferenciar les 8 varietats en data de verema. Les variables que contribueixen amb major pes relatiu en els factors són els nivells d'acilació.
2. Es pot establir una composició antociànica per a cada varietat, que roman prou estable amb l'anyada. En aquest sentit, convé destacar per les seves peculiaritats la varietat Pinot noir, que no presenta acilació; i la varietat Cabernet sauvignon, que és la única de les varietats estudiades en què predomina l'acetilació.
3. El contingut d'antocians totals està fortament influït per la varietat, però també hi ha una intervenció de les característiques climàtiques de l'anyada.
4. La dinàmica d'evolució del contingut d'antocians al llarg de la maduració ve determinada per la varietat i per l'anyada, de manera que segons aquestes variables presenta una disminució o no abans de la verema; cosa que implica que no coincideix la maduresa fenòlica amb la tecnològica.
5. Hi ha un canvi en la composició antociànica al llarg de la maduració. Per una banda, té lloc un increment dels antocians acilats i, per l'altra, un increment dels nivells de malvidina.
6. La disponibilitat d'aigua pot tenir efectes en el contingut i en la composició antociànica. Els efectes de les pluges acostumen a ser més decisius que l'establiment de les dosis de reg, i la resposta varietal és diferent. En varietats ben adaptades al mesoclima, l'estrès provoca un increment en els nivells d'antocians i en el grau d'acilació dels mateixos.
7. L'estudi dels compostos antociànics també permet detectar varietats amb maduració incompleta o mal adaptades, com el cas d'ull de llebre.

6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. **Strack,D; Wray, V.** (1994). “The anthocyanins”, a “The flavonoids: Advances in research since 1986” Chapman & Hall
2. **Markham, KR; Gould, KS; Winefield, CS; Mitchell, KA; Bloor, SJ; Boase, MR.** (2000). “Anthocyanic vacuolar inclusions – their nature and significance in flower colouration”. *Phytochemistry* 55: 327-336
3. **Chalker-Scott; L** (1999). “Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses”. *Photochemistry and Photobiology.* 70(1): 1-9
4. **Souquet, JM; Cheynier, V; Sarni-Manchado, P; Moutounet, M** (1996). “Les composés phénoliques du raisin”. *J. Int. Sci. Vigne et Vin, Hors série*, 99-107
5. **Climent D; Pardo T.** (1993). “Study of the phenolic composition of Bobal, Grenache and Tempranillo grapes”; *Riv di Vitic e di Enol*, 46 (3) 35-44
6. **Ortega Meder, M. D.; Rivas Gonzalo, J. C.; Vicente, J. L.; Santos Buelga, C** (1994). “Diferenciación de variedades de uvas tintas por su composición antocianica”. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 34 (4) 409-426
7. **Arozarena, I.; Casp, A.; Marín, R.; Navarro, M.** (2000). “Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition”. *European Food Research and Technology*, 212 (1) 108-112
8. **Eder R;Wendelin S;Barna J.** (1994). “Klassifizierung von Rotweinsorten mittels Anthocyananalyse. 1. Mitteilung: Anwendung multivariater statistischer Methoden zur Differenzierung von Traubenproben”. *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruechtevewertung*;44: 201-212
9. **Scienza A;Piergiovanni L;Visai C;Conca E;Romano F.** (1986). “Il profilo antocianico delle uve quale mezzo tassonomico per il riconoscimento dei vitigni rossi”. *Vignevini*, 13: 75-81
10. **Roggero JP;Larice JL;Rocheville-Divorne C;Archier P;Coen S.** (1988). “Composition anthocyanique des cepages. I. Essai de classification par analyse en composantes principales et par analyse factorielle discriminante”. *Revue Francaise d'Oenologie, Cahier Scientifique*, 28 (112): 41-48
11. **González-Neves, G.;Gómez-Cordovés, C.;Barreiro, L.** (2001). “Anthocyanic composition of Tannat, Cabernet Sauvignon and Merlot young red wines from Uruguay”. *Journal of Wine Research*;12 (2) 125-133
12. **Holbach, B.;Marx, R.;Ackermann, M.** (1997). “Determination of anthocyanins composition of red wine by HPLC”. *Lebensmittelchemie.* 51 (4) 78-80
13. **Gonzalez-San Jose ML; Santa-Maria G; Diez C.** (1990). “Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region, and wine-making methods”. *Journal of Food Composition and Analysis*;3: 54-66
14. **Hesford, F.;Schneider, K** (1997). “Anthocyanins, the natural red coloring matter of the wine”. *Schw. Zeit. für Obst- und Weinbau*;133 (22): 559-561
15. **Katalinic, V.;Males, P.** (1997). “Compositional changes in grape polyphenols throughout maturation”. *Journal of Wine Research* 8 (3): 169-177
16. **Kallithraka, S.;Arvanitoyannis, I. S.;Kefalas, P.;El-Zajouli, A.;Soufleros, E.;Psarra, E.** (2001). “Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin”. *Food Chemistry*;73 (4): 501-514

17. **García-Beneytez, E; Revilla, E; Cabello, F.** (2002). "Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them". *European Food Research and Technology*, 215 (1):32-37
18. **Scienza A;Failla O;Anzani R;Mattivi F;Villa PL;Gianazza E;Tedesco G;Benetti U.** (1990). "Possible similarities between the Lambrusco with cleft leaves and some cultivated and wild grapevines grown in southern Trentino, North Italy". *Vignevini*, 17 (9): 25-36
19. **Otteneder, H.;Holbach, B.;Marx, R.;Zimmer, M.** (2002). "Identification of grape cultivars in red wine by means of their anthocyanin spectra". *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung*, 52 (5-6): 187-194
20. **Calo A;Di Stefano R;Costacurta A;Calo G.** (1991). "Characterization of Cabernet franc and Carmenere, *Vitis* sp., and explanations on their cultivation in Italy". *Rivista di Viticoltura e di Enologia*. 44 (3) 3-25
21. **Valenti, L.;Mastromauro, F.;Brancadoro, L.;Bogoni, M.;Mattivi, F.** (1997). "The description and evaluation of grapevine land races in Oltrepo Pavese, northern Italy". *Journal of Wine Research*, 8 (2) 87-102
22. **Crespan, M.;Caló, A.;Costacurta, A.;Milani, N.;Giust, M.;Carraro, R.;Di Stefano, R** (2002). "Ciliegiolo and Aglianicone: The only varieties with a direct relationship to Sangiovese". *Rivista di Vitic e di Enologia*, 255 (2-3): 3-14
23. **Burns, J.;Mullen, W.;Landrault, N.;Teissedre, P. L.;Lean, M. E. J.;Crozier, A..** (2002). "Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (14) 4096-4102;
24. **Scienza A;Mattivi F;Villa P;Gianazza E;Tedesco G;Failla O.** (1994). "Genetic relationships between Teroldego and some wine grape genotypes of different geographic origin". *Bolletino dell'Instituto Agrario;Supplemento al 2* (3) 23-32
25. **Del Caro A;Franco MA;Sferlazzo G;Mattivi F;Versini G;Monetti A;Castia T.** (1994). "Characterization of anthocyanic profiles of *Vitis vinifera* grown in Sardinia". *Vignevini*, 21 (11) 63-69
26. **Rossoni, M.;Fasoli, V.;Labra, M.;Spinardi, A.;Failla, O.;Scienza, A.;Sala, F.** (2001). "Exploration of elite grapevine germplasm of Oltrepó pavese (northern Italy) using genetic, chemotaxonomic and morphological markers". *Advances in Horticultural Science*, 15 (1-4):72-78
27. **Costantini, L.;Malossini, U.;Roncador, I.;Mattivi, F.;Grando, M. S.** (2001). "Cultivar identity control of Moscato rosa grapevines undergoing clonal selection". *Advances in Horticultural Science*, 15 (1-4): 56-60
28. **Golodriga Pla; Doubovienko NP.** (1978). "Anthocyanins and genotype in the vine" *Genet. Amelior. Vigne. Ite Symp. Intern., Bordeaux.INRA*, 413-416
29. **Flamini, R.;Tomasi, D..** (2000). "The anthocyanin content in berries of the hybrid grape cultivars Clinton and Isabella"; *Vitis*, 39 (2) 79-81
30. **Blouin, J; Guimberteau, G.** (2002). "Maduración y madurez de la uva"; Ed Mundi-Prensa
31. **Baldi, A; Romani, A; Mulinacci, N; Vincieri, FF; Casetta, B.** (1995). "HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L.". *J Agric Food Chem* 43 (8):2104-2109
32. **Ribéreau-Gayon,P.** (1964). "Les composés phenoliques du raisin et du vin". *Ann., Phhysiol. Vég INRA*
33. **Shiraishi Sh;Watanabe Y;Okubo H;Uemoto Sh.** (1986). "Anthocyanin pigments of black-purple grapes related to variety Kyoho (*Vitis vinifera* L. * *V. labrusca* L.". *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 55 123-129

34. **Yokotsuka K; Nishino N; Singleton VL.** (1988). "Unusual Kosu grape skin anthocyanins"; *American Journal of Enology and Viticulture*; 39: 288-292
35. **Goldy RG; Ballinger WE; Maness EP.** (1986). "Fruit anthocyanin content of some Euvitis * *Vitis rotundifolia* hybrids". *J Am Soc for Hort Sci*; 111: 955-960
36. **Baldi A; Romani A; Mulinacci N; Vincieri FF.** (1993). "Polyphenolic compounds in Tuscan varieties of *Vitis vinifera* L.". *J Int Sci Vigne et du Vin*; 27 201-215
37. **Bucelli P; Faviere V; Giannetti F; Gigliotti A.** (1991). "Analytical features and evaluation of the aptitude of Colorino grapes for improving the quality of Chianti wine". *Vignevini*, 18 (3): 57-62
38. **Roson JP; Moutounet M.** (1992). "Quantités d'anthocyanes et de tanins des raisins de quelques cepages du sud-ouest en 1988 et 1989". *Revue Française d'Oenologie*, 32 (135): 17-27
39. **Bucelli P; Faviere V; Giannetti F; Gigliotti A.** (1995). "Evaluation of phenolic components of some black grape varieties grown in Tuscany". *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 48 (1): 39-50
40. **Aguilo F; Diez C.** (1995). "Anthocyanins and watering in *Vitis vinifera* L." (in: Brouillard, R.; Jay, M.; Scalbert, A. (Eds.): *Polyphenols 94. 17th International Conference on Polyphenols*, Palma de Mallorca, Spain, May 23-27, 1994); *Colloques de l'INRA* (69) 231-232, 1995
41. **Yokotsuka, K.; Nagao, A.; Nakazawa, K.; Sato, M.** (1999). "Changes in anthocyanins in berry skins of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes grown in two soils modified with limestone or oyster shell versus a native soil over two years". *American Journal of Enology and Viticulture*, 50 (1) 1-12
42. **Di Stefano, R.; Moriondo, G.; Borsa, D.; Gentilini, N.; Foti, S.** (1994). "Influenza di fattori climatici e colturali sul profilo antocanico varietale"; *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*, 25 (1) 31-46
43. **Arozarena, I.; Ayestarán, B.; Cantalejo, M. J.; Navarro, M.; Vera, M.; Abril, I.; Casp, A.** (2002). "Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyards over two years". *European Food Research and Technology*, 214(4)303-309
44. **Castia T; Franco MA; Mattivi F; Muggioli G; Sferlazzo G; Versini G.** (1992). "Characterization of grapes cultivated in Sardinia: Chemometric methods applied to the anthocyanic fraction". *Sciences des Aliments*, 12: 239-255
45. **Keller, M; Hrazdina, G.** (1998). "Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening". *Am J Enol Vitic*, 49 (3): 341-349
46. **Sipiora, MJ; Gutiérrez Granda, MJ.** (1998). "Effects of pre-veraison irrigation cutoff and skin contact time on the composition, color, and phenolic content of young Cabernet Sauvignon wines in Spain". *Am J Enol Vitic*, 49 (2): 152-162
47. **Moriondo G; Gentilini N.** (1992). "Phenolic composition of some grape varieties grown in Valle d'Aosta". *Riv Vitic e di Enol*, 45 (3) 59-68
48. **Bucelli, P.; Giannetti, F.; Dodi, S.; Scalabrelli, G.** (1997). "Preliminary results of anthocyanin and polyphenol studies with black grapes of Lunigiana, Italy". *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*, 27 (1996-97) 221-234
49. **Borsa, D.; Di Stefano, R.** (2000). "Polyphenol changes in colored grapes during drying". *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 53 (4) 25-35

50. **Cacho J; Fernandez P; Ferreira V; Castells JE.**(1992). “Evolution of five anthocyanidin-3-glucosides in the skin of the Tempranillo, Moristel, and Garnacha grape varieties and influence of climatological variables”. *American Journal of Enology and Viticulture*; 43 244-248
51. **Mateus, N.;Machado, J. M.;De Freitas, V..** (2002). “Development changes of anthocyanins in **Vitis vinifera** grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 (14) 1689-1695
52. **Lanaridis, P.; Tzourou-Bena, I**(1997).”Changes of anthocyanin contents during berry ripening of five greek red wine cultivars”. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 31 (4) 205-212
53. **Jordao, A. M.; Ricardo da Silva, J. M.; Laureano, O.** (1998). “Evolution of anthocyanins during grape maturation of two varieties (**Vitis vinifera** L.), Castelao Frances and Touriga Francesa”. *Vitis*, 37 (2) 93-94
54. **Gonzalez-San Jose ML; Diez C.** (1992). “Compuestos fenólicos en el hollejo de uva tinta durante la maduración”. *Agrochimica*; 36 63-70
55. **Gonzalez-SanJose ML; Barron LJR; Diez C.** (1990). “Evolution of anthocyanins during maturation of Tempranillo grape variety, *Vitis vinifera*, using polynomial regression models”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51 337-343
56. **Chalmers, DJ; Faragher, JD; Raff; JW.** (1973). “Changes in anthocyanin synthesis as an index of maturity in red apple varieties”; *J. Hort Sci*, 48: 387-392
57. **Barcelo, J. M** (1997). “Management of berry ripening from enological point of view. Effects on Syrah Cotes du Rhone quality wines”. *Progres Agricole et Viticole*, 114 (12) 281-286
58. **Lamikanra O.** “Development of anthocyanin pigments in muscadine grapes”. *HortScience*, 23 597-599
59. **Jeandet P; Sbaghi M; Bessis R; Meunier P.** (1995). “The potential relationship of stilbene, resveratrol, synthesis to anthocyanin content in grape berry skins”. *Vitis*,34 (2) 91-94
60. **Roggero, JP; Coen, S; Ragonnet, B.** (1986). “High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism”. *Am J Enol Vitic*, 37, 77-83
61. **Fernández-López, JA; Almela, L; Muñoz, JA; Hidalgo, V; Carreño, J.** (1998). “Dependence between colour and individual anthocyanin content in ripening grapes”. *Food Research International*, vol 31 (9), 667-672
62. **DiStefano, R; Moriondo, G; Borsa, D; Gentilini, N; Foti, S.** (1994). “Influenza di fattori climatici e culturali sul profilo antocianico varietale”. *L’Enotecnico*, abr 1994, 73-77
63. **Boss PK; Davies C; Robinson SP.** (1996). “Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes”. *Plant Mol Biol*, 32 (3) 565-569
64. **Boss PK; Davies C; Robinson SP.** (1996). “Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour”. *Australian Journal of Grape and Wine Research*; 2 (3) 163-170
65. **Kobayashi, S.; Ishimaru, M.; Ding, C. K.; Yakushiji, H.; Goto, N.** (2001). “Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (**Vitis vinifera**) and their sports with red skin”. *Plant Science*, 160 (3) 543-550
66. **Anderson, DW; Gueffroy, DE; Webb, AD; Kepner, RE.** (1970). “Identification of acetic acid as an acylating agent of anthocyanin pigments in grapes”; *Phytochemistry*, vol 9 (7): 1579-83

67. **Shiraishi S; Watanabe Y** (1988). "Anthocyanin pigments in the blue-black tetraploid grape cultivars 'Black Olympia', 'Pione' and 'Izunishiki', *Vitis vinifera* L. * *V. labrusca* L." *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*; 57 (1) 17-21
68. **Shiraishi SI; Watanabe Y** (1993). "Anthocyanin pigments in the grape skins of several red *Vitis vinifera* cultivars bred in Japan". *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*; 36 (1-2) 63-67
69. **Lay H; Draeger U** (1991). "Profiles of the pigments from different red wines". *Wein-Wissenschaft*, 46: 48-57
70. **Revilla, E.; García-Beneytez, E.; Cabello, F.; Martín-Ortega, G.; Ryan, J. M** (2001). "Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them". *Journal of Chromatography A*, 915 (1-2) 53-60
71. **Bernardino García** (2000). *Treball de 12 crèdits*. URV.
72. **Núñez, V; Monagas, M; Gómez-Cordovés, MC; Bartolomé, B** (2004). "Vitis vinifera L.cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile ". *Postharvest Biol and Technol*, 31: 69-79
73. **Hmamouchi,M; Es-safi, N; Pellecuer, J; Essassi, EM** (1995). "Anthocyanic composition of grape skins of four red grape varieties grown in Morocco"; *Bulletin de l'OIV*. 777-778, 907-919
74. **Matthews, MA; Anderson, MM** (1988). "Fruit ripening in *Vitis vinifera* L: responses to seasonal water deficits". *Am J Enol Vitic* 39, 313-320
75. **Jackson, DI; Lombard, PB** (1993). "Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality – a review". *Am J Enol Vitic*, vol 44, n°4, 409-429
76. **Peterlunger, E; Sivilotti, P; Bonetto, C; Paladin, M** (2002). "Water stress induces changes in polyphenol concentration in Merlot grapes and wines". *Riv Vitic. Enol*. N°1: 51-66
77. **GonzalezSanJose, ML; Diez, C** (1992). "Relationship between anthocyanins and sugars during the ripening of grape berries". *Food Chemistry*, 43(3): 193-197
78. **Hrazdina, G; Parsons, GF; Mattick, LR** (1986). "Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries"" *Am J Enol Vitic* 35 (4): 220-227
79. **Freeman, BM; Kliewr, WM** (1983). "Effect of irrigation, crop level and potassium fertilization on Carignan vines. II. Grape and wine quality"; *Am J Enol Vitic* 34: 197-207
80. **Matthews MA; Anderson, M** (1989). "Reproductive development in grape (*Vitis vinifera* L.): responses to seasonal water deficits". *Am J Enol Vitic*. 40: 52-60
81. **Escalona, JM** (2003). "Respuestas de la vid frente al déficit hídrico: efectos sobre la fotosíntesis y la transpiración en hoja y en planta entera y su repercusión en la calidad del fruto"; *Tesi Doctoral*; Dep Biología UIB
82. **Esteban, M. A.; Villanueva, M. J.; Lissarrague, J. R** (2001). "Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening". *J Sci Food Agric*; 81 (4) 409-420
83. **Piergiovanni,L; Volonteiro, G** (1983). "Studio della frazione antocinaica delle uva". *Tecnol Aliment-Imbottigliamento*, 6: 22-28
84. **Fernández-López, JA; Hidalgo, V; Almela, L; López Roca, JM** (1992). "Quantitative changes in anthocyanin pigments of *Vitis vinifera* cv Monastrell during maturation". *J Sci Food Agric*, 58, 153-155
85. **Ryan, JM; Revilla, E** (2003). "Anthocyanin composition of cabernet sauvignon and tempranillo grapes at different stages of ripening", *J Agric Food Chem*. 51, 3372-3378

- ^{86.} **Budin, R.** (1984). "Accumulation of anthocyanins, sugars and organic acids in grapes of the Blue Franconia and Saint Laurence varieties during ripening". *Kvansy Prum*, 30: 55-58
- ^{87.} **Kampis, A; Kerény, Z; Hoschke, A; Hajdu, F.** (1986). "Evolution des pigments anthocyanins pendant la maturation des cépages rouges". *Bull Liaison Groupe* 13,
- ^{88.} **Bravdo, B; Hepner, Y; Loinger, C; Cohen, S; Tabacman, H.** (1985). "Effect of irrigation and crop level on growth, yield and wine quality of Cabernet sauvignon". *Am J Enol Vitic* 36:132-139
- ^{89.} **Hardie, WJ; Coinsidine, JA.** (1976). "Response of grapes to water-deficit stress in particular stages of development". *Am J Enol Vitic* 27:55-61
- ^{90.} **Pirie AJG; Mullins, MG.** (1980). "Concentration of phenolics in skin of grape berries during fruit development and ripening". *Am J Enol Vitic* 31:34-36 (1980)
- ^{91.} **Lampreave, M.** (2002). "Fisiologia de l'absorció en l'ecosistema vitícola sòl-planta-atmosfera i repercussions en la qualitat del raïm". *Tesi doctoral*, Dep Bioq i Biotecn URV

Capítol 2



CATEQUINES I PROANTOCIANIDINES EN PINYOLS

2.1. INTRODUCCIÓ

Els flavan-3-ols, més comunament coneguts com a catequines, i els seus derivats oligòmers i polímers, els tanins, constitueixen una família de compostos fenòlics que es troben en elevades concentracions en el raï m i que juguen un paper preponderant en la qualitat del vi, al qual confereixen propietats astringents, de color, d'estructura, cos i de capacitat d'envelliment gràcies a la seva participació en l'estabilització del color ¹⁶⁷.

2.1.1. Estructura química

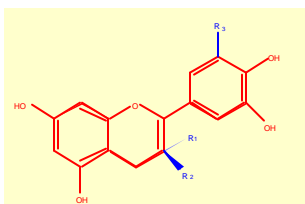


Fig 2. 1.1. Estructura general dels flavan-3-ols

Els flavan-3-ols es caracteritzen per l'estructura general representada en la figura 2.1.1. Els principals flavanols monomèrics del raï m són (fig 2.1.2.) la (+)-catequina i el seu isòmer, la (-)-epicatequina, que també pot trobar-se en forma d'èster de l'àcid gàl·lic (3-gal·lat d'epicatequina). També ha estat descrita la presència d'altres formes monomèriques, com la gal·locatequina, el 3-gal·lat de catequina i el 3-gal·lat de gal·locatequina, però semblen específics de certes varietats ¹⁶⁸.

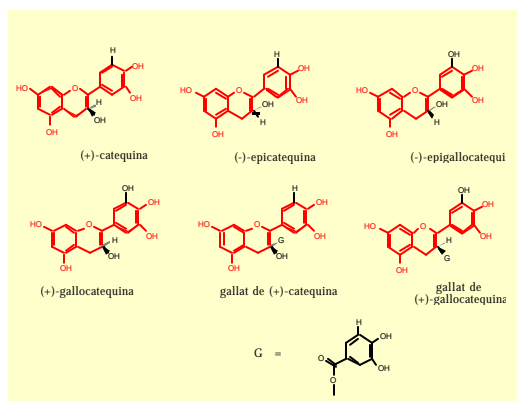


Fig 2.1.2. Estructura dels principals flavan-3-ols monomèrics detectats en raïm

¹⁶⁷ Cheynier, V; Moutounet, M; Sarni-Manchado, P. (2003). "Los compuestos fenólicos". A "Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos". Coord. Claude Fanzi, EMV Ediciones

¹⁶⁸ Souquet, JM; Cheynier, V; Sarni-Manchado, P; Moutounet, M. (1996). "Les composés phénoliques du raisin". *J. Int. Sci. Vigne et Vin, Hors série*, 99-107

Les proantocianidines o tanins condensats es generen a partir dels flavan-3-ols i existeixen en una gran varietat de formes (des de dímers fins a polímers). El terme “tanins” pel qual es designa als oligòmers i polímers de flavanols fa referència a la seva capacitat d’interaccionar amb les proteïnes, i el terme “proantocianidols” (o “proantocianidines”), a la seva propietat d’alliberar antocianidols en medi àcid per ruptura de les unions intermonomèriques. Dintre de les proantocianidines, reben el nom de procianidines aquelles que deriven de la catequina i l’epicatequina, que en hidròlisi àcida generen la molècula de cianidina; i el nom de prodelfinidines aquelles derivades de la gal.locatequina i l’epigal.locatequina¹⁶⁹, que s’hidrolitzen a delphinidina en medi àcid.

La majoria de dímers i trímers identificats al raïm pertanyen a la sèrie B, terme amb el qual es designa el tipus d’unió entre les unitats monomèriques que els constitueixen (figura 2.1.3). En les proantocianidines de la sèrie B, la unió dels dos monòmers es produeix entre les posicions C4-C6 o C4-C8. Els dímers presents en els pinyols del raïm presenten l’estructura que es recull a la figura 3: tenim aquells en què l’unió és C4-C8 (dímers B1, B2, B3, B4), i aquells en què l’unió és C4-C6 (dímers B5, B6, B7, B8)^{170,171}.

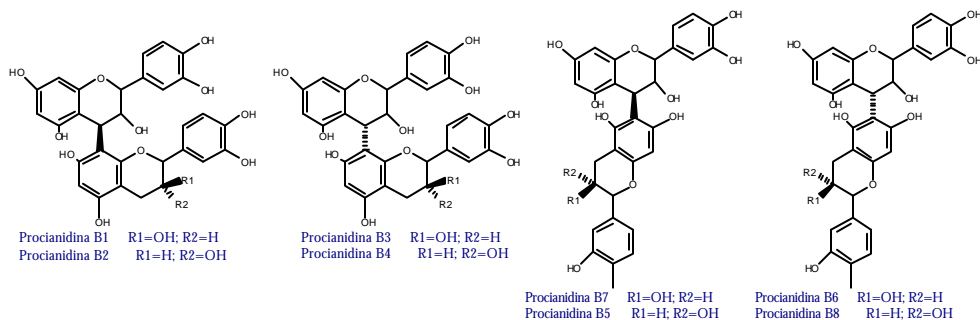
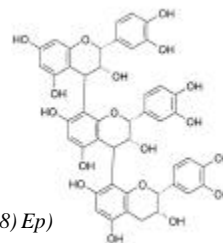


Fig 2.1.3. Principals dímers aïllats en *Vitis vinifera*: B1 (Ep 4 →8 Cat); B2 (Ep 4→8 Ep), B3(Cat 4→8 Cat); B4 (Cat 4→8 Ep); B5 (Ep 4→6 Ep); B6 (Cat 4→6 Cat); B7 (Ep 4→6 Cat); B8 (Cat 4→6 Ep).
 “cat”= catequina; “Ep”= epicatequina

També s’han identificat trímers, que inclouen les procianidines C1 i C2.¹⁷⁰ (figura 2. 1.4)

Figura 2. 1.4. Estructura del trímer C1 (Ep (4→8) Ep (4→8) Ep)



¹⁶⁹ Pascual-Teresa, S; Rivas-Gonzalo, JC; Santos-Buelga, C. (2000). “Prodelfinidins and related flavanols in wine”, *Int J Food Science & Technol*, 35, 33-40
¹⁷⁰ Ricardo-da-Silva, JM. (1992). “Procyanidines du raisin et du vin. Structure et propriétés chimiques”; *Tesi Doctoral*. École Nationale Sup Agronomique Montpellier
¹⁷¹ Freitas, VAP; Glories, Y; Bourgeois, G; Vitry, C. (1998). “Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry”. *Phytochemistry*, vol 49, n°5: 1435-1441

En articles recents¹⁷² s'ha descrit també la presència de dímers de la sèrie A en pinyols, pells i vins de Merlot i Cabernet sauvignon; concretament, la proantocianidina A2 (figura 2.1.5), malgrat que es trobi en unes concentracions molt baixes que evitarien que es manifestés en els vins el seu caràcter amargant. La sèrie A correspon a una unió C4-C8 simultània a un pont éter C2-O-C7, com es recull a la figura 2.1.5.

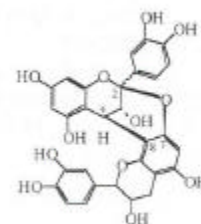


Fig 2.1.5.
Proantocianidina A2

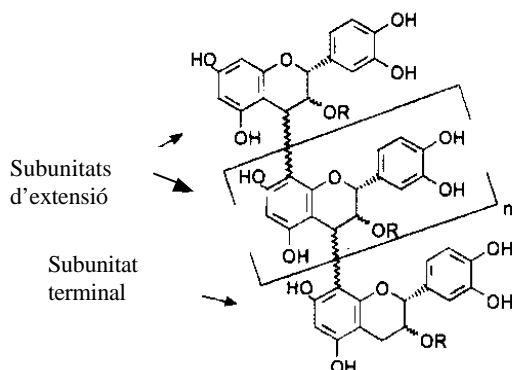


Fig 2.1.6. Estructura general dels tanins. A partir d'un monòmer (subunitat terminal) es van estenent la cadena per l'addició successiva de nous monòmers

Quant a les formes polimèriques, poden comprendre un nombre molt elevat de monòmers, de tal manera que en les pells d'algunes varietats s'han trobat fraccions de graus de polimerització superiors a les 80 unitats¹⁷³. En ells es distingeixen les unitats terminals i les unitats d'extensió de la cadena (fig 2.1.6).

2.1.2 Localització i evolució durant la maduració

Aquests compostos es distribueixen en les parts sòlides del rai m: sobretot en els pinyols, però també en les pells¹⁷⁴ i les rapes¹⁷⁵. A la polpa s'hi poden trobar a nivells de traça. La naturalesa de les proantocianidines que s'acumulen en cadascuna d'aquestes parts és diferent.

¹⁷² Vivas de Gaulejac, N; Vivas, N; Absalon, C; Nonier, MF. (2001). "Identification du procyanidole A2 dans le raisin et le vin de Vitis vinifera L.CV. Merlot noir and abernet sauvignon". *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 35, n°1, 51-56

¹⁷³ Souquet, JM; Cheyner, V; Brossaud, F; Moutounet, M. (1996). "Polymeric proanthocyanidins from grape skins". *Phytochemistry*, vol 43, n°2: 509-512

¹⁷⁴ Freitas, VAP; Glories, Y. (1999). "Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white Vitis vinifera varieties". *J Sci Food Agric*, 79: 1601-1606

¹⁷⁵ Jordao, AM; Ricardo-da-silva, JM; Laureano, O. (2001). "Evolution of proanthocyanidins in bunch stems during berry development (Vitis vinifera L.); *Vitis* 40(1), 17-22

Els pinyols són més rics en flavan-3-ols que les pells, amb una predominància de la catequina sobre l'epicatequina. Destaca la presència de flavanols gal.loilats, encara que les procianidines no gal.loilades s'hi troben en presència més elevada, i els trimers es troben encara en menor proporció¹⁷⁶.

Els tanins de les pells difereixen dels dels pinyols principalment per la presència de prodelfinidines en les pells¹⁷⁷, però també pel seu baix contingut en derivats gal.loilats i pel seu major grau de polimerització¹⁷³: encara que el contingut de tanins en les pells és força menor que en pinyols, el contingut relatiu de proantocianidines polimèriques en les pells és normalment més gran que en les llavors, podent arribar a graus de polimerització superiors a 30. Aquest fenomen podria provenir d'alguna activació per part de la llum de les reaccions de polimerització¹⁷⁸.

Els valors de concentració de procianidines es situen generalment al voltant dels 200– 700 mg/kg de raï m. La procianidina B1 és la majoritària en les pells, mentre que la B2 és la majoritària als pinyols. En els vins és majoritària la B1, cosa que indica que l'extractabilitat de les procianidines dels pinyols és limitada.¹⁷⁹ Alguns autors calculen la contribució de pells i pinyols a la tanicitat dels vins a partir de les relacions que s'estableixen entre el dímer B4, present únicament en els pinyols, i el B2, que es troba tant en pells com en pinyols¹⁸⁰.

Hi ha una àmplia variabilitat en les concentracions de catequines i proantocianidines en rapes, pells i pinyols en relació a la varietat de raï m. De fet, a diferència del que succeeix amb els antocians, les varietats blanques no són menys riques en aquests compostos que les varietats negres¹⁶⁸.

Pel que fa a les varietats, les del grup de Pinot, que es caracteritzaven per un baix nivell d'antocians, són les que presenten els valors globals superiors en mg/kg de raï m de catequines i proantocianidols^{181,182}. Cabernet també és descrita com una varietat amb elevats continguts de catequina i proantocianidines¹⁸³.

¹⁷⁶ Ricardo da Silva JM;Belchior AP;Spranger MI;Bourzeix M. (1992). "Oligomeric procyanidins of three grapevine varieties and wines from Portugal". *Sciences des Aliments*, 12 223-237

¹⁷⁷ Escribano-Bailon MT; Guerra MT; Rivas-Gonzalo JC; Santos-Buelga C. (1995). "Proanthocyanidins in skins from different grape varieties"; *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*;200 (3) 221-224

¹⁷⁸ Sun, B.;Ricardo-da-Silva, J. M.;Spranger, M. I. (2001). Quantification of catechins and proanthocyanidins in several Portuguese grapevine varieties and red wines; *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*;16 (1) 23-34

¹⁷⁹ Hmamouchi M;Es-Safi N;Boubekri C;Bourzeix M;Essassi EM. (1994). "Qualitative and quantitative analysis of berry proanthocyanidins of four Moroccan grape varieties". *Bulletin de l'O.I.V.*;67 901-915

¹⁸⁰ Freitas, V. A. P. de;Glories, Y.;Monique, A. (2000). "Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines"; *American Journal of Enology and Viticulture*; 51 (4) 397-403

¹⁸¹ Kovac V;Bourzeix M;Heredia N;Ramos T. (1990). "Etude des catechines et proanthocyanidols de raisins et vins blancs"; *Rev Franç d'Oenologie*;30 (125) 7-14

¹⁸² Mattivi F;Nicolini G;Sanchez C. (1991). "Comparison between the polyphenol content of Marzemino, Pinot noir and Sangiovese wines of 1989". *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 44 (1) 39-52

¹⁸³ Auv, J. M.;Blanco, V.;O'Keefe, S. F.;Sims, C. A.. (1996). "Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin, and Noble wines and juices". *American Journal of Enology and Viticulture*, 47 (3) 279-286

Les concentracions de procianidines tenen normalment el seu màxim en el moment del verolament, i després van decreixent fins a mantenir-se relativament constants al voltant del moment de la verema¹⁸⁰. No obstant això, en alguns casos aquest creixement no és uniforme i presenta variacions entre els anys¹⁸⁴.

2.1.3. Propietats que confereixen als vins

Les proantocianidines afecten propietats gustatives (amargor, astringència), cromàtiques i l'estabilitat i capacitat d'envelliment dels vins. Aquests efectes indiquen l'important paper que juguen en la qualitat del vi. De fet, en algunes pràctiques enològiques, el fet d'afegir quantitats suplementàries de pinyols en la fermentació pot resultar en una millor variació organolèptica del vi¹⁸⁵, encara que un excés condueix als efectes contraris¹⁸⁶.

Astringència: Els tanins interaccionen amb les glicoproteïnes de la saliva, agregant-se i podent precipitar, cosa que causa la sensació de sequedat en el paladar coneguda com astringència.¹⁸⁷ Aquesta astringència augmentaria amb el grau de polimerització, de manera que les catequines tindrien un efecte amargant, però no astringent¹⁸⁸.

Color: Aquestes molècules participen en processos de copigmentació amb els antocians. Com ja hem descrit, els antocians constitueixen una altra família de flavonoides que es caracteritzen per donar coloracions vermell-blavoses a flors, fruits, etc i són els principals responsables del color dels vins. Tanmateix, no en són els únics, ja que també és important per al color del vi els processos de copigmentació, és a dir, la interacció d'un grup cromòfor (antocià) amb un grup sense color (copigment) que modifica les propietats cromàtiques del primer. Això pot significar un increment de la coloració i un desplaçament del color cap a tonalitats més blavoses. Molecularment, aquest efecte s'aconseguiria per un apilament dels anells aromàtics de les molècules implicades en el procés. Dintre dels copigments, resulten molt importants els àcids fenòlics com el cafeic, el ferúlic, el p-cumàric, etc.; però els flavan-3-ols també poden participar en el procés.

¹⁸⁴ Katalinic, V.; Males, P. (1997). "Compositional changes in grape polyphenols throughout maturation". *Journal of Wine Research*; 8 (3) 169-177

¹⁸⁵ Kovac, V.; Alonso, E.; Revilla, E. (1995). "The effect of adding supplementary quantities of seeds during fermentation on the phenolic composition of wines". *Am J Enol Vitic.* Vol 46, n°3: 363-367

¹⁸⁶ Laminkara, O.; Garlick, D. (1987). "Effects of grape skin and seeds on the composition and quality of Muscadine wines". *Food Chem* 26:245-251

¹⁸⁷ Bravo, L. (1998). "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance". *Nutr Rev* ; 56, 317-333

¹⁸⁸ Rochibaud, J.L.; Noble, A.C. (1990). "Astringency and bitterness of selected phenolics in wine". *J Sci Food Agric* , 53, 343-353

Per altra banda, les catequines i les proantocianidines són les responsables de part de la component groga del color¹⁸⁹.

Estabilitat i capacitat d'envelliment del vi: Durant la vinificació i l'envelliment sofreixen canvis estructurals importants a causa de reaccions d'oxidació i polimerització, que comporten els canvis de color i sensorials característics d'aquests vins. Els antocians del raï m s'estabilitzen en la matriu vínica per una sèrie de reaccions que comporten la formació de nous pigments més estables. Entre el grup de reaccions possibles, hi ha la combinació amb els flavan-3-ols, en processos de condensació que poden estar mitjançats per molècules com l'acetaldehid. Aquests nous compostos confereixen estabilitat al color del vi i constitueixen el fonament de l'evolució dels vins joves cap als vins de cria.

Propietats biològiques: Tant les proantocianidines com els seus precursors, les catequines, són compostos actius biològicament, que poden actuar com a antioxidants¹⁹⁰, antihipertensius, capturadors de radicals lliures, anticancerigens, antivirals i antimicrobians. Òbviament, la seva solubilitat en el cos depèn del grau de polimerització¹⁹¹. Pel que fa a l'activitat capturadora de radicals lliures, s'ha descrit que l'esterificació amb àcid gàlic n'augmenta l'activitat, que per altra banda és superior en els dímers amb unió C4-C8 (proantocianidines B1-B4) que en els d'unió C4-C6 (dímers B5-B8).

Totes aquestes propietats justifiquen l'interès a quantificar i identificar la seva presència en raï ms i vi.

2.2. OBJECTIUS

1. Determinar la composició en catequines i proantocianidines oligòmeres en els pinyols de diferents varietats negres, així com del seu grau de polimerització mitjà, utilitzant diferents metodologies.
2. Avaluar-ne l'evolució al llarg de la maduració del raï m.
3. Estudiar la influència del reg en els anteriors punts.

¹⁸⁹ Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubordieu, Y. (1999). "Phenolic compounds", a "Handbook of enology, vol 2. The chemistry of wine, stabilization and treatments"; Ed. John Wiley & Sons.

¹⁹⁰ Teissedre, P.L.; Waterhouse, A.L.; Walzem, R.L.; German, J.B.; Frankel, e.n.; Ebeler, S.E.; Clifford, A.J. (1996). "Composés phénoliques du raisin et du vin et santé"; *Bull. OIV* 781-782:252-277

2.3. MATERIALS I MÈTODES

1. Mostreig

Els estudis es van efectuar en pinyols de les varietats negres de la finca del Mas dels Freres, durant la campanya 2002. De 20 raï ms agafats aleatòriament es separaven les pells, la polpa i els pinyols. Cada fracció era triturada en un morter amb nitrogen líquid, i la mostra congelada es conservava a -20°C fins al moment de l'extracció.

2. Extracció

El procediment d'extracció s'efectuà amb acetona 60%, que s'ha utilitzat sovint en l'extracció de proantocianidines.^{177, 192} Així, 0.1 g de mostra s'extreien amb 10 ml de solvent. L'extracte s'evaporava en un rotavapor i la fracció aquosa s'extreia tres vegades amb un volum de 10 ml d'acetat d'etil. La fracció orgànica es tornava a rotavaporar, i es redissolia en 1 ml de metanol.

3. Quantificació

El procés de quantificació de les catequines i les proantocianidines resulta problemàtic, ja que es tracta d'una família complexa, d'estructures diverses i diferent reactivitat. No hi ha cap assaig universal útil, cosa que fa que els resultats difereixin segons la metodologia emprada¹⁹³.

En el nostre cas, les determinacions que es van dur a terme van ser 3:

1. Reacció amb aldehids
 - 1.1. Assaigs colorimètrics
 - 1.2. Cromatografia en capa fina
2. Separació dels oligòmers per HPLC
3. Estimació del grau mitjà de polimerització per anàlisi dels productes de trencament.

¹⁹¹ daSilva, J.; Rigaud, J.; Cheynier, V. (1991). "Procyanidin dimers and trimers from grape seeds"; *Phytochemistry*, 30:1259-1264

¹⁹² Brunet, M.J. (1999) "Identificació i transport plasmàtic de les procianidines del vi", *Tesi Doctoral*. URV.

¹⁹³ Escribano-Bailón, M.T. (1993). "Estudio de la Composición Flavánica de la Semilla de la Uva", *Tesi Doctoral*. Facultat de Farmàcia, Universitat de Salamanca.

2.3.1 REACCIÓ AMB ALDEHIDS

2.3.1.1) Assaigs colorimètrics

Aquests assaigs es fonamenten en l'atac electròfil que executen els aldehids protonats sobre l'anell A de les catequines i proantocianidols, que té una densitat electrònica especialment elevada. La reacció depèn de l'aldehid escollit; així, per exemple, amb el formaldehid i l'acetaldehid es formen complexos incoloros que precipiten al cap de poc temps.¹⁹⁴ Per utilitzar aquesta reacció com a mesura de quantificació de catequines i proantocianidines, destaquen principalment 2 metodologies:

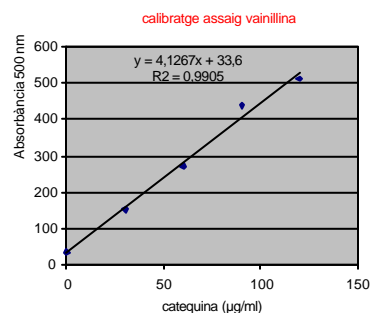
- a) Assaig de la vainillina
- b) Assaig del DMACH

a) L'assaig de la vainillina és força específic per un estret grup de flavanols (monòmers i polímers) i dihidrocalcones que tenen un enllaç senzill en la posició 2,3 i els grups hidroxil de l'anell B en posició meta. El resultat és la formació de complexos vermells solubles. Durant molts anys l'assaig de la vainillina ha estat utilitzat extensivament com un mètode colorimètric estàndard per a la determinació de flavanols¹⁹⁵; encara que la seva manca de reproduïbilitat ha provocat molts estudis per tal d'optimitzar el mètode.¹⁹⁶

Assaig de la vainillina

Mostra	Blanc
125 µl de mostra dilució 1:233)	125 µl de mostra (dilució 1:233)
305 µl de vainillina en MeOH (1% p/v)	305 µl de metanol
305 µl de H ₂ SO ₄ en MeOH	305 µl de H ₂ SO ₄ en MeOH
Lectura a 500 nm passats 15 minuts	

La recta patró s'efectuava amb catequina 0-120 µg/ml



¹⁹⁴ Glories, Y. (1974). "Recherches sur la structure et les propriétés des composés phénoliques polymérisés des vins rouges. I- Précipitation par l'aldéhyde formique et par l'acide chlorhydrique concentré". *Conn. Vigne Vin*, 8, n°1, 57-74

¹⁹⁵ Price, ML; Scoyoc, SV; Butler, LG. (1978). "A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain". *J. Agric. Food Chem.*, 26, 1214-1218

¹⁹⁶ Sun, B; Ricardo-da-Silva, J.M; Spranger, I. (1998) "Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins". *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4267-4274

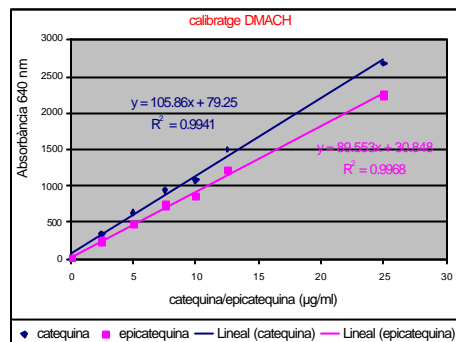
b) El p-dimetilcinnamoaldehyd (DMACH) és molt més específic que la vainillina, però té el desavantatge que el complex blau que genera resulta molt menys estable.¹⁹⁷

Assaig DMACH¹⁹⁸

Mostra	Blanc
200 µl de mostra (dilució 1:233)	200 µl de mostra (dilució 1:233)
500 µl solució DMACH*	500 µl solució HCl 37% en MeOH

Lectura a 640 nm passats 10 minuts

100 mg de DMACH dissolts en 10 ml de HCl 37% i enrasats a 100 ml amb MeOH



Es van efectuar dues rectes de calibratge, amb catequina i epicatequina, 0-25 µg/ml. A partir d'aquestes rectes, s'interpolava el valor de catequines de les mostres.

Aquest darrer mètode s'ha proposat com a índex per fer una estimació de l'estat de condensació de les proantocianidines, a partir de la relació entre els valors que s'obtenen mitjançant els assajos de Folin-Ciocalteu i de flavonoides¹⁹⁹ respecte als valors obtinguts pel mètode del DMACH. El fonament és que, com més elevat sigui el grau de polimerització, menys accessibles a l'aldehyd són els llocs nucleòfils dels tanins, de manera que el color format és més feble quan el grau de condensació és elevat, especialment si es formen estructures ramificades¹⁹⁷.

2.3.1.2) Anàlisi de catequines mitjançant cromatografia en capa fina

La reactivitat dels aldehids protonats amb les catequines ha permès que s'utilitzin com a agents reveladors en cromatografia en capa fina. D'entre ells, el més comunament utilitzat és la vainillina en àcid clorhídric concentrat^{200, 201} o en àcid sulfúric²⁰², però en alguns treballs s'utilitza el DMACH en medi àcid²⁰³, que és particularment útil en l'anàlisi

¹⁹⁷ Nagel, CW; Glories, Y. (1991). "Use of a modified Dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols", *Am.J.Enol. Vitic.*, vol 42, n°4, 364-366

¹⁹⁸ Vivas N; Glories Y; Lagune L; Saucier C; Augustin M. (1994). "Estimation of the polymerisation level of procyranidins from grapes and wines by use of p-dimethylaminocinnamaldehyde"; *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*; 28 319-336

¹⁹⁹ Amerine, MA; Ough, CS. (1980). "Methods for analysis of musts and wines", John Wiley & Sons, New York

²⁰⁰ Lea, AGH; Timberlake, CF; Singleton, VL. (1979). "The procyranidins of white grapes and wines"; *Am J Enol Vitic* 30, 289-300

²⁰¹ Sun, B; Leandro, C; Ricardo Da Silva, JM; Spranger, I. (1998). "Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization"; *J Agric Food Chem*, 46, 1390-1396

²⁰² Ruiz, J. (1999). Comunicació personal

²⁰³ Vivar-Quintana, AM. (2001). "Fraccionamento y estudio preliminar de la materia colorante del vino tinto". *Tesi Doctoral*. Fac. Farmàcia, Univ Salamanca

de vins negres i d'extractes de pells, ja que presenta l'avantatge que permet diferenciar clarament les proantocianidines, que donen coloracions blavoses, dels compostos antociànics, que donen color vermell.

La formació de color resulta un aspecte avantatjós perquè permet una major especificitat que la detecció ultravioleta, amb vapors d'amoniac o amb vapors de iode, també utilitzades per la identificació de catequines²⁰⁴.

La tècnica de la cromatografia en capa fina en fase de sílica permet diferenciar les catequines fins al grau d'hexàmers^{192, 205} o fins i tot d'heptàmers²⁰⁶. Altres metodologies permeten també la separació de les proantocianidines segons el seu grau de polimerització, com són la utilització de columnes Sephadex LH-20²⁰⁷ o columnes Fractogel¹⁷⁰, però tenen l'inconvenient de resultar tècniques més laborioses i menys econòmiques.

Per la separació en la cromatografia en capa fina, s'utilitzen cromatoplaques de sílica (Merck, 20 x 20) i s'empra com a eluent una mescla de toluè: acetona: àcid acètic (3:3:1), d'acord amb l'establert en la bibliografia²⁰¹. El volum de càrrega fou de 4 µl d'extracte i de 2 µl de patrons de catequina/epicatequina 10 mM en metanol, i de malvidina 1.02 mg/ml.

La revelació s'efectua per pulverització amb una de les següents solucions:

- a) Vainillina 10% en àcid clorhídric 6N en metanol.
- b) DMACH 1% en àcid sulfúric 3M en metanol

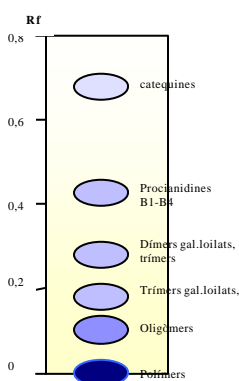


Fig 2.3.1.1. Separació per TLC de les proantocianidines segons el seu grau de polimerització. Adaptat de Sun.²⁰¹

En aquestes condicions, s'obté una separació de les proantocianidines d'acord al seu grau de polimerització, tal i com es recull a la figura 2.3.1.1. Mitjançant aquesta metodologia es poden separar les catequines, que són les que més avancen en el front del dissolvent, els oligòmers i els polímers. En aquest sentit, és una bona tècnica per avaluar la presència de cadascuna d'aquestes fraccions, i també evita la interferència

²⁰⁴ Merck. (1998). "Anfangsreagenzien für Dünnschicht und Papier-Chromatography"

²⁰⁵ Oszmianski, J; Sapis, JC. (1989). "Fractionation and identification of some low molecular weight grape seed phenolics". *J Agric Food Chem* 37, 1293-1297

²⁰⁶ Lea, AGH. (1978). "The phenolics of cider: oligomers and polymers procyanidins"; *J SciFood Agric*, 25, 1537-1545

²⁰⁷ Boukharta, M; Girardin, M; Metche, M. (1988). "Procyanidines galloylées du sarment de vigne (Vitis vinifera). Séparation et identification par chromatographie liquide haute performance et chromatographie en phase gazeuse". *J Chromatogr* 455, 4065-409

dels antocians en el cas dels dímers i monòmers, ja que la seva Rf és diferent. Malgrat això, el fet que les Rf dels isòmers sigui similar¹⁷⁶ suposa que en cada banda es poden trobar diversos isòmers amb el mateix grau de polimerització. Això és particularment acusat en el cas de la fracció polimèrica, en què coincideixen totes les proantocianidines a partir dels pentàmers.

2.3.2) ANÀLISI DE CATEQUINES PER HPLC

La cromatografia líquida en fase reversa resulta una tècnica àmpliament utilitzada per la determinació de catequines i proantocianidines dímers. També és possible l'anàlisi de trímers²⁰⁸ i fins i tot tetràmers²⁰⁹, però a majors graus de polimerització, en incrementar el nombre d'isòmers, resulta una co-elució d'aquests compostos en un pic no resolt, tot i que recentment s'ha utilitzat també aquest pic per l'estimació de la fracció polimèrica²¹⁰. El sistema de detecció més utilitzat és l'absorbància a 280 nm, encara que la seva inespecificitat ha propiciat la utilització de sistemes de derivatització amb DMACH²⁰⁸.

En la present tesi, la separació cromatogràfica es va efectuar mitjançant HPLC en fase reversa, amb una columna Spherisorb ODS-2 (Waters) de 5 µM de mida de partícula, 25 cm de longitud i 0,46 cm de diàmetre intern. La temperatura de columna es manté constant a 25°C, i el volum d'injecció de mostra és de 100 µl. La detecció es monitoritza a $\lambda=280$ nm, encara que també es registren els resultats corresponents a $\lambda=254$ nm. Les fases mòbils utilitzades foren: A (àcid fòrmic 4.5%, de Panreac); B (90%A – 10% acetonitril, de Carlo Erba). L'elució es va produir a flux constant de 1,5 ml/min, amb el següent gradient: 0 minuts, 0% B; 10 minuts, 40%B; 30 minuts, 60%B, 35 minuts, 100%B; 50 minuts, 100%B; 60 minuts, 0%B.¹⁷⁷

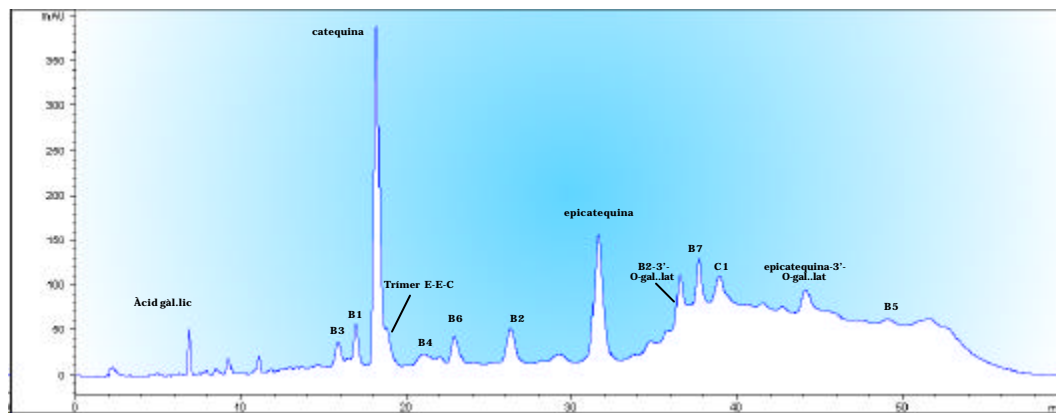
Per a realitzar aquesta determinació, es requereix que la mostra estigui en solució aquosa, ja que si no tots els pics elueixen al principi del procés cromatogràfic. Per aquest motiu es va procedir a l'evaporació del metanol dels extractes sota atmosfera de gas inert (nitrogen), i a la seva posterior redissolució en un volum equivalent d'aigua milliQ.

²⁰⁸ S de Pascual-Teresa, S; Santos-Buelga, C; Rivas-Gonzalo, JC. (2000). "Quantitative analysis of flavan-3-ols in spanish foodstuff and beverages". *J Agric Food Chem*, 48, 5331-5336

²⁰⁹ Carando, S; Teissedre, PL; Pascual-Martinez, L; Cabanis, JC. (1999). "Levels of flavan-3-ols in french wines". *J Agric Food Chem*, 47, 4161-4167

²¹⁰ Peng, Z; Hayasaka, Y; Iland, PG; Sefton, M; Hoj, P; Waters, EJ. (2001). "Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography "; *J Agric Food Chem*, 49, 26-31

En el cromatograma 2.3.1.1 es presenten els pics obtinguts per una mostra de pinyols. La identificació, en no disposar de patrons comercials de tots els oligòmers, es va efectuar a partir de la comparació dels temps de retenció amb la bibliografia¹⁹³.



Cromatograma 2.3.1.1. Separació cromatogràfica de catequines, dímers i trímers

La quantificació es realitzava a partir de rectes patrons d'àcid gàl.líc, catequina i epicatequina, en un rang de concentracions (0-100 μ M). En el cas dels oligòmers, els resultats s'expressen com a catequina.

2.3.3. ESTIMACIÓ DEL GRAU DE POLIMERITZACIÓ MITJÀ PER DETERMINACIÓ DELS PRODUCTES DE TRENCAMENT

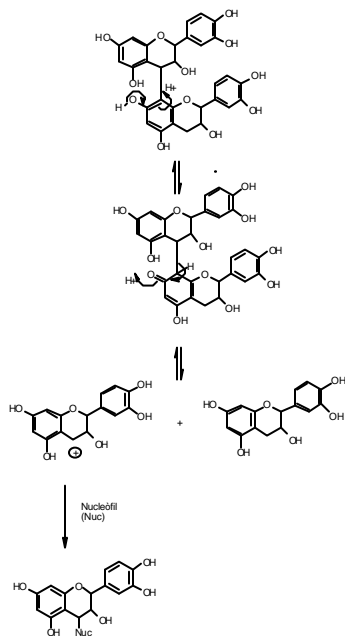


Figura 2.3.3.1. Mecanisme de la reacció de despolimerització

La relativa facilitat amb què es pot trencar l'anell interflavonoid fa possible determinar la composició en subunitats de les proantocianidines, després del seu trencament mitjançant catalisi àcida²¹¹. Aquest tipus de degradació constitueix el fonament de la determinació mitjançant l'assaig en butanol/HCl²¹², en què les unitats flavan-3-ol de la cadena s'oxiden per donar els corresponents antocians.

En aquestes condicions àcides, la despolimerització de les proantocianidines (figura 2.3.3.1) té lloc de manera que les unitats terminals són alliberades en forma de monòmers flavan-3-ol, mentre que les subunitats d'extensió generen intermedis flavan-3-ols electrofílics, que poden ser capturats per reactius nucleofílics i generar així adductes analitzables.

Entre els agents nucleofílics més utilitzats es troben el fluroglucinol i el benzil mercaptà. El fluoroglucinol presenta una sèrie d'avantatges, com són una major selectivitat en la formació dels adductes, així com el fet que és inodor, cosa que facilita el treball amb aquest reactiu²¹³.

Els adductes formats poden ser separats mitjançant HPLC, i dels resultats es pot calcular el grau mitjà de polimerització (mean degree of polymerization, mDP), a partir de la relació entre les concentracions molars de les subunitats terminals respecte les subunitats totals (terminals + d'extensió).

$$\text{mDP} = \frac{\text{subunitats totals}}{\text{Subunitats terminals}}$$

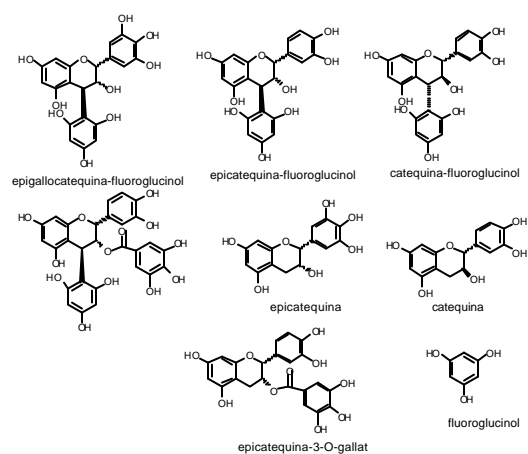
²¹¹ Matthews, S.; Mila, I.; Scalbert, A.; Pollet, B.; Lapierre, C.; Hervé du Penhoat, CLM; Rolando, C.; Donnelly, DMC. (1997). "Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles"; *J. Agric Food Chem.* 45, 1195-1201

²¹² Bate-Smith, E. (1955). *Food*, 23, 124

²¹³ Kennedy, JA; Jones, GP. (2001). "Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol". *J Agric Food Chem*, vol 49(4), 1740-1746

Per altra banda, l'anàlisi dels productes de trencament també ens permet averiguar la participació de cada monòmer en la polimerització.

Els productes que es poden formar de la degradació dels oligòmers i polímers després de la catalisi àcida són els següents (figura 2.3.3.2):



a) Subunitats terminals: catequina, epicatequina, epicatequina-3-O-gallat

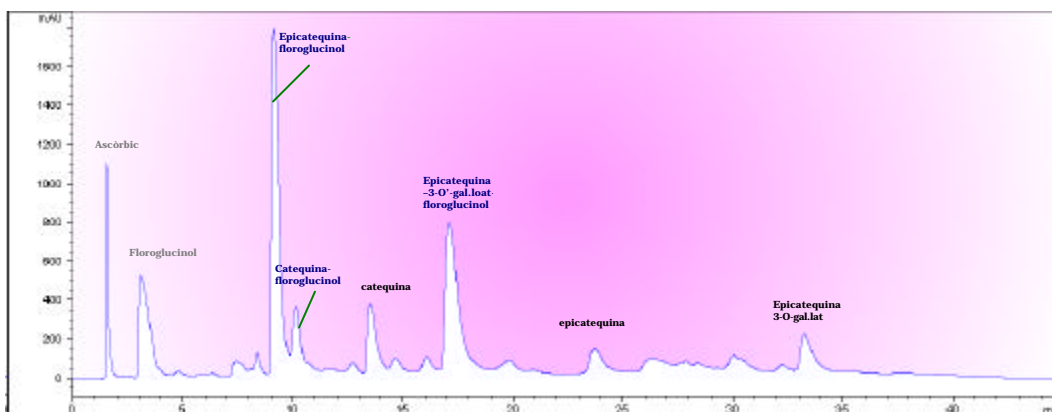
b) Adductes amb fluoroglucinol:
 Epigallocatequina-(4 β →2)-floroglucinol;
 Epicatequina-(4 β →2)-floroglucinol;
 catequina-(4 α →2)-floroglucinol;
 epicatequina-3-O-gallat-(4 β →2)-floroglucinol

Figura 2.3.3.2. Estructura química dels adductes formats en la reacció de trencament en presència d'un nucleòfil

Està descrita una inhibició de la reacció amb el floroglucinol quan al medi de reacció hi ha aigua²¹³. Amb un 20% d'aigua, la conversió global s'inhibia en un 50%, i en casos particulars (concretament, l'adducte amb epicatequina-3-O-gallat), la inhibició resultava del 63%. Per aquest motiu, l'extracte que s'utilitzà en la reacció de despolimerització era l'extracte metanòlic.

La metodologia emprada fou similar a la citada en les fonts bibliogràfiques²¹³, tot i que augmentant la concentració d'àcid. Així, a un volum d'extracte metanòlic s'afegia un volum de solució 10% de floroglucinol, 2% d'àcid ascòrbic i 0,5 N de HCl. La barreja de reacció s'incubava durant 20 minuts a 50°C, i la reacció s'aturava amb 4 volums de solució d'acetat sòdic 200 mM, que neutralitzava l'excés d'àcid. Per altra banda, la concentració final de metanol en la mostra és del 20%, que resulta acceptable per a la separació cromatogràfica.

La determinació per HPLC dels adductes de floroglucinol es duia a terme adaptant el mètode per a la determinació de catequines que s'ha descrit prèviament, de manera que el flux s'augmentava a 2 ml/min. En el cromatograma 2.3.3.1 es recull l'ordre d'elució dels adductes de floroglucinol i les subunitats terminals, identificades a partir del seu temps de retenció. En les fonts bibliogràfiques s'ha dut a terme la caracterització dels productes mitjançant LC-MS; mentre que en el nostre cas l'assignació s'ha fet per comparació dels temps de retenció i per comparació del cromatograma obtingut entre la mostra i un blanc en què s'afegien els 4 volums d'acetat sòdic prèviament a l'àcid, de manera que la reacció de despolimerització no podia tenir lloc.



Cromatograma 2.3.3.1. Separació cromatogràfica dels productes de despolimerització en medi àcid dels tanins dels pinyols

Per calcular el grau de polimerització mitjà, es van utilitzar els següents valors d'absortivitat molar²¹³:

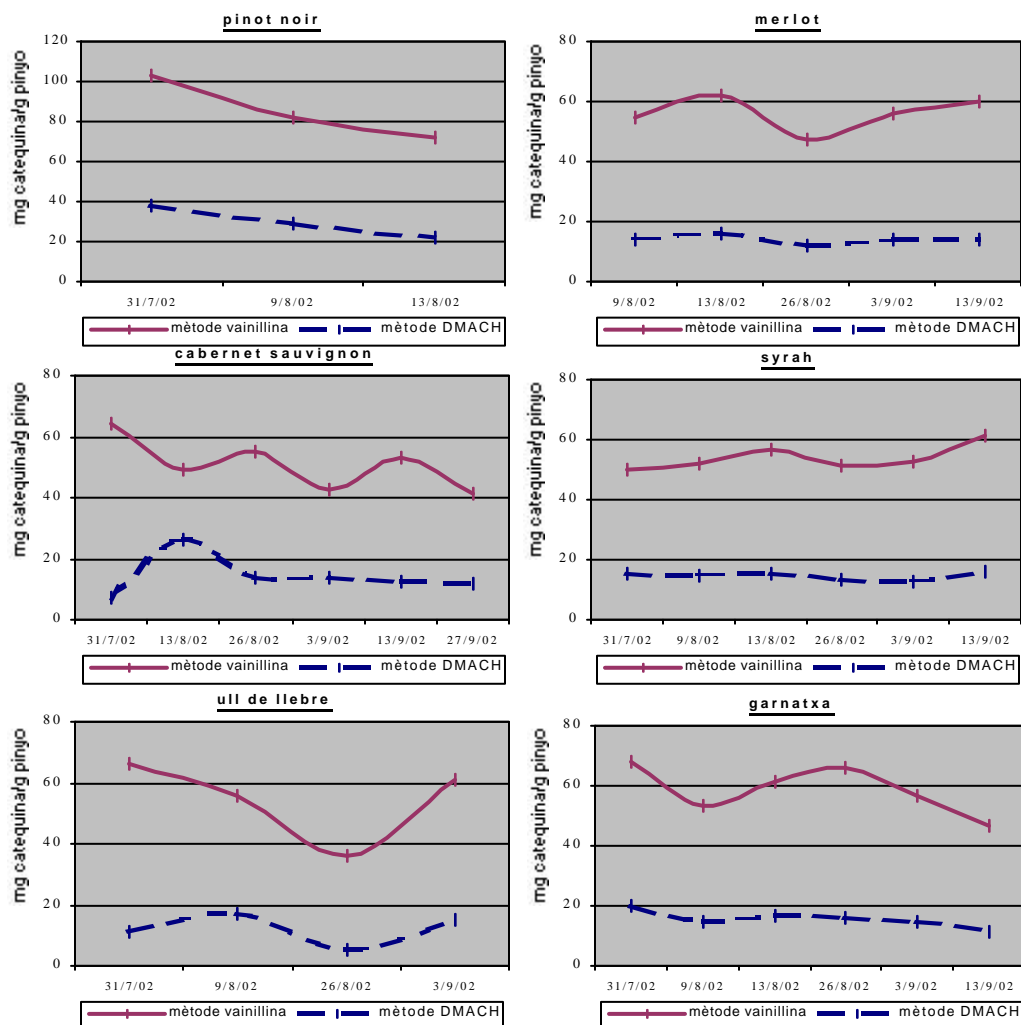
Epicatequina-floroglucinol	4218
Catequina-floroglucinol	4218
Epicatequina-3-O-gal.loat-floroglucinol	14766
Epicatequina	3988
Catequina	3988
Epicatequina-3-O-gal.loat	12611

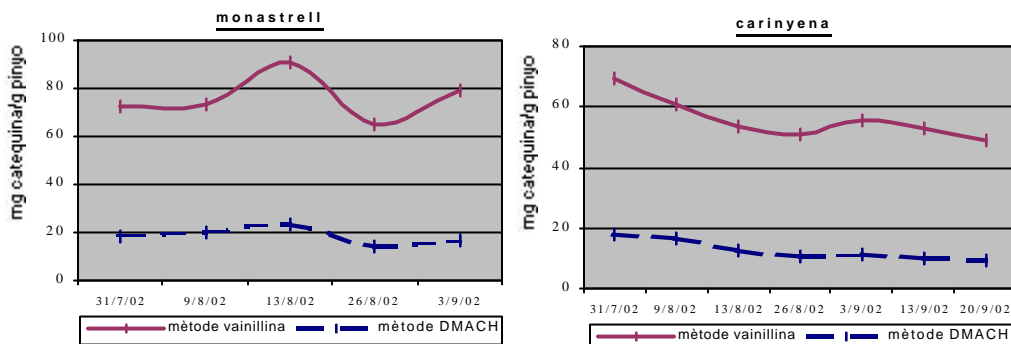
El càlcul del grau de polimerització mitjà (mDP) és la relació entre el nombre de subunitats terminals, expressades en mols; respecte les unitat totals.

2.4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

2.4.1) Anàlisi del contingut en catequines dels pinyols de les diferents varietats

En les següents gràfiques es recull l'evolució en catequines dels pinyols al llarg del verolament i la maduració per les varietats cultivades al Mas dels Frares. Els resultats corresponen a la campanya 2002. En la gràfica es presenten els valors corresponents a l'índex de vainillina i a l'índex DMACH.





Gràfics 2.4.1.1. Proantocianidines totals calculades pels mètodes de la vainillina i del DMACH. Es representa l'evolució al llarg de la maduració per les diferents varietats objecte d'estudi.

Una primera observació és que els resultats obtinguts mitjançant la metodologia de la vainillina resulten més elevats que els corresponents amb el DMACH. Una possible explicació seria com a conseqüència del propi mètode, ja que el DMACH no dona uns adductes tan estables, de manera que el color no resulta tampoc estable. Tanmateix, també cal contemplar que amb el mètode de la vainillina es sobreestimen els valors a causa d'una menor especificitat, cosa que ja recull la bibliografia.¹⁹⁸ De totes maneres, la correlació entre les mesures sembla prou bona, ja que es mantenen les proporcions entre els valors calculats per les 2 metodologies.

Encara que no presentin influència en les determinacions de catequines en pinyols, els antocians, malgrat no reaccionar (o fer-ho molt feblement) amb aquests aldehids, sí poden provocar una sobreestimació de la lectura, sobretot en el cas de la vainillina, ja que absorbeixen a una longitud d'ona molt propera a la que es fa servir per efectuar la mesura (500 nm). Sembla, doncs, que la realització d'un blanc no resultaria suficient per corregir aquesta presència. En el cas del DMACH, també s'han trobat problemes en el cas que la mostra presenti color, ja que el reactiu provoca un canvi cromàtic de la solució que es tradueix en un increment de l'absorbància a 520 (provocada per l'efecte hiperacròmic de l'àcid respecte el ió flavili dels antocians) i en nous pics d'absorbància en la regió del groc, que podrien estar associats a absorció de tanins. El resultat és que tampoc esdevé una mesura reproduïble, cosa que desaconsella la seva utilització directa en mostres colorejades (com són extractes de pells o vins). La solució metodològica podria implicar l'anàlisi dels efectes de matriu per tal de fer rectes d'addicions estàndards, encara que pot resultar una

tasca extraordinàriament feixuga. Però, l'alternativa de fraccionament per columna de les mostres per tal de separar els antocians dels flavanols i tanins presenta el problema que resulta difícil trobar la metodologia apropiada per garantir una adequada separació amb uns bons rendiments¹⁹³.

Pel que fa al contingut, la tendència general és que a mida que avança la maduració de la baia, hi ha una disminució en les catequines dels pinyols, encara que no sembli tan dràstica com es descriu en la bibliografia. Això podria ser degut a diferències en l'efectivitat del mètode segons l'etapa de mostreig: s'atribueix una major resistència de les estructures dels pinyols en les primeres etapes del verolament, que comportarien una menor extractabilitat dels compostos fenòlics.

Quant als nivells segons les varietats, convé destacar:

a) els alts valors de catequines en pinyol de Pinot noir i de Monastrell, que gairebé dupliquen els que es troben en les altres varietats. En ambdós casos, els valors segons l'índex de la vainillina es situarien al voltant dels 70 mg/g pinyol (al voltant dels 20 mg/g pinyol per l'índex de DMACH). En el cas del Pinot noir, el fet que sigui una varietat de verema molt avançada (a l'agost) podria influir en aquests continguts elevats. En el cas del monastrell, és evident que no ha assolit el nivell de maduresa adequat per la varietat. De fet, és de cicle llarg i no madura bé en el mesoclima de Constantí, motiu pel qual, seguint les pautes enològiques establertes en la finca experimental de la facultat, es verema un mes abans de la maduresa tecnològica per tal d'utilitzar-lo per elaborar vi escumós.

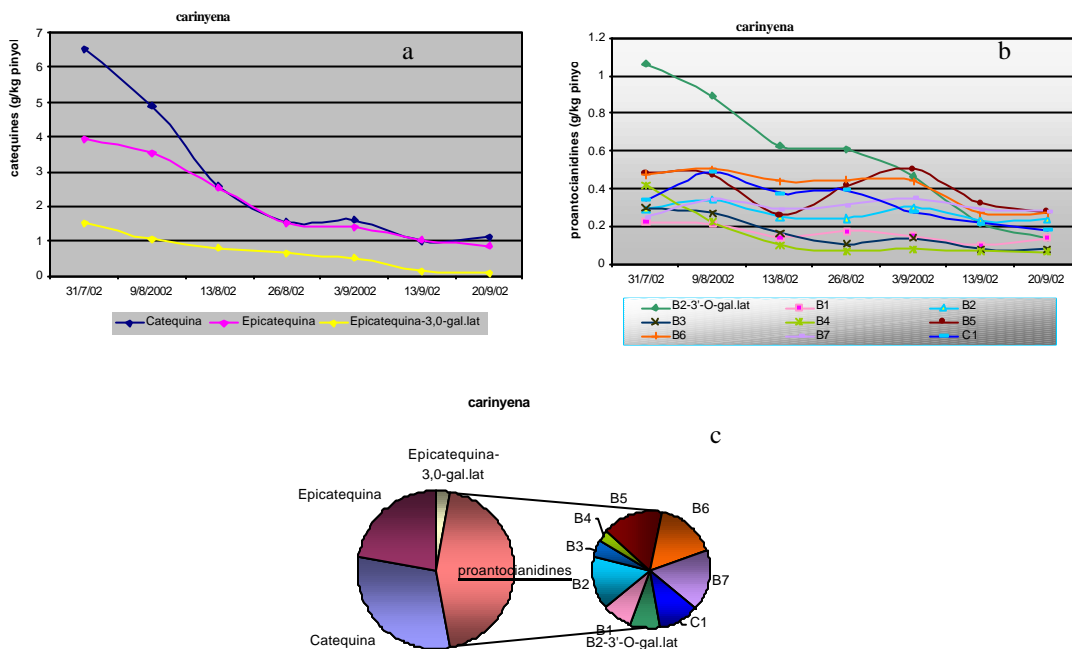
b) Els valors per la varietat carinyena i garnatxa són els més baixos (50 mg/g en l'assaig de vainillina; 10 mg/g en l'assaig de DMACH). Novament l'explicació podria venir raonada pel temps de maduració, ja que aquestes dues són de les varietats més tardanes (amb veremes al 20 i 13 de setembre, respectivament). No obstant això, Syrah i Merlot tenen una data de collita pròxima a la de la garnatxa, i presenten uns valors més elevats de catequines en pinyol. El fet de trobar aquests valors elevats apunta cap al major contingut fenòlic que caracteritza a merlot i syrah per una banda, i per l'altra, que en ambdós casos les gràfiques presenten un augment anòmal en les darreres fases de la maduració, que podria ser atribuït a un increment de l'extractabilitat més que a un increment real de la síntesi.

c) El cabernet i l'ull de llebre, en canvi, assoleixen uns nivells de catequines en verema menors que merlot i syrah.

2.4.2 Procianidines oligòmers per HPLC.

En les següents gràfiques es presenta l'evolució dels monòmers i oligòmers de procianidines pels pinyols de les diferents varietats en la campanya 2002:

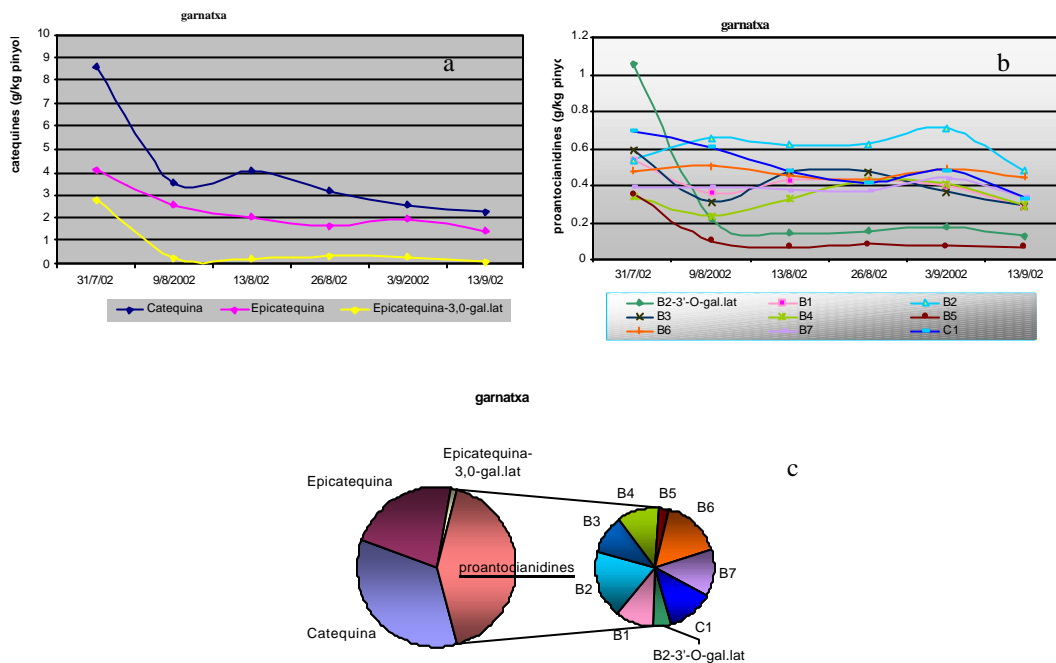
1. Carinyena



Gràfics 2.4.2.1. Evolució durant la maduració en la varietat carinyena de: A) flavan.-3-ols monomèrics. B) Proantocianidines oligomèriques. Resultats expressats en g / kg pinyol (pes fresc). C) Representació sectorial de la composició percentual dels flavanols i dels proantocianidols en el moment de la verema.

En la varietat Carinyena, hi ha una disminució clara dels monòmers, especialment de la catequina, en la maduració, de tal manera que d'unes concentracions inicials de $6,5 \pm 0,3$ g/kg pinyol (pes fresc), els valors finals són de $1,1 \pm 0,2$ g/kg pinyol. De totes maneres, els valors sempre estan per sobre dels dímers i trímers determinats, els quals oscil·len en tot moment entre els 0,2 i els 0,4 mg/kg pinyol. Entre aquests oligòmers, hi ha un descens de la B2 esterificada amb àcid gàl·lic, així com de la B4.

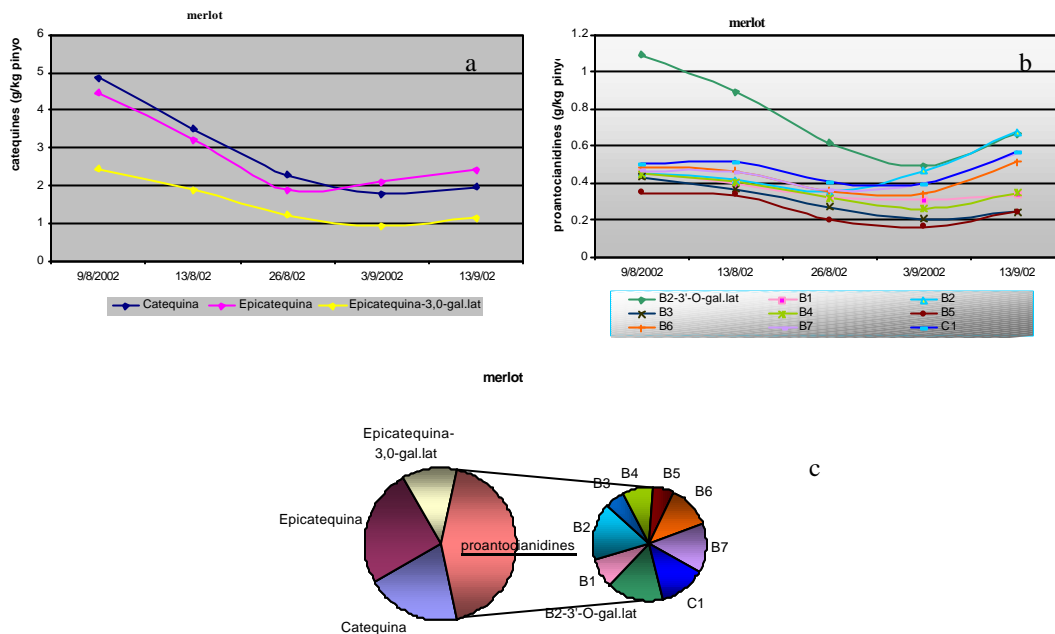
2. Garnatxa



Gràfics 2.4.2.2. Evolució durant la maduració en la varietat garnatxa de: A) flavan.-3-ols monomèrics. B) Proantocianidines oligomèriques. Resultats expressats en g / kg pinyol (pes fresc). C) Representació sectorial de la composició percentual dels flavanols i dels proantocianidols en el moment de la verema.

En la Garnatxa, també hi ha una disminució dels monòmers al llarg de la maduració del pinyol, tot i que resulta més suau. En canvi, en els oligòmers resulta, en general, molt més estable al llarg de la maduració, a excepció de la procianidina B2 esterificada amb àcid gàl·lic, que disminueix dràsticament de concentració. En contraposició, la corresponent forma no esterificada, la B2, es manté força constant i a uns nivells relativament alts (al voltant dels 0.6 mg/kg pinyol). Això suggereix que més que una síntesi neta de B2, el que hi ha és una hidròlisi de l'enllaç ester de la forma gal·lada, de tal manera que, malgrat que hi pugui haver desaparició de B2 en processos de polimerització, queden compensades per aquesta hidròlisi.

3) Merlot



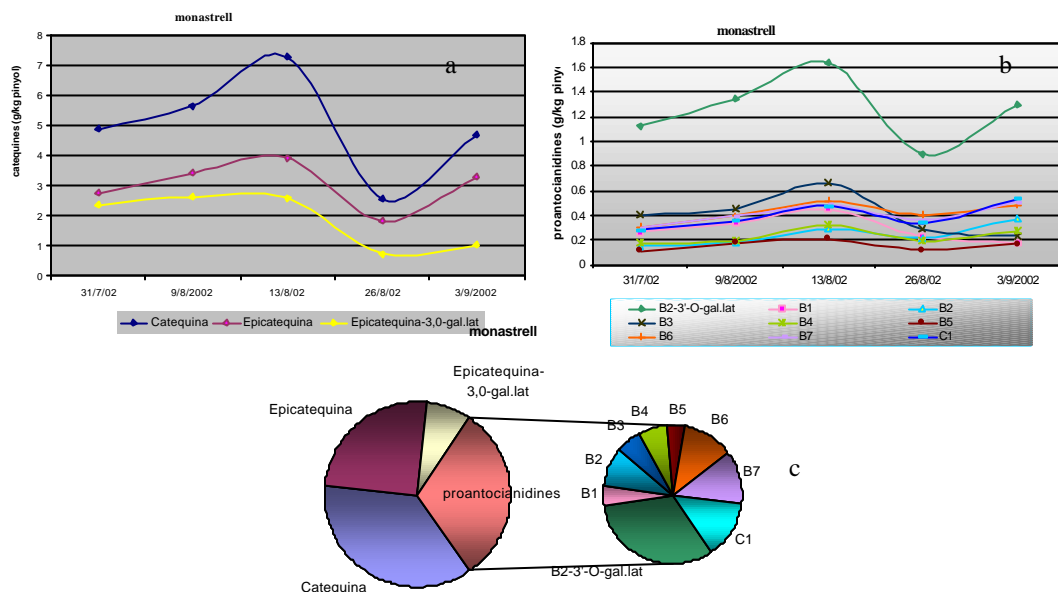
Gràfics 2.4.2.3. Evolució durant la maduració en la varietat merlot de: A) flavan.-3-ols monomèrics. B) Proantocianidines oligomèriques. Resultats expressats en g / kg pinyol (pes fresc). C) Representació sectorial de la composició percentual dels flavanols i dels proantocianidols en el moment de la verema.

En el cas del Merlot, l'evolució sembla concordar amb la de les varietats abans comentades, per bé que la primera mostra analitzada, del 9 d'agost, resulta una mica més madura que les primeres mostres analitzades en les altres varietats. Podem suposar, doncs, que els nivells inicials estarien al voltant dels 10 g/kg pinyol. Convé destacar el fet que els nivells de catequina i epicatequina són molt similars al llarg de tota la maduració, i de fet al moment de la verema són lleugerament més alts els d'epicatequina, sobretot si considerem la suma de les dues formes (lliure i esterificada amb gál.lic). Aquests valors concorden amb els de la bibliografia²¹⁴. Pel que fa als oligòmers, també predominen les combinacions d'epicatequina: la B2 (Epicatequina→Epicatequina), tant lliure com esterificada amb àcid gál.lic, i la C1 (Epicatequina→Epicatequina→Epicatequina), així com la B6 (Epicatequina→Catequina) són les majoritàries al moment de la verema. La B2 especialment, augmenta al final del període, cosa que està d'acord amb resultats observats en altres regions.²¹⁵

²¹⁴ Fuleki, T; Ricardo da Silva, JM.(1997). "Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario", *J. Agric. Food Chem.* 145, 1156-1160

²¹⁵ Saint-Cricq de Gaulejac,N; Augustin, M; Vivas, N; Glories, Y.(1997). "A biochemical approach to the evolution of procyanidin in grape seeds during the ripening of red grapes (*Vitis vinifera* L.cv. Merlot Noir); *Journal of Wine Research*, vol 8, n°3, 159-167

4) Monastrell

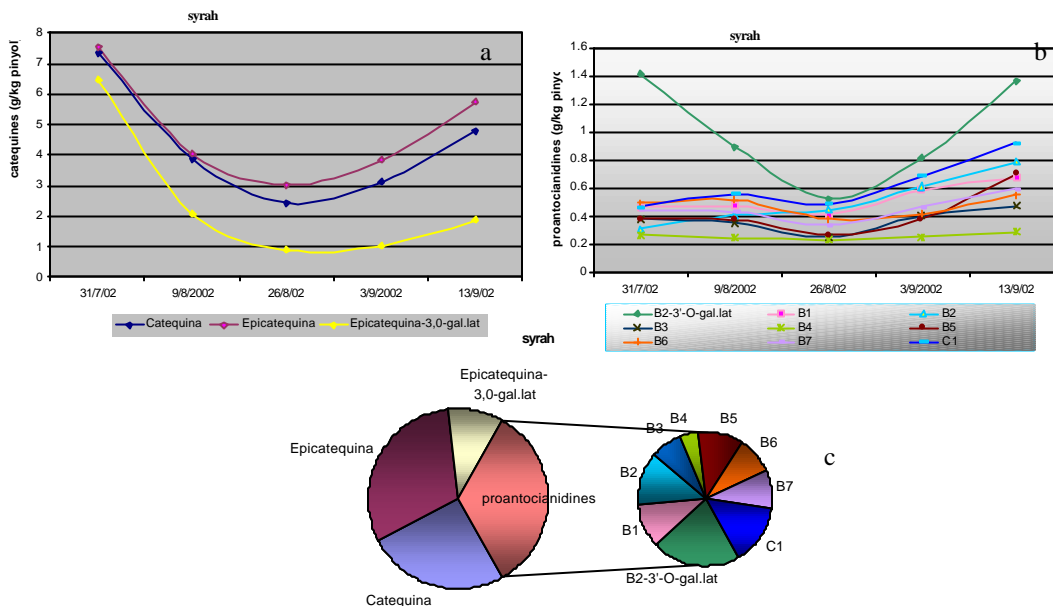


Gràfics 2.4.2.4. Evolució durant la maduració en la varietat monastrell de: A) flavan.-3-ols monomèrics. B) Proantocianidines oligomèriques. Resultats expressats en g / kg pinyol (pes fresc). C) Representació sectorial de la composició percentual dels flavanols i dels proantocianidols en el moment de la verema.

En monastrell hi ha un lleuger increment al final de la maduració del contingut en catequines, i també hi ha un augment de la síntesi al principi del procés maduratiu. Aquest comportament és inusual, ja que prèviament només ha estat descrit¹⁸⁴ un increment en el contingut fins a moments propers al verolament, i en canvi, el monastrell, a data de 13 d'agost ja es trobava verolat. Cal comentar que la seva maduració no ha estat completa, ja que és una varietat que es destina a la producció de vins escumosos, cosa que implica una verema avançada.

En la composició d'oligòmers, destaca l'abundància del trimer C1. El fet que la seva abundància sigui superior a la dels dímers indicaria que en aquest varietat es dóna una alta tendència a les reaccions de polimerització dels tanins.

5) Syrah



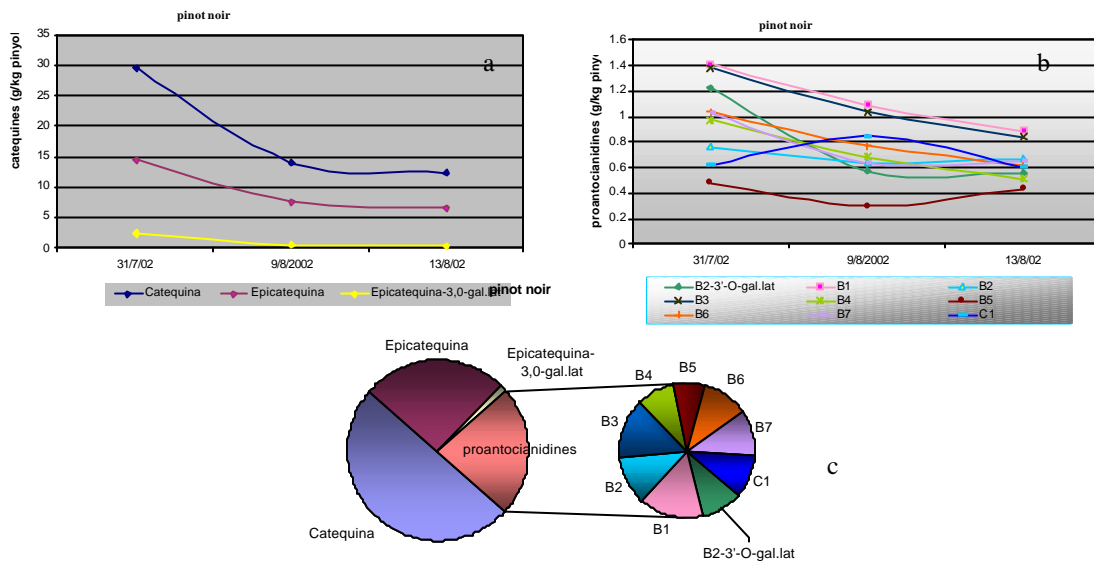
Gràfics 2.4.2.5. Evolució durant la maduració en la varietat syrah de: A) flavan.-3-ols monomèrics. B) Proantocianidines oligomèriques. Resultats expressats en g / kg pinyol (pes fresc). C) Representació sectorial de la composició percentual dels flavanols i dels proantocianidols en el moment de la verema.

Syrah presenta un comportament anòmal quant a l'evolució d'aquests compostos en comparació amb les corbes que s'observen per d'altres varietats, ja que els seus valors augmenten en acostar-se el moment de la verema. De fet, en la bibliografia es recullen alguns comportaments similars, encara que els valors no augmenten amb la magnitud que s'observa en els nostres resultats²¹⁶. La gràfica concorda, però, amb l'obtinguda en el cas de la reacció amb aldehids, i per tant indicaria que, d'haver-hi alguna anomalia, correspondria al procés d'extracció i no al de determinació. Una possible explicació és que es produeixi en el processament de les mostres una degradació per part dels polímers. En la fase de rotavaporació s'intenta treballar per sota de 40°C per tal d'evitar aquest procés, ja que s'està evaporant un solvent amb característiques lleugerament àcides. No sembla, però, que aquest procés hagi afectat la resta de varietats objecte d'estudi.

Pel que fa a la composició, els nivells d'epicatequina són superiors que no pas els de catequina, i destaquen els elevats valors de l'espècie B2-gal.lat.

²¹⁶ Downey, M.O; Harvey, JS; Robinson, SP. (2003). "Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development"; *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9, 12-14

6. Pinot noir

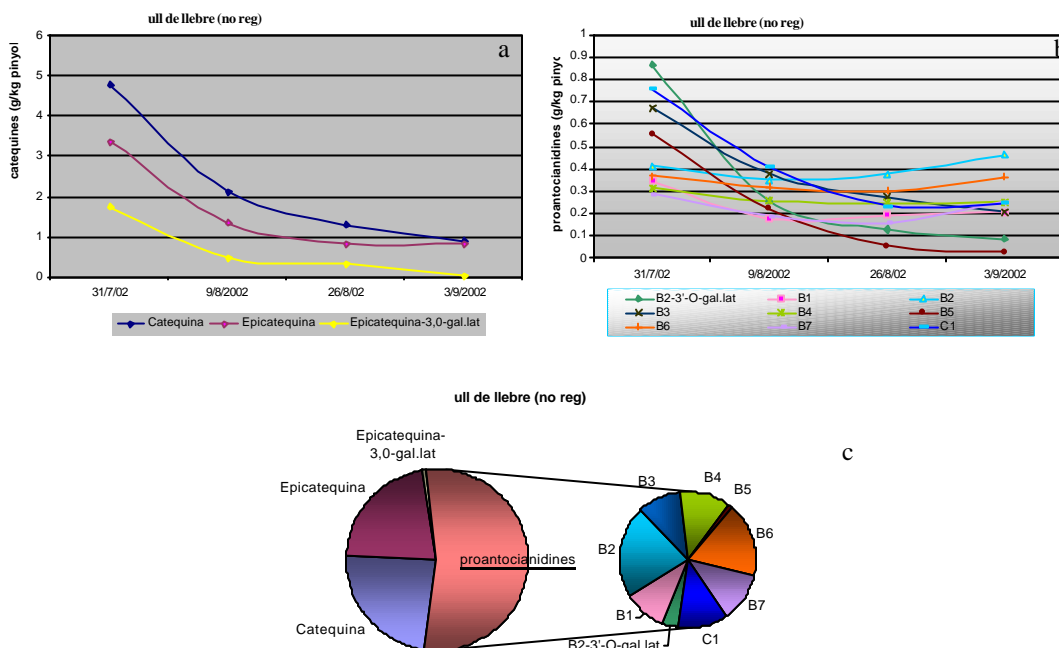


Gràfics 2.4.2.6. Evolució durant la maduració en la varietat pinot noir de: A) flavan-3-ols monomèrics. B) Proantocianidines oligomèriques. Resultats expressats en g / kg pinyol (pes fresc). C) Representació sectorial de la composició percentual dels flavanols i dels proantocianidols en el moment de la verema.

Pinot Noir és la varietat que presenta uns nivells més elevats de catequines i proantocianidines. De fet, els valors no corresponen als d'una maduració acabada, ja que el seu destí és l'elaboració de vins escumosos, i per tant la verema és precoç amb la finalitat d'aconseguir un most amb l'acidesa adequada. Això implica que la maduresa en la composició fenòlica encara no ha arribat al seu fi, motiu pel qual els nivells de catequina continuen sent quantitativament i relativa elevats. A més, per ser una varietat que s'adapta millor a zones fredes, el seu comportament en clima mediterrani mostra una acceleració de la maduració del raïm que només es reflecteix en la maduració de la polpa, però sense existir correspondència amb la maduració fenòlica dels pinyols. Així doncs, els nivells de catequina segurament continuarien disminuint. Pel que fa als dímers i trímers, considerant l'estabilització que s'observa per d'altres varietats, podríem inferir que el comportament seria similar i, per tant, no es reduirien massa més els valors de concentració que s'obtenen a la data de la collita efectuada, en què la proantocianidina predominant és la B1. En treballs d'altres autors²¹⁷, els valors de B1 finals són inferiors que els de B2 i similars als de C1, cosa que ens indicaria com podria anar seguint l'evolució d'aquestes espècies.

²¹⁷ Santos-Buelga, C; Francia-Aricha, EM; Escribano-Bailón, MT. (1995). "Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties"; *Food Chemistry* 53: 197-201

7.Ull de llebre

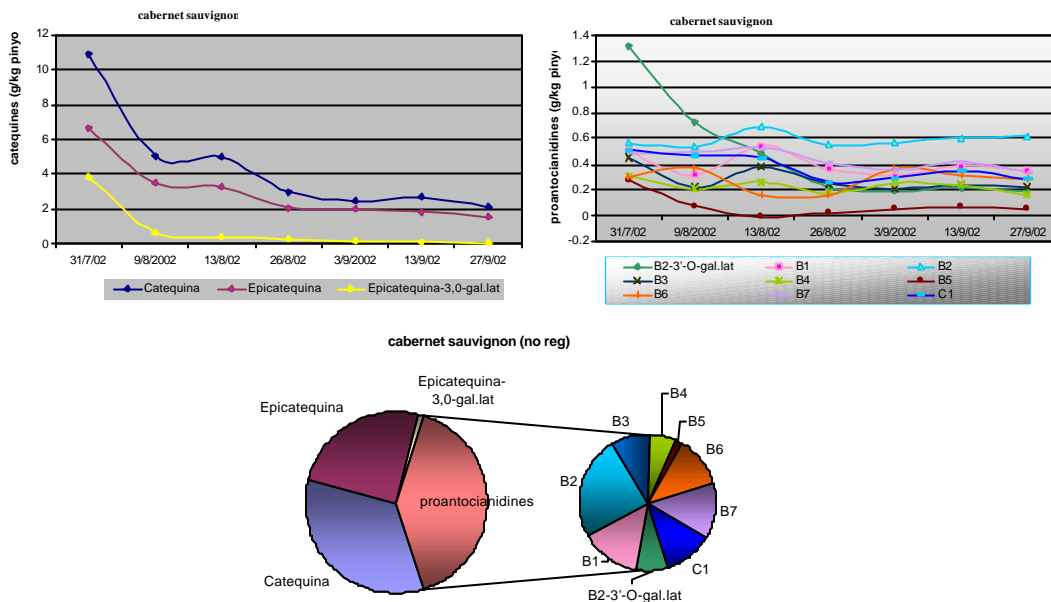


Gràfics 2.4.2.7. Evolució durant la maduració en la varietat ull de llebre de: A) flavan.-3-ols monomèrics. B) Proantocianidines oligomèriques. Resultats expressats en g / kg pinyol (pes fresc). C) Representació sectorial de la composició percentual dels flavanols i dels proantocianidols en el moment de la verema.

Per l'ull de llebre, la gràfica torna a seguir el comportament habitual, en el sentit de disminució dels continguts en catequines. L'evolució de les procianidines es caracteritza per una disminució també de la majoria d'elles, amb excepció de la B2, la B6, la B4 i la B1.

La composició mostra certes discrepàncies amb altres resultats de les fonts bibliogràfiques²¹⁷. Es mantenen els nivells de les procianidines B2 i B4, però no així els nivells de catequina, que en estudis dut a terme a Castilla-León²¹⁷ presenta uns valors finals més elevats. Quant als nivells de B6, la segona proantocianidina amb més quantitat en el nostre estudi, el treball citat no n'arriba a fer la quantificació individual, ja que en la separació aquesta procianidina es solapa amb un trimer. Sí que es fa una estimació total de la suma de les procianidines B5-B8, amb uns resultats per sota dels que obtenim en la nostra anàlisi. Això sembla suggerir, malgrat la manca de més estudis, que la composició catequínica dels pinyols del raï m, malgrat estar clarament influïda per la varietat, també deu estar afectada, com en el cas dels antocians, per tota una altra sèrie de factors.

8) Cabernet sauvignon



Gràfics 2.4.2.8. Evolució durant la maduració en la varietat cabernet sauvignon de: A) flavan.-3-ols monomèrics. B) Proantocianidines oligomèriques. Resultats expressats en g / kg pinyol (pes fresc). C) Representació sectorial de la composició percentual dels flavanols i dels proantocianidols en el moment de la verema.

En Cabernet sauvignon, novament la gràfica recull la disminució en el temps de les concentracions de catequines. Els valors finals en catequina i epicatequina s'assemblen més als registrats per Santos-Buelga²¹⁷ que als de Fuleki²¹⁴, que n'arribava a obtenir sobre els 0.6 g/kg pinyols. En canvi, els valors baixos en E-3-gal.lat s'ajusten més als resultats d'aquest últim, en què es troben a nivells de traça, que no pas als dels primers, en què guarda una relació 1:3 respecte la catequina i l'epicatequina. De fet, els valors van disminuint amb la maduració, de manera que, per diferents maduracions, hi hauran uns continguts diferents, cosa que reforça la hipòtesi de variabilitat que ja indicaven els resultats obtinguts amb ull de llebre.

En el que sí que coincideixen les nostres determinacions amb les dels autors citats és en l'ordre d'importància de les procianidines amb l'enllaç 4-8: la B2 és la majoritària, seguida per la B1; i a nivells menors, la B3 i la B4. Cap dels dos estudis presenta resultats per les de la sèrie d'enllaç 4-6.

Discussió general

1) Continguts finals

Segons la concentració de procianidines, les varietats es poden establir en els següents grups:

- 1- Pinot té unes concentracions 2 o 3 vegades més grans que les altres varietats. En verolament els valors són de 50 g de catequina /kg pinyol. Els valors finals es situen sobre els 20-25 g de catequina/kg pinyol.
- 2- Syrah i Monastrell tenen uns valors elevats en el moment de la verema, entre 10-20 g/kg, que no difereixen excessivament dels valors en el moment del verolament.
- 3- Cabernet té uns valors elevats en el moment del verolament, sobre els 25 g/kg pinyol, però els valors finals són de 7-8 g/kg.
- 4- Merlot conté en verema entre 7-8 g de catequina/kg pinyol. Però a diferència de cabernet, els valors en el verolament són baixos.
- 5- Garnatxa té uns valors finals baixos, per sota dels 6 g/kg pinyol, però en el moment del verolament són alts.
- 6- Carinyena i ull de llebre tenen els valors més baixos de totes les varietats, i en el moment de la verema estan per sota dels 6 g de catequina/ kg pinyol.

Com ja hem comentat, el pinot noir no assoleix la seva màxima maduresa en la finca mas dels frares, ja que es destina a la producció d'escumosos. Per tant, la degradació de procianidines que té lloc al llarg de la maduració no ocorre en aquesta varietat en tota la seva potència. Malgrat això, els valors elevats concorden amb els descrits en la bibliografia²¹⁸: Bourzeix *et al.*²¹⁸ també destaquen l'elevat contingut en catequina i epicatequina de Pinot noir, que es troba per sobre dels 1000 mg/kg raï m. En els seus estudis també es ressalten els valors elevats en cabernet sauvignon (344 mg/kg raï m) i merlot (601 mg/kg raï m), i els valors més discrets en garnatxa (173 mg/kg raï m) o carinyena (94 mg/kg raï m) Amb Syrah, Downey²¹⁶ obté uns valors finals en catequines de 4 g/kg pinyol, similars als que obtenen Kennedy *et al.*²¹⁹, i força inferiors als del nostre treball.

²¹⁸ Bourzeix, M; Weyland, D; Heredia, N. (1986). "Étude des catechines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne". *Bulletin de l'OIV*;669-670: 1177-1254

²¹⁹ Kennedy, JA; Troup, GJ; Pilbrow, JR; Hutton, DR; Hewitt, D; Hunter, CR; Ristic, R; Iland, PG; Jones, GP. (2000). "Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L.cv. Shiraz". *Aust J Grape and Wine Research* 6, 244-254

2) Evolució

Es pot observar que en la majoria dels casos la dinàmica d'aquests compostos contempla una disminució contínua dels monòmers a partir del verolament fins al moment de la verema. Aquestes disminucions concorden amb les descrites per altres autors, com de Freitas *et al.*^{180, 174}; Kennedy *et al.*^{219, 220}, Jordao *et al.*¹⁷⁵ o Downey *et al.*²¹⁶.

Només Monastrell i Syrah descriuen un comportament erràtic, ja que augmenten a meitat del període de maduració. En el cas de Syrah, segueix augmentant fins al moment de la verema.

La disminució en contingut és superior en la catequina que en l'epicatequina, cosa que s'escau amb una major velocitat de desaparició. Kennedy²¹⁹ estableix que el comportament és d'una cinètica de 2n ordre, consistent amb les de reaccions d'oxidació radicalària descrites per Plumb²²¹.

3) Composició

Syrah és una varietat característica quant a la composició en flavan-3-ols, ja que és la única en què els continguts d'epicatequina resulten superiors en tota la fase de maduració. Aquesta característica coincideix amb les descripcions de la varietat que es troben als treballs de Kennedy²¹⁹ i Downey²¹⁶. La resta de varietats presenten uns continguts majors en catequina que en epicatequina al llarg de tota l'evolució, però en els estadis finals poden igualar-se (cas de carinyena o ull de llebre) o fins i tot, com en el cas de merlot, invertir la tendència.

Merlot, syrah i ull de llebre presenten valors similars de catequina i epicatequina en data de verema; les altres varietats mostren quantitats més elevades de catequina que d'epicatequina. En treballs de Santos-Buelga²¹⁷ també observen aquesta equivalència en el moment de la verema, però a excepció de merlot, l'obtenen per a altres varietats (garnatxa, monastrell).

La presència d'esters gal·loilats dels flavan-3-ols en els pinyols és una característica que suscita molts estudis, ja que no s'han trobat precursors gal·loilats de les procianidines.

²²⁰ Kennedy, JA; Matthews, MA; Waterhouse, AL. (2000). "Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening". *Phytochemistry* 55, 77-85

²²¹ Plumb, GW; Pascual-Teresa, SD; Santos-Buelga, C; Cheynier, V; Williamson, G. (1998). "Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerization, galloylation and glycolisation". *Free Radical research* 29, 351-358

La gal·loilació té lloc sobre l'epicatequina, com ja anota Santos-Buelga²¹⁷. De totes maneres, pot haver-hi sobreestimació de les seves quantitats en el cromatograma, ja que alguns autors com Waterhouse²²² atribueixen una absorbància a 280 nm superior a les espècies no-gal·loilades.

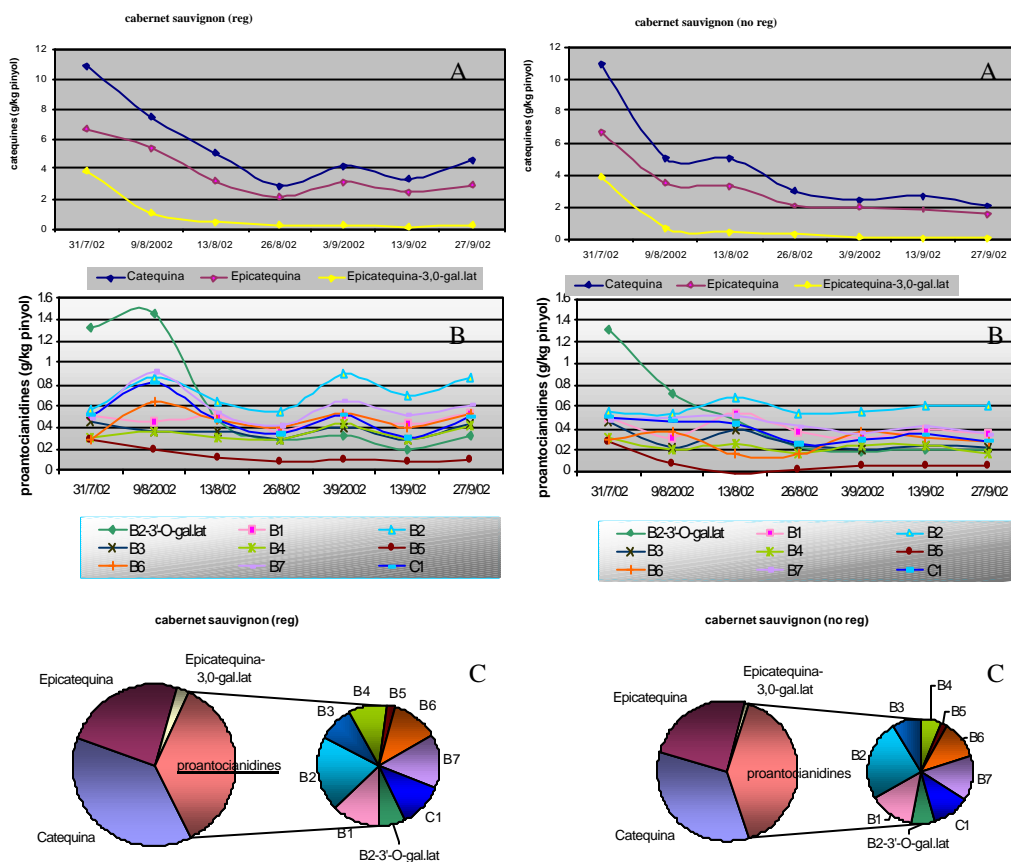
Per altra banda, hi ha molta variació en el contingut de procianidines. Destaquen els nivells del Pinot noir, que malgrat ser una varietat de poca concentració fenòlica, presenta uns valors de proantocianidines molt elevats. També es pot observar que hi ha una variació composicional, ja que no totes les varietats mantenen les mateixes proporcions en els dímers. De fet, totes elles presenten elevats nivells del dímer d'epicatequina gal·loilat, però difereixen en la resta d'oligòmers de la sèrie B. En Pinot noir predomina la procianidina B1, resultats que coincideixen amb els treballs de Bourzeix²¹⁸. En les altres varietats, excepte Carinyena, predomina la B2 en la seva forma lliure o gal·loilada. En Merlot, Syrah i Garnatxa són remarcables els nivells elevats de trímers.

²²² Waterhouse, AL; Ignelzi, S; Shirley, JR. (2000). "A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts"; *Am J Enol Vitic*, 51 (4): 383-389

2.2.1. Comparació situacions reg i no reg

La següent figura recull l'evolució per al cas de les varietats ull de llebre i cabernet sauvignon, en condicions de reg i no reg.

a) cabernet sauvignon

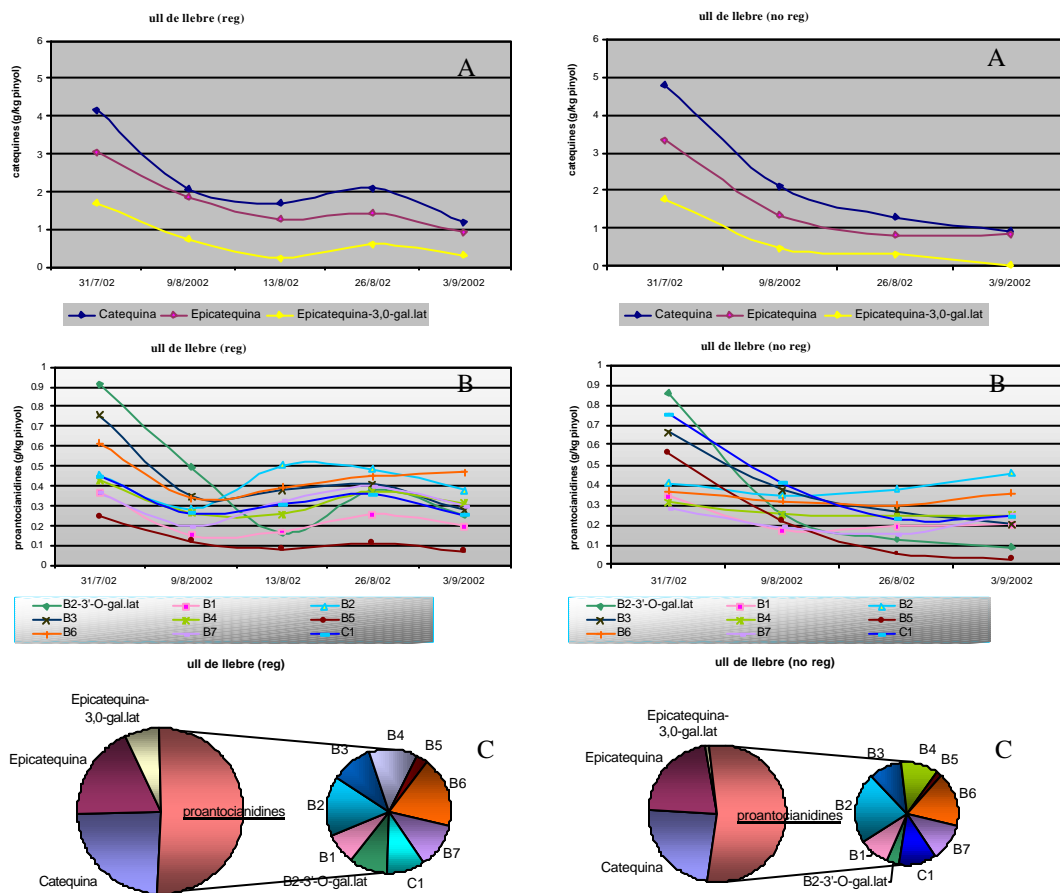


Gràfics 2.4.2.9. Evolució durant la maduració en la varietat cabernet sauvignon en condicions de reg (esquerra) i no reg (dreta) de: A) flavan.-3-ols monomèrics. B) Proantocianidines oligomèriques. Resultats expressats en g / kg pinyol (pes fresc). C) Representació sectorial de la composició percentual dels flavanols i dels proantocianidols en el moment de la verema.

Com es pot comprovar, la situació de reg sembla causar un retard en la desaparició de les catequines i les proantocianidines, de manera que els nivells disminueixen molt

menys dràsticament que en baies no irrigades. També genera una major quantitat de catequines (monòmers) en el pinyol al moment de la verema, malgrat que aquest efecte es produeix per una estabilització final del contingut. Igualment, la situació d'irrigació ofereix uns valors de proantocianidines en verema superiors, tot i que la composició final (gràfica sectorial) no es veu afectada. El fet que els pesos frescs dels pinyols no difereixin entre les situacions de reg i no reg (amb uns valors de $0,78 \pm 0,05$ g/baia, i $0,75 \pm 0,08$ g/baia, per les situacions de reg i no reg, respectivament), indica que no es produeix un efecte de dilució i, per tant, les diferències entre uns valors i altres han de ser degudes al balanç entre nova síntesi i desaparició per degradació o per unió amb altres subunitats monomèriques per augmentar el grau de polimerització.

b) ull de llebre



Gràfics 2.4.2.10. Evolució durant la maduració en ull de llebre en condicions de reg (esquerra) i no reg (dreta) de: A) flavan-3-ols monomèrics. B) Proantocianidines oligomèriques. Resultats expressats en g / kg pinyol (pes fresc). C) Representació sectorial de la composició percentual dels flavanols i dels proantocianidols en el moment de la verema.

En ull de llebre la situació de reg també sembla provocar una desaparició suau del contingut de catequines, però cal tenir en compte que els valors inicials són significativament menors que en la situació de no reg.

Quant a composició, la irrigació sembla conduir a petites diferències en els valors d'algunes proantocianidines en ull de llebre, especialment en el cas de la B2. Així, en situació de reg sembla que hi ha un major nivell de la B2 gal·loada, que provoca una disminució final en la concentració de la procianidina B2 lliure. A diferència del que passava amb el cabernet, no hi ha variació en els nivells finals de catequines monòmeres, encara que en el tractament de reg estan en unes proporcions lleugerament per sota respecte les proantocianidines del que succeeix en situació de no reg.

Com a conclusió general, podem establir per les 2 varietats que en ceps regats la disminució de les catequines i oligòmers és progressiva al llarg del període : no és tan ràpida i presenta uns esglaonats augments i disminució fins la verema. Aquests resultats concorden amb els que obtenen Kennedy *et al.*²²⁰ en tractaments amb reg estàndard, reg excessiu i dèficit de reg, en què observen que les velocitats de desaparició dels monòmers són incrementades pels dèficits hídrics.

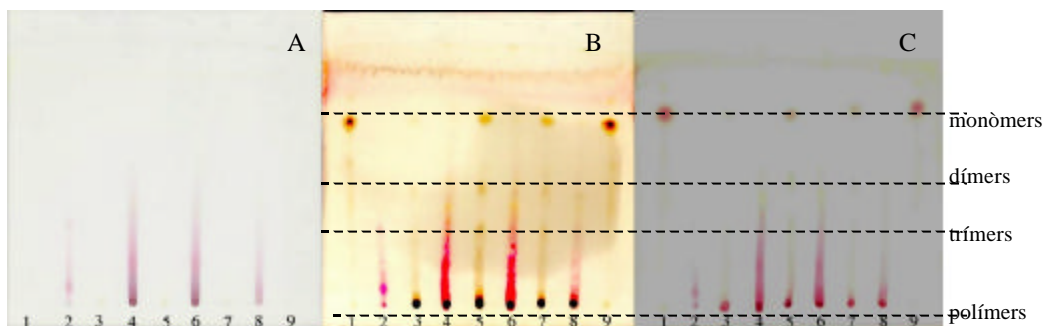
Sembla que el reg pot retardar la maduració del pinyol, i això fa que en cabernet en data de verema, el tractament de reg atenyi uns nivells de prop del doble que el no reg. Els oligòmers segueixen un patró similar, sent els més abundants B2, B6 i B7.

En ull de llebre, en no reg s'observa un comportament semblant, però les diferències en els valors finals són menors que per la varietat cabernet. Quant als oligòmers, també en el reg s'observen els valors més elevats, i en aquest cas, els dímers més abundants són el B2 i B6.

A diferència dels antocians, per als quals abunden els estudis de la influència dels factors sobre els seus continguts, hi ha pocs treballs realitzats que relacionin els continguts en catequines i procianidines oligòmers amb factors ambientals o culturals. Un d'aquests treballs, el de Mateus *et al.*²²³, mostra que l'altitud (que es relaciona amb una menor temperatura i humitat) pot exercir una influència en aquests continguts, encara que el seu efecte depèn de la varietat. Els nostres estudis semblen també indicar que les concentracions d'aquests compostos són un paràmetre més subjecte a la influència dels factors que el que resultaven ser els antocians.

2.4.3 Determinació dels graus de polimerització

Una primera aproximació als valors del grau de polimerització s'aconsegueix mitjançant la utilització de la cromatografia en capa fina. En la cromatoplaca 2.4.31 es recull el resultat abans i després del revelat amb DMACH i vainillina, respectivament. En el cas del DMACH, la coloració inicial blavosa dóna pas al cap de poc temps a tonalitats verdoses-marronoses, mentre que amb la vainillina dóna coloracions vermelloses.



Cromatoplaca 2. 4.3.1. Separació mitjançant cromatografia en capa fina de les catequines i proantocianidines d'extractes de pinyol i pell per la varietat ull de llebre. Es presenta la placa abans del revelat (A), després del revelat amb DMACH (B), i després del revelat amb vainillina (C): 1,9) Catequina/Epicatequina 10 mM; 2) Malvidina; 3, 5, 7) Extractes de pinyol; 4,6,8) Extracte de pells.

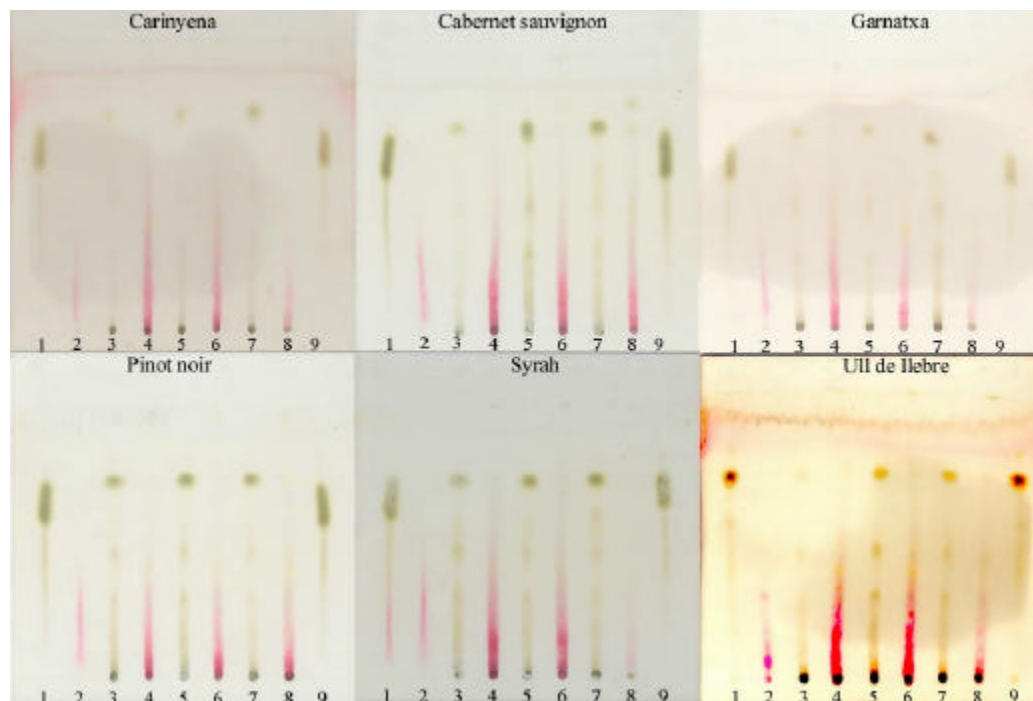
En la figura es pot apreciar en els pinyols les bandes corresponents a catequines, a procianidines dimèriques i trímers, però també resulta observable la presència d'altres oligòmers i de polímers, que pràcticament no elueixen en la cromatografia.

En les pells, el contingut de flavan-3-ols monomèrics és molt minoritari en comparació amb el dels pinyols, de manera que en el revelat amb vainillina (C) pràcticament no es diferencien dels antocians. No obstant això, el fet que les taques en la zona dels oligòmers de major grau de polimerització presentin coloracions blavoses en la seva reacció amb el DMACH indica la presència d'aquests compostos en alt grau de polimerització (B). De fet, és difícil separar completament els antocians de les proantocianidines en aquests tipus d'extracte, cosa que suggereix l'existència d'interaccions, ja sigui covalents o no covalents entre ambdós grups de molècules, encara que no està clar si es tracta d'un artefacte de l'aïllament o bé si aquestes associacions es formen ja al llarg del desenvolupament de la baia²²⁴.

²²³ Mateus, N; Marques, S; Gonçalves, A; Machado, J; deFreitas, V. (2001). "Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro valley during ripening: influence of cultivation altitude". *Am J Enol Vitic* 52 (2): 115-121

²²⁴ Kennedy, JA; Hayasaka, Y; Vidal, S; Waters, E; Jones, GPO. (2001). "Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development". *J Agric Food Chem*, 49, 5348-5355

En les següents cromatoplagues es presenta el contingut en algunes varietats:



Cromatoplagues 2.4.3.2. Separació per TLC i revelat amb DMACH. 1,9) Catequina/Epicatequina 10 mM; 2) Malvidina; 3, 5, 7) Extractes de pinyol; 4,6,8) Extracte de pells.3 i 4) mostres de maduració; 5 i 6) mostres de meitat de maduració; 7 i 8) mostres de verolament

Els resultats són complementaris dels obtinguts en la separació mitjançant l'anàlisi per HPLC, en el sentit que es pot observar una disminució dels monòmers en els pinyols al llarg de la maduració, que fa que només siguin detectables en les mostres de cabernet, ull de llebre i syrah, que eren precisament les que valors més alts en presentaven en el moment de la verema. Per altra banda, també serveix per detectar de forma qualitativa la presència de dímers i trímers, i per constatar, per la presència de la banda corresponent, l'existència de polímers. Tanmateix, el mètode no permet fer una estimació clara d'aquest grau de polimerització, ja que coincideixen en la banda oligòmers i polímers de diferent mida.

Altres autors²⁰³, utilitzant un sistema més polar, de toluè: acetona: àcid fòrmic (3:6:1), permeten l'elució d'aquesta banda polimèrica, tot i que no està feta l'assignació. De fet, aquesta assignació és difícil a causa de la manca de patrons comercials més enllà de

tetràmers²²⁵. En general, els graus de polimerització es determinen de fraccions aï llades aplicant tècniques de despolimerització, de RMN, d'espectrometria de masses, o per cromatografia de gel permeació²²⁵.

Resulten més concloents els graus de polimerització calculats pel mètode de la despolimerització en presència de fluoroglucinol. En les següents taules se'n recullen els valors al llarg del verolament per als pinyols:

	<u>Mon 31/7</u>	<u>Mon 13/8</u>	<u>Mon 26/8</u>	<u>Mon 3/9</u>
Epicat-f	12.4±1.1	11.1±0.9	14.3±1.2	11.9±1.0
Cat-f	3.0±0.3	2.1±0.2	3.9±0.3	2.7±0.2
Catequina	2.1±0.2	2.0±0.2	2.5±0.2	2.5±0.2
E3G-f	2.3±0.2	1.3±0.1	1.4±0.1	1.0±0.1
Epicatequina	1.3±0.1	1.1±0.1	1.0±0.1	0.7±0.1
Ep-3-G	0.6±0.5	0.6±0.4	0.5±0.3	0.5±0.4
total	21.7±2.3	18.2±2.0	23.6±2.4	19.2±2.0
Total terminal	4.2±0.8	3.0±0.7	3.0±0.7	2.1±0.5
mDP	5.2± 0.6	6.2± 0.9	8.2± 1.2	9.2± 1.7

	<u>Sy 31/7</u>	<u>Sy 13/8</u>	<u>Sy 26/8</u>	<u>Sy 13/9</u>
Epicat-f	10.1±1.2	7.6±0.9	7.0±2.1	9.8±1.6
Cat-f	2.2±0.5	1.4±0.2	1.4±0.8	2.4±1.4
Catequina	1.6±0.2	1.3±0.2	1.3±0.6	2.1±0.7
E3G-f	2.5±0.8	1.4±0.2	1.0±0.4	1.6±0.6
Epicatequina	2.3±0.8	1.0±0.3	1.0±0.4	1.6±0.6
Ep-3-G	0.4±0.3	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1
total	19.1±3.3	12.9±1.8	11.8±4.2	17.6±4.7
Total terminal	5.2±1.5	2.6±0.5	2.1±0.8	3.3±1.1
mDP	3.8± 0.5	5.1± 0.4	5.8± 0.4	5.3± 0.5

	<u>Gx 31/7</u>	<u>Gx 13/8</u>	<u>Gx 26/8</u>	<u>Gx 13/9</u>
Epicat-f	1.4±0.5	10.6±0.9	9.4±0.8	9.4±0.8
Cat-f	1.4±0.1	2.0±0.2	1.4±0.1	1.6±0.1
Catequina	1.1±0.1	1.9±0.2	1.9±0.2	2.3±0.2
E3G-f	2.8±0.2	2.3±0.2	1.7±0.1	1.5±0.1
Epicatequina	1.4±0.1	1.1±0.1	1.2±0.1	1.0±0.1
Ep-3-G	0.7±0.6	0.3±0.3	0.4±0.3	0.3±0.3
total	12.8±1.6	18.3±1.8	16.0±1.6	16.2±1.6
Total terminal	4.9±0.9	3.7±0.6	3.3±0.5	2.9±0.5
mDP	2.6± 0.2	4.9± 0.3	4.9± 0.4	5.7± 0.5

²²⁵ Cheynier, V; Fulcrand, H. (2003). "Analysis of polymeric proanthocyanidins and complex polyphenols", a "Methods in polyphenol analysis", Editat per Santos-Buelga, C i Williamson, G, The Royal Society of Chemistry

	<u>Cs 31/7</u>	<u>Cs 13/8</u>	<u>Cs 3/9</u>	<u>Cs 13/9</u>
Epicat-f	6.6±0.6	9.3±0.8	7.3±0.6	7.5±0.6
Cat-f	0.8±0.1	1.7±0.1	0.8±0.1	0.9±0.1
Catequina	1.0±0.1	1.5±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1
E3G-f	1.6±0.1	1.5±0.1	1.0±0.1	0.9±0.1
Epicatequina	0.9±0.1	1.1±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1
Ep-3-G	0.4±0.3	0.3±0.2	0.2±0.1	0.2±0.1
total	11.3±1.2	15.3±1.5	11.1±1.1	11.5±1.1
Total terminal	2.9±0.5	2.8±0.5	1.8±0.3	1.9±0.3
mDP	4.0± 0.3	5.4± 0.4	6.2± 0.6	6.2± 0.5

	<u>Ull 31/7</u>	<u>Ull 13/8</u>	<u>Ull 26/8</u>	<u>Ull 3/9</u>
Epicat-f	8.8±0.7	9.9±0.8	8.9±0.8	1.35 ±0.1
Cat-f	1.0±0.1	1.8±0.2	1.3±0.1	0.02±0.01
Catequina	1.8±0.2	2.2±0.2	2.0±0.2	0.20±0.03
E3G-f	0.9±0.1	1.2±0.1	0.8±0.1	0.10±0.03
Epicatequina	0.6±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1	0.06±0.01
Ep-3-G	0.6±0.4	0.5±0.4	0.4±0.3	0.05±0.01
total	13.8±1.5	16.2±1.7	13.9±1.4	1.78±0.2
Total terminal	2.2±0.5	2.3±0.6	1.8±0.4	0.22±0.03
mDP	6.4± 1.3	7.4± 1.4	8.1± 1.4	8.28± 0.2

	<u>Car 31/7</u>	<u>Car 13/8</u>	<u>Car 26/8</u>	<u>Car 20/9</u>
Epicat-f	3.7±0.3	3.8±0.3	1.41±0.3	1.7±0.2
Cat-f	0.7±0.1	0.6±0.1	0.03±0.01	0.03±0.01
Catequina	0.4±0.1	0.4±0.1	0.11±0.02	0.13±0.02
E3G-f	0.7±0.1	0.3±0.1	0.11±0.02	0.12±0.02
Epicatequina	0.4±0.1	0.4±0.1	0.08±0.02	0.11±0.01
Ep-3-G	0.2±0.1	0.2±0.1	0.05±0.01	0.00±0.00
total	6.3±0.7	5.7±0.6	1.79±0.3	0.02±0.2
Total terminal	1.4±0.3	0.9±0.2	0.24±0.03	0.02±0.02
mDP	4.7± 0.5	6.9± 1.2	7.36± 2.2	7.38± 1.48

	<u>Mt 9/8</u>	<u>Mt 13/8</u>	<u>Mt 26/8</u>	<u>Mt 13/9</u>
Epicat-f	2.36±0.3	3.73±0.3	2.61	2.05±0.2
Cat-f	0.11±0.1	0.15.1	0.10	0.060.01
Catequina	0.34±0.1	0.450.1	0.35	0.33.02
E3G-f	0.6±0.1	0.86.1	0.45±0.02	0.23±0.02
Epicatequina	0.44±0.1	0.55.1	0.30±0.02	0.20±0.01
Ep-3-G	0.18±0.1	0.250.1	0.16±0.01	0.10±0.00
total	4.03±0.7	6.00	3.97±0.3	2.97±0.2
Total terminal	1.23±0.3	1.67	0.91±0.03	0.53±0.02
mDP	3.28± 0.5	3.60	4.36± 2.2	5.57± 1.48

	<u>PN 31/7</u>	<u>PN 7/8</u>	<u>PN 13/8</u>
Epicat-f	1.62±0.3	3.37±0.3	2.79±0.3
Cat-f	0.09±0.1	0.19±0.1	0.16±0.01
Catequina	0.09±0.1	0.18±0.1	0.13±0.02
E3G-f	0.92±0.1	1.35±0.1	0.97±0.02
Epicatequina	0.39±0.1	0.64±0.1	0.47±0.02
Ep-3-G	0.08±0.1	0.13±0.1	0.12±0.01
total	3.2±0.7	5.86±0.6	4.64±0.3
Total terminal	1.4±0.3	2.13±0.2	1.56±0.03
mDP	2.29± 0.5	2.76± 1.2	2.98± 2.2

Taules 2.4.1. Quantificació dels adductes generats en la reacció de despolimerització amb floroglucinol. Es donen els valors per a cada adducte, per a les subunitats terminals, els sumatoris i el grau de polimerització mitjà (MDP) corresponent.

En relació a altres tècniques de determinació dels graus de polimerització, els valors obtinguts amb el mètode del floroglucinol són comparables als resultats de les cromatografies de gel permeació, i a la vegada resulten superiors a les estimacions que s'obtenen mitjançant assaigs colorimètrics²²⁵

De les diferents varietats, els valors més elevats en grau de polimerització corresponen a Monastrell, que assoleix uns nivells mitjans de 9.2 Unitats de monòmer per molècula. Això concorda amb el que s'ha observat en l'anàlisi dels dímers i trímers, en què ja s'apuntava aquesta possibilitat pel fet que presentava uns valors elevats de trímer respecte els dímers. També presenta uns valors elevats la carinyena, encara que en aquest cas no hi ha una correlació amb els nivells de trímer C1. Cal tenir en compte, però, que la separació cromatogràfica no arriba a separar tots els trímers, i per tant no se n'arriba a fer la identificació.

De totes maneres, aquests són graus mitjans, cosa que significa que poden trobar-se espècies amb graus de polimerització majors. En diverses experimentacions¹⁷⁰ es fa una separació prèvia per cromatografia de les diferents fraccions segons la seva mida molecular, i resulta relativament fàcil aïllar tetràmers.

En canvi, els menors graus es troben en Pinot noir, que presenta uns nivells molt elevats dels monòmers, cosa que pot explicar aquests baixos nivells de polimerització.

Es constata que al llarg de la maduració dels pinyols, n'augmenta el grau de polimerització. Això pot tenir importància en la qualitat del vi, ja que en augmentar el grau

de polimerització, en disminueix l'amargor i l'extractabilitat, però n'augmenta l'astringència. La composició d'aquests polímers seria principalment d'unitats monòmer d'epicatequina, com indica el fet que en totes les varietats s'hi ha gran proporció de l'adducte epicatequina-floroglucinol. Aquestes observacions coincideixen amb les de tots els autors, que en els oligòmers hi ha destacuen que les subunitats d'extensió són fonamentalment d'epicatequina, mentre que les subunitats d'iniciació són catequina^{217,213,211}. L'alta participació d'aquest monòmer en les estructures polimèriques podria explicar el fet que els valors de l'epicatequina lliure en pinyols siguin inferiors a la catequina. Igualment, l'increment en el grau de polimerització mitjà justifica la desaparició en el pinyol tant de catequina com d'epicatequina monòmer que s'observa al llarg de l'evolució. Curiosament, la varietat Syrah, que presentava un increment del contingut en aquest monòmers al final de la maduració, també registra una disminució del grau de polimerització final. Això podria ser a causa d'algun tipus d'hidròlisi dels tanins del pinyol, que podria ser un efecte fisiològic o bé un procés interferent al llarg de la manipulació de la mostra.

Per altra banda, també es posa de manifest la participació de l'epicatequina gal·loilada en les estructures polimèriques, en major proporció fins i tot que la catequina, com demostren els valors de concentració del corresponent adducte amb floroglucinol (E3G-f). Així doncs, aquest flavan-3-ol està implicat fonamentalment en la formació de subunitats d'extensió que condueixen a les formes polimèriques.

Aquesta evolució del grau de polimerització mitjà obtingut mitjançant procediments de tiolisi coincideix amb els resultats obtinguts per Saucier *et al.*²²⁶. Els mateixos autors observen que aquesta polimerització tindria lloc associada a la paret cel·lular. També obtenen resultats en aquest sentit les separacions mitjançant cromatografia d'exclusió, tant amb columna de sílica-gel²²⁷ com amb columna TSK-Toyopearl HW-40²¹⁵. També observa Kennedy, aplicant el mètode del trencament amb floroglucinol, l'increment del grau de polimerització en pells de Syrah²²⁴. No obstant això, els resultats obtinguts poden ser discrepants, ja que el mateix Kennedy observa una disminució del grau de polimerització en els pinyols²¹⁹, però en canvi Downey *et al.* n'observen un increment per a la mateixa varietat en pinyols, però una disminució en pells²¹⁶. Sembla que les condicions d'extracció poden ser decisives en la diferència en aquest comportament, ja que en incrementar els graus de polimerització també en disminueix la seva solubilitat. A més, també caldria

²²⁶ Saucier, C; Geny, L; Glories, Y. (2003). "Composition et localisation cellulaire des tanins de pépins de raisin au cours de la maturation de la baie". 7e Symposium International d'Oenologie, Editions Tec & Doc, 111-113

²²⁷ Waterhouse, AL. (2003). "A new understanding of seed tannin ripening"; Seed Report, online

avaluar els rendiments de la reacció de tiolisi, procés complicat a causa de la dificultat de disposar de patrons idonis i representatius. En aquest sentit dels rendiments de la reacció, Kennedy apunta que la possible formació d'adductes covalents al llarg de la maduració que no poden ser degradats en la reacció de tiolisi²²⁰, o l'oxidació dels tanins al llarg de la maduració, de l'extracció o de la reacció de trencament, conduirien a enllaços no susceptibles de ser atacats per la reacció de trencament i, per tant, a una infraestimació dels graus de polimerització.

2.5. CONCLUSIONS

1. Les metodologies de l'assaig de la vainillina i de l'assaig DMACH permeten estimar el contingut de catequines i proantocianidines en extractes de pinyols, però cada mètode implica una reactivitat diferent i, per tant, condueix a uns valors numèrics diferents.

2. A diferència del que succeï a amb els antocians, es dona una gran variació en els continguts de catequines i proantocianidines oligòmeres al llarg de la maduració. En aquest sentit, les catequines disminueixen de manera molt més dràstica, mentre que les proantocianidines tenen disminucions més suaus o fins i tot estabilitzacions i increments al llarg de la maduració.

3. En el moment de la verema, les varietats difereixen en la seva composició en flavan-3-ols. En general, predomina la catequina i la proantocianidina B2.

4. La varietat pinot noir és la que presenta valors més alts de catequines en pinyols.

5. Els graus de polimerització augmenten al llarg de la maduració en totes les varietats, com posen de manifest els resultats obtinguts mitjançant el trencament dels polímers en presència de floroglucinol. En els polímers participa fonamentalment l'epicatequina, que pot presentar gal·loilació.

6. Els tractaments de reg semblen provocar uns majors continguts de catequines i proantocianidines en pinyols, especialment en cabernet sauvignon, continguts que podrien estar associats a un diferent grau de maduració en pinyol.

2.6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. **Cheyrier, V; Moutounet, M; Sarni-Manchado, P.** (2003). “Los compuestos fenólicos”. A “Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos”. Coord. Claude Fanzi, EMV Ediciones
2. **Souquet, JM; Cheyrier, V; Sarni-Manchado, P; Moutounet, M** (1996). “Les composés phénoliques du raisin”. *J. Int. Sci. Vigne et Vin, Hors série*, 99-107
3. **Pascual-Teresa, S; Rivas-Gonzalo, JC; Santos-Buelga, C.** (2000). “Prodelphinidins and related flavanols in wine”, *Int J Food Science & Techn*, 35, 33-40
4. **Ricardo-da-Silva, JM.** (1992). “Procyanidines du raisin et du vin. Structure et propriétés chimiques”; *Tesi Doctoral*. École Nationale Sup Agronomique Montpellier
5. **Freitas, VAP; Glories, Y; Bourgeois, G; Vitry, C.** (1998). “Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry”. *Phytochemistry*, vol 49, nº5: 1435-1441
6. **Vivas de Gaulejac, N; Vivas, N; Absalon, C; Nonier, MF.** (2001). “Identification du procyanidole A2 dans le raisin et le vin de *Vitis vinifera* L.CV. Merlot noir and abernet sauvignon”, *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 35, nº1, 51-56
7. **Souquet, JM; Cheyrier, V; Brossaud, F; Moutounet, M.** (1996). “Polymeric proanthocyanidins from grape skins”. *Phytochemistry*, vol 43, nº2: 509-512
8. **Freitas, VAP; Glories, Y.** (1999). “Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties”. *J Sci Food Agric*, 79: 1601-1606
9. **Jordao, AM; Ricardo-da-silva; JM; Laureano, O.** (2001). “Evolution of proanthocyanidins in bunch stems during berry development (*Vitis vinifera* L.); *Vitis* 40(1), 17-22
10. **Ricardo da Silva JM;Belchior AP;Spranger MI;Bourzeix M.** (1992). “Oligomeric procyanidins of three grapevine varieties and wines from Portugal”. *Sciences des Aliments*, 12 223-237
11. **Escribano-Bailon MT; Guerra MT; Rivas-Gonzalo JC; Santos-Buelga C.** (1995). “Proanthocyanidins in skins from different grape varieties”; *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*;200 (3) 221-224
12. **Sun, B.;Ricardo-da-Silva, J. M.;Spranger, M. I.**(2001). Quantification of catechins and proanthocyanidins in several Portuguese grapevine varieties and red wines; *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*;16 (1) 23-34
13. **Hmamouchi M;Es-Safi N;Boubekri C;Bourzeix M;Essassi EM.** (1994). “Qualitative and quantitative analysis of berry proanthocyanidins of four Moroccan grape varieties”. *Bulletin de l'O.I.V.*;67 901-915
14. **Freitas, V. A. P. de;Glories, Y.;Monique, A.** (2000). “Developmental changes of procyanidins in grapes of red **Vitis vinifera** varieties and their composition in respective wines”; *American Journal of Enology and Viticulture*; 51 (4) 397-403
15. **Kovac V;Bourzeix M;Heredia N;Ramos T.** (1990). “Etude des catechines et proanthocyanidols de raisins et vins blancs”; *Rev Franç d'Oenologie*;30 (125) 7-14
16. **Mattivi F;Nicolini G;Sanchez C.** (1991). “Comparison between the polyphenol content of Marzemino, Pinot noir and Sangiovese wines of 1989”. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 44 (1) 39-52

17. **Auw, J. M.;Blanco, V.;O'Keefe, S. F.;Sims, C. A..** (1996). "Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin, and Noble wines and juices". *American Journal of Enology and Viticulture*, 47 (3) 279-286
18. **Katalinic, V.;Males, P.**(1997). "Compositional changes in grape polyphenols throughout maturation". *Journal of Wine Research*; 8 (3) 169-177
19. **Kovac, V; Alonso, E; Revilla, E.** (1995). "The effect of adding supplementary quantities of seeds during fermentation on the phenolic composition of wines". *Am J Enol Vitic.* Vol 46, n°3: 363-367
20. **Laminkara, O; Garlick, D.** (1987). "Effects of grape skin and seeds on the composition and quality of Muscadine wines". *Food Chem* 26:245-251
21. **Bravo, L.** (1998). "Polyphenols:chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance". *Nutr Rev* ; 56, 317-333
22. **Rochibaud, JL; Noble, AC.** (1990). "Astringency and bitterness of selected phenolics in wine". *J Sci Food Agric*, 53, 343-353
23. **Ribéreau-Gayon, P; Glories, Y; Maujean, A; Dubordieu, Y.** (1999). "Phenolic compounds", a "Handbook of enology, vol 2. The chemistry of wine, stabilization and treatments"; Ed. John Wiley & Sons.
24. **Teissedre,P.L; Waterhouse, A.L; Walzem, R.L; German, J.B; Frankel, e.n; Ebeler, S.E; Clifford, A.J.** (1996). "Composés phénoliques du raisin et du vin et santé"; *Bull. OIV* 781-782:252-277
25. **daSilva,J; Rigaud, J; Cheyner,V.** (1991). "Procyanidin dimers and trimers from grape seeds"; *Phytochemistry*, 30:1259-1264
26. **Brunet, MJ.** (1999). "Identificació i transport plasmàtic de les procianidines del vi", *Tesi Doctoral*. URV. 1999
27. **Escribano-Bailón, M.T.**(1993). "Estudio de la Composición Flavánica de la Semilla de la Uva", *Tesi Doctoral* (1993). Facultat de Farmàcia, Universitat de Salamanca.
28. **Glories, Y.** (1974). "Recherches sur la structure et les propriétés des composés phénoliques polymerisés des vins rouges. I- Précipitation par l'aldéhyde formique et par l'acide chlorhydrique concentré". *Conn. Vigne Vin*, 8, n°1, 57-74
29. **Price, ML; Scoyoc, SV; Butler, LG.** (1978). "A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain ". *J Agric Food Chem*, 26, 1214-1218
30. **Sun,B; Ricardo-da-Silva, J.M; Spranger, I.** (1998)"Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins"; *J.Agric.Food Chem.*, 46, 4267-4274
31. **Nagel, CW; Glories, Y.** (1991). "Use of a modified Dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols", *Am.J.Enol. Vitic.*, vol 42, n°4, 364-366
32. **Vivas N;Glories Y;Lagune L;Saucier C;Augustin M.** (1994). "Estimation of the polymerisation level of procyanidins from grapes and wines by use of p-dimethylaminocinnamaldehyde"; *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*;28 319-336
33. **Amerine,MA; Ough, CS.** (1980). "Methods for analysis of musts and wines", John Wiley & Sons, New York
34. **Lea, AGH; Timberlake, CF; Singleton, VL.**(1979). "The procyanidins of white grapes and wines"; *Am J Enol Vitic* 30, 289-300
35. **Sun, B; Leandro, C; Ricardo Da Silva, JM; Spranger, I** (1998). "Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization"; *J Agric Food Chem*, 46, 1390-1396

36. **Ruiz, J.** (1999). Comunicació personal
37. **Vivar-Quintana, AM.** (2001). “Fraccionamento y estudio preliminar de la materia colorante del vino tinto”. *Tesi Doctoral*. Fac. Farmàcia, Univ Salamanca
38. **Merck.** (1998). “Anfarbungsreagenzien für Dünnschicht und Papier-Chromatography”
39. **Oszmianski, J; Sapis, JC.** (1989). “Fractionation and identification of some low molecular weight grape seed phenolics”. *J Agric Food Chem* 37, 1293-1297
40. **Lea, AGH.** (1978). “The phenolics of cider: oligomers and polymers procyanidins”; *J SciFood Agric*, 25, 1537-1545
41. **Boukharta, M; Girardin, M; Metche, M.** (1988). “Procyanidines galloylées du sarment de vigne (*Vitis vinifera*). Séparation et identification par chromatographie liquide haute performance et chromatographie en phase gazeuse”. *J Chromatogr* 455, 4065-409
42. **S de Pascual-Teresa, S; Santos-Buelga, C; Rivas-Gonzalo, JC.** (2000). “Quantitative analysis of flavan-3-ols in spanish foodstuff and beverages”. *J Agric Food Chem*, 48, 5331-5336
43. **Carando, S; Teissedre, PL; Pascual-Martínez, L; Cabanis, JC.** (1999). “Levels of flavan-3-ols in french wines”. *J Agric Food Chem*, 47, 4161-4167
44. **Peng, Z; Hayasaka, Y; Iland, PG; Sefton, M; Hoj, P; Waters, EJ.** (2001). “Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography”; *J Agric Food Chem*, 49, 26-31
45. **Matthews, S; Mila, I; Scalbert, A; Pollet, B; Lapiere, C; Hervé du Penhoat, CLM; Rolando, C; Donnelly, DMC.** (1997). “Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles”; *J. Agric Food Chem.* 45, 1195-1201
46. **Bate-Smith, E.** (1955). *Food*, 23, 124
47. **Kennedy, JA; Jones, GP.** (2001) “Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol”. *J Agric Food Chem*, vol 49(4), 1740-1746
48. **Fuleki, T; Ricardo da Silva, JM.** (1997). “Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario”, *J. Agric. Food Chem.* 145, 1156-1160
49. **Saint-Cricq de Gaulejac, N; Augustin, M; Vivas, N; Glories, Y.** (1997). “A biochemical approach to the evolution of procyanidin in grape seeds during the ripening of red grapes (*Vitis vinifera* L.cv. Merlot Noir); *Journal of Wine Research*, vol 8, nº3, 159-167
50. **Downey, M.O; Harvey, JS; Robinson, SP.** (2003). “Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development”; *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9, 12-14
51. **Santos-Buelga, C; Francia-Aricha, EM; Escribano-Bailón, MT.** (1995). “Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties”; *Food Chemistry* 53: 197-201
52. **Bourzeix, M; Weyland, D; Heredia, N.** (1986). “Étude des catechines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d’autres dérivés de la vigne”. *Bulletin de l’OIV*; 669-670: 1177-1254
53. **Kennedy, JA; Troup, GJ; Pilbrow, JR; Hutton, DR; Hewitt, D; Hunter, CR; Ristic, R; Iland, PG; Jones, GP.** (2000). “Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L.cv. Shiraz”. *Aust J Grape and Wine Research* 6, 244-254
54. **Kennedy, JA; Matthews, MA; Waterhouse, AL.** (2000). “Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening”. *Phytochemistry* 55, 77-85
55. **Plumb, GW; Pascual-Teresa, SD; Santos-Buelga, C; Cheynier, V; Williamson, G.** (1998). “Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerization, galloylation and glycolisation”. *Free Radical research* 29, 351-358

- ^{56.} **Waterhouse, AL; Ignelzi, S; Shirley, JR.** (2000). "A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts"; *Am J Enol Vitic*, 51 (4): 383-389
- ^{57.} **Mateus, N; Marques, S; Gonçalves, A; Machado, J; deFreitas, V.** (2001), "Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro valley during ripening: influence of cultivation altitude". *Am J Enol Vitic* 52 (2): 115-121
- ^{58.} **Keneddy, JA; Hayasaka, Y; Vidal, S; Waters, E; Jones, GPO.** (2001). "Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development". *J Agric Food Chem*, 49, 5348-5355
- ^{59.} **Cheyrier, V; Fulcrand, H.** (2003). "Analysis of polymeric proanthocyanidins and complex polyphenols", a "Methods in polyphenol analysis", Editat per Santos-Buelga, C i Williamson, G, The Royal Society of Chemistry
- ^{60.} **Saucier, C; Geny, L; Glories, Y.** (2003). "Composition et localisation cellulaire des tanins de pépins de raisin au cours de la maturation de la baie". 7e Symposium International d'Oenologie, Editions Tec & Doc, 111-113
- ^{61.} **Waterhouse, AL.** (2003). "A new understanding of seed tannin ripening"; Seed Report, online



BLOC II

*Composició
fenòlica
en
vi*

El contingut dels compostos fenòlics en el raï m és un condicionant del seu contingut posterior en els vins, però no el determina de manera absoluta. La comparació de la composició fenòlica del raï m i del vi mostra que juntament amb les molècules directament procedents de la baia, apareixen en el vi també altres fenols. Això és a causa, per una banda, de la influència del procés de la maceració, i per l'altra, de la reactivitat d'aquestes molècules dintre de la matriu vínica. Ambdós són processos en què es modifica aquesta composició fenòlica:

- 1) l'extracció dels compostos fenòlics en la maceració no és equivalent per a tots els compostos, de manera que les concentracions trobades en el raï m no tenen perquè traduir-se de manera proporcional posteriorment en el most ni en el vi.
- 2) el vi és una matriu complexa en què els compostos fenòlics experimenten tota una sèrie de reaccions, que condueixen a una estabilització o una degradació del color.²²⁸

Així doncs, la composició fenòlica del vi depèn a la vegada de la matèria prima i del tipus de vinificació adoptat, que influeix en fenòmens físics com la difusió d'aquests components des de les parts sòlides cap al most; i, per altra banda, influeix sobre els fenòmens bioquímics i químics en els quals estan implicats els polifenols (oxidació, degradació, condensació).

En els dos capítols següents abordarem l'efecte dels dos processos, centrant l'estudi fonamentalment en els antocians.

²²⁸ Zamora,F; "Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos"; AMV Ediciones, Mundi-Prensa (2003)

Capítol 3



EXTRACCIÓ DELS ANTOCIANS AL LLARG DE LA MACERACIÓ

3.1. INTRODUCCIÓ

El vi negre és un vi macerat, de manera que en el procés de maceració hi ha una extracció fraccionada del material del raï m²²⁹. El grau d'extracció influeix en la quantitat i estabilitat del color, l'astringència i l'estructura tànica del vi, el seu potencial per envellir i la seva composició aromàtica²³⁰.

Durant la vinificació, només una tercera part dels compostos fenòlics del raï m és extreta selectivament al vi, amb una extractabilitat i un rendiment final fortament influïts per la varietat vinífera. A partir d'aquesta premissa, s'ha desenvolupat el concepte de "potencial fenòlic del raï m", en contraposició al de "maduresa tecnològica" mimetitzant el procés de vinificació per tal d'obtenir informació quantitativa sobre el contingut de compostos fenòlics extractables en el raï m²³¹. Aquests poden provenir de la polpa, la pell, les llavors i les parts llenyoses. Per aquest motiu, la mida del raï m (relació pell/most) o el nombre de pinyols per baia són paràmetres que afecten la posterior concentració fenòlica en els mostos i vins. Cal considerar que el volum de la baia és proporcional al cub del seu radi, mentre que l'àrea de pell és proporcional al quadrat. Això provoca que de baies amb una relació elevada pellofes:most, en resulten vins de més concentració en potassi, pH, contingut de flavonoides, contingut d'antocians, aroma, color i astringència, podent arribar a uns nivells d'extracció excessiva, de vins massa concentrats.

L'extracció dels constituents del raï m al vi és essencialment un procés de difusió, que segueix normalment un comportament de saturació, caracteritzat per una primera fase exponencial que condueix posteriorment a una fase estacionària sense increment d'extracció. La velocitat i extensió de la fase exponencial estan fortament influïdes per la

²²⁹ Peynaud. (1984). "Knowing and making wine". John Wiley & Sons, New York

²³⁰ Zoecklein, B. (1991). "An overview of maceration during red winemaking". *Aust & NZ Wine Ind J.*, 6: 265-267

²³¹ Mateos, S., Valls, J., Nadal M.; Arola, L. (2001) "Estudio de la madurez fenólica sobre diferentes variedades tintas y su relación con el color de los vinos". *Tecnología del vino*, nº 2, Sept-Oct, pp 45-50

natura química del constituent, la seva concentració i localització en la baia, i pels mètodes de processament. Així, el temps de contacte, el ratio entre líquid i sòlid, els continguts relatius de most, pells, pinyols i rapes, o la inclusió de rapes en la maceració són factors importants que afecten l'extracció.

3.1.1. Difusió dels compostos fenòlics al most

Els diferents compostos fenòlics estan localitzats en diferents parts del raï m i tenen diferents solubilitats i difusivitats respecte la fase aquosa o alcohòlica, en un equilibri influït per la temperatura i l'ambient químic del most²³².

1. Els compostos fenòlics no flavonoides ja estan presents al most, ja que es solubilitzen des de les pells cap a la fase aquosa.

2. Els antocians també són solubles en aigua, i per tant són extrets a una velocitat relativament ràpida, de manera que als primers dies de fermentació s'assoleix un màxim en els antocians monomèrics. Després d'aquest punt, sovint hi ha un decreixement, a causa de l'adsorció sobre les lies de llevat i les parts sòlides del raï m, d'una petita part de degradació, i de la seva inclusió en cristalls de bitartrat potàsic que es van insolubilitzant a mesura que el contingut etanòlic augmenta²³³.

El coneixement dels continguts d'antocians extractables permet poder dissenyar adequadament el procés de vinificació²³⁴, ja que el percentatge de polifenols individuals respecte el contingut total és indicatiu de l'elecció de la millor tècnica de vinificació.

En el cas dels antocians, el seu mecanisme de difusió des de les pells del raï m fins al most sembla estar afectat per l'estructura molecular, per factors varietals i per la composició de la fase líquida²³⁵. En alguns estudis d'extractabilitat s'ha observat una major facilitat d'extracció de la peonidina-3-glucòsid respecte la malvidina-3-glucòsid²³⁶, però en contraposició, en altres estudis és la malvidina el principal compost recuperat, amb valors

²³² Parley, A. (1997). "Voodoo and the art of winemaking. Part II. Technology of red wine vinification". Lincoln University.

²³³ Parley, A. (1997). "The effect of pre-fermentation enzyme maceration on extraction and colour stability in pinot noir wine"; *Tesi Doctoral*. Lincoln University.

²³⁴ Mattivi, F.; Prast, A.; Nicolini, G.; Valenti, L. (2002). "Validation of a new method to measure the polyphenolic potential of red grapes and discussion of its use in enology"; *Rivista di Viticoltura e di Enologia*; 55 (2-3) 55-74

²³⁵ Di Stefano, R.; Borsa, D.; Gentilini, N. (1994). "Estrazione degli antociani dalle bucce dell'uva durante la fermentazione". *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*; 25 (1) 31-46; It.

²³⁶ Dell'Oro V.; Di Stefano R. (1991). "Carbonic maceration. Evolution of vanillic and syringic acids and anthocyanins during conservation of Barbera and Nebbiolo grapes in carbon dioxide". *Vini d'Italia*, 33 (4) 53-62

d'aproximadament un 90% ²³⁷. D'aquests estudis, sembla inferir-se que la recuperació depèn fonamentalment de la concentració de l'antocià en la matèria prima, el raï m.

També s'observa que les formes antociàniques varien segons el tipus de processament. Així, malgrat que la maceració tradicional i la intensiva donen uns continguts similars d'antocians en el most, la maceració intensiva afavoreix un increment de les formes hidroxilades (cianidina, delfinidina) i una pèrdua de les formes acilades. La maceració carbònica canvia els ratios d'antocians entre el most i el vi i promou l'extracció dels antocians-3-monoglucòsids no acilats; i la maceració en calent afavoreix una major extracció inicial dels antocians hidroxilats en el most, però una pèrdua dels mateixos i dels acilats en el vi final. De fet, en general el procés maceratiu comporta un empobriment en el contingut de derivats acilats, efecte al qual s'ha d'afegir que les formes acilades es descomponen més ràpidament que les no acilades durant el processament²³⁸.

Hi ha altres factors que poden implicar pèrdua de material antociànic. Malgrat que al llarg de la fermentació hi ha una gran extracció dels antocians de les pells, també hi ha una pèrdua d'aquests compostos a causa de la seva oxidació, precipitació i adsorció sobre els llevats. La presència d'etanol, acetaldehid i altres compostos al llarg de la fermentació comporta canvis en el mecanisme de difusió i la precipitació d'antocians tant monomèrics com polimèrics. La presència de nivells elevats d'acetaldehid (en els casos de fermentacions de mostos clarificats o filtrats o en què els llevats tenen carències metabòliques) sembla ser responsable de pèrdues significatives en la quantitat d'antocians²³⁵. Aquests efectes seran més àmpliament discutits en el següent capítol de la present tesi.

3. Els flavan-3-ols i els seus oligòmers, les procianidines, són més solubles en alcohol, i estan localitzats principalment en els pinyols, malgrat que la majoria de varietats també presenten quantitats significatives d'aquests flavonoids en les pells. Per la seva localització i solubilitat, el seu contingut incrementa lentament a mesura que progressa la fermentació alcohòlica²³⁹. L'extracció dels flavan-3-ols i les proantocianidines dels pinyols és un aspecte important de la llargada del temps de maceració.

²³⁷ Vivas de Gaulejac, N.;Nonier, M. F.;Guerra, C.;Vivas, N. (2001). "Anthocyanin in grape skins during maturation of *Vitis vinifera** L. cv. Cabernet Sauvignon and Merlot noir from Bordeaux terroirs". *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*; 35 (3) 149-156

²³⁸ La Notte E.;Liuzzi VA;Esti M. (1992). "The polyphenolic wine components. 2. Note: Anthocyanins content and composition in relation to different winemaking techniques". *Vignevini*; 19 (10) 49-55;1992

²³⁹ Rizzon, L.A. (1985). "Incidence de la macération sur la composition chimique des vins". *Tesi Doctoral*. Bordeaux II.

Encara que els pinyols presenten unes quantitats més elevades de tanins, els tanins de les pells, a causa de la seva localització i major polaritat (especialment en el cas de les prodelfinidines) són més fàcilment extractables²⁴⁰.

Les condicions de vinificació poden modificar el contingut de proantocianidines del vi i, per tant, modificar-ne les propietats organolèptiques. La distribució de cada tipus de monòmer, oligòmer i polímer en el vi jove està estretament relacionada amb el contingut en la varietat. Així, la varietat Pinot noir, que té un alt contingut de flavan-3-ols i proantocianidines en els pinyols però és molt més pobre en les pells, origina vins més rics en (+)-catequina i (-)-epicatequina que els vins de Cabernet Sauvignon²⁴¹. Per altra banda, de pràctiques enològiques que condueixin a una major extracció dels pinyols en resulten vins més tàncics.

3.1.2. Procés de maceració en negres

El raï m està altament compartimentat en cèl·lules amb paret cel·lular de pectines, cel·lulosa i hemicel·lulosa; i que mantenen una comunicació entre elles mitjançant una capa de pectina. Una bona pràctica de maceració requereix que es degradi aquesta capa per tal d'alliberar les cèl·lules, i que es trenquin les parets cel·lulars per tal d'alliberar-ne els components. Això es pot aconseguir mitjançant la utilització de maceració mecànica, calor, enzims pectolítics, maceració en fred, o per combinació de tots ells.

a) Maceració mecànica: El procés maceratiu tradicional implica la realització periòdica de remuntatges per facilitar un major contacte entre les pells i el most, i millorar així l'extracció de compostos fenòlics. A més, els remuntatges actuen regulant la temperatura del most i airejant-lo, la qual cosa inhibeix l'acetidificació del vi i afavoreix el creixement dels llevats i, per tant, possibilita un desenvolupament més ràpid de la fermentació alcohòlica.

Entre els factors amb més incidència sobre l'eficiència del procés maceratiu es poden citar la temperatura, l'oxigenació, el temps de maceració i l'agitació del barret²⁴².

²⁴⁰ Souquet, JM; Cheynier, V; Brossaud, F; Moutounet, M. (1996). "Polymeric proanthocyanidins from grape skins". *Phytochemistry*, vol 43, n°2: 509-512

²⁴¹ Karuamanchir, A; Tsang, E; Goldberg, DM; Diamnandis, EP; Soleas, GJ; "Catechin and epicatechin concentrations of red wines from 15 different regions"; (1996). *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 357

²⁴² Vivas N; Galvin C; Chabot PH. (2001). "Maceration techniques in the production of red quality wines". *Progres Agricole et Viticole*, 109 79-88

La durada de la maceració permet regular la quantitat de polifenols extractables i la seva estructura. Temps més llargs de contacte provoquen generalment més color, més flavonoids, més procianidines, menys antocians monomèrics, més compostos fenòlics polimèrics i més pigments polimèrics^{243,244,245}. En contraposició, les maceracions curtes condueixen a vins lleugers, amb poca quantitat de polifenols. En aquestes maceracions curtes hi haurà una bona extracció d'antocians, ja que difonen ja en l'encubat, i arriben al seu màxim al 5è-6è dia, però no així dels tanins, l'extracció dels quals té lloc preferentment durant la fase alcohòlica. Conseqüentment, el vi tindrà un grau de condensació baix per la carença de tanins i això implicarà una menor estabilitat. Quan el temps de maceració s'allarga, és possible extreure tanins més condensats que confereixen al vi la seva estructura i mitjançant la combinació amb antocians donen lloc a formes més estables en el temps.²⁴⁶ Aquest procés s'haurà d'adaptar al tipus de vi que es desitja obtenir, en funció del seu consum com a vi jove o com a vi de cria en bóta²⁴⁷.

La tendència generalitzada d'elaborar vins negres amb un contingut elevat en polifenols com a conseqüència de la demanda actual del mercat, ha donat lloc al desenvolupament de noves tecnologies de vinificació com la maceració prefermentativa en fred, l'addició d'enzims pectolítics al most, o el calentament de la pasta per millorar el contingut polifenòlic dels vins negres²⁴⁸.

b) La maceració prefermentativa en fred consisteix a disminuir la temperatura inicial del procés fermentatiu, de manera que es modifica l'extracció d'antocians, aromes i tanins a causa de la seva diferent solubilitat: en allargar el període d'extracció no alcohòlica, augmenta el contingut d'antocians i d'aromes.^{249,250}

²⁴³ Sims, CA;M Bates, RP. (1990). "Effects of skin fermentation time on the phenols, ellagic acid sediment and sensory characteristics of a red *Vitis rotundifolia* wine". *Am. J. Enol. Vitic.*, 45: 56-63

²⁴⁴ Scudamore-Smith, PD; Hooper, RL; McLaren, ED. (1990). "Colour and phenolic changes of Cabernet sauvignon wine made by simultaneous yeast/bacterial fermentation and extended pomace contact". *Am.J. Enol. Vitic.* 41: 57-67

²⁴⁵ Awu, JM; Blanco, V; O'Keefe, SF; Sims, CA. (1996). "Effect of processing on the phenolics and colour of Cabernet sauvignon, Chambourcin and Noble wines and juices"; *Am.J.Enol.Vitic.* 47: 279-286

²⁴⁶ Mayen, E; Mérida, J; Medina, M. (1994). "Free anthocyanins and polymeric pigments during the fermentation and postfermentation standing of musts from Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes". *Am. J. Enol. Vitic.*, vol 45, 161-166

²⁴⁷ Zamora, F. (1998). "Los compuestos fenólicos del vino tinto y su capacidad para la crianza"; Jornada Técnica sobre Aspectos científicos del color del vino. URV

²⁴⁸ Arfelli G;Chiavari G;Castellari M;Amati A. (1992). "The influence of wine making on polyphenolic compounds content in wines obtained from grapes of different cultivars. 2. Anthocyanins". *Vignevini*, 19 (9) 49-55

²⁴⁹ Couasnon, M. (1999). "Une nouvelle technique: La macération pré-fermentaire à froid - Extraction à la neige carbonique. 1ere partie: Résultats oenologiques". *Rev. Oenol. Tech. Vitivinic. Oenol.* 92, 26-30

²⁵⁰ Baraut, C; Joulain, H; Landron, C. "Comment vinifier les vins de garde?"; *Viti*, 222, 46-47

En aquesta tècnica s'empra neu carbònica, que provoca un major trencament de les pells, la qual cosa afavoreix l'extracció. Si es congelen els raï ms a -4°C , el gel format causa la ruptura de les cèl·lules, i les pells tendeixen a separar-se de les polpes, de manera que quan es puja la temperatura a 10°C l'extracció dels compostos fenòlics augmenta. A més, en retardar la fermentació uns quants dies, no es forma el barret i per tant el contacte entre el most i el raï m és més íntim. També presenta una sèrie d'avantatges addicionals relacionats amb les baixes temperatures, com són la inhibició de les polifenoloxidasas, de les bactèries acètiques i dels llevats oxidatius²⁵¹.

c) Termovinificació: La velocitat de l'extracció de compostos fenòlics s'incrementa significativament en augmentar la temperatura, que té un efecte de degradar les parets cel·lulars, incrementar les reaccions enzimàtiques, i augmentar la difusió dels compostos fenòlics. No obstant això, al llarg de la fermentació alcohòlica convé establir un control tèrmic, perquè si la temperatura resulta elevada pot provocar problemes d'aturades de fermentació, així com de pèrdua d'aromes²⁵².

En la termovinificació, s'utilitzen altes temperatures abans de la fermentació per tal d'extreure color i compostos fenòlics, i després d'aquesta extracció s'inicia el procés fermentatiu. Aquest procés pot afectar la composició del most, i per exemple s'ha observat que l'aplicació de calor a la pasta provoca un increment de l'extractibilitat dels compostos acilats²⁵³.

Similar fonament té la tècnica d'expansió flash, en què els raï ms són escalfats a 85°C durant 5 minuts, i després són sotmesos a una expansió flash sota buit a 60 mbar. A aquesta temperatura i pressió, part de l'aigua de les cèl·lules passa a fase vapor, i la pressió diferencial que s'exerceix sobre les parets cel·lulars provoca la seva ruptura. La maceració posterior aporta una major extracció d'antocians i compostos fenòlics, sense afectar el balanç entre les fraccions extretes ni l'estabilitat de les mateixes²⁵⁴.

d) Maceració enzimàtica: Els enzims pectolítics es troben en el raï m de forma natural, i en quantitat suficient per a la degradació de les pellofes durant la vinificació i l'alliberament al most de compostos fenòlics i aromàtics. Els preparats enzimàtics comercials amb activitat principal de tipus pectolític - i un ampli espectre d'activitats

²⁵¹ Zamora, F. (2002). "Extracción y estabilización de la materia colorante en la vinificación en tinto"; a "Maceración y Extracción de color. Gonierno de la Rioja. Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. 2002.

²⁵² Merida, J; Moyano, L; Millan, C; Medina, M. (1991). "Extraction of phenolic compounds in controlled macerations of Pedro Ximenez grapes"; *Vitis* 30: 117-127

²⁵³ Meier W;Steidl R;Eder R;Wendelin S. (1990). "Der Einfluss verschiedener Verarbeitungsmethoden auf die Anthocyanzusammensetzung von Rotweinen". *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung*; 40 : 241-2491

secundàries (cel·lulases, hemicel·lulases, glucosidases, proteases...) - permeten accelerar i optimitzar aquesta activitat natural. La seva acció extractiva té lloc al llarg de les primeres hores de maceració, i allibera en primer lloc els antocians i els tanins poc polimeritzats. L'eficàcia del procés pot estar influïda per la temperatura, el pH del most, la varietat de raïm i la presència d'inhibidors. Alguns autors dubten de la seva eficàcia²⁵⁵, ja que en ocasions provoquen una disminució del color, atribuïda a acció β -glicosidasa present com a impuresa en els preparats. Aquestes impureses de β -glicosidasa també hidrolitzen l'enllaç ester dels antocians-glucòsid, cosa que desestabilitza l'estructura dels adductes que formen els copigments, responsables d'un efecte hiperocròmic que caracteritza el color dels vins joves.

De fet, encara que en els primers dies hi ha una major extracció dels antocians, els nivells finals no difereixen dels obtinguts sense el tractament, motiu pel qual aquesta metodologia seria aconsellable només en casos que el temps de maceració hagi de ser breu.

3.2. OBJECTIUS

1. Es va proposar d'estudiar la difusió dels antocians individuals al most en el procés maceratiu al llarg del temps, per tal de veure la influència de l'estructura química en aquest procés.

2. Per altra banda, l'estudi es va dur a terme amb diferents varietats, per comprovar si en aquesta extracció es podia establir un comportament varietal.

²⁵⁴ Anon, F. (1995). "Flash expansion. A technology under development". *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et oenologiques* 77: 18-20

²⁵⁵ Lovino, R; Di Benedetto, G; Scazzariello, G. (1997). "L'impiego di enzimi pectolitici nella vinificazione in rosso di uve dell'Italia meridionale". *L'Enotecnico*, 33:75-86

3.3. MATERIALS I MÈTODES

Per preparar les vinificacions s'obtenia most a partir de 800 g de baies madures que es premsaven amb un colador xinès. Les pells i el most obtingut es recollien en flascons àmbar de 2 litres de capacitat i s'inoculava la soca comercial de llevat QA23 (Lallemand). Per simular el procés de remuntatge, es feia una inversió del flascó de manera diària, i per homogenitzar el medi aquesta operació es feia abans de la presa de mostra. De mostra s'extreien 5 ml de manera periòdica, que eren centrifugats a 5000g durant 5 minuts per eliminar les parts sòlides. El sobrenedant net es filtrava a través d'una membrana de 0,45 µM (Millipore) i constituïa la mostra a injectar en el HPLC, mètode de determinació ja comentat en el capítol 1 de la present tesi.

El seguiment de les fermentacions es realitzava mesurant la densitat i, quan s'arribava al final de la fermentació alcohòlica, es determinaven els sucres residuals mitjançant el kit de glucosa/fructosa de Roche.

3.4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

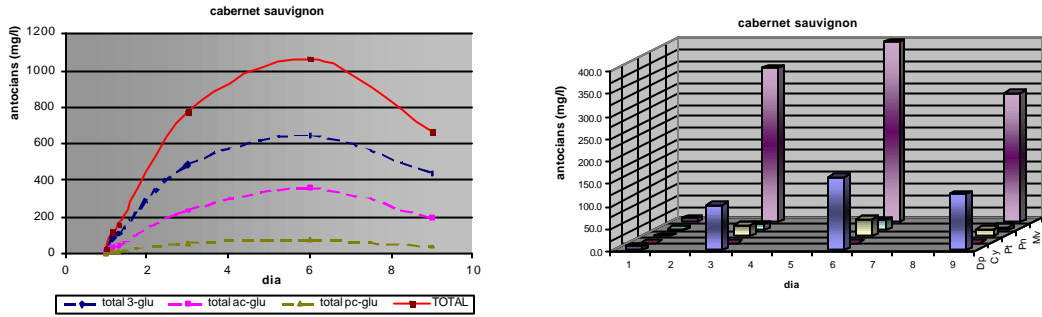
El contingut d'antocians en les baies per a cada varietat en el moment de la verema es van determinar per HPLC, i es recull a la taula 3.4.1.

	Cabernet sauvignon	Syrah	Monastrell	Merlot	Ull de llebre	Pinot noir	Garnatxa	Carinyena
NO ACILATS	1262±355	437±133	956±256	1338±80	880±127	822±283	863±287	686±70
Dp-3-glu	206±66	27±9	111±33	211±32	161±36	35±9	47±20	113±10
Cy-3-glu	20±8	6±4	87±33	55±6	25±7	11±2	43±14	15±3
Pt-3-glu	143±43	44±13	145±39	188±22	143±27	55±15	57±22	106±9
Pn-3-glu	65±17	50±23	116±46	138±11	46±8	114±37	216±84	29±3
Mv-3-glu	828±224	311±86	498±115	746±18	505±57	607±220	499±159	423±45
ACETILATS	504±155	188±42	34±10	277±10	36±1	0	16±5	29±4
P-CUMARILATS	165±56	467±68	162±21	308±29	292±36	0	92±28	302±20
TOTAL	1932±563	1093±204	1152±288	1922±69	1208±128	822±283	956±310	1017±87

Taula 3.4.1 Valors de concentració (µg/g baia) d'antocians en les varietats emprades en les microvinificacions

En les següents gràfiques es recull l'extracció dels antocianidin-3-glucòsids i del global d'antocians acetilats i p-cumarilats, per cadascuna de les fermentacions realitzades; és a dir, per a cada varietat objecte d'estudi.

1) Cabernet sauvignon



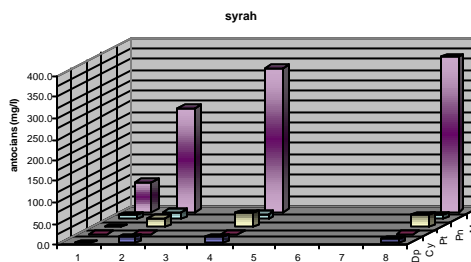
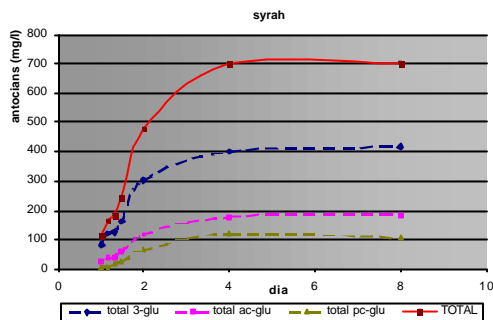
Gràfica 3.4.1. a) Evolució dels antocians monoglucòsids (“total 3-glu”), acetilats (“ac-glu”) i p-cumarilats (“pc-glu”) al llarg de la maceració per a la varietat cabernet. b) Evolució dels cinc antocians monoglucòsids: Dp (delfinidina-3-glu), Cy (cianidina-3-glu), Pt (petunidina-3-glucòsid), Pn (peonidina-3-glucòsid), Mv (malvidina-3-glucòsid)

Cabernet sauvignon és la varietat que proporciona una concentració més alta d'antocians en el most. Això ve motivat per la conjunció de dos factors: per una banda, l'elevada quantitat d'antocians que tenen les seves pells, i per l'altra, que és una varietat de gra petit. Això fa que els seus mostos siguin concentrats en compostos fenòlics. La velocitat d'extracció és ràpida, però no s'assoleix la saturació fins al 6è dia, segurament a causa de les elevades concentracions que presenta. Posteriorment, encara que en el medi ja s'hagi produït etanol, que contribueix a la solubilització dels compostos fenòlics, hi ha una disminució del contingut dels antocians. L'explicació més plausible és l'adsorció d'aquests compostos a les parts sòlides del raïm, així com a les parets del llevat, apreciable en forma de precipitat si es centrifuguen les mostres. La disminució és particularment elevada pel cas de la malvidina, que en ser l'antocià majoritari afecta decisivament en les quantitats totals.

Una característica observable, que després també es manifesta en les altres varietats, és la superior extracció dels antocianidin-3-glucòsids respecte la dels corresponents derivats acetilats, especialment en el cas dels derivats cumarilats.

D'entre els antocianidin-3-glucòsids, la malvidina és la que difon més ràpidament, seguida de la delfinidina i, ja en menor grau, la petunidina. En canvi, tant la peonidina com la cianidina són molt més difícils d'extreure. Cal tenir en compte que en la velocitat del procés també hi influeix la concentració, i en el cas de la cianidina les concentracions són baixes.

2) Syrah

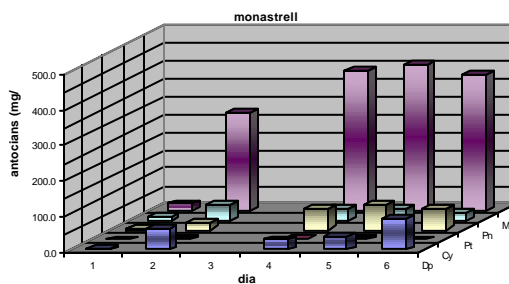
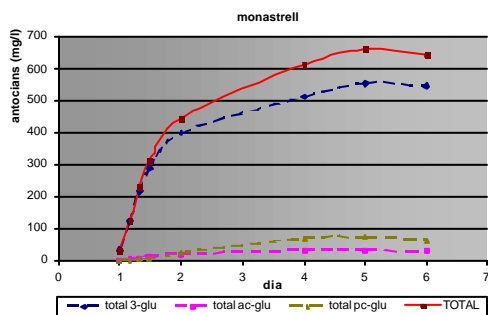


Gràfica 3.4.2. a) Evolució dels antocians monoglucòsid (“total 3-glu”), acetilats (“ac-glu”) i p-cumarilats (“pc-glu”) al llarg de la maceració per a la varietat syrah. b) Evolució dels cinc antocians monoglucòsids: Dp (delfinidina-3-glu), Cy (cianidina-3-glu), Pt (petunidina-3-glucòsid), Pn (peonidina-3-glucòsid), Mv (malvidina-3-glucòsid)

En Syrah, la situació és similar a la del Cabernet sauvignon: es tracta d’una varietat de gra petit amb alt contingut d’antocians. Hi ha una extracció ràpida dels antocians, en major mesura en el cas dels no acilats, i en aquest cas, el plateau s’assoleix el dia 5, però no hi ha una disminució posterior del contingut en antocians per processos d’adsorció. Una possible explicació és que en la fermentació de syrah, encara que els darrers dies no s’acabaven de consumir els sucres residuals, els valors de densitat sempre estigueren per sota dels de cabernet. En un medi més dens, les reaccions d’adsorció resulten més probables.

La malvidina-3-glucòsid és preponderantment l’antocià que més s’extreu, en nivells molt més elevats (350 mg/l) que els de la petunidina (50 mg/l)

3) Monastrell

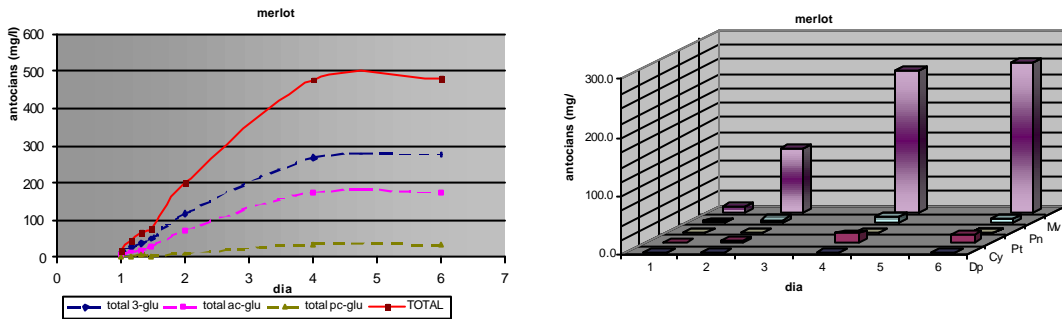


Gràfica 3.4.3. a) Evolució dels antocians monoglucòsid (“total 3-glu”), acetilats (“ac-glu”) i p-cumarilats (“pc-glu”) al llarg de la maceració per a la varietat monastrell. b) Evolució dels cinc antocians monoglucòsids: Dp (delfinidina-3-glu), Cy (cianidina-3-glu), Pt (petunidina-3-glucòsid), Pn (peonidina-3-glucòsid), Mv (malvidina-3-glucòsid)

En monastrell semblen produir-se dos plateaus; un primer el dia 2, i l'altre el dia 5. La causa és una frenada en l'extracció dels antocians monoglucòsid, ja que pels derivats acilats, encara que amb menor velocitat, l'extracció és més constant.

Com ja succeï a en les pells, la proporció d'antocians acilats és baixa. Quant als antocians-3-glucòsid, a part de la malvidina, també hi ha una extracció elevada de petunidina i peonidina, i sobretot de delphinidina cap als darrers moments de la maceració.

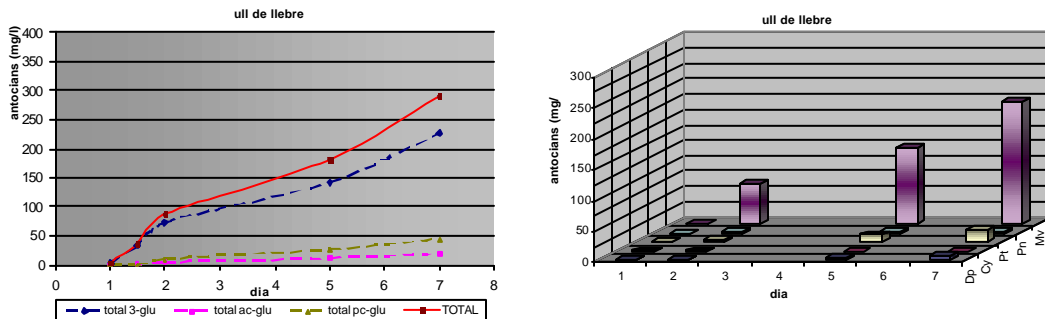
4) Merlot



Gràfica 3.4.4 a) Evolució dels antocians monoglucòsid ("total 3-glu"), acetilats ("ac-glu") i p-cumarilats ("pc-glu") al llarg de la maceració per a la varietat merlot. b) Evolució dels cinc antocians monoglucòsids: Dp (delphinidina-3-glu), Cy (cianidina-3-glu), Pt (petunidina-3-glucòsid), Pn (peonidina-3-glucòsid), Mv (malvidina-3-glucòsid)

En merlot, la velocitat inicial de difusió resulta menor. Malgrat ser una de les varietats amb majors quantitats al raï m de derivats acilats, novament és molt baixa la seva extracció, especialment en el cas dels cumarilats. Pel que fa referència a l'extracció dels antocianidin-3-glucòsids, de nou és predominant l'extracció de malvidina, mentre que de la resta s'obtenen uns rendiments d'extracció molt baixos.

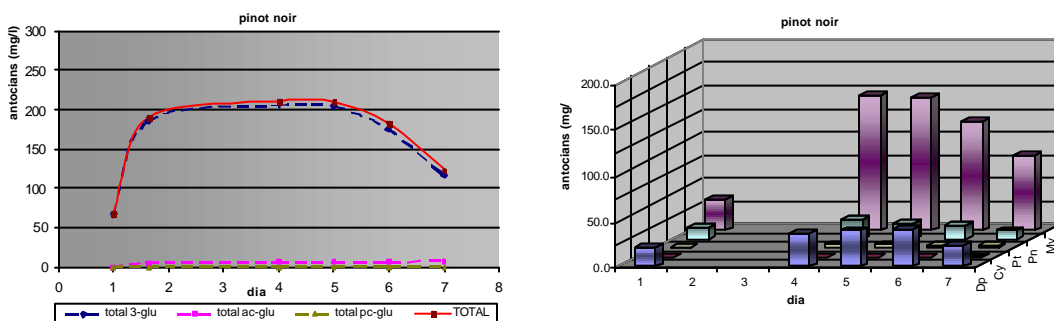
5) Ull de llebre



Gràfica 3.4.5. a) Evolució dels antocians monoglucòsid ("total 3-glu"), acetilats ("ac-glu") i p-cumarilats ("pc-glu") al llarg de la maceració per a la varietat ull de llebre. b) Evolució dels cinc antocians monoglucòsids: Dp (delphinidina-3-glu), Cy (cianidina-3-glu), Pt (petunidina-3-glucòsid), Pn (peonidina-3-glucòsid), Mv (malvidina-3-glucòsid)

En Ull de llebre, quan acaba la fermentació alcohòlica encara no s'ha assolit el nivell de plateau. De fet, en aquesta varietat sembla que hi hagi un alentiment del procés maceratiu al cap del 2n dia, per després tornar-se a promoure l'extracció. Una possible explicació és que, en ser una varietat de raï m gran, hi ha una relació molt menor de pells respecte baies, i té una elevada densitat del most, cosa que dificultaria el procés extractiu en els primers dies. Els antocians que s'extreuen tan ràpidament al principi provindrien de raï ms sobremadurats, en què hi ha hagut un alt grau de desintegració cel·lular i que, per tant, permeten un alliberament més ràpid del seu contingut.

6) Pinot noir

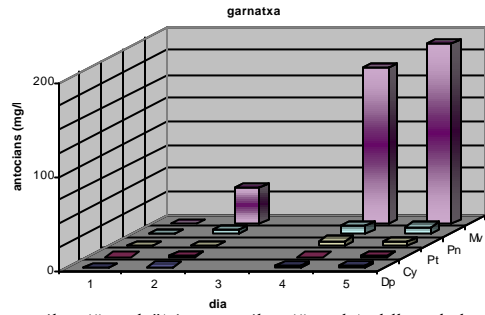
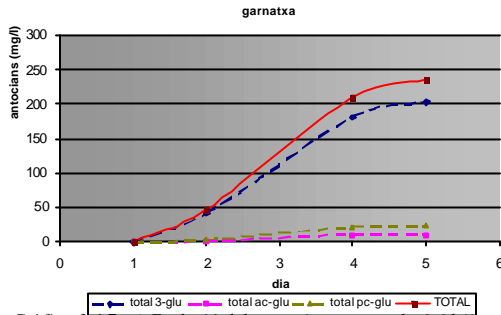


Gràfica 3.4.6. a) Evolució dels antocians monoglucòsid ("total 3-glu"), acetilats ("ac-glu") i p-cumarilats ("pc-glu") al llarg de la maceració per a la varietat pinot noir. b) Evolució dels cinc antocians monoglucòsids: Dp (delfinidina-3-glu), Cy (cianidina-3-glu), Pt (petunidina-3-glucòsid), Pn (peonidina-3-glucòsid), Mv (malvidina-3-glucòsid)

En pinot noir, que és una varietat de gra petit, també es dona una ràpida extracció dels antocians. S'arriba en poc temps als valors màxims de saturació, que es mantenen fins al 5è dia, en què comença una davallada. Com es pot comprovar en la gràfica, aquest efecte és especialment acusat en el cas de la malvidina.

A més de pel ja descrit efecte d'adsorció sobre les parts sòlides, una causa d'aquesta desaparició podria ser la participació dels antocians en productes de combinació amb els flavan-3-ols. Els vins de Pinot noir no són gaire rics en antocians, ja que, com hem vist, no presenten derivats acilats en les pells. Però són vins molt tàncics, perquè la quantitat de flavan-3-ols monòmers i polímers en els pinyols és molt elevada, i aquesta elevada presència pot afavorir que s'estableixin reaccions de polimerització que impliquin la participació i, per tant, desaparició dels antocians com a espècies aï llades.

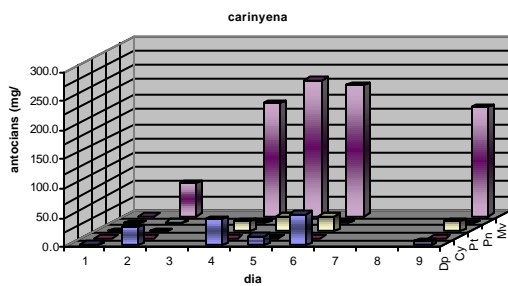
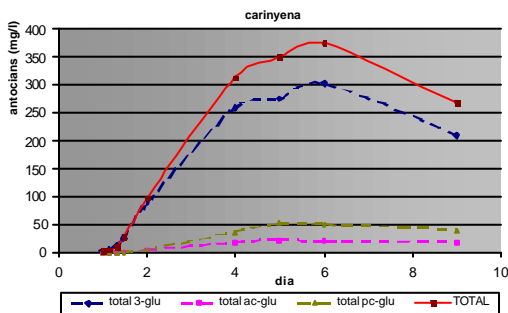
7) Garnatxa



Gràfica 3.4.7. a) Evolució dels antocians monoglucòsids ("total 3-glu"), acetilats ("ac-glu") i p-cumarilats ("pc-glu") al llarg de la maceració per a la varietat garnatxa. b) Evolució dels cinc antocians monoglucòsids: Dp (delfinidina-3-glu), Cy (cianidina-3-glu), Pt (petunidina-3-glu), Pn (peonidina-3-glu), Mv (malvidina-3-glu)

En Garnatxa succeeix el comportament clàssic de les varietats de gra gran: la velocitat de difusió és lenta, i els nivells finals d'antocians són baixos, igual que l'ull de llebre. Per a aquesta varietat la fermentació alcohòlica acaba en només 5 dies, ja que el contingut inicial de sucres en el most era menor. Aquesta rapidesa en la fermentació alcohòlica implica que el procés extractiu no s'hauria completat en el moment d'acabar el procés fermentatiu. La malvidina és l'antocià extret en proporcions més elevades.

8) Carinyena

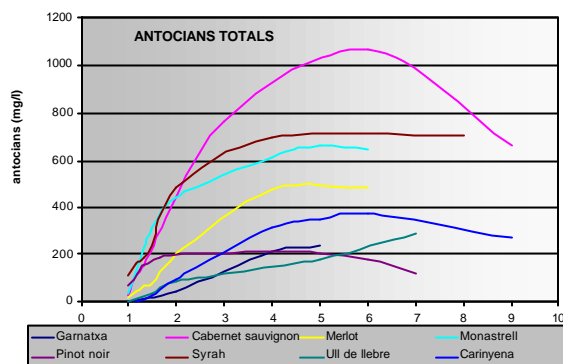


Gràfica 3.4.8. a) Evolució dels antocians monoglucòsids ("total 3-glu"), acetilats ("ac-glu") i p-cumarilats ("pc-glu") al llarg de la maceració per a la varietat carinyena. b) Evolució dels cinc antocians monoglucòsids: Dp (delfinidina-3-glu), Cy (cianidina-3-glu), Pt (petunidina-3-glu), Pn (peonidina-3-glu), Mv (malvidina-3-glu)

En Carinyena, que també és una varietat de gra gran, hi ha no obstant una velocitat d'extracció elevada en les primeres fases, fins arribar al plateau. Posteriorment, comencen a disminuir les concentracions dels antocians en el medi. El fet que es tracti d'una fermentació llarga podria afavorir els processos d'adsorció, que en aquest cas semblen implicar majoritàriament la delfinidina-3-glu, que gairebé ha desaparegut del medi al darrer dia de maceració.

Discussió general

a) Evolució de l'extracció



Gràfica 3.4.9. Gràfica global d'evolució de la quantitat d'antocians totals al llarg de la fermentació alcohòlica per les diferents varietats estudiades

extracció ràpida seguida d'una associació lenta dels antocians amb altres compostos, que provoca la disminució d'aquests antocians lliures en dissolució. Aquestes interaccions poden donar-se entre els propis antocians o amb altres molècules com els tanins. En experiències realitzades en la DO Penedès²⁵⁸, els resultats apunten en aquest sentit, ja que la proporció dels antocians polimèrics va augmentant a mesura que avancen els dies de maceració. La disminució també pot ser a causa d'una adsorció sobre els llevats²⁵⁹, i de fet, en els nostres experiments es pot observar color en les lies, cosa que reforça aquesta segona hipòtesi.

Es pot observar que la velocitat de l'extracció depèn de la varietat, i està fortament influïda pel contingut i la composició antociànica de la mateixa. Seguidament es comentaran els dos aspectes.

²⁵⁶ Martínez, J; López, R; Santamaría, P; Barua, M; Gutiérrez, AR. (2002). "Experiencias sobre maceración en vinos de tempranillo", a "Maceración y extracción de color". Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Gobierno de La Rioja. 2002.

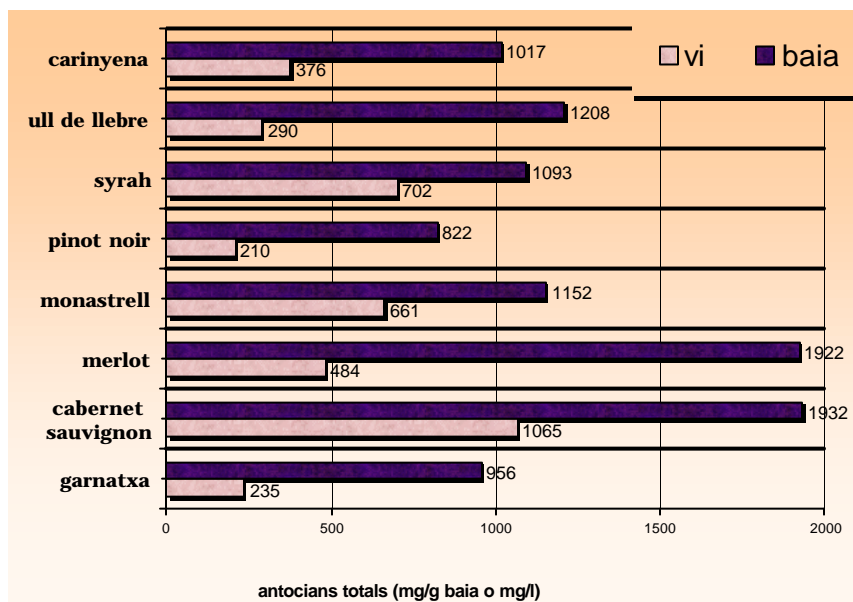
²⁵⁷ Singleton, VL; Trousdale, EK. (1992). "Anthocyanin-tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines". *Am J Enol Vitic*, 43: 63-70

²⁵⁸ Pardo, R; Castro, JJ. (2003). "Estudio de la extracción de compuestos fenólicos de variedades tintas durante la vinificación en la DO Penedès"; *Viticultura/Enología Profesional*, nº87, 37-42

²⁵⁹ Vasserot, Y; Caillet, S; Maujean, A. (1997). "Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters". *Am J Enol & Vitic*, 48: 433-437

b) Capacitat extractiva segons les varietats

Es van trobar grans diferències entre la capacitat de diferents varietats per permetre l'extracció dels antocians (gràfica 3.4.10).



Gràfica 3.4.10. Contingut d'antocians totals en baia (mg/kg baia) i màxims assolits en les corresponents vinificacions (expressats en mg/l)

Syrah i monastrell van donar les majors extraccions en relació al seu contingut inicial en pell.

Cabernet va presentar una extracció mitjana alta i aconsegueix en el vi nivells fins i tot superiors a syrah i monastrell.

En canvi, carinyena, garnatxa, ull de llebre i pinot noir donaven unes concentracions molt menors de les que s'esperarien del seu nivell en els raï ms, la qual cosa fa que originin vins de poca coloració. També dona una baixa extracció merlot, però tot i així, els continguts en el vi encara es poden considerar elevats.

L'extracció dels antocians està fortament influïda per la varietat (figura 3.4.9) i per la concentració d'antocians en la baia. Cabernet sauvignon, la varietat de major contingut antocianic, és qui permet una major extracció dels antocians, seguida de Syrah i Monastrell. Tanmateix, hi ha varietats d'elevat contingut en antocians, com merlot i ull de llebre, que

donen uns rendiments inferiors. Hi ha altres paràmetres que determinen el grau d'extracció, com és l'estat d'integritat de les pells, factor que està molt relacionat amb el grau de maduresa del raï m. Així, per exemple, els resultats que originen Carinyena o ull de llebre, varietats considerades tradicionalment de molt color, indiquen una mala adaptació d'aquestes varietats al clima de la zona, que es tradueix en una maduresa insuficient que dificulta el procés maceratiu. En el cas de Merlot, altres estudis en altres anys no mostren la baixa extractabilitat que obtenim en el nostre experiment.

Altres treballs sobre maduració fenòlica en el raï m que es realitzen en la Facultat d'Enologia²³¹, indiquen una extractabilitat potencial en la pell de la baia diferent segons les varietats, i agrupen les varietats de més a menys extractabilitat en: a) syrah, cabernet i merlot; b) ull de llebre c) garnatxa i carinyena.

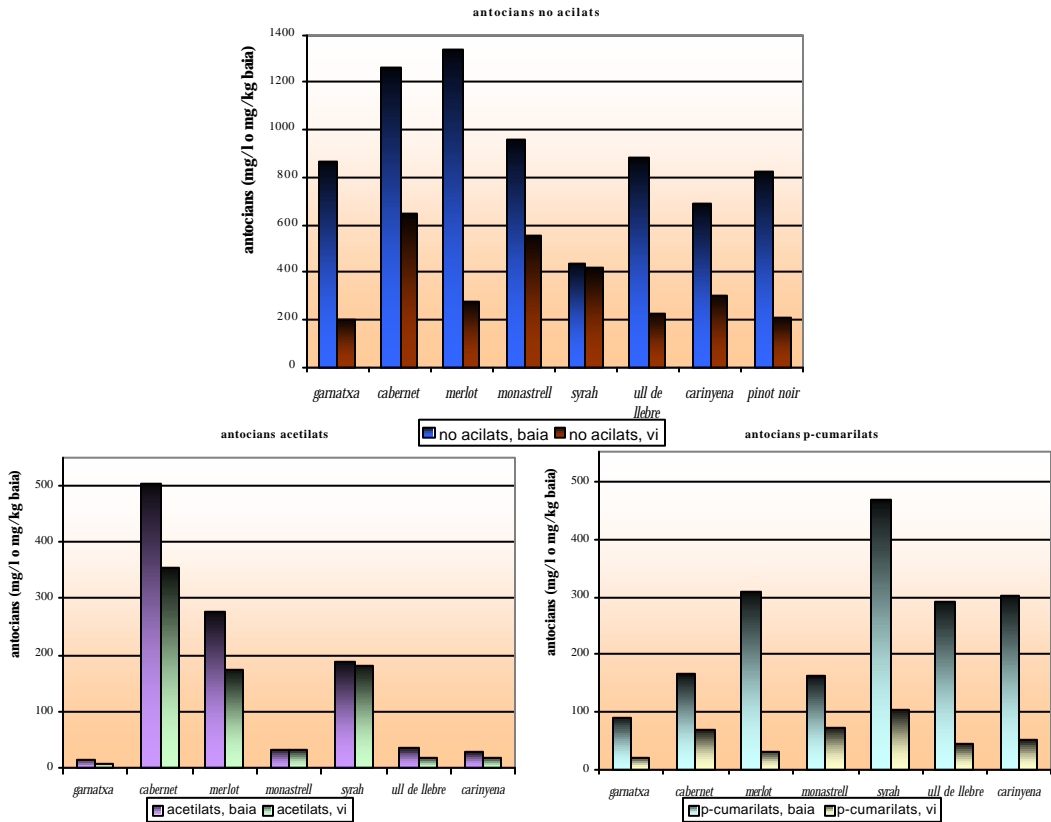
Resulta conflictiva la comparació dels continguts d'antocians en les maceracions del nostre treball amb les d'altres autors, a causa de la variabilitat de procediments enològics emprats, així com de la manca d'informació sobre els continguts inicials en els raï ms. Per cabernet sauvignon, Pardo i Castro²⁵⁸ obtenen uns valors màxims en la maceració de 800 mg/l, similars als nostres o als de Cabezudo *et al.*²⁶⁰, i superiors als valors de 400 mg/l obtinguts per Scudamore-Smith *et al.*²⁴⁴ o als 300 mg/l que obtenen Chicón *et al.*²⁶⁶ Pardo i Castro²⁵⁸ també realitzen l'experiència de maceració amb les varietats Merlot i Ull de llebre, i obtenen en ambdós casos unes concentracions d'antocians totals més elevades que les nostres. Convé dir que el procés d'extracció és diferent, ja que treballen amb dipòsits de 50 000 litres amb remontatges periòdics cada 15 minuts, cosa que explica la major extracció que obtenen, ja que en general, les macrovinificacions condueixen a majors concentracions que les microvinificacions²⁴⁴. També obtenen valors més elevats d'antocians en ull de llebre Cabezudo *et al.*²⁶⁰ en la regió de Castilla la Mancha, que confirmen les nostres hipòtesis d'una ineficient maduració d'aquesta varietat en el nostre mesoclima, tot i que els valors obtinguts per Mayen *et al.*²⁴⁶ són encara més baixos, sobre els 250 mg/l.

El treball de Cabezudo²⁶⁰ també posa de manifest l'elevat contingut antociànic en vins de Syrah, per sobre dels 800 mg/l.

²⁶⁰ Cabezudo, MD; Vicario, A. (2004). "Principales compuestos fenólicos de los vinos tintos de zonas cálidas: Cabernet Sauvignon, Cencibel/Tempranillo y Shiraz". *Tecnología del vino*, 15: 73-78

c) Extractabilitat segons la natura química

Els antocianidin-glucòsids no acilats són els principals pigments presents en el vi en tots els casos, mentre que la presència en el vi final dels antocians acilats amb l'àcid p-cumàric és menor de la que presenten en la pell de la baia, i per tant, semblen ser menys extractables. En canvi, les quantitats d'antocians acetilats es corresponen força més amb les que ja es trobaven al raï m. Aquestes diferències es recullen en la gràfica 3.4.11.



Gràfica 3.4.11. Comparació entre els nivells d'antocians en baia i en vi

S'observa que els nivells d'extracció dels antocians p-cumarilats és quantitativament la menor de totes les famílies d'antocians i en canvi, els dels derivats acetilats són els majors. Tanmateix, en els valors finals en vi, en tractar-se de varietats en què els nivells d'antocians acetilats són baixos, segueixen sent els antocians no acilats els majoritaris. Això també explica que les varietats amb elevat contingut d'antocians acetilats, com cabernet sauvignon

o syrah, presentin valors més elevats d'antocians totals en el vi que altres varietats en què hi ha major contingut dels antocians p-cumarilats, com ull de llebre i carinyena. Merlot també té uns alts continguts d'antocians acetilats, l'extracció dels quals es correspon amb les observacions anotades; no obstant això, l'extracció dels antocians sense acilar resulta escassa, motiu pel qual els seus nivells finals en antocians esdevenen sensiblement inferiors als esperables.

Aquests resultats concorden amb els dels treballs realitzats per LaNotte *et al.*²⁶⁴, en què l'extractabilitat dels derivats p-cumarilats és significativament molt més baixa per totes les varietats viníferes estudiades. Aquest és un resultat que es manifesta també en els vins finals, com demostren els treballs d'Arozarena *et al.*²⁶¹, en què els derivats p-cumarilats passen a ser minoritaris, tant en varietats en què hi ha alts nivells d'acetilació (cabernet, merlot); com fins i tot en varietats en què estan presents com a derivats acilats majoritaris (graciano, tempranillo, garnatxa o carinyena), o els treballs de Revilla *et al.*²⁶², que obté resultats similars als de la present tesi per a vins de cabernet sauvignon i ull de llebre. De fet, Marx *et al.*²⁶³ arriben a proposar la relació derivats acetilats / derivats p-cumarilats com a una característica que permet diferenciar vins de cabernet sauvignon de vins híbrids, tot i que Burns *et al.*²⁶⁴ demostren que tal mesura pot conduir a falsos positius.

Els resultats de baixa extractabilitat dels antocians cumarilats per a totes les varietats també coincideixen amb els de treballs de Leone *et al.*²⁶⁵. Tanmateix, en treballs de Chicón *et al.*²⁶⁶ o de Roggero *et al.*²⁶⁷ els vins obtinguts contenen nivells superiors d'antocians p-cumarilats. En el treball de Chicón *et al.*²⁶⁶ els vins s'obtenen mitjançant la tècnica del bazuqueig, i sembla que les extractabilitats poden variar àmpliament segons el mètode de maceració, com recull Mazza²⁶⁸. Aquest aspecte resulta especialment interessant per les característiques de major estabilitat i intensitat del color proporcionada pels antocians p-cumarilats²⁶⁹.

²⁶¹ Arozarena, I; Casp, A; Marín, R; Navarro, M. (2000). "Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition". *Eur Food Res Technol* 212: 108-112

²⁶² Revilla, E; García-Beneytez, E; Cabello, F; Martín-Ortega, G; Ryan, JM. (2001). "Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them"; *J Chromatography A*; 915: 53-60

²⁶³ Marx, R; Holbach, B; Ottender, H. (2000). "Determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC". *Off Int. Vigne* 2000

²⁶⁴ Burns, J; Mullen, W; Landrault, N; Teissedre, PL; Lean, MEJ; Crozier, A. (2002). "Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes"; *J Agric Food Chem* 50, 4096-4102

²⁶⁵ Leone, AM; La Notte, E; Gambacorta, G. (1984). "Gli antociani nelle fasi di macerazione e di elaborazione del vino. L'influenza della tecnica diffusiva sulla loro estrazione". *Vignevini*, 4, 17

²⁶⁶ Chicón, RM; Sánchez-Palomo, E; Cabezedo, MD. (2002). "El color y la composición en polifenoles de los vinos tintos varietales de Castilla-La Mancha (España)"; *Afinidad*, 500: 435-443

²⁶⁷ Roggero, JP; Archier, P; Coen, S. (1992). "Étude par HPLC des compositions phénolique et anthocyanique d'un moût de raisin en fermentation"; *Sciences des Aliments*, 12: 37-46

²⁶⁸ Mazza, G. (1995). "Anthocyanins in grapes and grape product". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(4):341-371

²⁶⁹ Mazza, G; Miniati, E. (1993). "Grapes". A "Anthocyanins in fruits, vegetables and grains"; CRC Press

Entre els antocians no acilats, la malvidina és el predominant al llarg del període estudiat, durant el qual els seus valors superen en la majoria de casos (Carinyena, Syrah, Ull de llebre, Garnatxa, Merlot) el 80% dels antocians totals. Per a Cabernet sauvignon i Pinot noir, també es troben valors elevats de Delfinidina, mentre que en monastrell també destaca la petunidina. En canvi, els nivells de cianidina són baixos per a totes les varietats, òbviament per la baixa concentració existent en el raïm d'aquesta antociana. Els nivells elevats de malvidina en la fermentació també estan àmpliament descrits en la bibliografia, en els treballs de LaNotte²³⁸, Arfelli²⁴⁸, Chicón²⁶⁶, Roggero²⁶⁷, Cheynier *et al.*²⁷⁰, o Sims *et al.*²⁴³.

3. 5. CONCLUSIONS

1) L'extracció dels antocians en el vi ve condicionada per la seva estructura química, de manera que, en comparació als nivells en la baia, els derivats p-cumarilats són els que s'extreuen en menor extensió, mentre que els derivats acetilats són els que originen millors recuperacions. Els antocians no acilats tindrien una resposta intermitja, però en presentar uns nivells molt més alts en baia que els derivats acetilats, mantenen uns nivells superiors en els vins. De la mateixa manera, els nivells de malvidina-3-glucòsid resulten superiors als de les altres antocianidines.

2) Aquesta diferent extracció segons la composició antocianica provoca un comportament varietal diferent front la maceració segons el contingut i la composició en antocians de les varietats. Així doncs, varietats amb altes concentracions d'antocians p-cumarilats en baia donen maceracions més pobres en antocians.

3) En algunes varietats com merlot, ull de llebre o carinyena, la composició i concentració antocianica no justifiquen els resultats obtinguts en vi, observació que significa que hi incideixen altres factors.

²⁷⁰ Cheynier, V.; Arellano, H; Souquet, JM; Moutounet, M. (1997). "Estimation of the oxidative changes in phenolic compounds of carignane during winemaking". *Am J Enol Vitic*, 48(2): 225- 228

3.6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. **Peynaud**. (1984). "Knowing and making wine". John Wiley & Sons, New York
2. **Zoecklein, B.** (1991). "An overview of maceration during red winemaking". *Aust & NZ Wine Ind J.*, 6: 265-267
3. **Mateos, S., Valls, J., Nadal M.; Arola, L** (2001) "Estudio de la madurez fenólica sobre diferentes variedades tintas y su relación con el color de los vinos". *Tecnología del vino*, nº 2, Sept-Oct, pp 45-50
4. **Parley, A.** (1997). "Voodoo and the art of winemaking. Part II. Technology of red wine vinification". Lincoln University.
5. **Parley, A.** (1997). "The effect of pre-fermentation enzyme maceration on extraction and colour stability in pinot noir wine"; *Tesi Doctoral*. Lincoln University.
6. **Mattivi, F.; Prast, A.; Nicolini, G.; Valenti, L.** (2002). "Validation of a new method to measure the polyphenolic potential of red grapes and discussion of its use in enology"; *Rivista di Viticoltura e di Enologia*; 55 (2-3) 55-74
7. **Di Stefano, R.; Borsa, D.; Gentilini, N.** (1994). "Estrazione degli antociani dalle bucce dell'uva durante la fermentazione". *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*; 25 (1) 31-46; It,
8. **Dell'Oro V; Di Stefano R.** (1991). "Carbonic maceration. Evolution of vanillic and syringic acids and anthocyanins during conservation of Barbera and Nebbiolo grapes in carbon dioxide". *Vini d'Italia*, 33 (4) 53-62
9. **Vivas de Gaulejac, N.; Nonier, M. F.; Guerra, C.; Vivas, N.** (2001). "Anthocyanin in grape skins during maturation of **Vitis vinifera** L. cv. Cabernet Sauvignon and Merlot noir from Bordeaux terroirs". *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*; 35 (3) 149-156
10. **La Notte E; Liuzzi VA; Esti M.** (1992). "The polyphenolic wine components. 2. Note: Anthocyanins content and composition in relation to different winemaking techniques". *Vignevini*; 19 (10) 49-55; 1992
11. **Rizzon, L.A.** (1985). "Incidence de la macération sur la composition chimique des vins". *Tesi Doctoral*. Bordeaux II.
12. **Souquet, JM; Cheynier, V; Brossaud, F; Moutounet, M.** (1996). "Polymeric proanthocyanidins from grape skins". *Phytochemistry*, vol 43, nº2: 509-512
13. **Karuamanchir, A; Tsang, E; Goldberg, DM; Diamnandis, EP; Soleas, GJ;** "Catechin and epicatechin concentrations of red wines from 15 different regions"; (1996). *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 357
14. **Vivas N; Galvin C; Chabot PH.** (2001). "Maceration techniques in the production of red quality wines". *Progres Agricole et Viticole*, 109 79-88
15. **Sims, CA; M Bates, RP.** (1990). "Effects of skin fermentation time on the phenols, ellagic acid sediment and sensory characteristics of a red *Vitis rotundifolia* wine". *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 56-63
16. **Scudamore-Smith, PD; Hooper, RL; McLaren, ED.** (1990). "Colour and phenolic changes of Cabernet sauvignon wine made by simultaneous yeast/bacterial fermentation and extended pomace contact". *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 57-67

17. **Auw, JM; Blanco, V; O'Keefe, SF; Sims, CA.** (1996). "Effect of processing on the phenolics and colour of Cabernet sauvignon, Chambourcin and Noble wines and juices"; *Am.J.Enol.Vitic.* 47: 279-286
18. **Mayen, E; Mérida, J; Medina, M.** (1994). "Free anthocyanins and polymeric pigments during the fermentation and postfermentation standing of musts from Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes". *Am. J. Enol. Vitic.*, vol 45, 161-166
19. **Zamora, F.** (1998). "Los compuestos fenólicos del vino tinto y su capacidad para la crianza"; Jornada Técnica sobre Aspectos científicos del color del vino. URV
20. **Arfelli G;Chiavari G;Castellari M;Amati A.** (1992). "The influence of wine making on polyphenolic compounds content in wines obtained from grapes of different cultivars. 2. Anthocyanins". *Vignevini*, 19 (9) 49-55
21. **Couasnon, M.** (1999). "Une nouvelle technique: La macération pré-fermentaire à froid – Extraction à la neige carbonique. Iere partie: Résultats oenologiques". *Rev. Oenol. Tech. Vitivinic. Oenol.* 92, 26-30
22. **Baraut, C; Joulain, H; Landron, C.** "Comment vinifier les vins de garde?", *Viti*, 222, 46-47
23. **Zamora, F.** (2002). "Extracción y estabilización de la materia colorante en la vinificación en tinto"; a "Maceración y Extracción de color. Gonierno de la Rioja. Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. 2002.
24. **Merida, J; Moyano, L; Millan, C; Medina, M.** (1991). "Extraction of phenolic compounds in controlled macerations of Pedro Ximenez grapes"; *Vitis* 30: 117-127
25. **Meier W;Steidl R;Eder R;Wendelin S.** (1990). "Der Einfluss verschiedener Verarbeitungsmethoden auf die Anthocyanzusammensetzung von Rotweinen". *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruechteverwertung*; 40 : 241-2491
26. **Anon, F.** (1995). "Flash expansion. A technology under development". *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et oenologiques* 77: 18-20
27. **Lovino, R; Di Benedetto, G; Scazzarriello, G** (1997). "L'impiego di enzimi pectolitici nella vinificazione in rosso di uve dell'Italia meridionale". *L'Enotecnico*, 33:75-86
28. **Martínez, J; López, R; Santamaría, P; Barua, M; Gutiérrez, AR.** (2002). "Experiencias sobre maceración en vinos de tempranillo", a "Maceración y extracción de color". Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Gobierno de La Rioja. 2002.
29. **Singleton, VL; Trousdale, EK.** (1992). "Anthocyanin-tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines". *Am J Enol Vitic*, 43: 63-70
30. **Pardo, R; Castro, JJ.** (2003). "Estudio de la extracción de compuestos fenólicos de variedades tintas durante la vinificación en la DO Penedès"; *Viticultura/Enología Profesional*, n°87, 37-42
31. **Vasserot, Y; Caillet, S; Maujean, A.** (1997). "Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters". *Am J Enol & Vitic*, 48: 433-437
32. **Cabezudo, MD; Vicario, A.** (2004). "Principales compuestos fenólicos de los vinos tintos de zonas cálidas: Cabernet Sauvignon, Cencibel/Tempranillo y Shiraz". *Tecnología del vino*, 15: 73-78
33. **Arozarena, I; Casp, A; Marín, R; Navarro, M.** (2000). "Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition". *Eur Food Res Technol* 212: 108-112
34. **Revilla, E; García-Beneytez, E; Cabello, F; Martín-Ortega, G; Ryan, JM** (2001). "Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the

differentiation of red grape cultivars and red wines made from them”; *J Chromatography A*; 915: 53-60

^{35.} **Marx, R; Holbach, B; Ottender, H.** (2000). “Determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC”. *Off Int. Vigne* 2000

^{36.} **Burns, J; Mullen, W; Landrault, N; Teissedre, PL; Lean, MEJ; Crozier, A.** (2002). “Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes”; *J Agric Food Chem* 50, 4096-4102

^{37.} **Leone, AM; La Notte, E; Gambacorta, G.** (1984). “Gli antociani nelle fasi di macerazione e di elaborazione del vino. L’influenza della tecnica diffusiva sulla loro estrazione”. *Vignevini*, 4, 17

^{38.} **Chicón, RM; Sánchez-Palomo, E; Cabezudo, MD.** (2002). “El color y la composición en polifenoles de los vinos tintos varietales de Castilla-La Mancha (España)”; *Afinidad*, 500: 435-443

^{39.} **Roggero, JP; Archier, P; Coen, S.** (1992). “Étude par HPLC des compositions phénolique et anthocyanique d’un moût de raisin en fermentation”; *Sciences des Aliments*, 12: 37-46

^{40.} **Mazza, G.** (1995). “Anthocyanins in grapes and grape product”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(4):341-371

^{41.} **Mazza, G; Miniati, E.** (1993). “Grapes”. A “Anthocyanins in fruits, vegetables and grains”; CRC Press

^{42.} **Cheyrier, V.; Arellano, H; Souquet, JM; Moutounet, M.** (1997). “Estimation of the oxidative changes in phenolic compounds of carignane during winemaking”. *Am J Enol Vitic*, 48(2): 225- 228

Capítol 4



EFFECTES DE LA COMPOSICIÓ FENÒLICA I LA SEVA EVOLUCIÓ SOBRE EL COLOR DEL VI

4.1) INTRODUCCIÓ

A causa de la natura de la química dels antocians, no es correlaciona sempre de manera directa el color d'un vi amb el seu contingut antociànic²⁷¹.

Cal tenir en compte que, mentre que en les cèl·lules de la pell els antocians es troben de forma localitzada en compartiments cel·lulars com els antocianoplasts, el vi és una matriu molt més complexa amb presència de gran quantitat de molècules que poden interaccionar amb les molècules d'antocians i causar fenòmens d'alteració de color, o fins i tot conduir a la formació de productes nous de major estabilitat.

Entre els factors que determinen la manifestació del color per part dels antocians, cal destacar el pH, el SO₂, la copigmentació i la polimerització.

4.1.1) Efecte del pH

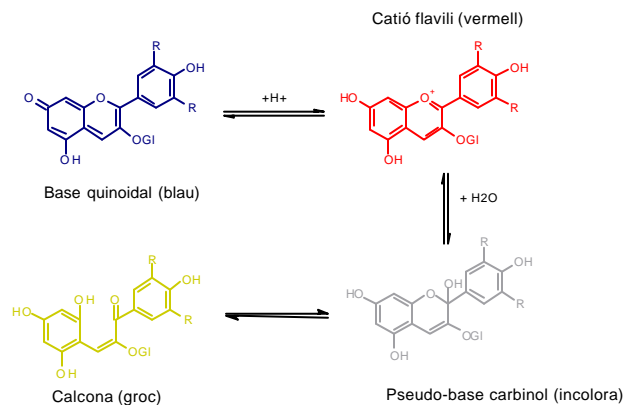


Figura 4.1.1. Equilibri dels antocians en funció del pH

En solucions aquoses lleugerament àcides, els antocians existeixen en 4 formes en equilibri químic (figura 4.1.1): el catió flavili (vermell), l'anhidrobase quinoidal (blava), la pseudobase carbinol (incolora) i la calcona (incolora o lleugerament groga)²⁷². A pH per sota de 2.0, els antocians es troben bàsicament en la forma catiónica. A mesura que augmenta el pH, té lloc una ràpida desprotonació que condueix a la forma quinoidal. En medi aquós, la hidratació del catió flavili origina la forma hemiacetàlica, que es troba en equilibri amb la calcona, encara que aquesta transformació a calcona és molt lenta. Aquest equilibri

²⁷¹ Sommers, TC; Evans. (1977). "Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, and "chemical age""; *J Sci Food Agric* 28:279-287

²⁷² Houbiers, C; Lima, J; Maçanita, A; Santos, H. (1998). "Color stabilization of malvidin-3-glucoside: self-aggregation of the flavylum cation and copigmentation with the Z-chalcone form"; *J Phys Chem B*, 102, 3578-3585

d'hidratació depèn de l'estructura de l'antocià, de manera que en els antocians-3,5-diglucòsids és més ràpid que en els corresponents 3-monoglucòsids.²⁷³

En el rang de pH dels vins, la forma predominant és l'hemiactalica, i només un 20% dels antocians es trobaria en la seva forma colorejada vermella.

4.1.2) Efecte del sulfurós

El diòxid de sofre, que s'addiciona en els vins en forma de metabisulfit per les seves propietats antioxidants i antimicrobianes, es lliga als antocians per generar una forma incolora, en una reacció d'equilibri.

4.1.3) Fenòmens de copigmentació

L'efecte copigmentatiu es postula com el responsable de la intensitat de color dels vins joves, en què encara no hi ha hagut temps perquè es puguin donar reaccions de polimerització.

Es coneix amb el terme "copigmentació" el fenomen pel qual es formen associacions moleculars o complexos entre pigments i molècules no colorejades, i que provoca un efecte hiperacròmic d'increment de l'absorbància i, en alguns casos, un canvi en la λ màx del pigment (desplaçament batocròmic o hipsocròmic).²⁷⁴ Mitjançant la utilització de les

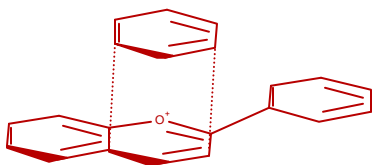


Figura 4.1.2. Apilament entre anells aromàtics que origina l'efecte copigmentatiu

tècniques de dicromisme circular i de RMN- ^1H s'ha proposat la raó molecular d'aquests desplaçaments: el copigment i el catió flavilium de l'antocià formen un apilament que s'estableix per interaccions hidrofòbiques, en què els orbitals δ dels anells, rics en electrons, es solapen i es mantenen junts per forces electrostàtiques. Aquestes interaccions δ - δ dels orbitals

implicats en l'apilament són similars a les que es troben en els nucleòsids. L'estabilització del ió flavilium és el que provoca l'efecte hiperacròmic (figura 4.1.2).

Per altra banda, els residus glicosídics que queden fora del complex prevenen de la hidratació del C2 del ió flavilium, que dona la forma incolora hemiacetalica. Per tant, l'aigua es distribueix al voltant d'aquest nucli inaccessible, formant una capa en què augmenten els

²⁷³ Heredia, FJ; Francia-Aricha, EM; Rivas-Gonzalo, JC; Vicario, IM; Santos-Buelga, C. (1998). "Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – LpH effect"; *Food Chemistry*, vol 63,nº4, 491-498

²⁷⁴ Boulton, R. (2001). "The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review", *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (2): 67-87

ponts d'hidrogen entre les molècules d'aigua, cosa que fa que globalment l'energia lliure disminueixi.

Els tipus de molècules que actuen de forma usual en la copigmentació dels antocians del raï m inclouen els flavanols, els flavonols, els àcids fenòlics, altres polifenols, alcaloides o aminoàcids. Però a més, també s'han descrit interaccions entre els antocians i altres compostos orgànics (làctic, galacturònic, pectines, cel.lulosa, etc)²⁷⁵. Un cas especial de copigmentació seria la auto-associació d'antocians, que vindria promoguda pels grups aromàtics, carbonil i els sucres que tenen presents els antocians.

La magnitud de l'efecte de copigmentació depèn primordialment de la natura i quantitat de l'antocià i de la molècula de copigment, del pH, de la temperatura i de la composició de la matriu aquosa.²⁷⁶

4.1.3.1) Efectes de la concentració

Una alta concentració d'antocians provoca un increment de l'absorbància i del desplaçament batocròmic. No obstant això, la magnitud de l'increment és dependent, per a un antocià donat, de la relació molar entre el pigment i el copigment, de tal manera que a major quantitat de copigment, major és l'efecte.²⁷⁴

4.1.3.2) Efectes estructurals

L'efecte de copigmentació augmenta amb el grau de metoxilació i glicosilació dels antocians. Això significa que es manifesta més amb la malvidina que amb les altres antocianidines de *Vitis vinifera*. Per altra banda, l'acilació en els antocians pot provocar un efecte positiu de copigmentació intramolecular. En casos en què l'agent acilant és un àcid hidroxicinnàmic (com és l'àcid p-cumàric, present com hem vist en el capítol 1 en diverses varietats d'antocians), aquest pot rotar amb el residu glucosil que el suporta per tal de situar-se sobre l'anell de l'antocià i formar així un copigment estable.²⁷⁷ Això significaria que vins amb major proporció d'aquests antocians donarien majors intensitats cromàtiques.

²⁷⁵ Mazzaracchio, P; Pifferi, P; Kindt, M; Munyaneza, A, Barbiroli, G. (2004). "Interactions between anthocyanins and organic food molecules in model systems"; *Int. J. Food Sci. And Techn.*, 39, 53-59

²⁷⁶ Mazza, G., and Brouillard, R. (1990). "The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions". *Phytochem.* 29:1097-1102.

²⁷⁷ George, F; Figueredo, P; Toki, K; Tatsuzawa, F; Saito, N; Brouillard, R. (2001). "Influence of trans-cis isomeration of coumaric acid substituents on colour variance and stabilisation in anthocyanins", *Phytochemistry* 57: 791-795

L'estequiometria del complex format entre la molècula de copigment i l'antocià varia segons els casos; així, per exemple, en el cas de l'àcid cafeic interaccionarien 2 molècules per cada molècula d'antocià. Igualment, la força de l'associació del complex també depèn de quines siguin les molècules implicades.

4.1.3.3) Efecte del pH

L'efecte del pH sobre la copigmentació està molt relacionat amb l'efecte del pH sobre l'equilibri dels antocians. Per sota de pH 1, com que tots els antocians es troben en forma de ió flavilium, l'efecte de copigmentació no produeix cap increment d'absorbància.

El pH òptim per l'efecte de copigmentació és entre 3-5 (que és on s'ubicarien els vins negres). En aquest cas, només el 20% dels antocians es trobarien en la forma flavilium, mentre que la fracció majoritària es trobaria en la forma hemiacetàlica, en què s'ha hidratat la molècula. En aquestes condicions, sí que es produeix l'efecte copigmentatiu, l'acció de l'apilament impedeix la hidratació de l'antocià i, en conseqüència, evita la seva pèrdua de color vermell. Aquest fet fa que s'hipotetizzi que la copigmentació funciona perquè retarda la hidratació i estabilitza el ió flavili, responsable del color, dintre del complex.

4.1.3.4) Efectes del solvent

Com que la copigmentació depèn de l'establiment de les interaccions hidrofòbiques que estableixen el complex format, a mesura que disminueix la concentració d'aigua disminuiria la magnitud de l'efecte. Aquest és l'efecte que es produeix a mesura que en la fermentació es genera etanol.²⁷⁸

4.1.3.5) Efectes de la Temperatura

Els copigments són exotèrmics i especialment sensibles a la temperatura. A mesura que la temperatura de la solució aquosa s'apropa al punt d'ebullició, el color de la solució s'aproxima més al dels antocians sols. Molecularment, l'explicació és clara: l'estructura de la matriu aquosa que envolta el complex i l'estabilitza per interaccions hidrofòbiques es destrueix i, per tant, provoca la ruptura de l'estructura del copigment, que llavors pot hidratar-se i passa a la forma hemiacetàlica incolora.

²⁷⁸ Somers, T.C., and Evans, M.E. (1979). "Grape pigment phenomena: Interpretation of major colour losses during vinification". *J. Sci. Fd. Agric.* 30:623-633.

4.1.4) Reaccions de condensació

Segons molts investigadors, la copigmentació dels antocians seria el primer pas cap a la formació de pigments més estables.^{279, 280}

En un medi aquós com és el vi, els antocians senzills que es troben a la pell del raïm no haurien de romandre estables durant massa temps. De fet, els antocians presents en el raïm es poden considerar estructuralment dels més simples que es troben en el regne vegetal: en les flors, per exemple, es caracteritzen per ser estructures químicament sofisticades que estabilitzen el color.²⁸¹ No obstant això, en el vi s'estabilitza el color gràcies a l'evolució dels antocians cap a la formació de nous cromòfors químics. Perquè un vi jove mantingui el seu color al llarg dels anys, els seus antocians s'han de combinar amb els tanins per generar pigments víncics que no es troben al raïm, encara que els seus precursors provinquin de les pells i els pinyols o dels llevats. Així, al llarg de l'envelliment el contingut polifenòlic del vi esdevé progressivament més complex, la qual cosa afecta directament les seves propietats cromàtiques²⁸².

Només petites quantitats dels antocians extrets de les pells durant la fermentació es detecten en vins envellits, encara que el color del vi es manté. Això és perquè, juntament amb els antocians, dos tipus de pigments contribueixen al color dels vins negres. En primer lloc, els pigments polimèrics, un grup molt heterogeni de biomacromolècules formades per la condensació dels antocians amb tannins. En segon lloc, els piranoantocians, que resulten de l'addició nucleòfila de vinilfenols o carbonils (com enols) als antocians seguits de reaccions de ciclació i oxidació.²⁸³

Les reaccions de condensació es posen en evidència per la desaparició dels antocians lliures, que són progressivament reemplaçats pels compostos polimèrics formats.

S'han establert diversos mecanismes (figura 4.1.3) que condueixen a aquests nous pigments de condensació, l'estructura dels quals roman en molts casos hipotètica²⁸⁴ :

²⁷⁹ Liao H., Cai Y., Haslam E., (1992). "Polyphenol interactions. Anthocyanins : copigmentation and color changes in red wines". *J. Sci. Food Agric.*, **59**, 299-305.

²⁸⁰ Brouillard, R; Dangles, O. (1994). "Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging?". *Food Chem*, **51**, 265-270

²⁸¹ Brouillard, R; Chassaing, S; Fougèrouse, A. (2003). "Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long?" *Phytochemistry* **64**: 1179–118

²⁸² I. Revilla, I; Perez-Magarino, S; Gonzalez-SanJose, ML; Beltran, S. (1999). "Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection". *Journal of Chromatography A*, **847**: 83–90

²⁸³ Hakansson, A; Pardon, K; Hayasaka, Y; Sa, M; Herderich, M. (2003). "Structures and colour properties of new red wine pigments". *Tetrahedron Letters* **44**: 4887-4891

²⁸⁴ Remy, S; Fulcrand, H; Labarbe, B; Cheynier, V; Moutounet, M. (2000). "First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions". *J Sci Food Agric* **80**:745-751

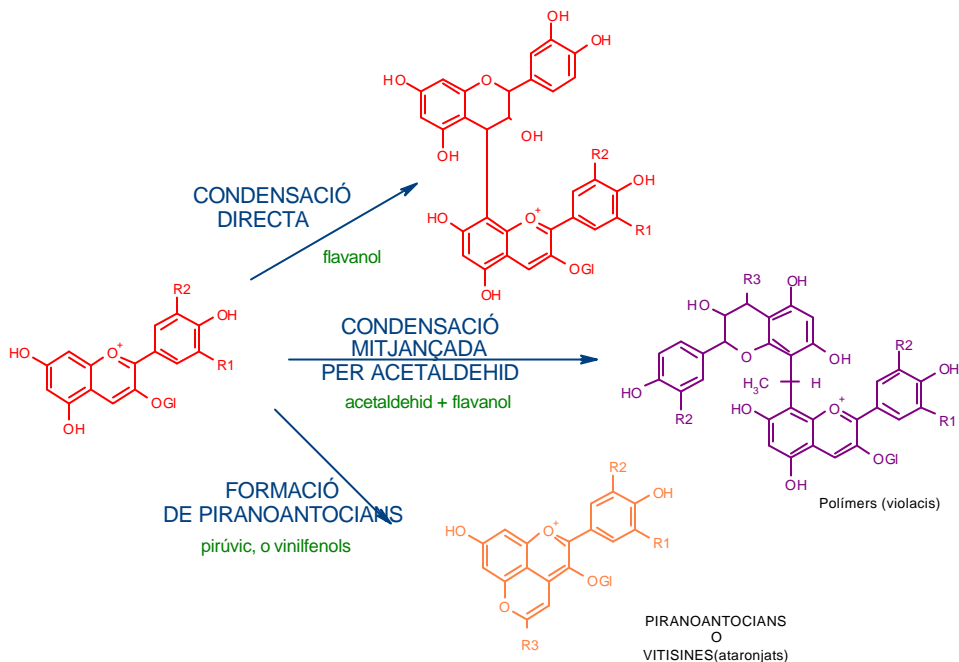


Figura 4.1.3. Esquema resum de les principals reaccions de condensació descrites

4.1.4.1) Condensació directa entre antocians i flavanols

En un principi, es suposava que els nous pigments que conduï en a l'evolució del color durant la maduració del vi eren els combinats dels antocians i els flavan-3-ols.

Hi ha 2 mecanismes d'acció postulats.

1) Addició de tipus A-T (figura 4.1.4). En aquest cas, l'antocianidol jugaria un paper d'electròfil, mentre que el taní faria de nucleòfil. El mecanisme de formació postulat és similar al de la formació de les sals de xantili d' associació de flavanols: els antocians poden reaccionar de manera directa amb els flavan-3-ols i formar polímers de colors més grogosos en presència d'acetaldehid o d'àcid glioxilic. El mecanisme que seguirien seria la unió del C4 de l'anell flavilium de l'antocianidol amb el C8 de la catequina, que generaria un producte incolor²⁸⁵. Aquest, quan és deshidratat i oxidat, genera el ió xantili, de coloració groga. Aquests cromòfors també poden donar-se entre 2 molècules de flavanol, i serien

els responsables de l'absorbància dels vins en la regió de 400-500 nm.^{286, 287} Per altra banda, l'adducte pot no evolucionar cap a la formació d'una sal de xantili, sinó com a un compost bicíclic.

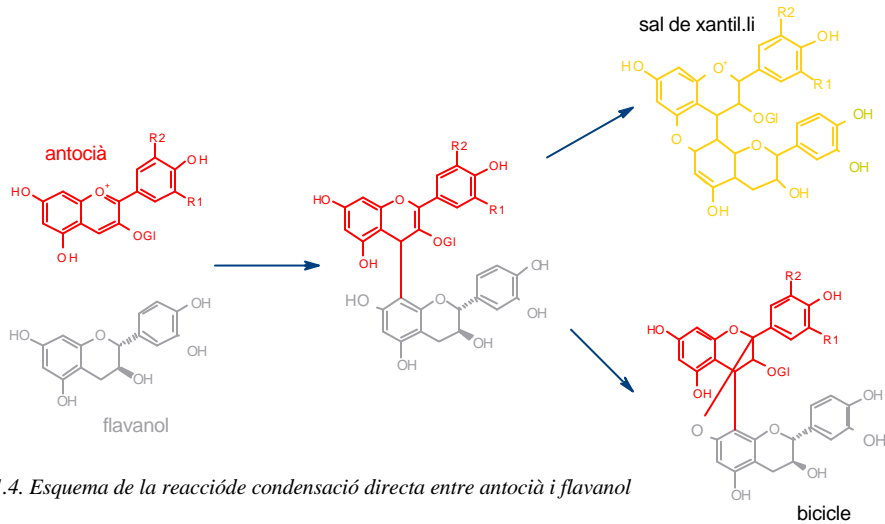


Figura 4.1.4. Esquema de la reacció de condensació directa entre antocià i flavanol

2. Addició de tipus T-A (figura 4.1.5): En aquest cas, l'antocià actua de nucleòfil i és susceptible a l'atac de compostos electròfils com carbocacions resultants de la ruptura de les proantocianidines.

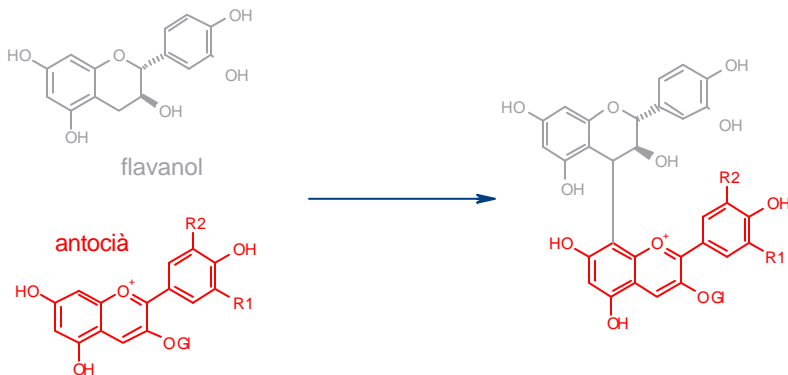


Fig 4.1.5. Esquema de la reacció de condensació entre flavanol i antocià

²⁸⁵ Remy-Tanneau, S.; Le Guernevé, C.; Meudec, E.; Cheynier, V. (2003). "Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbonyl carbon and ether interflavonoid linkages by NMR and Mass Spectrometry". *J. Agric. Food Chem.* 51: 3592-3597

²⁸⁶ Es-Safi, N.; Le Guernevé, C.; Labarbe, B.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. (1999). "Structure of a new Xanthylum salt derivative". *Tetrahedron Letters* 40: 5869-5872

4.1.4.2) Condensacions mitjançades per acetaldehid

L'acetaldehid es troba de forma natural en els vins, com a producte del metabolisme dels llevats durant la fermentació o com a producte d'oxidació de l'etanol. Pel que fa al primer cas, els nivells d'acetaldehid produïts varien segons l'espècie i soca de llevat, així com de les condicions de temperatura, oxigen i SO₂. L'anaerobiosi, un baix pH, una alta concentració de sucres, la presència de SO₂, i les baixes temperatures semblen induir la formació d'acetaldehid per part dels llevats.²⁸⁸ De fet, no només els llevats poden originar l'acetaldehid, sinó que aquest també pot ser subproducte del metabolisme de les bacteries acètiques i làctiques.

Per altra banda, l'acetaldehid també es pot generar en el vi a partir d'una oxidació de l'etanol, en una reacció acoblada a l'oxidació de certs compostos fenòlics. De fet, pràctiques enològiques com la microoxigenació, consistent a l'aportació de petites quantitats d'oxigen de manera continuada al vi, n'afavoreixen la formació.

L'acetaldehid participa en reaccions de condensació que condueixen a la formació de compostos (figura 4.1.6) en què s'estableixen lligams metil-metil ($\text{CH}_3\text{-CH}<$), també coneguts com a compostos lligats per etil, i que són prominents en els primers mesos del vi.²⁸⁹

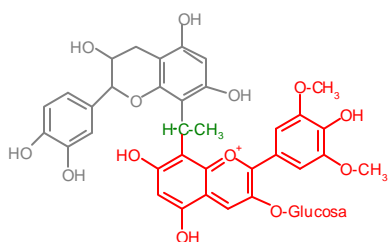


Figura 4.1.6. Estructura dels compostos lligats per etil

En presència d'acetaldehid, els flavanols condensen amb els antocians mitjançant ponts etil que s'estableixen entre les posicions nucleofíliques dels seus anells floroglucinol. Com a resultat, es formen pigments flavanol-etil-antocià, de tonalitat més violàcia que els antocians originals. Aquestes substàncies s'originarien primer com a dímers, per finalment formar polímers que poden precipitar si assoleixen una massa molecular crítica. En el

mecanisme d'aquesta reacció, es forma primer un adducte entre la catequina i l'acetaldehid en forma catiònica (la qual cosa implica que hi ha un efecte del pH), per després reaccionar

²⁸⁷ Es-Safi, N; Le Guernevé, C; Fulcrand, H; Cheyner, V; Moutounet, M. (2000). "Xanthylum salts formation involved in wine colour changes". *Int. J. Food Science and Technology*, 35: 63-74

²⁸⁸ Liu, S-Q; Pilone, G.J. (2000). "An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications". *Int. J. Food Sci. And Techn.*, 35: 49-61

²⁸⁹ Atanasova, A; Fulcrand, F; Le Guernevé, C; Cheyner, V; Moutounet, M. (2002). "Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin-3-glucoside condensation product". *Tetrahedron letters* 43: 6151-6153

amb l'antocià; no obstant això, la reacció de condensació també pot tenir lloc com a autoassociació de catequina, en un procés competitiu.²⁹⁰

En aquests nous pigments, la part antociànica presenta una major resistència a la decoloració per SO₂ i una major preferència a la formació de la base quinona (de coloració blava) en lloc de l'hemiacetal (incolores). Això es posa de manifest en avaluar l'efecte del pH sobre el pigment: en augmentar a pH=5.5, la solució de pigment esdevé progressivament més violeta, mentre que la de l'antocià és incolora ja a pH=4.0. Tot i això, l'estabilitat dels dímers és menor que la de l'antocià, ja que el pont es pot trencar (en una reacció afavorida en medis àcids). Malgrat això, el vi mantindria el color, ja que el trencament recupera l'antocià, però és probable que combinacions amb major grau de polimerització puguin ser més estables.²⁹¹ De fet, en estudis similars amb epicatequina, s'han arribat a aïllar productes trimèrics i tetràmers, encara que en cap cas impliquen més de dues molècules de l'antocià, la qual cosa fa que es proposi un mecanisme d'acció en què l'antocià és l'espècie atacada pel carbocatió flavanol-acetaldehid, però no pot actuar després com a agent atacant.²⁹²

Similars estudis de condensació s'han dut a terme amb la proantocianidina B2²⁹³.

A més de l'acetaldehid, altres aldehids presents en el vi han demostrat tenir també aquest efecte pont i generar per tant combinacions entre antocians i flavanols. En solucions model, s'ha comprovat que altres aldehids, com l'isovaleraldehid, el benzaldehid, el formaldehid, el propionaldehid o l'isobutiraldehid, presents en el vi (especialment en els vins d'Oporto), generen nous pigments que inclouen en la seva estructura la malvidina i epicatequina, epigallocatequina, o procianidines (B2, B4)²⁹⁴.

Aquestes reaccions de condensació per aldehid es poden establir també entre molècules de flavanol, formant compostos incoloros del tipus flavanol-etil-flavanol. Per altra banda, en estudis en solucions model, també s'han detectat, mitjançant tècniques espectroscòpiques, combinacions en

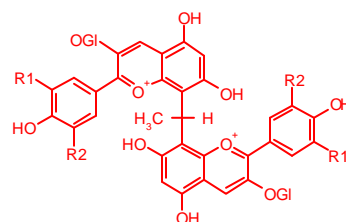


Figura 4.1.7. Estructura dels compostos lligats per etil en què només participen antocians

²⁹⁰ Rivas-Gonzalo, J.C.; Bravo-Haro, S.; Santos-Buelga, C. (1995). "Detection of compounds formed through the reaction of malvidin-3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde". *J. Agric. Food Chem.* 43:1444-1449

²⁹¹ Escribano-Bailón, T.; Álvarez-García, M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Heredia, F.J.; Santos-Buelga, C. (2001). "Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin-3-O-glucoside and (+)-catechin". *J. Agric. Food Chem.* 49: 1213-1217

²⁹² Es-Safi, N.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. (1999). "Studies on the acetaldehyde-induced condensation of (-)-Epicatechin and Malvidin-3-O-Glucoside in a model solution system". *J. Agric. Food Chem.* 47: 2096-2102

²⁹³ Dallas, C.; Ricardo-da-Silva, J.M.; Laureano, O. (1996). "Products formed in wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2, and acetaldehyde". *J. Agric. Food Chem.* 44: 2402-2407

²⁹⁴ Pissarra, J.; Lourenço, S.; González-Paramás, A.; Mateus, N.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V. (2003). "Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl-flavanol pigments in model solutions". *Analytica Chimica Acta, en premsa*

què només participen antocians (fig 4.1.7): en combinar la malvidina-3-glucòsid amb l'acetaldehid, es genera un nou pigment que presenta dos màxims d'absorbància en el rang del visible, a 450 i 528 nm. Per altra banda, l'anàlisi de la fracció polimèrica també dona senyal en ESI-MS del dímer i fins i tot de trímers d'aquesta estructura, resultats que confirmen la intervenció d'aquest mecanisme en la formació de pigments polimèrics que contribueixen a l'estabilitat del vi.

4.1.4.3) Condensacions mitjançades per àcid pirúvic o àcids vinilfenols: Formació de Vitisines o piranoantocians

Les vitisines (fig 4.1.8) són pigments que es caracteritzen per la presència d'un anell pirànic addicional a l'estructura de l'antocià. Aquestes vitisines causen canvis en el color de la solució: per una banda, aquests compostos resisteixen la decoloració causada pel sulfurós, i expressen més color que la corresponent malvidina. Per altra, causen un desplaçament hipsocròmic cap a coloracions taronja-marronoses.

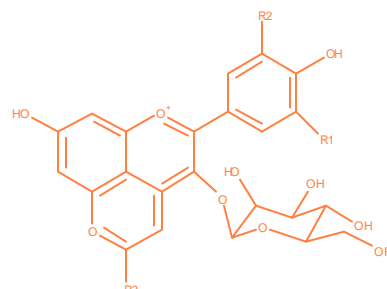


Figura 4.1.8. Estructura general de les vitisines

Al principi, es va observar que les vitisines es generen a partir de la reacció amb àcid pirúvic, que es cicla sobre l'anell flavili de l'antocià.

Detectades inicialment en vins²⁹⁵, es va dilucidar el mecanisme de la seva formació mitjançant l'ús de solucions model. Combinant la malvidina-3-glucòsid i l'àcid pirúvic, es va obtenir la vitisina A, i també es van generar les corresponents formes acilades (3-acetilvitisina A i 3-p-cumarilvitisina A) a partir de la malvidina-3-glucòsid acilada amb acètic i p-cumàric, respectivament²⁹⁶ (fig 4.1.9). Totes tres formes s'han pogut detectar posteriorment en vins²⁹⁷. L'estructura, identificada mitjançant tècniques de FABMS i de RMN (1H i 13C) suggereix que correspondria a la malvidina-3-glucòsid amb un CH=C-COOH addicional entre la posició 4 i l'hidroxil en posició 5 de la molècula.

²⁹⁵ Cameira dos Santos, PJ; Brillouet, JM; Cheynier, V; Moutounet, M.; (1996). "Detection and partial characterisation of new anthocyanin pigments in wine". *J. Sci. Food Agric.* 70: 204-208

²⁹⁶ Romero, C; Bakker, J. (1999). "Interactions between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and colour in model solutions". *J.Agric. Food Chem.*, 47 (3130-3139)

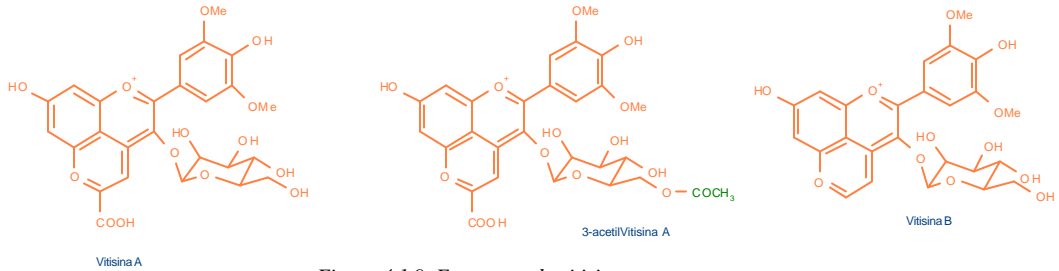


Figura 4.1.9. Estructura de vitisines

També s'ha detectat en vins la vitisina B, que seria l'estructura descarboxilada de la vitisina A, en què el pont el forma CH=CH, i la corresponent acetilvitisina B.²⁹⁸ No s'ha detectat encara la cumarilvitisina B, tot i que cal tenir en compte que la cumarilvitisina A també es va detectar més tard que les altres vitisines A. De fet, la detecció és difícil, perquè el senyal que donen en els mètodes cromatogràfics clàssics per a l'anàlisi d'antocians és feble. Encara que sembli una contradicció, això no significa que no tinguin importància pel color del vi, ja que aquests cromatogrames s'obtenen en condicions molt àcides, en què els antocians existeixen en la forma flavili, altament colorejada. Però al pH del vi, aquests antocians existrien en la forma hemiacetàlica incolora. En canvi, el color de les vitisines està molt menys afectat per el pH, de manera que encara que la seva absortivitat molar sigui menor a pH àcids, al pH del vi la seva coloració és més gran que la dels antocians.²⁹⁹ A més, també està descrit que les constants de velocitat de degradació d'aquests adductes amb pirúvic són molt més baixes que les que corresponen als respectius antocians³⁰⁰. Això explica que hi hagi un important increment en el percentatge de vitisines entre un vi jove i el corresponent de criaça, ja que la disminució de les vitisines serà molt menor que la dels antocians procedents del raï m.

Per tot això, encara que les seves concentracions siguin baixes, el seu efecte contribueix fortament al color dels vins envellits.³⁰¹ En solucions model sotmeses a un procés

²⁹⁷ Mateus, N; Silva, AMS; Vercauteren, J; de Freitas, V. (2001). "Occurrence of anthocyanin-derived pigments in red wines" *J. Agric. Food Chem.* 49: 4836-4840

²⁹⁸ Bakker, J; Timberlake, CF. (1997). "Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines"; *J. Agric. Food Chem.* 45: 35-43

²⁹⁹ Vivar-Quintana, AM; Santos-Buelga, C; Rivas-Gonzalo, JC. (2002). "Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines"; *Analytica Chimica Acta* 458: 147-155

³⁰⁰ Mateus, N; de Freitas, V. (2001). "Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during Port wine aging". *J. Agric. Food Chem.* 49:5217-5222

³⁰¹ Bakker, J; Bridle, P; Bellworthy, SJ; García-Viguera, C; Reader, HP; Watkins, SJ; "Effects of sulfur dioxide and must extraction on color, phenolic composition and sensory quality of red table wine". (1998). *J.Sci.Food Agric.* 78, 297-307

d'envelliment, la presència de vitisina A generava uns vins molt més vermellosos-ataronjats que els vins vermell-marronosos que s'obtenien sense l'addició de pirúvic.³⁰²

Òbviament, la seva formació està afavorida per un increment en la quantitat d'àcid pirúvic. Aquest àcid és present en el vi com a producte d'excreció dels llevats, on actua com a intermediari de la via Embden-Meyerhof-Parnas, i la seva màxima concentració té lloc aproximadament quan la meitat dels sucres han estat fermentats.

La formació de les vitisines és màxima a un pH al voltant de 2.7-3.0, i està afavorida per les baixes temperatures, no perquè afavoreixi la síntesi, sinó perquè les altes temperatures en faciliten la degradació.³⁰²

Després de la reacció amb el pirúvic, s'han descrit altres reaccions similars de ciclació i oxidació que tenen lloc amb altres molècules, com ara els vinilfenols³⁰³.

4.2) OBJECTIUS

Amb l'objectiu de fer un estudi preliminar del color en relació amb les varietats viníferes estudiades, es va plantejar treballar amb solucions model i amb vins. Els objectius concrets van ser:

1. Estudiar la reactivitat dels antocians amb l'acetaldehid en solucions model i en vins, a diferents pH, per avaluar quins possibles productes poden formar-se en l'evolució dels vins.
2. Estudiar l'efecte de copigmentació en solucions model, per establir quins copigments poden participar més activament en el canvi de les propietats cromàtiques dels antocians

³⁰² Romero, C; Bakker, J. (2000). "Effect of storage temperature and pyruvate on kinetics of anthocyanin degradation, vitisin A derivative formation, and color characteristics of model solutions". *J. Agric. Food Chem.* 48, 2135-2141

³⁰³ Mateus, N; de Pascual-Teresa, S; Rivas-Gonzalo, JC; Santos-Buelga, C; de Freitas, V. (2002). "Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines". *Food Chemistry* 76: 335-342

4.3) MATERIALS i MÈTODES

Per tal de veure quina era la influència de la varietat i de la composició antociànica sobre el color del vi, es va treballar en 2 aspectes:

- 1) Una solució sintètica d'antocians.
- 2) Mostres de vins joves monovarietals de la campanya 2002 de la finca experimental Mas dels frares.

A l'hora de preparar la solució sintètica, es va decidir obtenir-la a partir dels extractes d'una varietat negra. Es va triar la varietat Merlot perquè, com s'ha vist al capítol 1, era una varietat amb un contingut antociànic força elevat i, sobretot, perquè era la varietat amb uns nivells més elevats de complexitat, en el sentit que tenia una gran proporció tant de derivats acetilats com de derivats p-cumarilats. Això anava bé per al nostre estudi, ja que ens proposàvem veure la influència dels antocians acilats sobre alguns dels efectes descrits.

L'extracció es va fer de manera anàloga a la descrita en el capítol 1 de la present tesi, partint d'un volum més gran de mostra (1,4 grams) i fent l'extracció amb 3 volums de 100 ml de la solució extraient. Posteriorment, es va fer una purificació per columna. La separació havia de complir 2 objectius: en primer lloc, ens havia de proporcionar una fracció prou pura d'antocians; i en segon lloc, l'elució havia de ser possible amb un solvent no acidificat, ja que posteriorment convenia evaporar l'extracte purificat per tal de redissoldre'l amb solució sintètica, i que estigués a un pH=3.2, similar al del vi. Per a tal efecte, es va treballar amb les següents columnes (fig 4.2.1):

- 1) Dowex 1 (Sigma)
- 2) Gel de sílice (Panreac)
- 3) Poliamida (Sigma)
- 4) Sephadex LH-20 (Pharmacia)
- 5) Sephadex G-15 (Pharmacia)
- 6) Sephadex G-100 (Pharmacia)
- 7) Toyopearl HW-50 (Tosoh)
- 8) PVPP (Sigma)

I les fases mòbils emprades van ser:

- 1) 10 ml aigua milliQ



- 2) 5 ml etanol (Panreac)
- 3) 15 ml etanol
- 4) 10 ml etanol 1% fòrmic (Panreac)
- 5) acetona 50% fòrmic

En la següent taula es representa en vermell en quines fraccions elui a la matèria colorant:

	aigua	etanol	Etanol 1% fòrmic	Acetona 50% fòrmic
Dowex 1				
Gel de sílice				
Poliamida				
Sephadex LH-20				
Sephadex G-15				
Sephadex G-100				
Toyopearl				
PVPP				

Taula 4.1 Elució de compostos antociànics per les diferents columnes. Es marquen en color els eluents que arrosseguen matèria colorant, i es deixen en blanc si no elueixen.

D'entre les columnes, la de PVPP, la G-15 i la Dowex 1 només alliberaven matèria colorant amb el solvent de major polaritat. El mateix succeï a amb la de poliamida, encara que ja deixava eluir en condicions menys dràstiques. En canvi, les de Sephadex G-100 i la de gel de sílice no retenien els antocians. La Toyopearl deixava eluir en totes les condicions, cosa que indicaria que permet un fraccionament de les molècules responsables del color. No obstant això, la recuperació de color que s'obtenia en la fracció etanòlica era molt baixa.

L'elecció final fou, doncs, la columna Sephadex LH-20.

3.4 grams de Sephadex LH-20 (Pharmacia) s'hidrataven amb 100 ml d'aigua milliQ en agitació durant 3 hores. Després es procedia a reblir la columna (una xeringa de 10 ml x 1 cm de diàmetre). 1 ml de mostra es deixava dipositar sobre el llit de la columna. Posteriorment, s'afegien 10 ml d'aigua milliQ, fins que començava a eluir la fracció colorejada. A continuació s'eluí a amb etanol. Els primers mililitres es descartaven, ja que encara contenien un alt percentatge d'aigua, que dificultaria l'evaporació, i a més, encara presentaven un pH àcid (a causa del fòrmic present en l'extracció). La resta de volum (50

ml) d'etanol era després evaporat amb un rotavapor, i el residu sec es resuspensia amb 10 ml de solució sintètica (etanol 12%, 5 g/l tartàric, pH=3.2 o pH=2.0).

Posteriorment, es va determinar la quantitat d'antocians en la solució final, per comparació de les lectures d'absorbància a 530 nm respecte a un patró de malvidina-3-glucòsid 0,175 mg/ml. El resultat fou de 261 mg/ml., i es va efectuar una determinació per HPLC, per tal d'assegurar la presència dels diferents antocians.

El següent pas va ser plantejar un experiment de polimerització amb acetaldehid. Les condicions de l'assaig van ser les que es descriuen a la bibliografia²⁹³: per una banda, la concentració d'antocians es va ajustar a 150 mg/l, la de (+)-catequina hidrat (Fluka) i (-)-epicatequina (Sigma) es va ajustar a una concentració 1 mM, i la d'acetaldehid (Sigma), a unes concentracions del 0.4%, molt superiors als valors que es poden trobar en els vins, per tal de forçar els processos en els quals intervé l'acetaldehid. S'efectuà un blanc de catequina/epicatequina, així com un blanc d'acetaldehid. Es va fer un seguiment de l'evolució de l'espectre del visible i la determinació per HPLC dels antocians que romanien en la solució.

El mateix estudi es va dur a terme sobre mostres de vins joves monovarietals de Carinyena, cabernet sauvignon, garnatxa, merlot, syrah i ull de llebre; corresponents a la campanya 2002 de la finca Mas dels Frares, però en aquest cas només es va treballar amb acetaldehid.

Finalment, per tal d'estudiar com podien afectar a les propietats cromàtiques de l'extracte d'antocians diferents molècules presents en el vi, es va fer un estudi de l'espectre cromàtic amb l'addició d'àcids hidroxicinnàmics, concretament el cafeic, el cinnàmic, el cumàric, i el ferúlic (Sigma), en una concentració final 10 mM.

També es va decidir provar l'efecte d'altres àcids alifàtics majoritaris en el vi, com són l'àcid acètic (Sigma), el màlic (Sigma), el cítric (Sigma), el làctic (Sigma), el tartàric (Sigma) i el succínic (Panreac), i que s'ha descrit que tenen efecte en solucions model d'antocians individuals²⁷⁵. Per a això, es van preparar diferents alíquotes d'extracte per cadascun d'ells, i per cada alíquota es va afegir un dels àcids en una concentració final de 0.1 M. El pH dels àcids abans d'afegir-los es va ajustar a 3.2 o a 2.0 amb hidròxid potàssic 2N (Sigma).

4.4) RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.4.1) Reaccions de condensació mitjançades per acetaldehid en solucions model

L'addició d'acetaldehid i catequina + epicatequina en quantitats elevades a la solució model provoca un ràpid canvi en el perfil cromàtic de l'extracte, així com en la quantitat d'antocians característics del raï m (figura 4.4.1). En l'espectre d'absorció transcorreguts cinc dies del moment de l'addició, es produeix un desplaçament batocròmic cap a un nou màxim d'absorció: passa de 523,6 a 540,5 nm. Això significa que la solució passa a tenir una coloració violàcia. També s'aprecia un efecte hipercròmic d'augment de l'absorbància. L'espatlla que s'observa en la regió entre 420-480 és característica dels productes de condensació mitjançant acetaldehid^{293,289}.

Els productes formats serien de natura polimèrica, ja que al cap de pocs dies s'observava un precipitat violaci en la solució.

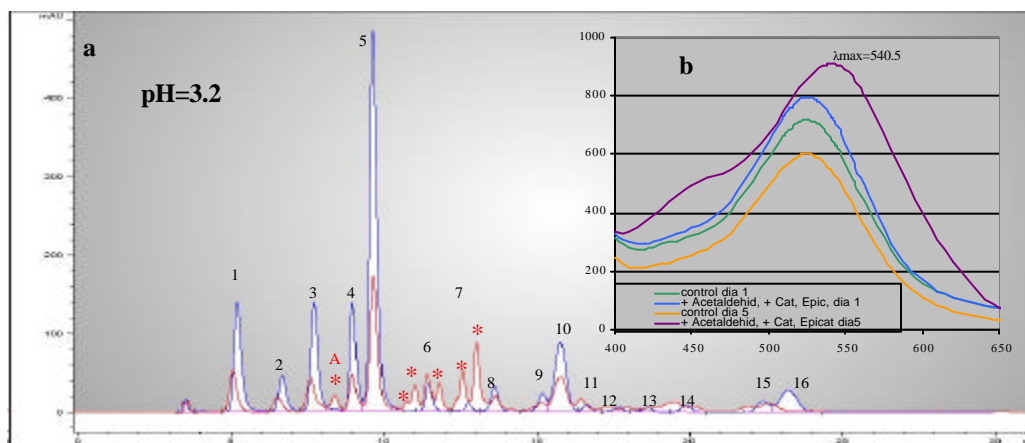


Figura 4.4.1. a) Cromatograma dels antocians al primer dia (color blau) i al cap de 5 dies de l'addició d'acetaldehid i catequina/epicatequina (color vermell). B) Es presenta també l'espectre de la solució en les condicions control i en les condicions amb acetaldehid i catequina/epicatequina al primer i al cinquè dia.

1: Dp-3-glu; 2: Cy-3-glu; 3: Pt-3-glu; 4: Pn-3-glu; 5: Mv-3-glu; 6: Dp-ac-glu; 7: Cy-ac-glu; 8: Pt-ac-glu; 9: Pn-ac-glu; 10: Mv-ac-glu; 11: Dp-pc-glu; 12: Mv-cf-glu; 13: Cy-pc-glu; 14: Pt-pc-glu; 15: Pn-pc-glu; 16: Mv-pc-glu.

En el cromatograma (figura 4.4.1), es detecten nous pics (marcats amb l'asterisc *): un pic (A) contigu al de la petunidina-3-glucòsid, i uns altres en la zona que correspondria als antocians acetilats. Aquests darrers coincideixen en temps de retenció amb productes lligats per etil obtinguts per Rivas-Gonzalo *et al.*²⁹⁰ en solucions model amb malvidina-3-glucòsid, i catequina, tot i que caldria confirmar la seva estructura mitjançant tècniques espectroscòpiques. Concretament, en el citat treball obtenen 2 isòmers corresponents a la molècula de malvidina lligada pel pont etil a la molècula de catequina.

Per tal de forçar encara més les condicions, es van comparar els resultats amb els corresponents a un pH més àcid (figura 4.4.2).

Com podem veure, les reaccions de condensació estan afavorides a baixos pH. En aquest cas, al cap del primer dia ja es produïen pèrdues significatives dels antocians, i la solució adquiria immediatament tonalitats violàcies:

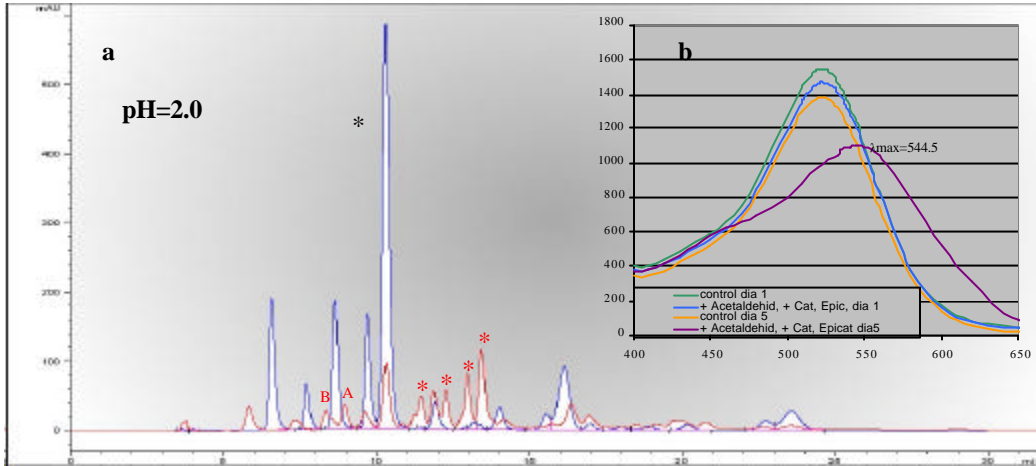


Figura 4.4.2. a) Cromatograma dels antocians al primer dia (color blau) i al cap de 3 dies de l'addició d'acetaldehid i catequina/epicatequina (color vermell, a pH=2.0. b) Es presenta també l'espectre de la solució en les condicions control i en les condicions amb acetaldehid i catequina/epicatequina al primer i al cinquè dia.

En l'espectre, que es va enregistrar al cap de 5 dies de reacció, es pot apreciar que el desplaçament batocròmic és considerable (arriba als 544.5 nm) i, tot i que pot semblar que desapareix l'efecte hiperacròmic, en realitat el que succeeix és que hi ha una gran pèrdua de material colorant a causa de la formació de precipitats, de natura polimèrica. De fet, l'efecte hiperacròmic es manifesta en un principi, abans d'iniciar-se les pèrdues per polimerització.

En aquestes condicions més dràstiques, s'obté un major nombre de nous pics, en només un dia de reacció, i en el cromatograma al 3r dia (figura 4.4.2) les concentracions d'antocians estan ja molt disminuïdes respecte les inicials. De fet, al 5è dia les concentracions són gairebé inapreciables, motiu pel qual s'ha optat per presentar els resultats corresponents al 3r dia.

Novament, es genera tota una sèrie de pics en la zona que correspon als derivats acetilats, i que podrien correspondre, segons els treballs bibliogràfics, a l'estructura de productes lligats per etil. També apareix un nou pic ("B"), tot i que en molt baixa concentració, contigu al de la cianidina. En estudis de Dallas *et al.*²⁹³, treballant amb una solució model de només cianidina, s'obté també un pic contigu a la de la molècula

d'antocià, l'estructura del qual correspon a un adducte de cianidina amb el flavan-3-ol. Això ens suggereix que el pic contigu a la petunidina ("A"), detectat tant a pH 2.0 com a pH 3.2, podria correspondre a un adducte petunidina-flavan-3-ol, similar a l'anteriorment descrit.

Quant a les solucions control, la presència d'acetaldehid conduï a a un molt lleuger desplaçament batocròmic de 1.5 nm en el màxim d'absorció, en absolut comparable als que s'obtenien amb la mescla d'acetaldehid i catequina + epicatequina. Tanmateix, es podia apreciar una certa desaparició dels antocians, com es pot observar a la figura 4.4.3:

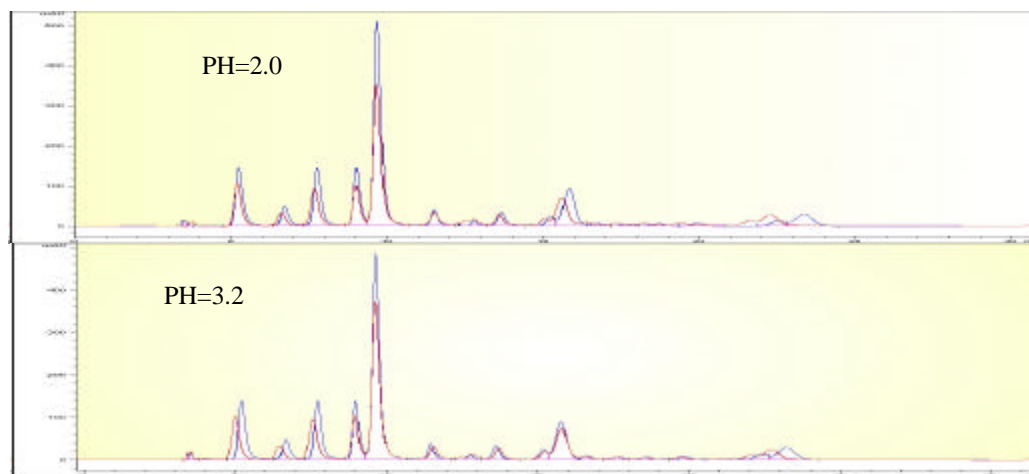


Figura 4.4.3. Cromatograma dels antocians al primer dia (color blau) i al cap de 5 dies de l'addició d'acetaldehid (color vermell); a diferents pH)

En les solucions control sense afegir cap dels reactius utilitzats (acetaldehid, catequina, epicatequina), no es van apreciar canvis ni en les propietats cromàtiques ni en les molècules que les composaven al cap de 5 dies.

4.4.1.b) Determinació de les constants de velocitat

Per tal de manifestar la diferent reactivitat dels diferents antocians en les dues solucions, es va fer una estimació de la seva velocitat de desaparició. De la representació de l'àrea integrada en front del temps (fig 4.4.4), es pot observar que el comportament de la reacció és exponencial negativa, que correspon a una reacció de primer ordre, l'equació de velocitat de la qual és:

$$v = k [\text{Antocià}]$$

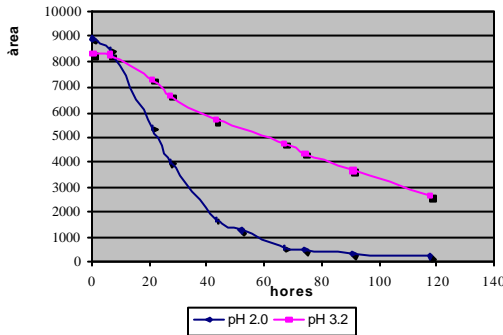


Figura 4.4.4. Desaparició de la malvidina-3-glucòsid en la solució model amb acetaldehid i catequina/epicatequina als dos pH d'estudi

Aquesta observació concorda amb els treballs de Dallas et al²⁹³. Fent una representació logarítmica i amb un càlcul de la regressió per mínims quadrats, es pot calcular el valor d'aquesta constant de velocitat a partir del valor del pendent (fig 4.4.5). Pot demostrar-se que aquest valor és independent de les unitats utilitzades (ja siguin àrea o concentració), i només depèn del temps.

$$\ln[\text{Antocià}] = \ln[\text{Antocià}]_0 - k t$$

I, en ser un comportament exponencial, tenim:

$$[\text{Antocià}] = [\text{Antocià}]_0 \cdot e^{-kt}$$

On k és la constant de velocitat, i t és el temps.

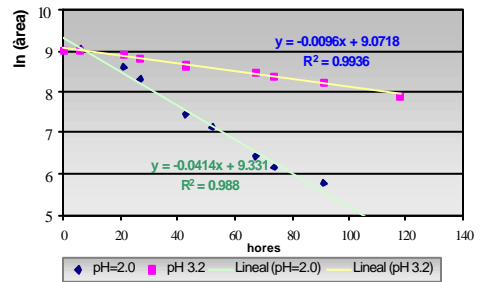


Figura 4.4.5. Representació logarítmica de desaparició de la malvidina-3-glucòsid en la solució model amb acetaldehid i catequina/epicatequina als dos pH d'estudi. El pendent correspon a la constant de velocitat

La taula 4.4.1 recull les constants, expressades en hores⁻¹, de desaparició d'antocians per les dues condicions de treball, la de pH 2.0 i la de pH 3.2:

	K velocitat (pH=2.0) h ⁻¹	K velocitat (pH=3.2) h ⁻¹	Relació k(2.0)/k (3.2)
Dp-3-glu	-0.040	-0.0083	4.8
Cy-3-glu	-0.042	-0.0064	6.6
Pt-3-glu	-0.057	-0.0094	6.1
Pn-3-glu	-0.054	-0.0100	5.4
Mv-3-glu	-0.035	-0.0090	3.9
Pt-ac-glu	-0.032	-0.0108	3.0
Pn-ac-glu	-0.029	-0.0053	5.5
Mv-ac-glu	-0.022	-0.0056	3.9
Cy-pc-glu	-0.013	-0.0064	2.0
Pt-pc-glu	-0.006	-0.0094	0.6
Pn-pc-glu	-0.038	-0.0100	3.8
Mv-pc-glu	-0.048	-0.0090	5.3

Taula 4.4.1. Constants de velocitat determinades en desaparició d'àrea pels antocians a pH=2.0 i pH=3.2

Les constants de velocitat a pH àcid són de l'ordre d'entre 3-6 vegades més elevades que les corresponents al pH del vi; això justifica que la velocitat de desaparició sigui també més elevada.

En un medi a pH=3.2, més similar al del vi, es posen de manifest algunes diferències quant a reactivitat d'aquests compostos. A diferència de les observacions de Romero i Bakker^{302, 304}, que en solucions model d'antocians aïllats descriuen unes constants de velocitat de desaparició de l'ordre de 3-4 vegades superiors pels antocians acilats, especialment els p-cumarilats, en els nostres estudis no s'observa aquest fenomen i, de fet, els antocians acetilats són els que presenten una menor reactivitat (gairebé la meitat). En els estudis citats, però, treballen en unes concentracions encara més elevades d'acetaldehid, de l'ordre de 200 mM, i treballen en solucions model dels antocians aïllats, cosa que pot justificar la diferència en els resultats.

Dintre dels monoglucòsids, a pH= 2.0, la petunidina és la més reactiva, seguida de la peonidina i la malvidina, encara que a pH=3.2 no hi ha diferències significatives. En els experiments de Dallas *et al.*²⁹³ també arriben a uns valors similars entre la malvidina i la peonidina. Però en el seu cas, la cianidina resulta lleugerament més reactiva que la malvidina. De totes maneres, els seus experiments també treballen amb solucions model de

l'antocià aï llat, i no amb una barreja d'antocians, per la qual cosa un efecte d'interacció podria justificar les diferències.

En la taula 4.4.2 es recullen les constants de velocitat de desaparició en el cas de l'addició única d'acetaldehid, calculades segons la metodologia descrita anteriorment:

	K velocitat (pH=2.0)	K velocitat (pH=3.2)
<i>Dp-3-glu</i>	-0.0030	-0.0028
<i>Cy-3-glu</i>	-0.0031	-0.0026
<i>Pt-3-glu</i>	-0.0033	-0.0026
<i>Pn-3-glu</i>	-0.0035	-0.0025
<i>Mv-3-glu</i>	-0.0035	-0.0024
<i>Pt-ac-glu</i>	-0.0034	-0.0028
<i>Pn-ac-glu</i>	-0.0044	-0.0023
<i>Mv-ac-glu</i>	-0.0036	-0.0056
<i>Cy-pc-glu</i>	-0.0035	-0.0021
<i>Pt-pc-glu</i>	-0.0025	-0.0031
<i>Pn-pc-glu</i>	-0.0028	-0.0029
<i>Mv-pc-glu</i>	-0.0030	-0.0031

Taula 4.4.2. Constants de velocitat determinades en desaparició d'àrea pels antocians a pH=2.0 i pH=3.2

Les constants de velocitat són de l'ordre de 10 vegades inferiors en el cas de la solució a pH=2.0; i 3-4 vegades inferiors a les de la solució a pH=3.2. En aquestes condicions, la reactivitat és lleugerament superior en les condicions més àcides, però no hi ha una influència del pH en la reactivitat tan marcada com en les reaccions en què participaven l'acetaldehid i els flavan-3-ols.

Convé tenir present que en la situació control sense addició d'acetaldehid, ni catequina ni epicatequina, no s'observava aquesta desaparició dels antocians.

Així doncs, podem veure que l'acetaldehid participaria en dos processos que promouen la desaparició en els vins de les formes antocianiques provinents del raï m. Per una banda, en presència de flavan-3-ols (que en el vi es troben procedents de l'extracció de les pells o dels pinyols) tindria lloc una reacció de condensació que provoca un desplaçament cap a tonalitats violàcies i que pot arribar a provocar l'aparició de precipitats de natura polimèrica. Per altra banda, també participaria, sense involucrar molècules de

³⁰⁴ Romero, C; Bakker, J. (2000). "Effect of acetaldehyde and several acids on the formation of vitisin A in model wine anthocyanin and colour evolution". *Int. J. Food Sci. And Techn* 35: 129-140

flavan-3-ol, en altres reaccions sensiblement més lentes que condueixen a la desaparició dels antocians en el vi.

La velocitat de desaparició depèn de la constant de velocitat, però també és proporcional a la concentració de l'antocià. Això significa que, a majors concentracions, hi ha una major desaparició. En els vins elaborats amb la varietat *Vitis vinifera*, en què l'antocià majoritari és la malvidina, la desaparició d'aquest antocià per reaccions com les de condensació serà, doncs, més elevada que per als altres antocians, malgrat que la seva constant de velocitat sigui menor. En canvi, els nivells d'antocians acilats ja són de per si petits, i per tant la velocitat de desaparició serà menor.

De totes maneres, com ja hem comentat en el capítol anterior, en general, l'extracció de derivats p-cumarilats en el procés de maceració és escassa, de manera que és la família d'antocians minoritària en els vins. A conseqüència de les reaccions de desaparició en què poden estar implicades, el resultat és que la seva presència en vins acostuma a ser limitada. De fet, en vins de criaça l'únic antocià que es detecta al cap d'uns mesos d'envelliment és la malvidina-3-glucòsid, pel fet de ser el majoritari en el vi inicial; mentre que els altres es troben en molts baixos nivells o no es detecten.

Resulta controvertida la influència que poden exercir aquests nous pigments en el color dels vins envellits. Per una banda, s'han aïllat en el vi, però per l'altra, les seves característiques cromàtiques no corresponen al perfil cromàtic dels vins de criaça. En els vins de criaça i els vins envellits, la proporció d'antocians procedents del raïm és efectivament molt baixa, però en canvi el color és més intens, i amb un lleuger desplaçament cap a tonalitats vermell-teula. En canvi, en la solució model, el desplaçament ha estat cap a zones més blavoses. Això reflecteix que en el vi es produeixen una altra sèrie de reaccions per acció de l'acetaldehid, tot i que els experiments efectuats amb les solucions model aporten informació sobre possibles molècules que es formarien.

4.4.2) Reaccions de condensació mitjançades per acetaldehid en Vins monovarietals

Com ja hem comentat, l'addició d'acetaldehid a les solucions model sense participació de flavanols provocava una desaparició molt lenta dels antocians, i un molt lleuger desplaçament batocròmic de la λ màx.

En canvi, la situació canvia quan s'afegeix l'acetaldehid a vins joves. Les següents gràfiques (figura 4.4.6) presenten l'espectre entre 400-650 nm dels diferents vins monovarietals estudiats, després de l'addició d'acetaldehid.

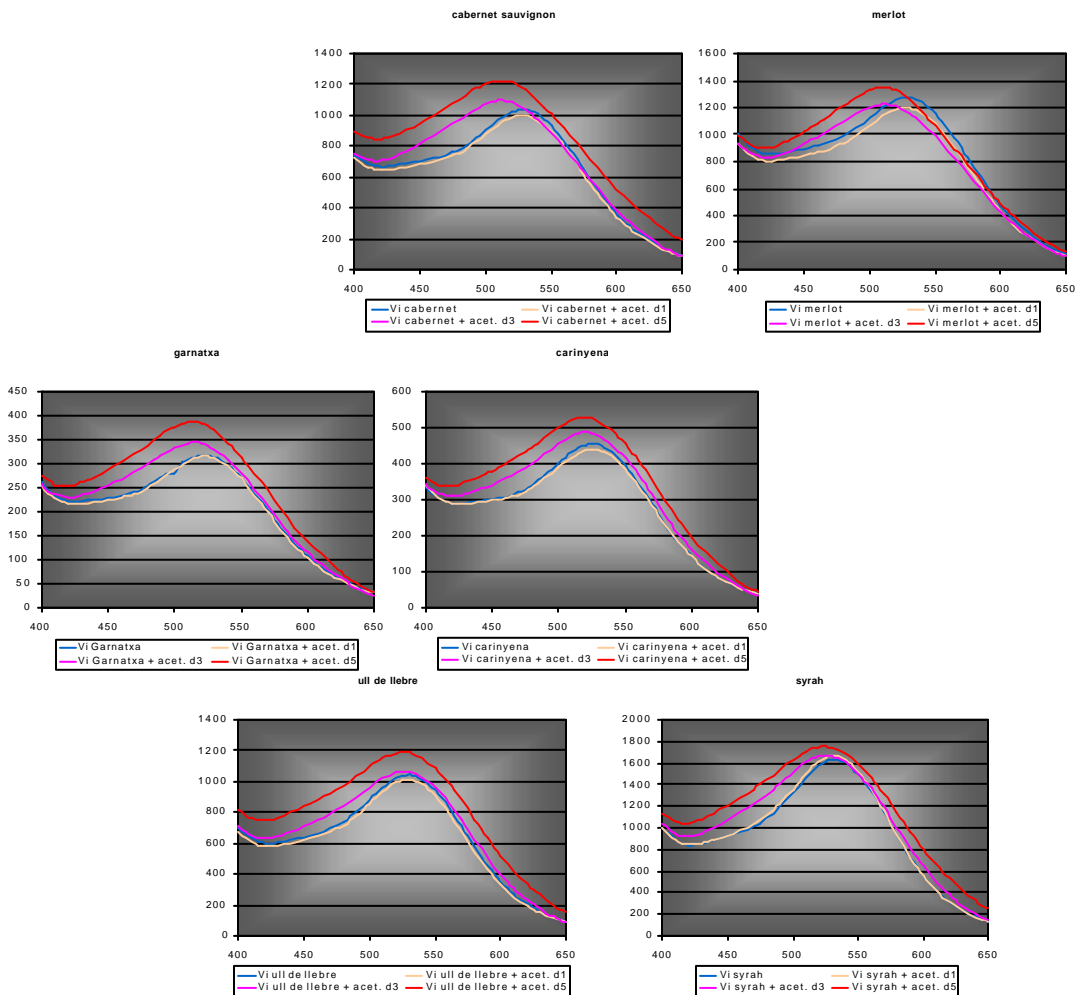


Figura 4.4.6. Espectres d'absorció a la regió del visible dels diferents vins monovarietals, i evolució al cap d'1, 3 i 5 dies d'addicionar acetaldehid

En aquest cas, es produeix un desplaçament hipsocròmic dels màxims d'absorció, cap a zones més ataronjades.

Aquest desplaçament no és igual per a tots els vins monovarietals. En la taula 4.4.3 es presenten aquests desplaçaments:

	λ màx vi	λ màx vi+acetaldehid	$\Delta \lambda$ màx
Cabernet sauvignon	528	511	17
Merlot	527,5	510	17,5
Syrah	531.5	524	7.5
Garnatxa	522.5	514.5	8
Carinyena	525.5	518	7.5
Ull de llebre	529	525	4

Taula 4.4.3. Magnitud dels desplaçaments hipsocròmics obtinguts en vins monovarietals per l'addició d'acetaldehid

Per altra banda, en tots ells s'obté un desplaçament hiperocròmic, això és, un increment de la intensitat de l'absorbància.

Aquests desplaçaments hipsocròmic i hiperocròmic sí resulten més característics dels vins envellits o de cria³⁰⁵. Per tant, la solució model no resultava representativa del que succeeix en un vi envellit, ja que els antocians no donaven increment de color quan se'ls enfrontava a l'acetaldehid. Tampoc sembla que en aquestes reaccions hi hagi participació dels flavan-3-ols, ja que l'espectre que s'obté és justament el contrari.

Per tal de veure la relació d'aquest canvi cromàtic amb el contingut en els antocians individuals, es van comparar els cromatogrames en els diferents dies. A continuació es presenta un exemple (figura 4.4.7), corresponent al vi monovarietal de cabernet sauvignon, que era dels que presentava major variació en l'espectre.

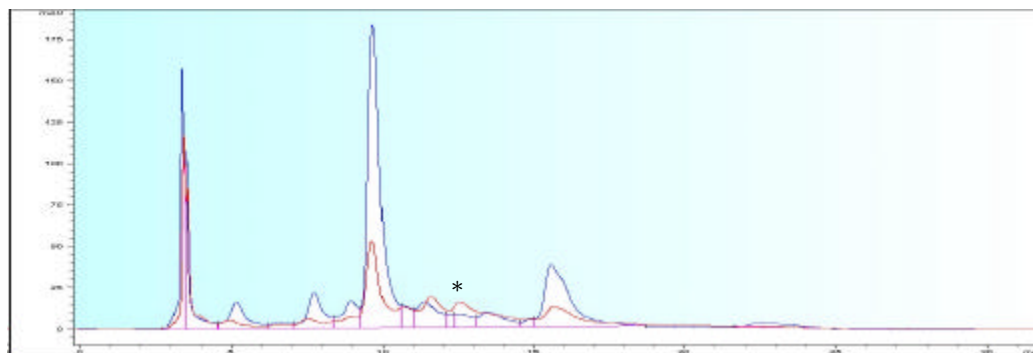


Figura 4.4.7. Desaparició dels antocians per efecte de l'addició d'acetaldehid en els vins monovarietals. En blau es representa el contingut el primer dia, i en vermell al cap de 3 dies d'addicionar l'acetaldehid.

Pot apreciar-se que, malgrat aquest increment del color que presenten els vins, hi ha una disminució de la concentració dels antocians individuals. Per tant, sembla clar que aquests antocians desapareixen del medi però es formen estructures més colorejades per efecte de l'acetaldehid. Tot i així, només s'observa un nou pic (*) en el cromatograma per efecte de l'addició d'acetaldehid. En els treballs de Vivar-Quintana³⁰⁵, en afegir acetaldehid en concentracions 800 mg/l a un vi, aconseguen detectar, en molt baixa quantitat, al cap de 120 hores, compostos amb màxims d'absorció desplaçats a la zona de 500-513 nm, i que identificaven mitjançant LC-MS com a derivats de la família de les vitisines, amb substituents acetil, cumaril i també de procianidines. El pic aparegut sembla coincidir, almenys en temps de retenció, amb el de l'acetilvitisina B, compost detectat en vins, tot i que no s'han pogut efectuar estudis estructurals que confirmin aquesta hipòtesi.

Així doncs, tal i com comenta Vivar-Quintana³⁰⁵, l'acetaldehid no actua només formant productes de condensació lligats per etil, sinó que també pot causar l'aparició de molècules d'estructura vitisina.

Convé senyalar que, malgrat que la concentració d'aquests pigments és baixa, poden ser molt importants en el color, ja que el cromatograma està enregistrat en unes condicions molt àcides, que no corresponen a les del vi. En les condicions d'anàlisi, a pH àcid, tots els antocians es troben en forma de catió flavili, i per tant totes donen color. Però al pH del vi, els antocians es trobarien en la forma hemiacetàlica incolora.

De totes maneres, sembla clar que en el vi hi ha d'haver algun altre tipus de molècules que intervinguin el color, i que no són recollides en el cromatograma. En aquest sentit, resulten interessants treballs com els de Peng *et al.*³⁰⁶, que utilitzen columnes de poliestirè/divinilbenzè, amb les quals aconseguen detectar, a més dels antocians monòmers, un pic amb antocians polimèrics. Aquest pic, present ja en vins joves, augmenta de concentració i de proporció relativa durant l'envelliment del vi, i pot ser molt important en el color dels vins.

³⁰⁵ Vivar- Quintana, AM. (2001). "Fraccionamento y estudio preliminar de la materia colorante en el vino tinto". *Tesi doctoral*. Univ Salamanca

³⁰⁶ Peng, Z.; Iland, PG; Oberholster, A; Sefton, MA; Waters, EJ. (2002). "Analysis of pigmented polymers in red winew by reverse phase HPLC". *Aust. J. Grape and wine research* 8, 70-75

4.4.3) Fenòmens de copigmentació en solucions model

a) Àcids hidroxicinnàmics

L'efecte dels àcids sobre el color de les solucions d'antocians depèn de l'estructura de l'àcid. Quan aquest és un àcid hidroxicinnàmic, es manifesta un efecte hiperacròmic i batocròmic, com es recullen a a la figura 4.4.8 i a la taula 4.4.4:

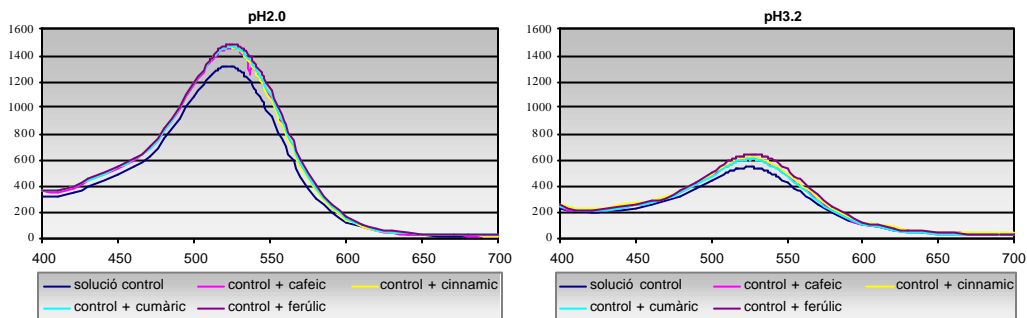


Figura 4.4.8. Espectre visible de l'efecte copigmentatiu entre la solució model i diferents àcids fenòlics, a pH=2.0 i pH=3.2

	λ màx (pH=2.0)	λ màx (pH=3.2)
control	522.0	523.6
control + cafeic	523.7	525.7
control + cinnàmic	522.5	524.6
control + cumàric	523.7	525.2
control + ferúlic	524.0	528.8

Taula 4.4.4. Magnitud dels desplaçaments batocròmics obtinguts en solucions model per l'addició d'àcids hidroxicinnàmics

Tots els àcids cinnàmics provoquen un efecte hiperacròmic i un efecte batocròmic en ambdós valors de pH. En alguns treballs, els pH molt àcids no produeixen efecte^{307, 308 309}, mentre que en d'altres el color a causa de la copigmentació continua sent més pronunciat a pH 1 o inferiors. L'àcid ferúlic és el que crea un efecte de copigmentació major, tot i que en la bibliografia²⁷⁵, en solucions individuals de delfinidina-3-glucòsid, de peonidina-3-glucòsid, de malvidina-3-glucòsid, i de petunidina-3-glucòsid, arriba a provocar desplaçaments de més de 10 nm en els màxims d'absorció al cap de poques hores. Almenys en la nostra solució model, aquests efectes no són tan acusats, cosa que podria ser causada

³⁰⁷ Asen, S; Jurd, L. (1972). "Co-pigmentation og anthocyanins in plant tissues and its effect on color". *Phytochemistry* 11: 1139-1145

³⁰⁸ Davies, AJ; Mazza, G. (1995). "Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds". *J Agric Food Chem* 41:716-720

³⁰⁹ Lebengood, J. (1996). "A survey on copigmentation in cabernet sauvignon wines" *Tesi doctoral*, Univ Califòrnia, Davis

per una resposta diferent segons l'estructura dels antocians, o per altres possibles associacions antocià-antocià amb les quals haurien de competir els àcids hidroxicinnàmics.

Els àcids hidroxicinnàmics són copigments més àmpliament descrits, ja que permeten la interacció dels seus anells aromàtics amb els orbitals π del catió flavili de l'antocià, estabilitzant-ne l'estructura³¹⁰. Les seves propietats d'incrementar el color han conduït a noves pràctiques d'addició pre-fermentativa d'aquests copigments, que resulta en un increment del 60% del color del vi jove en cas de la utilització d'àcid cafeic³¹¹. De fet, els àcids benzoics i cinnàmics ja són presents de manera natural als vins negres, en unes concentracions que oscil·len entre els 50-200 mg/l en total³¹².

b) Àcids alifàtics

L'efecte no és tan espectacular quan es tracta d'àcids alifàtics, com es recull en la figura 4.4.9 i la taula 4.4.5:

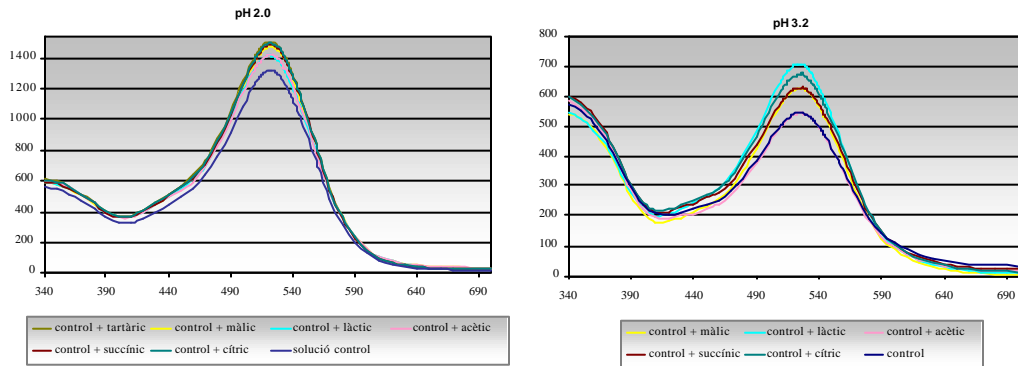


Figura 4.4.9. Espectre visible de l'efecte copigmentatiu entre la solució model i diferents àcids alifàtics, a pH=2.0 i pH=3.2

	λ màx (pH=2.0)	λ màx (pH=3.2)
control	521.5	523.6
acètic	521.5	523.4
cítric	521.5	523.8
làctic	520.5	523
màlic	521.5	523.2
succínic	521.5	524.5
tartàric	521.0	

Taula 4.4.5. Magnitud dels desplaçaments hipsocròmics obtinguts en solucions model per l'addició d'àcids alifàtics

³¹⁰ Brouillard, R; Wigand, MC; Dangles, o; Cheminat, A. (1991). "pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives". *J Chem Soc Perkin Trans*, 2:1235-1241

³¹¹ Darias-Martín, J; Carrillo, M; Díaz, E; Boulton, R. (2001). "Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments". *Food Chemistry* 73, 217-220

³¹² Cheynier, V.; Moutounet, M; Sarni-Manchado, P. (2003). "Los compuestos fenólicos", a "Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos".

Com es pot observar en la gràfica 4.4.9, es manifesta un efecte hiperacròmic per l'acció dels àcids alifàtics. Aquest efecte és de magnitud quantitativament menor que l'obtingut amb els àcids hidroxicinnàmics (recordem que els nivells de concentració amb què s'ha treballat són 10 vegades superiors en el cas d'aquests àcids alifàtics). L'efecte depèn també del pH de treball, ja que a pH més àcids (2.0) les diferències respecte la situació control són menys acusades, i s'estableixen menys diferències entre els àcids alifàtics. És especialment acusat l'efecte de l'àcid làctic, que també s'observa en els treballs de Mazzaracchio *et al.*²⁷⁵.

Hi ha diferents hipòtesis que justifiquen aquest efecte. Per una banda, l'acció molecular que postulen Mazzaracchio *et al* seria la de l'establiment d'interaccions electrostàtiques i la formació de ponts d'hidrogen i interaccions hidrofòbiques que resulten en una expulsió de l'aigua del catió flavili, cosa que permet apilaments auto-associatius que produeixen l'efecte cromàtic. Per altra banda, Boulton²⁷⁴ indica la necessitat d'un contraió que compensi la càrrega del catió flavili, i els experiments d'Asen³⁰⁷, Brouillard³¹⁰ i Davies i Mazza³⁰⁸ posen de manifest que la carència d'aquests contraions disminueix l'efecte copigmentatiu. Els vins són tampons dominats pels ions bitartrat, però en què també intervenen en el poder tamponador els ions lactat, els bisuccinat, els dihidrogen fosfat o els bisulfat²⁷⁴, la variació dels quals en els vins pot ser significant.

Els nostres resultats semblen confirmar la influència del contraió en l'efecte copigmentatiu. Per a una discussió acurada, convé considerar els pK_a d'aquests àcids alifàtics, que es recullen a la taula 4.4.6:

Àcid	pK _a
acètic	4.76
succínic	4.16, 5.61
màlic	3.40, 5.11
làctic	3.246
cítric	3.14, 4.77, 6.34
tartàric	2.98, 4.34

Taula 4.4.6. pK_a dels àcids alifàtics

La constant d'acidesa (K_a) estableix la relació entre les formes aniòniques i neutres, de manera que, donat un àcid AH és fàcil deduir l'equació: $10^{pH-pK_a} = [A^-] / [AH]$

A pH=2.0, la majoria d'àcids estan en la forma neutra, de manera que la proporció d'anió present en la solució model serà escassa. Això justifica que l'efecte d'increment del color sigui també reduït.

A pH=3.2, hi ha majors diferències. La magnitud de l'efecte hiperacròmic està clarament relacionada amb el valor del pKa. L'acètic, que és l'acid més feble, seria doncs el menys dissociat en aquest pH i, en conseqüència, el que menys podria establir el catió flavili. Això explica que no presenti diferències respecte les condicions control. Sí que les presenten l'àcid succínic i l'àcid màlic, encara que en el cas del succínic seria esperable un efecte menor. El següent àcid, el cítric, ja té un valor de pKa inferior al del pH, i per tant, la concentració de ió citrat és superior a la forma neutra i, en conseqüència, té l'efecte hiperacròmic.

En el cas de l'àcid làctic, malgrat tenir un pKa superior al del cítric, té un considerable efecte. Aquest efecte hiperacròmic, així com el desplaçament batocròmic han estat descrits²⁷⁵, encara que en el nostre cas els efectes són significativament menors. El mecanisme d'acció seria la formació de ponts d'hidrogen, que allunyarien l'aigua del ió flavili, evitant-ne així la conversió a forma hemiacetàlica. L'efecte de l'àcid làctic és especialment important, ja que és el producte de la fermentació malo-làctica, desenvolupada pels bacteris làctics. En aquest procés, es produeix una desacidificació del medi, cosa que implicaria una pèrdua de color vermell a causa de l'equilibri que manté el ió flavili; però sembla que en part l'efecte quedaria compensat per l'increment hiperacròmic resultat del fenomen de copigmentació amb l'àcid làctic format.

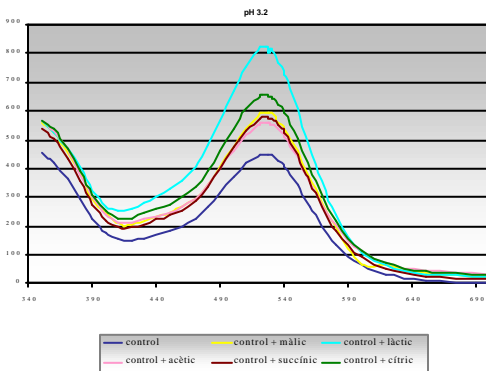


Figura 4.4.10. Espectre visible de l'efecte copigmentatiu entre la solució model i diferents àcids alifàtics, a pH=3.2 al cap de 5 dies de l'addició

Aquest efecte encara es potencia si es torna a registrar l'espectre al cap d'uns dies d'haver afegit l'àcid (figura 4.4.10). En les condicions control hi ha una pèrdua considerable de color, mentre que es manté en les altres condicions, i en el cas de l'àcid làctic, fins i tot es potencia. Per tant, els àcids alifàtics estabilitzarien el color de la solució.

Dels resultats obtinguts amb els àcids hidroxicinnàmics i els àcids alifàtics podem establir que en el cas dels primers, que aporten anells aromàtics que poden participar en l'apilament, hi ha una contribució tant per un efecte incrementador del color com per un desplaçament de l'espectre visible cap a regions més blavoses. En canvi, en el cas d'altres àcids que no poden participar de l'apilament, el resultat seria un increment de la copigmentació per autoassociació dels propis antocians, que genera un lleuger desplaçament batocròmic del color, de manera que en aquests casos l'efecte que es manifesta fonamentalment és l'hipercròmic. Convé comentar que, a més dels àcids alifàtics, s'han descrit altres molècules que no presenten anells aromàtics però que poden actuar, en canvi, com a copigments, com són l'arginina.³¹³

4.5) CONCLUSIONS

1. En solucions model amb la presència d'antocians, l'addició d'acetaldehid i un flavan-3-ol, provoca que els antocians s'hi combinin per formar compostos de color violaci que precipiten al cap de pocs dies. La velocitat d'aquesta reacció depèn del pH del medi i de la concentració de l'antocià, però també de la seva natura química.
2. En vins, l'addició d'acetaldehid provoca un desplaçament del màxim d'absorbància cap a tonalitats més ataronjades. Aquest comportament és diferent del de les solucions model i, per tant, implica que en el mecanisme hi participen altres molècules que les catequines.
3. Els àcids hidroxicinnàmics tenen un efecte hipercròmic i batocròmic sobre el color en solucions model. L'efecte és particularment més acusat en el cas de l'àcid ferúlic.
4. Alguns àcids alifàtics, especialment l'àcid làctic, també poden modificar les propietats cromàtiques dels antocians, contribuint a augmentar la intensitat cromàtica del vi. Aquesta funció està afectada per la naturalesa de l'àcid.

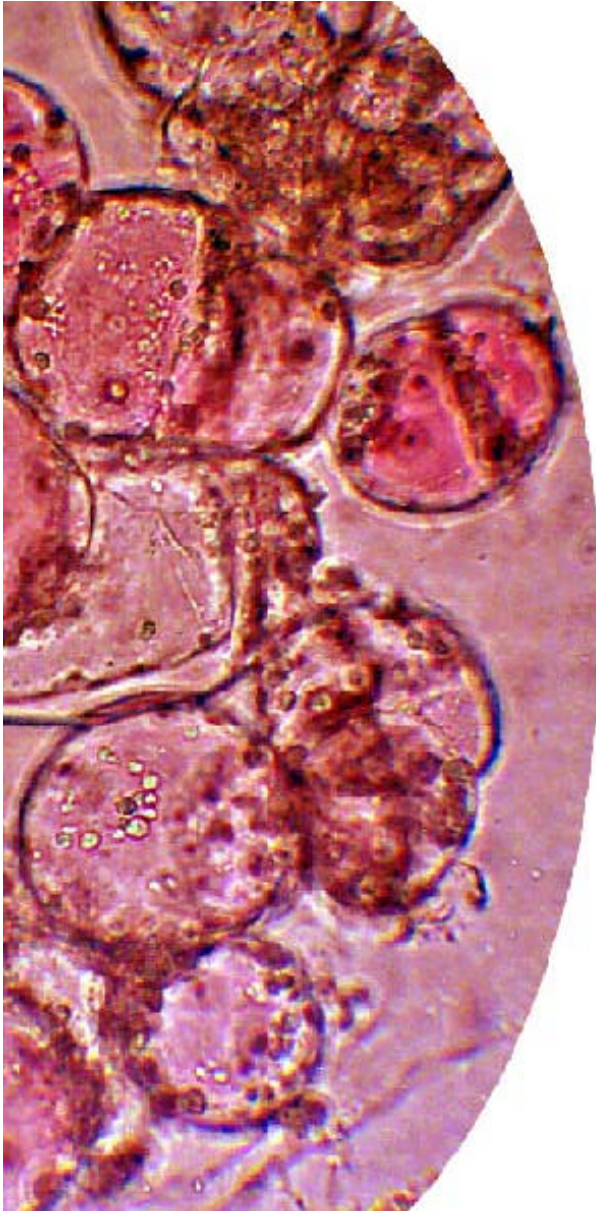
³¹³ Asen, S; Stewart, RN; Norris, KH; "Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color"; *Phytochemistry* 11:1139-1145 (1972)

6) REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. **Sommers, TC; Evans.** (1977). "Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, and "chemical age""; *J Sci Food Agric* 28:279-287
2. **Houbiers, C; Lima, J; Maçanita, A; Santos, H.** (1998). "Color stabilization of malvidin-3-glucoside: self-aggregation of the flavylum cation and copigmentation with the Z-chalcone form"; *J Phys Chem B*, 102, 3578-3585
3. **Heredia, FJ; Francia-Aricha, EM; Rivas-Gonzalo, JC; Vicario, IM; Santos-Buelga, C.** (1998). "Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes -I.pH effect"; *Food Chemistry*, vol 63,nº4, 491-498
4. **Boulton, R.** (2001). "The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review", *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (2): 67-87
5. **Mazzarazchchio, P; Pifferi, P; Kindt, M; Munyaneza, A, Barbiroli, G.** (2004). "Interactions between anthocyanins and organic food molecules in model systems"; *Int. J. Food Sci. And Techn.*, 39, 53-59
6. **Mazza, G., and Brouillard, R.** (1990). "The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions". *Phytochem.* 29:1097-1102.
7. **George, F; Figureido, P; Toki, K; Tatsuzawa, F; Saito, N; Brouillard, R.** (2001). "Influence of trans-cis isomerization of coumaric acid substituents on colour variance and stabilisation in anthocyanins", *Phytochemistry* 57: 791-795
8. **Somers, T.C., and Evans, M.E.** (1979). "Grape pigment phenomena: Interpretation of major colour losses during vinification". *J. Sci. Fd. Agric.* 30:623-633.
9. **Liao H., Cai Y., Haslam E.,** (1992). "Polyphenol interactions. Anthocyanins : copigmentation and color changes in red wines". *J. Sci. Food Agric.*, **59**, 299-305.
10. **Brouillard, R; Dangles, O.** (1994). "Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging?". *Food Chem*, 51, 265-270
11. **Brouillard, R; Chassaing, S; Fougerousse, A.** (2003). "Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long?" *Phytochemistry* 64: 1179-118
12. **Revilla, I; Perez-Magarino, S; Gonzalez-SanJose, ML; Beltran, S.** (1999). "Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection" . *Journal of Chromatography A*, 847: 83-90
13. **Hakansson, A; Pardon, K; Hayasaka, Y; Sa, M; Herderich, M.** (2003). "Structures and colour properties of new red wine pigments". *Tetrahedron Letters* 44 :4887-4891
14. **Remy, S; Fulcrand, H; Labarbe, B; Cheynier, V; Moutounet, M.** (2000). "First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions". *J Sci Food Agric* 80:745-751
15. **Remy-Tanneau, S; Le Guernevé, C; Meudec, E; Cheynier, V.** (2003). "Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbob-carbon and ether interflavonoid linkages by NMR and Mass Spectrometry". *J. Agric. Food Chem.* 51: 3592-3597
16. **Es-Safi, N; Le Guernevé, C; Labarbe, B; Fulcrand, H; Cheynier, V; Moutounet, M;** "Structure of a new Xanthylum salt derivative". (1999). *Tetrahedron Letters* 40: 5869-5872

17. **Es-Safi, N; Le Guernevé, C; Fulcrand, H; Cheynier, V; Moutounet, M.** (2000). "Xanthylum salts formation involved in wine colour changes". *Int. J. Food Science and Technology*, 35: 63-74
18. **Liu, S-Q; Pilone, G.J.** (2000). "An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications". *Int. J. Food Sci. And Techn.*, 35: 49-61
19. **Atanasova, A; Fulcrand, F; Le Guernevé, C; Cheynier, V; Moutounet, M.** (2002). "Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin-3-glucoside condensation product". *Tetrahedron letters* 43: 6151-6153
20. **Rivas-Gonzalo, JC; Bravo-Haro, S; Santos-Buelga, C.** (1995). "Detection of compounds formed through the reaction of malvidin-3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde". *J.Agric.Food Chem*, 43:1444-1449
21. **Escribano-Bailón, T; Álvarez-García, M; Rivas-Gonzalo, JC; Heredia, FJ; Santos-Buelga, C.** (2001). "Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin-3-O-glucoside and (+)-catechin". *J. Agric Food Chem*, 49: 1213-1217
22. **Es-Safi, N; Fulcrand, H; Cheynier, V; Moutounet, M;** (1999). "Studies on the acetaldehyde-induced condensation of (-)-Epicatechin and Malvidin-3-O-Glucoside in a model solution system". *J. Agric. Food Chem*, 47: 2096-2102
23. **Dallas, C; Ricardo-da-Silva, JM; Laureano, O.** (1996). "Products formed in wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2, and acetaldehyde" *J. Agric. Food Chem.* 44: 2402-2407
24. **Pissarra, J; Lourenço, S; González-Paramás, A; Mateus, N; Santos-Buelga, C; de Freitas, V.** (2003). "Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl-flavanol pigments in model solutions". *Analytica Chimica Acta, en premsa*
25. **Cameira dos Santos, PJ; Brillouet, JM; Cheynier, V; Moutounet, M;** (1996). "Detection and partial characterisation of new anthocyanin pigments in wine". *J. Sci. Food Agric.* 70: 204-208
26. **Romero, C; Bakker, J.** (1999). "Interactions between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and colour in model solutions". *J.Agric. Food Chem.*, 47 (3130-3139)
27. **Mateus, N; Silva, AMS; Vercauteren, J; de Freitas, V.** (2001). "Occurrence of anthocyanin-derived pigments in red wines" *J. Agric. Food Chem.* 49: 4836-4840
28. **Bakker, J; Timberlake, CF.** (1997). "Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines"; *J. Agric. Food Chem.* 45: 35-43
29. **Vivar-Quintana, AM; Santos-Buelga, C; Rivas-Gonzalo, JC.** (2002). "Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines"; *Analytica Chimica Acta* 458: 147-155
30. **Mateus, N; de Freitas, V.** (2001). "Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during Port wine aging". *J. Agric. Food Chem.* 49:5217-5222
31. **Bakker, J; Bridle, P; Bellworthy, SJ; García-Viguera, C; Reader, HP; Watkins, SJ;** "Effects of sulfur dioxide and must extraction on color, phenolic composition and sensory quality of red table wine". (1998). *J.Sci.Food Agric.* 78, 297-307
32. **Romero, C; Bakker, J.** (2000). "Effect of storage temperature and pyruvate on kinetics of anthocyanin degradation, vitisin A derivative formation, and color characteristics of model solutions"; *J. Agric. Food Chem.* 48, 2135-2141

33. **Mateus, N; de Pascual-Teresa, S; Rivas-Gonzalo, JC; Santos-Buelga, C; de Freitas, V.** (2002). "Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines". *Food Chemistry* 76: 335-342
34. **Romero, C; Bakker, J.** (2000). "Effect of acetaldehyde and several acids on the formation of vitisin A in model wine anthocyanin and colour evolution". *Int. J. Food Sci. And Techn* 35: 129-140
35. **Vivar- Quintana, AM.** (2001). "Fraccionamento y estudio preliminar de la materia colorante en el vino tinto". *Tesi doctoral*. Univ Salamanca
36. **Peng,Z; Iland, PG; Oberholster, A; Sefton, MA; Waters, EJ.** (2002). "Analysis of pigmented polymers in red winew by reverse phase HPLC". *Aust. J. Grape and wine research* 8, 70-75
37. **Asen, S; Jurd, L.** (1972). "Co-pigmentation og anthocyanins in plant tissues and its effect on color". *Phytochemistry* 11: 1139-1145
38. **Davies, AJ; Mazza, G.** (1995). "Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds". *J Agric Food Chem* 41:716-720
39. **Lebengood, J.** (1996). "A survey on copigmentation in cabernet sauvignon wines" *Tesi doctoral*, Univ Califòrnia, Davis
40. **Brouillard, R; Wigand, MC; Dangles, o; Cheminat, A.** (1991). "pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives". *J Chem Soc Perkin Trans, 2*:1235-1241
41. **Darías-Martín, J; Carrillo, M; Díaz, E; Boulton, R.** (2001). "Ehnhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments". *Food Chemistry* 73, 217-220
42. **Cheyrier,V.; Moutounet, M; Sarni-Manchado,P.** (2003). "Los compuestos fenólicos", a "Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos".
43. **Asen, S; Stewart, RN; Norris, KH;** "Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color"; *Phytochemistry* 11:1139-1145 (1972)



BLOC III

Síntesi d'antocians en cultius in vitro

En les darreres dècades ha esdevingut un ràpid increment de la recerca científica i tecnològica en l'àmbit dels cultius vegetals. Amb aquest terme es defineix el cultiu *in vitro* de plantes, llavors, parts de planta (teixits, òrgans, embrions, cèl·lules, protoplasts, etc.) en un medi nutrient sota condicions asèptiques³¹⁴. Aquest camp d'investigació es basa en la premissa que les plantes es poden separar en els seus components (òrgans, teixits o cèl·lules), que després poden ser manipulats *in vitro* i, sovint, regenerar plantes completes³¹⁵.

Històricament, els cultius vegetals neixen a partir de les afirmacions de la Teoria Cel·lular de Schwann (1839), primer a sostenir que cada cèl·lula d'un organisme, en condicions adequades, és capaç d'un desenvolupament independent. Aquesta teoria, doncs, està lligada al concepte de totipotència: la capacitat d'una cèl·lula de regenerar el fenotip de l'organisme complet i diferenciat del qual deriva.³¹⁶

Els primers intents de cultius *in vitro* daten de principis del segle XX, quan Haberlandt, el 1902, establí el cultiu en medi salí suplementat amb sacarosa de cèl·lules del teixit mesòfil de les fulles. No obstant això, aquestes cèl·lules no van dividir-se, a causa de la manca de factors reguladors del creixement en el medi. Però és comunament acceptat el seu nom com a pare del cultiu tissular³¹⁷.

Els primers cultius tissulars vertaders, en el sentit estricte de cultius prolongats de materials no-organitzats, no arribaren fins el 1939, en què Gautheret, Nobecourt i White, en treballs independents, utilitzaren cèl·lules meristemàtiques per generar cultius de creixement continu de tomàquet, pastanaga i de tabac. Poc temps després es van iniciar cultius d'embrions (1941) i de cal·lus (1942), a partir dels quals es podien regenerar òrgans (1950).

En les dècades posteriors s'establí el paper de les vitamines i dels factors de creixement, com l'adenina (1950), les citokines o les auxines, que intervenen decisivament

³¹⁴ Chawla, HS. (2002). "Introduction to plant biotechnology". Second edition, Science Publishers, Inc.

³¹⁵ Hall, RD. (1999). "Plant cell culture protocols"; Humana Press

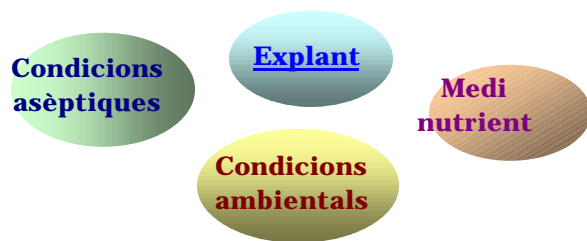
³¹⁶ Ignacimuthu, S. (1997). "Plant Biotechnology", Science Publishers, inc.

en els processos de diferenciació cel·lular i d'organogènesi, claus en els cultius cel·lulars, ja que determinen si aquests es dirigiran a un estadi de dediferenciació cel·lular o bé a un estadi de competència previ a un procés de diferenciació (organogènesi) que condueixi a la regeneració de l'òrgan o de la planta³¹⁸.

A partir del 1960 es va desenvolupar la micropropagació, és a dir, la multiplicació vegetativa *in vitro*, i els cultius de cèl·lules en suspensió a partir del trencament dels cultius de cal·lus. Als anys 70 s'establí la inducció de l'embriogènesi somàtica, procés mitjançant el qual s'obtenen embrions no-zigòtics que desenvolupen posteriorment la planta sencera, i el cultiu de protoplasts, cèl·lules vegetals de les quals s'ha extret la paret.

Actualment, gràcies a la tecnologia de l'ADN recombinant, s'han pogut efectuar transformacions de cèl·lules, amb la qual cosa s'obtenen per regeneració plantes modificades genèticament amb nous caràcters (transgèniques: resistència a herbicides, insectes, virus, etc.)³¹⁹

2. COMPONENTS DELS CULTIUS VEGETALS



Els cultius vegetals consisteixen en (esquema III.1) un material vegetal, al que s'anomena explant, que en condicions asèptiques es fa créixer i dividir en un medi nutrent sota unes condicions determinades i fixades.

Esquema III. 1. Cultius vegetals

³¹⁷ Gautheret, R.J. (1985). "History of plant tissue and cell culture: a personal account"; a "Cell culture and somatic cell genetic of plants, vol 2, Ed . Vasil. Academic Press, Inc.

³¹⁸ Schwarz, O; Beauty, R.M. (1996). "Propagation from nonmeristematic tissues – organogenesis". A "Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory exercises"; Ed. Trigiano, RN; Gray, DJ. CRC Press

³¹⁹ Chawla, H.S.(2002) "Transgenics in crop improvement" a "Introduction to plant biotechnology". Second edition, Science Publishers, Inc.

Segons la naturalesa de l'explant, s'estableixen 4 tipus diferents de cultius vegetals:

- a) Cultius de plantes completes
- b) Cultius d'òrgans/teixits
- c) Cultius de cal.lus
- d) Suspensions cel.lulars

a i b) Cultius de plantes completes i d'òrgans i teixits

Tant en els cultius de plantes completes com en els d'òrgans i teixits, l'explant és teixit meristemàtic, que en les condicions adequades es desenvolupa fins regenerar el teixit, l'òrgan o la planta. En aquests casos, els cultius mantenen una integritat estructural i, per tant, una estabilitat genètica i metabòlica. Això fa que, a part de la seva utilització per efectuar estudis de les propietats fisiològiques dels teixits/òrgans/plantes en condicions ambientals ben definides, també s'utilitzin per la propagació clonal d'espècies, coneguda amb el nom de micropropagació, l'esquema general de la qual es presenta en la figura III.1³²⁰. La micropropagació és la multiplicació vegetativa *in vitro*, que proporciona una descendència clonal, i és molt important en casos d'espècies de difícil multiplicació.³²¹. Amb aquesta tècnica, s'aconsegueixen multiplicacions ràpides, que poden arribar a ser de 1 milió a l'any.

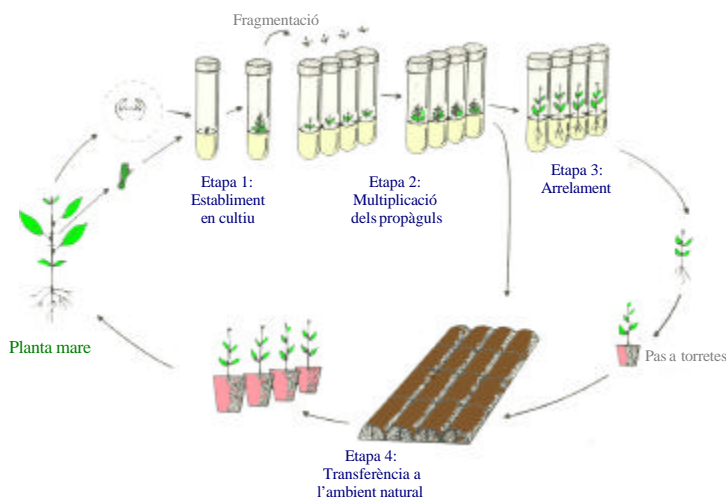


figura III.1. Representació general de la tècnica de micropropagació

³²⁰ Vieitez, AM; Ballester, A; Vieitez, ML; Sanjosef, MC; Vieitez, P; Vieitez, E. (1987). "Propagación de planata leñosas por cultivos *in vitro*". Dip. Provincial, Pontevedra

³²¹ Rout, R; Samantaray, S; Das, P. (2000). "In vitro manipulation and propagation of medicinal plants"; *Biotechnology advances*, vol 18 (2), 91-120

c) **Cultius de cal.lus**



Figura III.2. Cultiu de cal.lus de *Vitis vinifera*

Els cal.lus (figura III.2) són masses en contínua divisió d'agregats cel.lulars desorganitzats i pobrament diferenciats. Es fan créixer generalment en plaques Petri, tubs de vidre o Erlenmeyers sobre medi solidificat amb agar³²². A causa d'això, hi ha gradients químics i físics en la massa de cal.lus, ja que hi ha un aport unidireccional de nutrients (provinents del medi nutritiu, que es troba a sota) i de gasos i de llum (que provenen de damunt)³²³. En termes morfològics, poden ser molt variables: des dels cal.lus durs/compactes, en què les cèl.lules tenen un extens i fort contacte, als cal.lus "friables", consistents en petits agregats de cèl.lules pobrament associades. Aquests darrers són els més adequats per la posterior iniciació de suspensions cel.lulars³²⁴.

En general, la font de l'explant en els cultius de cal.lus són regions d'òrgans que es fereixen en la planta. Quan un òrgan és lesionat, s'indueix una resposta de reparació de la zona lesionada que consisteix a la inducció de la divisió de les cèl.lules adjacents per sellar la ferida, i posteriorment s'endureix la zona amb dipòsits de lignina, suberina, cera, etc per tal de recuperar la barrera protectora de la planta. Si es trasllada la zona ferida a un cultiu asèptic abans que la resposta comenci, es poden aconseguir els cultius de cal.lus, en què la resposta inicial de divisió pot ser estimulada i induïda per continuar indefinidament sota la influència exògena de la composició química del medi de cultiu³²³.

Els cultius de cal.lus tenen un ampli rang d'aplicacions. Poden ser utilitzats directament com a font de material cel.lular per a estudis bioquímics, per a la producció de metabòlits secundaris, o per a la regeneració de plantes i l'obtenció de variants somaclonals. Però la seva utilització més comuna és com a pas intermediari per la iniciació de cultius de suspensions cel.lulars³²⁵.

³²² Pieik, RLM. (1987). "In vitro culture of higher plants" Martins Mijhoff Publishers

³²³ Hall, RD. (1991). "The initiation and maintenance of callus cultures of carrot and tobacco"; a "Plant Tissue Culture Manual"; ed. K Lindsey; Kluwer Academic Publishers.

³²⁴ Dixon, RA. (1985). "Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures"; a "Plant cell culture: a practical approach", ed RA Dixon; IRL Press

³²⁵ Caponetti, JD. ((1996). "Nutrition of callus cultures"; a "Plant tissue culture concepts and laboratory exercises", ed RN Trigiano, DJ Gray; CRC Press

d) Suspensions cel.lulars



Figura III.3. Suspensions cel.lulars de *Vitis vinifera* varietats Gamay Freaux i Gamay Freaux tintorera, fetes créixer en erlemmeyers

Idealment, un cultiu de suspensió de cèl.lules de planta consistiria en una població de cèl.lules aï llades en suspensió, en agitació contínua, en un medi nutritiu líquid. Però generalment no s'assoleix, perquè sempre es troba un cert grau d'associació. De fet, sovint els cultius amb agregats de 0.5-1 mm de diàmetre són més assequibles, creixen perfectament i depenent de l'objectiu de la recerca són suficients per complir els requisits de treball (malgrat que, com més fina és una suspensió, major és la uniformitat del cultiu).³²⁶

Les suspensions cel.lulars més utilitzades són de tipus BATCH, en què les cèl.lules es fan créixer en un volum fix de medi líquid i es mantenen rutinàriament transferint una porció del cultiu crescut a nou medi fresc a intervals regulars (figura III.3).

En general, les cèl.lules d'una suspensió tenen vacuoles relativament grans, una fina capa de citoplasma i una paret cel.lular fina i arrodonida (figura III.4).

Les suspensions cel.lulars constitueixen una població relativament homogènia de cèl.lules que poden ser exposades ràpidament i uniforme a agents químics addicionats exògenament, i són el material a escollir per experiments bioquímics que investiguen la inducció enzimàtica^{327,328} l'expressió gènica^{329,330}, el metabolisme dels compostos addicionats³³¹ i l'aï llament i caracterització de mutants³³².

No obstant això, la principal utilització d'aquest tipus de cultius en suspensió és la producció de metabòlits secundaris d'interès industrial o terapèutic.

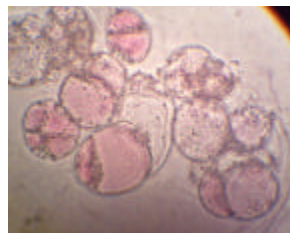


Figura III.4. Cèl.lules (x400) de *Vitis vinifera* en suspensió.

³²⁶ Hall, RD. (1991) "The initiation and maintenance of plant cell suspension cultures" a Plant Tissue Culture Manual; ed RD.Hall; Kluwer Academic Publishers

³²⁷ Dörnenburg, H; Knorr, D. (1988). "Monitoring the impact of high-pressure processing on the biosynthesis of plant metabolites using plant cell cultures", *Trends in Food Science & Technology*, vol 9 (10), 355-361

³²⁸ Anderson, M.D.; Chen, Z; and Klessig, D. (1998). "Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of PR-1 gene expression" , *Phytochemistry*, Vol 47(4) 555-566 (1998)

³²⁹ Parmentier-Line,C; Panta,G; Rowland, L. (2002). "Changes in dehydrin expression associated with cold, ABA and PEG treatments in blueberry cell cultures"; *Plant Science*, 162 (2) 273-282

³³⁰ Sobkowiak,R; Deckert,J. (2003). "Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean"; *Plant Physiology and Biochemistry*, 41 (8), 767-772

³³¹ Koehl,J; Opwald,W; Kohn, H; Elstner, EF; Heiser, I. (2003). "Different responses of two tobacco cultivars and their cell suspension cultures to quercetin, a novel elicitor from *Phytophthora quercina*"; *Plant Physiology and Biochemistry*, vol 41 (3), 261-269 (2003)

³³² Akashi, H; Kurata, H; Seki, M; Taira, K and Furusaki; S (2002). "Screening for transgenic plant cells that highly express a target gene from genetically mixed cells", *Biochemical Engineering Journal*, 10 (3), 175-182

MATERIALS I MÈTODES

Material vegetal

Els presents estudis es van efectuar amb cèl.lules de Gamay Fréaux, varietat tintorera, proporcionades gentilmente per l'equip del Dr. Latché (Toulouse). Aquest cultiu és el que s'utilitza per a pràcticament tots els estudis que es troben en la Bibliografia de suspensions cel.lulars en *Vitis vinifera*. També es va establir una línia de cultiu de cèl.lules Gamay Fréaux no tintorera. Ambdós s'obtenen a partir de cèl.lules de la polpa, però en el cas de la varietat tintorera una mutació possibilita que siguin sintetitzadores d'antocians.

Els primers cultius amb què es va treballar eren cultius de cal.lus, de manera que es procedí a l'establiment de les suspensions cel.lulars disgregant aquests cal.lus en medi líquid. Després de 3 dies, aquest medi líquid es transferia a un volum major, separant els cúmuls grans. Aquest pas és important, ja que si no les suspensions tindrien un baix grau de friabilitat, que condiciona l'homogeneïtat del cultiu.

Medi

El medi utilitzat era el Murashige-Skoog amb modificacions³³³.

<i>Macroelements de Gamborg</i>		<i>Microelements de Murashige i Skoog</i>	
Nitrat de potassi	2.5 g/l	Sulfat de manganès	10 mg/l
Sulfat d'amoni	150 mg/l	Àcid bòric	3 mg/l
Clorur de calci	150 mg/l	Sulfat de zenc	2 mg/l
Fosfat de sodi monosòdic	150 mg/l	Iodur potàssic	0.75 mg/l
Sulfat de magnesi	250 mg/l	Molibdat de sodi	0.25 mg/l
		Sulfat de coure	0.25 mg/l
		Clorur de cobalt	0.25 mg/l
Sulfat de ferro	139.5 mg/l		
EDTA	186.6 mg/l	<i>Vitamines de Morel</i>	
<i>Compostos orgànics</i>		Pantotemat de calci	1 mg/l
Sacarosa	20 g/l	Inositol	0.1 g/l
Hidrolitzat de caseïna	250 mg/l	Biotina	0.01 mg/l
		Àcid nicotínic	1 mg/l
<i>Factors de creixement</i>		Tiamina	1 mg/l
Kinetina	0.2 mg/l	Piridoxina	1 mg/l
Àcid alfa-naftalenacètic	0.1 mg/l		

El pH s'ajustava a 6.0 amb KOH 2M. En el cas del medi sòlid, es suplementava el medi amb una concentració de 7 g/l d'agar bacteriològic americà.

³³³ Gamborg, O. (1991). "Media preparation"; a Plant Tissue Culture Manual; ed Robert D.Hall; Kluwer Academic Publishers

Condicions físiques

Les suspensions cel.lulars es mantenen a temperatura ambient (ca 25 °C), amb un fotoperíode de 12 hores a 6000 lux, i en agitació constant de 150 rpm.

Per mantenir els cultius de cal.lus, es transfereix asèpticament una petita porció del cultiu en un medi fresc. El subcultiu s'estableix cada quatre setmanes.

En canvi, les suspensions cel.lulars, en presentar un creixement molt més ràpid, requereixen d'un canvi de medi setmanal. Es transfereix asèpticament 1/5 del volum del cultiu inicial en medi fresc. Convé dir que, a causa dels treballs de diversos autors, que senyalen que les transferències successives acaben fent que es perdin les condicions inicials de les suspensions, de forma periòdica es torna a establir la suspensió cel.lular a partir del cultiu de cal.lus.

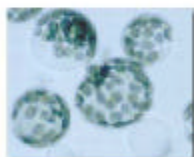
REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. **Chawla, HS.** (2002). "Introduction to plant biotechnology". 2nd edition, Science Publishers, Inc.
2. **Hall, RD.** (1999). "Plant cell culture protocols"; Humana Press
3. **Ignacimuthu, S.** (1997). "Plant Biotechnology", Science Publishers, inc.
4. **Gautheret, RJ.** (1985). "History of plant tissue and cell culture: a personal account"; a "Cell culture and somatic cell genetic of plants, vol 2, Ed . Vasil. Academic Press, Inc.
5. **Schwarz, O; Beauty, RM.** (1996). "Propagation from nonmeristematic tissues – organogenesis". A "Plant Tissue Culture Concepts & Laboratory exercises"; Ed. Trigiano, RN; Gray, DJ. CRC Press
6. **Chawla, HS.** (2002) "Transgenics in crop improvement" a "Introduction to plant biotechnology". Second edition, Science Publishers, Inc.
7. **Vieitez, AM; Ballester, A; Vieitez, ML; Sanjosé, MC; Vieitez, P; Vieitez, E.** (1987). "Propagación de planata leñosas por cultivos *in vitro*". Dip. Provincial, Pontevedra
8. **Rout, R; Samantaray, S; Das, P** (2000). "*In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants"; *Biotechnology advances*, vol 18 (2), 91-120
9. **Pieik, RLM.** (1987). "*In vitro* culture of higher plants" Martins Mijhoff Publishers
10. **Hall, RD.** (1991). "The initiation and maintenance of callus cultures of carrot and tobacco"; a "Plant Tissue Culture Manual"; ed. K Lindsey; Kluwer Academic Publishers.
11. **Dixon, RA.** (1985). "Isolation and maintenace of callus and cell suspension cultures"; a "Plant cell culture: a practical approach", ed RA Dixon; IRL Press
12. **Caponetti, JD.** ((1996). "Nutrition of callus cultures"; a "Plant tissue culture concepts and laboratory exercises", ed RN Trigiano, DJ Gray; CRC Press
13. **Hall, RD.** (1991) "The initiation and maintenance of plant cell suspension cultures" a Plant Tissue Culture Manual; ed RD.Hall; Kluwer Academic Publishers
14. **Dörnenburg, H; Knorr, D.** (1988). "Monitoring the impact of high-pressure processing on the biosynthesis of plant metabolites using plant cell cultures", *Trends in Food Science & Technology*, vol 9 (10), 355-361
15. **Anderson, M,D.; Chen, Z; and Klessig; D.** (1998). "Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of PR-1 gene expression" , *Phytochemistry*, Vol 47(4) 555-566 (1998)
16. **Parmentier-Line, C; Panta, G; Rowland, L.** (2002). "Changes in dehydrin expression associated with cold, ABA and PEG treatments in blueberry cell cultures"; *Plant Science*, 162 (2) 273-282
17. **Sobkowiak, R; Deckert, J.** (2003). "Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean"; *Plant Physiology and Biochemistry*, 41 (8), 767-772
18. **Koehl, J; Obwald, W; Kohn, H; Elstner, EF; Heiser, I.** (2003). "Different responses of two tobacco cultivars and their cell suspension cultures to quercinin, a novel elicitor from *Phytophthora quercina*"; *Plant Physiology and Biochemistry*, vol 41 (3), 261-269 (2003)
19. **Akashi, H; Kurata, H; Seki, M; Taira, K and Furusaki S** (2002). "Screening for transgenic plant cells that highly express a target gene from genetically mixed cells", *Biochemical Engineering Journal*, 10 (3), 175-182
20. **Gamborg, O.** (1991). "Media preparation"; a Plant Tissue Culture Manual; ed Robert D.Hall; Kluwer Academic Publishers

Capítol 5



INFLUÈNCIA DE DIFERENTS FACTORS EN LA SÍNTESI D'ANTOCIANS EN CULTIUS IN VITRO



5.1) INTRODUCCIÓ

Les plantes constitueixen una via de subministrament de carbohidrats, proteïnes i greixos, principalment en l'àmbit de l'alimentació. Però a més, també constitueixen una valuosa font d'un rang molt ampli de metabòlits secundaris, que són utilitzats com a productes farmacèutics, agroquímics, aromes, colorants, biopesticides i additius alimentaris. En termes globals, el 80% dels aproximadament 30 000 productes naturals coneguts són d'origen vegetal.³³⁴

Els cultius cel·lulars són una estimable font alternativa a la planta completa per a l'obtenció de metabòlits d'alt valor afegit. En ser cèl·lules indiferenciades totipotents, cadascuna d'elles reté tota la informació genètica i per tant és capaç de produir tot el ventall de productes químics que sintetitzava la planta sencera. A més, presenta l'avantatge que els cultius cel·lulars no es veuen afectats per les limitacions geogràfiques, estacionals i climàtiques³³⁵.

D'aquesta manera, s'han utilitzat cultius cel·lulars per l'obtenció de diversos compostos, que es recullen en la taula 5.1:

COMPOSTOS FENÒLICS	ALCALOIDES ³³⁶	TERPENOIDES ³³⁷	QUINONES ³³⁸	ESTEROIDES ³³⁴
Antocians	Acridines	Carotens	Antroquinones	Glicòsids cardíacs
Estilbens	Betalàines	Monoterpens	Benzoquinones	Pregnenolona
Tanins ³³⁹	Quinolizidines	Sesquiterpens	Naftoquinones	
Flavanols ³⁴⁰	Furonoquinones	Diterpens		
Àcids fenòlics ³⁴¹	Isoquinolines	Triterpens		
Lignines	Purines			
	Piridines			

Taula 5.1. Metabòlits d'interès obtinguts mitjançant suspensions cel·lulars vegetals

³³⁴ Ramachandra, S., Ravishankar, G.A. (2002). "Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites". *Biotechnology Advances* 20 101-153

³³⁵ DiCosmo, F.; Misawa, M. (1995). "Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production". *Biotechnology advances*, 13 (3): 425-453

³³⁶ Wink, M. (1987). "Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids"; a "Cell culture and somatic cell genetics of plants", ed F Constabel i IK Vasil; Academic Press

³³⁷ Banthorpe, DK. (1988). "Monoterpenes and sesquiterpenes"; a "Cell culture and somatic cell genetics of plants. Volume 5: Phytochemicals in plant cell cultures"; Ed F. Constabel; IK Vasil; Academic Press

³³⁸ Koblitz, H. (1988). "Anthraquinones"; a "Cell culture and somatic cell genetics of plants. Volume 5: Phytochemicals in plant cell cultures"; Ed F. Constabel; IK Vasil; Academic Press

³³⁹ Yazaki, K.; Yoshida, T.; Okuda, T. (1991). "Tannin production in cell suspension cultures of *Geranium thunbergii*". *Phytochemistry*, 30 (2): 501-503

³⁴⁰ Prusky, D.; Hamdan, H.; Ardi, R.; Keen, NT. (1996). "Induction of biosynthesis of epicatechin in avocado suspension cells treated with an enriched CO₂ atmosphere". *Physiological and molecular plant pathology*, 48, 171-176

Cal tenir present que els metabòlits secundaris es caracteritzen per la seva baixa abundància relativa (aproximadament de menys del 1% del carboni total de la planta)³⁴². Per tant, convé buscar estratègies per augmentar-ne la productivitat en els cultius. Per a això, es busca provocar condicions d'estrès en el cultiu, la qual cosa s'aconsegueix incidint sobre el medi nutrient o les condicions ambientals. Les situacions d'estrès (canvis en la pressió osmòtica, temperatura, condicions de pH, toxines, infeccions virals, radiació UV) canvien els patrons cel·lulars de proteïnes, de manera que, en general, promouen les vies de metabolisme secundari enfront de les de metabolisme primari i conseqüentment, condueixen a la formació de metabòlits secundaris.

Suspensions cel·lulars productores d'antocians

Els antocians són uns dels metabòlits secundaris més presents en els cultius *in vitro*, a causa dels seus possibles usos com a colorants alimentaris, i com a preparats farmacèutics. En el primer camp, s'apliquen en refrescos, melmelades, o productes de pastisseria. Quant als seus efectes terapèutics, com succeeix amb altres compostos fenòlics, tenen activitats quimiopreventives antimutagèniques³⁴³, antihipertensives, antioxidatives³⁴⁴, i de reducció de lesions hepàtiques³⁴⁵.

S'han establert cultius productors d'antocians en patata³⁴⁶, rosa³⁴⁷, pastanaga³⁴⁸, maduixa³⁴⁹ i *Vitis*³⁵⁰, a més d'altres espècies^{351,352,353,354,355}. Per a cada tipus, la composició antociànica és diferent.

³⁴¹ Funk, C; Brodelius, PE. (1992). "Phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia* Andr. IV. Induction of vanillic acid formation". *Plant Physiol* 99, 256-262

³⁴² Bourgaud, F.; Gravot, A; Milesi, S.; Gontier, E. (2001). "Production of plant secondary metabolites: a historical perspective". *Plant Science* 161: 839-851

³⁴³ Castonguay, A; Gali, H; Perchellet, E; Gao, X; Boukharta, M; Jalbert, G; Okuda, T; Yoshida, T; Hatano, T; Perchellet, JP. (1997). "Antitumorogenic and antipromoting activities of ellagic acid, ellagitannins, and oligomeric anthocyanin and procyanidin". *Int. J. Oncol.* 10, 367-373

³⁴⁴ Espin, JC; Soler-Rivas, C; Winchers, HJ; Garcia-Viguera, C. (2000). "Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff". *J Agric Food Chem*, 48, 1588-1592

³⁴⁵ Magnuson, BA. (2002). "Evidence of cancer inhibition by anthocyanin-rich extracts". a I Koneczak-Islam (ed.), Proceedings of the International Workshop on anthocyanins research and development in anthocyanins, Australia, p 23.

³⁴⁶ Koneczak-Islam, I; Okuno, S.; Yoshimoto, M; Yamakawa, O. (2003); "Composition of phenolics and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture". *Biochemical Engineering Journal*, 14 (3): 155-161

³⁴⁷ R. Filippini, R. Caniato, A. Piován and E. M. Cappelletti. (2003). "Production of anthocyanins by *Catharanthus roseus*". *Fitoterapia*, 74 (1-2), 62-67

³⁴⁸ Ozeki, Y. (1996). "Regulation of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultured cells". *J Plant Res*, 109: 343-351

³⁴⁹ Wei, Z; Seki, M; Furusaki, S.; Middelberg, APJ. (1998). "Anthocyanin Synthesis, Growth and Nutrient Uptake in Suspension Cultures of Strawberry Cells". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86 (1), 72-78

³⁵⁰ Hirasuna, T.J; Shuler, M.L.; Lackney, VK; Spanswick, R.M. (1991). "Enhanced anthocyanin production in grape cell cultures". *Plant Science*, 78 (1): 107-120

³⁵¹ Meyer, J.E; Pépin, MF; Smith, M.A. (2002). "Anthocyanin production from *Vaccinium pahalae*: limitations of the physical microenvironment". *Journal of Biotechnology*, 93 (1), 45-57

³⁵² Callebaut, A.; Hendrickx, G.; Voets, A. M; Motte, J. C.. (1990). "Anthocyanins in cell cultures of *Ajuga reptans*". *Phytochemistry*, 29(7): 2153-2158

³⁵³ Zhong J, Yoshida, T. (1993). "Effects of temperature on cell growth and anthocyanin production in suspension cultures of *Perilla frutescens*". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76 (6), 530-531

³⁵⁴ Wellmann, E; Hrazdina, G; Grisebach, H; (1976) "Induction of anthocyanin formation and of enzymes related to its biosynthesis by UV light in cell cultures of *Haplopappus gracilis*". *Phytochemistry*, 15(6): 913-915

La majoria d'aquests cultius són heterogenis, on creixen simultàniament cèl·lules pigmentades i cèl·lules no pigmentades³⁵⁶. Totes tenen –en major o menor mesura– la capacitat de sintetitzar antocians³⁵⁷ però aquesta no és expressada en les cèl·lules no pigmentades³⁵⁸. Això fa que la freqüència de les cèl·lules pigmentades pugui ser molt baixa, ja que la pigmentació prové d'un procés de citodiferenciació³⁵⁹.

Per obtenir uns rendiments adequats d'antocians, la bibliografia proposa solucions diverses. Molts investigadors augmenten la productivitat seleccionant línies cel·lulars potencialment productives. Per altra banda, la biosíntesi està condicionada també per factors físics i químics del cultiu, com són la mida de l'inòcul, el pH, la temperatura, l'ús d'el·licitors, la llum, l'estrès hídric, o la font de nitrogen.

En el cas concret de les suspensions cel·lulars de *Vitis vinifera*, s'ha constatat que, a més d'antocians, també són una font valuosa d'altres compostos, com estilbens³⁶⁰ o catequines³⁶¹, que en moltes ocasions han estat descrits com a compostos biològicament actius. En aquest sentit, un ampli camp d'aplicació dels cultius *in vitro* contempla l'obtenció en quantitats suficients d'aquests compostos per tal de disposar, amb el fi d'efectuar estudis de bioactivitat³⁶², d'un material de partida suficient i econòmic que fins i tot pot obtenir-se marcat si es subministren precursors radioactius en el medi³⁶³.

Per altra banda, les suspensions cel·lulars han permès l'aïllament i caracterització de nombroses activitats enzimàtiques difícilment aïllables *in vivo*^{364,365,366}, o l'elucidació dels mecanismes pels quals actuen els atacs fúngics sobre el raïm^{367,368}.

³⁵⁵ Kakegawa, K; Hattori, E; Koike, K; and Takeda, K. (1991). "Induction of anthocyanin synthesis and related enzyme activities in cell cultures of *Centaurea cyanus* by UV-light irradiation". *Phytochemistry*, 30 (7): 2271-2273

³⁵⁶ Hall, RD; Yeoman, MM. (1986). "Temporal and spatial heterogeneity in the accumulation of anthocyanins in cell cultures of *Catharanthus roseus*". *J Exp Botany*, 37, 486-498

³⁵⁷ Hall, RD; Yeoman, MM. (1987). "Intercellular and intercultural heterogeneity in secondary metabolite accumulation in cultures of *Catharanthus roseus* following cell line selection". *J Exp Botany*, 38(193):1391-1398

³⁵⁸ Marshall, Smith. MA; Lee, C; Deroles, S; Davies, KM. (2002). "Differential gene expression between pigmented and non-pigmented cell culture lines of *Daucus carota*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70:91-97

³⁵⁹ Seitz, HU; Hinderer, W. (1988). "Anthocyanins"; a "Cell culture and somatic cell genetics of plants. Volume 5: Phytochemicals in plant cell cultures"; Ed F. Constabel; IK Vasil; Academic Press

³⁶⁰ Waffo, T; Decendit, A; Vercauteren, J; Defieux, G; Méillon, JM. (1996). "Trans-resveratrol-3-O-β-glucoside (piceid) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*". *Phytochemistry*, 42(6), 1591-1593

³⁶¹ Decendit, A; Gopal, K; Waffo, P; Defieux, G; Badoc, A; Méillon, JM. (1996). "Anthocyanins, catechins, condensed tannins and piceid production in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures". *Biotechnology letters*, 6: 659-662

³⁶² Waffo, P; Fauconneau, B; Défieux, G; Huguet, F; Vercauteren, J; Méillon, JM. (1998). "Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures". *J Nat Prod*, 61: 655-657

³⁶³ Krisa, S; Waffo, P; Décendit, A; Defieux, G; Vercauteren, J; Méillon, JM. (1999). "Production of 13C-labelled anthocyanins by *Vitis vinifera* cell suspension cultures". *Phytochemistry*, 51: 651-656

³⁶⁴ Bailly, C; Cormier, F; Do, CB. (1997). "Characterization and activities of S-adenosyl-L-methionine: cyanidin 3-glucoside 3'-O-methyltransferase in relation to anthocyanin accumulation in *Vitis vinifera* cell suspension cultures". *Plant Science* 122:81-89

³⁶⁵ Lofty, S; Fleuriot, A; Ramos, T; Macheix, JJ. (1989). "Biosynthesis of phenolic compounds in *Vitis vinifera* cell suspension cultures: study on hydroxycinnamoyl CoA:ligase". *Plant Cell Reports*, 8:93-96

³⁶⁶ Suzuki, N; Sakuta, M; Shimizu, S; Komamine, A. (1995). "Changes in the activity of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase in suspension-cultured cells of *Vitis*". *Physiologia Plantarum*, 94: 591-596

³⁶⁷ Deswarte, C; Canut, H; Kläbe, A; Roustan, JP; Fallot, J. (1996). "Transport, cytoplasmic accumulation and mechanism of action of the toxin eutypine in *Vitis vinifera* cells". *J Plant Physiol*, 149: 336-342

5.2) OBJECTIUS

1. Estudiar la influència de diferents factors sobre la síntesi d'antocians en cultius *in vitro*, per tal d'obtenir unes condicions de treball que siguin adequades per efectuar-ne estudis metabòlics.
2. Avaluar els canvis en la composició antociànica que provoquen els diferents agents.

5.3) MATERIALS i MÈTODES

Els medis de cultiu es preparaven seguint les condicions descrites en l'apartat general de cultius cel·lulars. Les particularitats de cada experiment s'han indicat en l'apartat de resultats i discussió, per facilitar la lectura de la memòria.

Determinacions

Pes fresc: Es filtra un volum de 5 ml de suspensió, i es renta amb aigua destil·lada per eliminar restes de sucres. Es pesen les cèl·lules.

Pes sec: Es transfereix un volum de cèl·lules a un filtre sec i tarat, es deixa 24 hores a 60°C i es determina el pes sec per diferència de pes.

Nombre de cèl·lules: Cal un tractament previ amb triòxid de crom al 70% per disgregar els cúmuls de cèl·lules. S'incuba 1 hora a 60°C, s'agita vigorosament i s'efectua el comptatge en una cambra de Neubauer.

Antocians totals: Es pesa una quantitat de 100 mg de material fresc i s'aplica 1 ml de solució d'etanol absolut al 80% amb HCl 1 N. Es llegeix l'absorbància a 535 nm al cap d'un dia. Pels càlculs s'aplica el coeficient d'extinció molar de la peonidina-3-glucòsid ³⁶⁹(15100 l/mol*cm), que és l'antocià majoritari en aquests cultius.

Antocians individuals: L'extracció i la quantificació dels antocians per HPLC s'efectua seguint les mateixes directrius que s'han exposat en el capítol 1.

Anàlisi de glucosa, fructosa, sacarosa: S'utilitza el kit de determinació enzimàtic de Roche.

³⁶⁸ Morales, M; Bru, R; García-Carmona, F; Ros-Barceló, A; Pedreño, MA. (1998). "Effect of dimethyl- β -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus ampelinus*". *Plant, cell, tissue and organ culture*, 53:179-187

³⁶⁹ Cabrita, L; Fossen, T; Andersen, MO. (2000). "Colour and stability of the six common anthocyanidin-3-glucosides in aqueous solutions". *Food Chem.* 68: 101-107

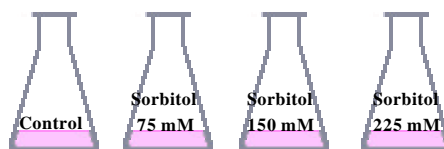
5.4) RESULTATS I DISCUSSIÓ

I. Factors que influeixen en la síntesi d'antocians totals

5.4.1. Efecte de l'estrès osmòtic

L'aigua és essencial com a medi per a les activitats bioquímiques de la cèl·lula. Un dels recursos més utilitzats en suspensions cel·lulars per augmentar la productivitat de metabòlits d'interès és afegir al medi de cultiu un agent osmòtic. L'estat hídric de la cèl·lula dependrà de l'energia lliure de les seves molècules d'aigua, que constitueix el seu potencial hídric. En una cèl·lula, aquest potencial consisteix bàsicament en el potencial de turgència i el potencial osmòtic. Mentre mantenen una pressió de turgència positiu, les cèl·lules han de regular el seu potencial osmòtic per ajustar-se al potencial osmòtic extern³⁷⁰. D'aquesta manera, si s'imposen potencials osmòtics elevats en el medi de creixement, s'altera l'activitat cel·lular, i això pot conduir a la síntesi de metabòlits secundaris. Els soluts més freqüentment utilitzats per incrementar la pressió osmòtica del medi són els alcohols de glúcids (poliols) com el manitol, el sorbitol o el polietilenglicol.

Per avaluar la incidència de l'estrès osmòtic sobre el creixement i la producció d'antocians, es va treballar en el medi base de Murisahge-Skoog (80 ml), al qual es va afegir sorbitol en condicions creixents (75 mM, 150 mM, 225 mM) en erlenmeyers de 250 ml. L'elecció del sorbitol com a agent d'estrès osmòtic es fonamentà en la seva condició de no-metabolitzable per les cèl·lules, en el sentit que és metabòlicament més inert que altres sucres³⁷¹, de manera que el seu efecte es manifestarà principalment com a agent d'increment de l'osmolaritat del medi.

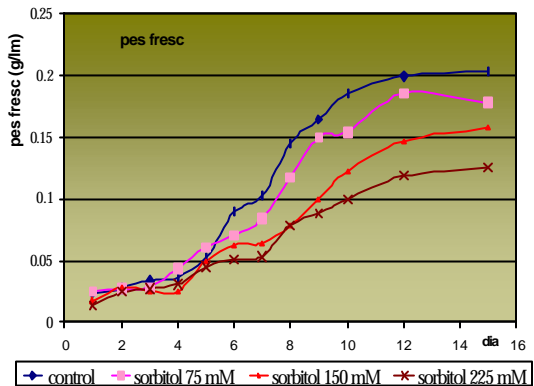


Es va determinar l'evolució en el pes fresc, el pes sec i l'acumulació d'antocians per les diferents condicions.

³⁷⁰ Xiong, L. Zhu, JK. (2002). "Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress". *Plant, Cell and Environment*, 25: 131-139

³⁷¹ Wang, HL; Lee, PD; Liu, LF; Su, JC. (1999). "Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures". *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40:219-225

1.1) Pes fresc



Gràfic 5.4.1.1. Evolució del pes fresc dels cultius en diferents situacions d'estrès hídric

Les corbes de creixement dels cultius vegetals presenten una fase de latència, en què les cèl·lules s'adapten a les noves condicions del medi, una etapa de creixement exponencial, en què hi ha una contínua divisió mitòtica, i una darrera fase estacionària en què comença la mort cel·lular³⁷². Aquest comportament s'observa en el gràfic 5.4.1.1, que recull la progressió del pes fresc de cèl·lules al llarg del cultiu, per a diferents

concentracions de sorbitol en el medi. S'observa que el creixement cel·lular en les condicions control va començar al 4t dia i va mostrar el comportament sigmoïdal típic. En anar augmentant l'osmolaritat del medi, es retardava l'inici de la fase exponencial, de manera que en unes concentracions de 75 i 150 mM de sorbitol aquesta etapa no s'iniciava fins al 5è dia, i en el cas de les concentracions de 225 mM no s'apreciava una fase clara fins al 7è dia.

En condicions d'estrès osmòtic, la densitat del cultiu està clarament disminuïda respecte les condicions control, de manera proporcional a l'estrès imposat en el medi. Es troben diferències significatives en el creixement entre cadascuna de les condicions d'estrès aplicades. Això resulta d'especial interès a l'hora de seleccionar el que s'anomena medi de producció dels metabòlits secundaris, ja que s'ha d'arribar a un compromís entre la síntesi i la capacitat de creixement del cultiu.

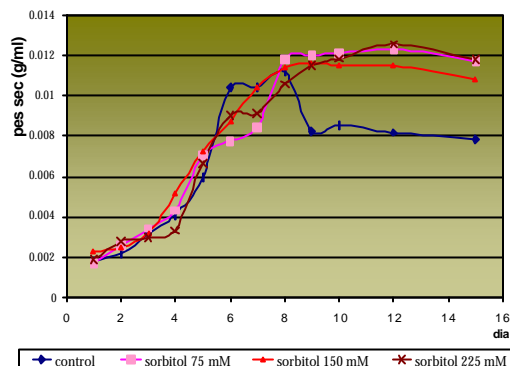
1.2) Pes sec

En la gràfica del pes sec (gràfica 5.4.1.2) s'aprecia també el comportament sigmoïdal típic, però en aquest cas no hi ha diferències entre les corbes de creixement en condicions control i en condicions estressades. En canvi, en la fase estacionària en situació control, hi ha una disminució clara en el pes sec, que correspondria a una fase de mortalitat.

Els resultats indiquen que el contingut d'aigua de les cèl·lules és clarament diferent en una situació control respecte una situació amb estrès osmòtic. En situació control, el volum cel·lular és major, i per això el pes fresc resulta més elevat, però una bona part d'aquest pes

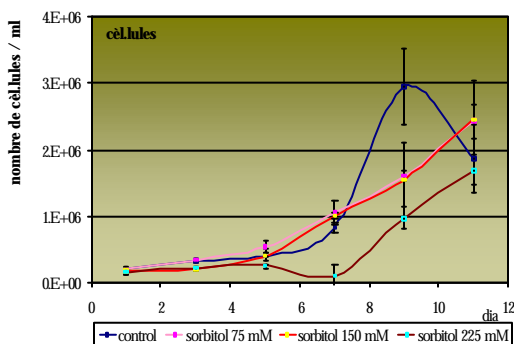
³⁷² King, PJ; Street, HE. (1977). "Growth patterns in cell cultures"; a "Plant tissue and cell culture"; edited by HE Street; Blackwell Scientific Publications

fresc l'aporta l'aigua que contenen les cèl.lules. Això fa que els pesos secs s'igualin. Cal tenir en compte que en les situacions d'estrès a què està sotmès el medi de cultiu, la diferència de concentració salina entre el medi intracel.lular i extracel.lular és molt forta, de manera que un transport d'aigua dintre de la cèl.lula suposaria un gran gast energètic per poder vèncer el gradient. En canvi, en les cèl.lules control, els principals soluts del medi (concretament, la font de carboni: la sacarosa) van desapareixent en ser metabolitzats per al creixement cel.lular, de manera que desapareix aquest estrès i poden incorporar majors quantitats d'aigua.



Gràfic 5.4.1.2. Evolució del pes sec en cultius en diferents situacions d'estrès hídric

1.3) Nombre de cèl.lules



Gràfic 5.4.1.3. Evolució del nombre de cèl.lules totals en cultius en diferents situacions d'estrès hídric

Les gràfiques de pes fresc i pes sec plantejaven un dubte: si el pes sec era similar en totes les condicions, podria succeir que en realitat les diferències en el pes fresc no corresponguessin a un major nombre de cèl.lules, sinó simplement a un major contingut d'aigua de les mateixes.

En alguns protocols s'utilitza el comptatge de cèl.lules com a mesura de creixement en suspensions cel.lulars³⁷³. Però és necessari vèncer l'inconvenient de

l'elevat grau d'agregació que presenten les cèl.lules en aquests tipus de cultius. Per a això, la metodologia més comunament utilitzada en la bibliografia és el tractament amb triòxid de crom per trencar aquests cúmuls. En la gràfica 5.4.1.3 es presenta el resultat de mesures per triplicat del nombre de cèl.lules comptades en una cambra de Neubauer. Es pot observar que les condicions més dràstiques d'estrès, que són les de sorbitol 225 mM, provoquen un menor nombre de cèl.lules en el medi, mentre que en les condicions control hi ha una

³⁷³ Stepan-Sarkissian, G; Grey, D. (1990). "Growth and determination and medium analysis" a "Methods in Molecular Biology. Plant Cell and Tissue Culture, vol 6; JW Pollard & JM Walker; The Humana Press

major proliferació cel.lular. Per tant, podem concloure que les situacions d'estrès inhibeixen efectivament la divisió mitòtica i la multiplicació cel.lular.

No obstant això, els resultats presenten un error estàndard molt gran, ja que el tractament amb el triòxid de crom no acaba de disgregar els cúmuls i això dificulta l'homogeneïtat de la mostra en el moment de fer el comptatge, com es pot veure en la figura 5.4.1. Per aquest motiu es va decidir descartar aquesta metodologia com a mesura de creixement. De fet, la majoria de grups que treballen amb cultius cel.lular refereixen els seus resultats respecte a pesos (frescs o secs).

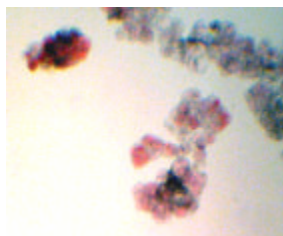
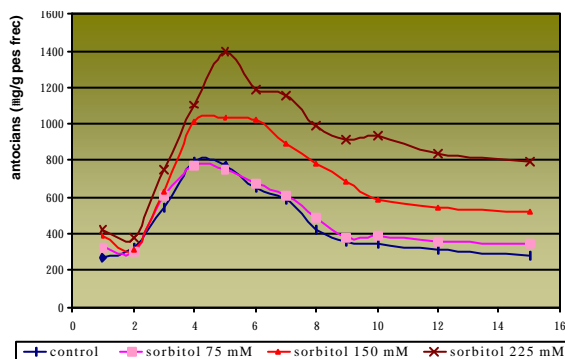


Figura 5.4.1. Observació de les cèl.lules de suspensions cel.lulars de *Vitis vinifera* al microscopi òptic (100 augments)

1.4) Antocians

Pel que fa a la producció d'antocians pel cultiu, es pot observar (gràfic 5.4.1.4) que hi ha un increment en la quantitat referida al pes fresc fins arribar a un màxim en el moment que comença el creixement exponencial, a partir del qual es multiplica la massa cel.lular, la cèl.lula entra en divisió contínua, i la relació metabòlit secundari/pes fresc va disminuint. La concentració d'antocians en un medi estressat arribava als 1400 µg/g pes fresc, que corresponen a aproximadament el doble de les condicions no estressades.



Gràfic 5.4.1.4. Evolució del nombre de cèl.lules totals en cultius en diferents situacions d'estrès hídric

De fet, els darrers dies la coloració de les cèl.lules en condicions control deixa de ser pigmentada per ser blanca, en un efecte que es manifesta en major grau en les situacions menys estressades. Si es deixen passar uns dies, la coloració passa a ser marronosa, característica dels compostos fenòlics oxidats.³⁷⁴

³⁷⁴ Cormier, F; Couture, R; Do, CB; Pham, TQ; Tong, VH. (1997). "Properties of anthocyanins from grape cell culture"; *J. Food Science*, 62 (2), 246-248

Discussió

Diversos treballs en què s'utilitzen agents com la sacarosa o el manitol estableixen l'acumulació d'antocians en situacions d'estrès osmòtic. En el cas de la sacarosa, en ser un substrat metabolitzable per la cèl.lula, el potencial osmòtic canvia al llarg dels dies de cultiu. Do i Cormier³⁷⁵ mesuren el potencial osmòtic de la solució i observen un increment en els primers dies, atribuïble a l'augment de sucres reductors provinents de la hidròlisi de la sacarosa, i una disminució a partir que les cèl.lules comencen a metabolitzar-los. El mateix equip³⁷⁶ posa de manifest que en les condicions d'estrès es produeix un augment del nombre de cèl.lules pigmentades, en un procés de dediferenciació d'aquestes cèl.lules no productores, de tal manera que l'acumulació d'antocians estaria promoguda per un increment del nombre de cèl.lules que n'expressen les vies. Alguns autors sostenen la relació entre la producció d'antocians i la interrupció de la divisió cel.lular, que menaria a una màxima acumulació en la fase estacionària³⁷⁷. A la vista de l'oposició dels nostres resultats i els d'altres autors a aquestes hipòtesis, l'afirmació sembla al menys, discutible, tot i poder dependre de les condicions del cultiu i de l'explant utilitzat.

Tholakalabavi *et al.*³⁷⁸ en suspensions de pollancre posen de relleu que en les situacions d'estrès osmòtic causades per glucosa o manitol, lligat a l'acumulació d'antocians hi ha un increment de l'activitat deaminasa, que és la que condueix a la producció de compostos fenòlics. A més, també observen que les cèl.lules estressades acumulen altres soluts com sucres, aminoàcids, i àcids orgànics. Tot això sembla ser conseqüència del menor volum cel.lular que assoleixen les cèl.lules en condicions d'alta pressió osmòtica.

El comportament que s'observa en general és que, en augmentar el contingut de sacarosa en els medis, disminueix el pes fresc i augmenta l'acumulació d'antocians^{375, 379}. Tot i així, la productivitat no augmenta en el mateix sentit, ja que la inhibició del creixement pot representar una producció global neta d'antocians inferior. Per tant, quan es pretén l'obtenció industrial d'antocians, són aconsellables medis amb un estrès no tan rigorós, ja que en situacions estressants excessives té lloc una prematura mort cel.lular i un emmarroniment dels cultius per acció oxidativa.

³⁷⁵ Do, CB; Cormier, F. (1990). "Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions". *Plant cell Reports*, 9:143-146

³⁷⁶ Cormier, F; Crevier, H; Do, CB. (1990) "Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension.". *Can J Bot*, 68: 1822-1825

³⁷⁷ Kakegawa, K; Suda, J; Sugiyama, M; Komamine, A. (1995). "Regulation of anthocyanin biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis* in relation to cell division". *Physiologia plantarum* 94:661-666

³⁷⁸ Tholakalabavi, A; Zwiazek, J; Thorpe, T. (1997). "Osmotically-stressed poplar cell cultures: anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition". *J. Plant Physiol*, 151: 489-496


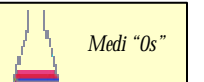

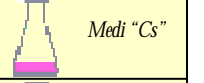
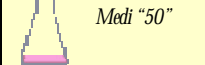
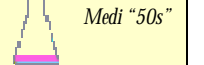
³⁷⁹ Mori, T; Sakurai, M. (1995). "Effects of riboflavin and increased sucrose on anthocyanin production in suspended strawberry cell cultures". *Plant Science* 110: 147-153

Com ja s'ha comentat en el bloc 1 de la present tesi, també *in vivo* es dona l'efecte positiu de l'estrès hídric sobre la síntesi d'antocians. En aquest sentit, la disponibilitat de suspensions cel·lulars pot ser de molta utilitat a l'hora d'investigar a nivell molecular i enzimàtic les raons d'aquest comportament.

5.4.2) Efecte de l'estrès nitrogenat

La composició mineral dels medis de cultiu de suspensions cel·lulars vegetals pot ser complexa. D'entre els seus components, la font de nitrogen és un dels que ha acaparat més atenció respecte al seu efecte en la síntesi de productes secundaris. El nitrogen pot ser subministrat en forma de nitrat o sals d'amoni, o en forma de compostos orgànics (aminoàcids, urea, hidrolitzat de caseïna). La limitació en el subministrament de nitrogen a les cèl·lules cultivades tendeix a suprimir-ne el creixement i, en alguns sistemes, afavorir la síntesi de productes secundaris. S'ha comprovat que el ratio amoni/nitrat i els nivells totals de nitrogen afecten marcadament la producció d'aquests metabòlits secundaris³³⁴.

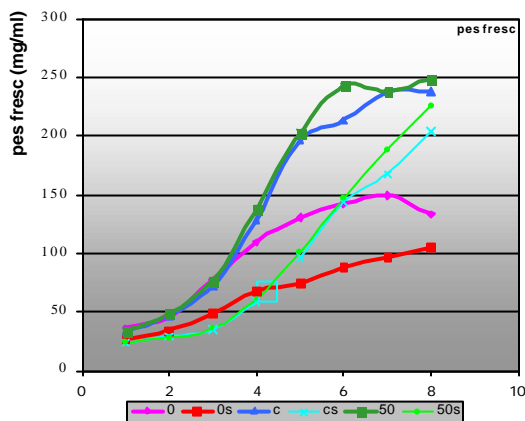
Per avaluar l'efecte de les carències de nitrogen, es va decidir comparar les situacions control amb situacions de carència de nitrat i amb situacions d'excés de nitrat. A més, es va afegir el factor d'estrès hídric en concentracions 150 mM, a partir de l'experiment anterior. D'aquesta manera, es van establir 6 condicions de treball:

	0 mM sorbitol	150 mM sorbitol
0 g/l nitrat	 Medi "0"	 Medi "0s"
2,5 g/l nitrat	 Medi "C"	 Medi "Cs"
5 g/l nitrat	 Medi "50"	 Medi "50s"

En els medis "0" i "0s", en què no s'afegeix nitrat, es va suplementar el medi amb sulfat potàssic per tal d'equilibrar la concentració de ions respecte la solució control ("C") i d'aquesta manera corregir el diferent estrès hídric que suposa la diferent concentració de nitrat de la solució control respecte la condició d'estrès nitrogenat.

Es van efectuar les determinacions de pes fresc, pes sec i antocians totals.

1) Pes fresc



Gràfic 5.4.2.1. Evolució del pes fresc dels cultius en diferents situacions d'estrès nitrogenat

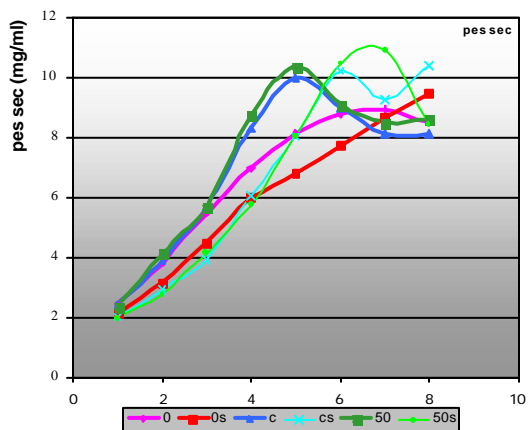
nitrogenat i estrès hídric ("0s"), fins i tot no s'estableix la corba de creixement sigmoïdal típica, sinó una fase contínua i lenta de creixement.

2) Pes sec

Els cultius no presenten tantes diferències quant als pesos secs (gràfica 5.4.2.2). S'aprecia que les condicions sense estrès hídric ("0", "C", "50") presenten la fase exponencial amb una anticipació d'un dia respecte les condicions estressades. Per altra banda, el creixement global en la situació en carència de nitrat ("0") és significativament menor a partir del començament de la fase exponencial del creixement, com era d'esperar, ja que el nitrogen és essencial per al creixement i la divisió cel·lular.

En la gràfica de pes fresc (gràfica 5.4.2.1) es pot apreciar, com en l'experiment anterior, que les condicions d'estrès osmòtic ("0s", "Cs", "50s") presenten un creixement menor que les respectives condicions control ("0", "C", "50") per tots tres casos.

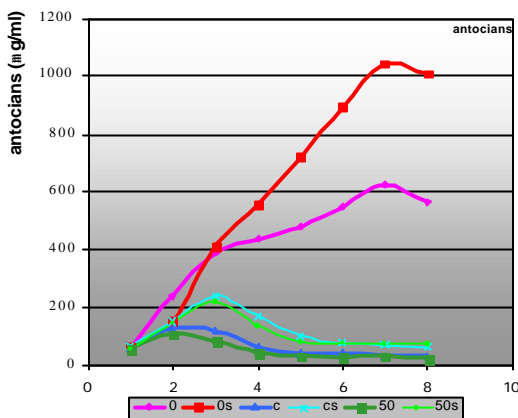
Pel que fa a la resposta en relació a la font nitrogenada, s'aprecia clarament que la carència de nitrat inhibeix dràsticament el pes fresc de les cèl·lules, que tenen una fase exponencial molt menys acusada en el cas d'estrès nitrogenat ("0"). En les situacions més extremes, que són les d'estrès



Gràfic 5.4.2.2. Evolució del pes fresc dels cultius en diferents situacions d'estrès hídric

3) Antocians

Quant a la producció d'antocians (gràfic 5.4.2.3), la síntesi està molt incrementada en les situacions d'absència de nitrat en el medi ("0", "0s"). El fet que el metabolisme primari i el creixement estiguin inhibits en aquestes condicions estimula clarament el metabolisme secundari. En aquest cas, a diferència del que succeï a en el de l'estrès osmòtic, el màxim no s'assoleix en el moment previ a l'inici de la fase exponencial, sinó que va augmentant linealment fins al període estacionari. Això concorda amb el que descriuen diversos autors, que situen en aquesta fase del creixement l'acumulació de metabòlits secundaris. Com hem pogut establir en aquestes experiències, sembla que aquesta afirmació només és certa en aquells casos en què hi ha una inhibició prou marcada de la multiplicació cel·lular, ja que en cas contrari la maquinària metabòlica afavoreix el metabolisme primari. Per altra banda, també cal fer la consideració que, a mesura que el cultiu creix, desapareix el nitrat del medi, sense que això suposi una activació de la biosíntesi d'antocians per part del cultiu. Això significaria que el moment en què es determina que el cultiu sigui productor o no del metabòlit d'interès és en la fase de latència.



Gràfic 5.4.2.3. Evolució del contingut en antocians dels cultius en diferents situacions d'estrès hídric

Discussió

La font de nitrogen és un dels paràmetres més importants en la producció d'antocians en suspensions cel·lulars. Diversos estudis mostren que el tipus i el contingut de font nitrogenada afecten tant al creixement com al rendiment de productes secundaris formats. En general, un increment de les fonts de nitrogen condueix a un increment del creixement del cultiu i a una disminució de l'acumulació d'antocians^{380, 381}. Però resulten més decisius que el nitrogen total els continguts en amoni i nitrat, i la relació entre ambdós. Així, per

³⁸⁰ Do, CB; Cormier, F. (1991). "Effects of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension cultured in a product medium". *Plant, cell, tissue and organ culture*, 27:169-174

³⁸¹ Mori, T; Sakurai, M. (1994). "Production of anthocyanin from strawberry cell suspension cultures; Effects of sugar and nitrogen". (1994). *Journal of food science*, 59(3): 588-593

exemple, Mori i Sakurai³⁸¹ constaten que una baixa relació amoni:nitrat dona productivitats superiors en cultius de maduixa, i en aquestes condicions la producció és superior en concentracions 30 mM de la suma dels dos compostos que no pas a 60 mM. En la present tesi, però, obtenim uns valors de producció d'antocians molt elevats quan la relació entre amoni i nitrat és alta. Aquesta característica diferenciaria les suspensions cel·lulars de maduixa de les de *Vitis*. Estudis de Do i Cormier³⁸⁰ també senyalen aquest efecte negatiu en l'acumulació d'antocians en *Vitis* de l'augment en la font d'amoni.

Altres estudis fets amb híbrids de *Vitis* també troben aquest efecte espectacular de producció d'antocians en medis on s'ha suprimit el nitrat, en una acció que no es reproduïx en la supressió de cap altre component del medi. Aquest fet implica que la seva repercussió transcendeix als efectes de la simple limitació de nutrient³⁸². Una proposta que plantegen Hirasuna *et al.*³⁵⁰ és que el nitrat de les vacuoles és expulsat al citoplasma per compensar les mancances en el medi, i llavors les cèl·lules podrien utilitzar la incorporació dels antocians en les vacuoles per compensar l'osmolaritat. En aquesta incorporació participaria l'ATPasa del tonoplast, enzim que és inhibit en excés de nitrat.

En augmentar la divisió cel·lular, l'estat de la majoria de cèl·lules és la divisió mitòtica i, per tant, les vies de metabolisme secundari es troben inhibides. Per aquest motiu, els màxims de síntesi es situen poc abans del començament de la fase exponencial.

En canvi, en les situacions d'estrès nitrogenat, en què la divisió mitòtica està inhibida al llarg de tot el cicle, els màxims de síntesi arriben més tard, quan la cèl·lula es troba ja en plena fase exponencial, i es mantenen en la fase estacionària.

L'efecte inhibidor del contingut antocianic per l'abundància de font nitrogenada és un efecte que també es dona *in vivo*, tot i que no en aquestes escales. Alts continguts de nitrogen retarden l'acumulació de compostos fenòlics, especialment d'antocians, en la baia³⁸³. En aquest sentit, com ja succeï a amb les condicions d'estrès hídric, la disponibilitat de cultius cel·lulars pot ser d'ajuda a l'hora d'abordar els efectes bioquímics que expliquen aquest fenomen.

³⁸² Kim, S; Kim, S. (2002): "Effect of nitrogen source on cell growth and anthocyanin production in callus and cell suspension cultures of "Sheridan" grapes". *J Plant Biotechnology*, 42:83-89

³⁸³ Keller, M; Hrazdina, G. (1998). "Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening". *Am J Enol and Vitic*, 49(3): 341-349

5.4.3. Efecte del pH:

El pH és un paràmetre fonamental en els medis de cultiu, ja que és fàcil de manipular, i afecta el balanç iònic del medi, que influeix a la vegada en la producció de metabòlits secundaris en cultius de plantes. En general, la majoria de medis s'utilitzen en un rang de pH entre 5.0-6.0, tot i ser qüestionable que aquest sigui el rang adequat per qualsevol línia cel·lular.³⁸⁴ Autors com Zhang troben màxima acumulació d'antocians en cultius de maduixa a pH superiors (8.7), mentre que per a cultius de *Vitis* es troben valors màxims d'acumulació a pH àcids³⁸⁵. El pH del medi de cultiu es manté relativament constant, tot i que pot variar per efecte de la lisi cel·lular.³⁸⁶

Per a estudiar la influència del pH en la producció d'antocians, es va treballar amb 5 valors de pH; un que correspon a les condicions habituals de preparació del medi (pH=6.0), dos de més àcids (4.75, 3.5) i dos de més bàsics (7.25, 8.5).

L'experiment es va repetir en 4 condicions diferents d'estrès: un medi control ("C"); un medi amb estrès nitrogenat ("0"), en què es suprimeix el nitrat del medi; un medi amb estrès osmòtic ("Cs"), en què s'afegeix sorbitol al medi control; i un medi amb estrès nitrogenat i estrès hídric (medi "0s"), sense nitrat però amb sorbitol.

pH	3.5	4.75	6	7.25	8.5
0	Estrès nitrogenat : 0 g/l nitrat				
0S	Estrès nitrogenat + estrès osmòtic 0 g/l nitrat, 150 mM sorbitol				
C	Control				
CS	Estrès osmòtic 150 mM sorbitol				

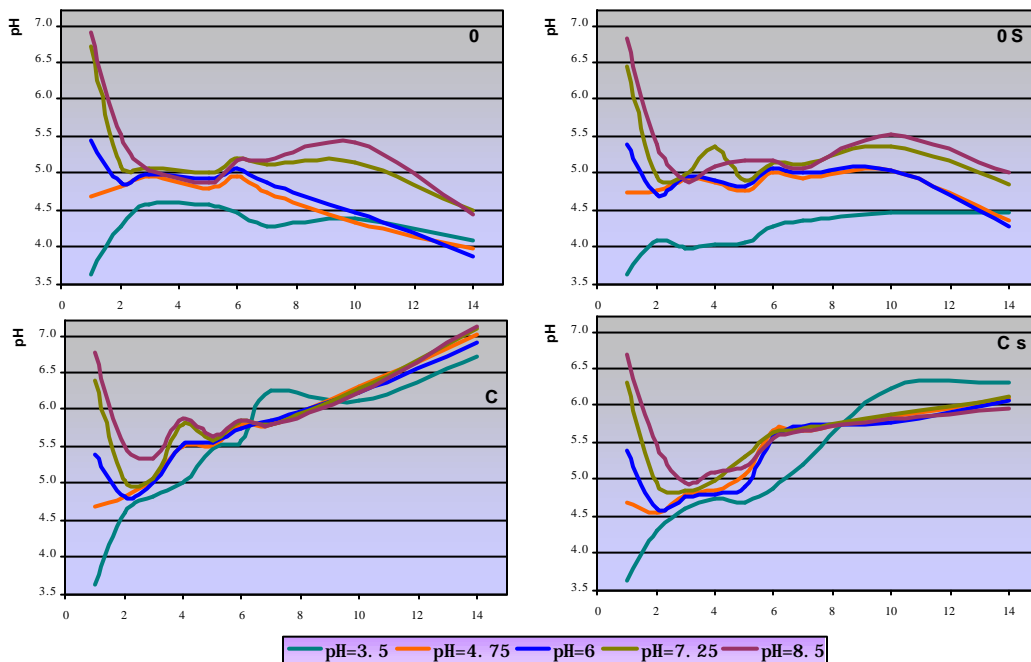
En l'estudi, es va determinar el pH de la solució, el pes fresc, i el contingut en antocians totals.

³⁸⁴ Zhang, W; Furusaki, S. (1997). "Regulation of anthocyanin synthesis in suspension cultures of strawberry cell by pH"; *Biotechnology Letters*, 19 (11), 1057-1061

³⁸⁵ Suzuki, M. (1995). "Enhancement of anthocyanin accumulation by high osmotic stress and low pH in grape cells (*Vitis* hybrids); *J. Plant. Physiol.* 147, 152-155

³⁸⁶ Jardin, B; Tom, R; Chavarie, C; Rho, D; Archambault, J. (1995). "Stimulated indole alkaloid release from *Catharanthus roseus* immobilized cultures. Initial studies"; *J Biotechnol* 21: 43-62

1. pH



Gràfics 5.4.3.1. Evolució del pH del medi al llarg del temps en cultius en què s'aplica un diferent pH inicial. S'aplica en condicions d'estrès nitrogenat ("0"), control ("C"), d'estrès hídric ("C s") i d'estrès nitrogenat i hídric ("0 s").

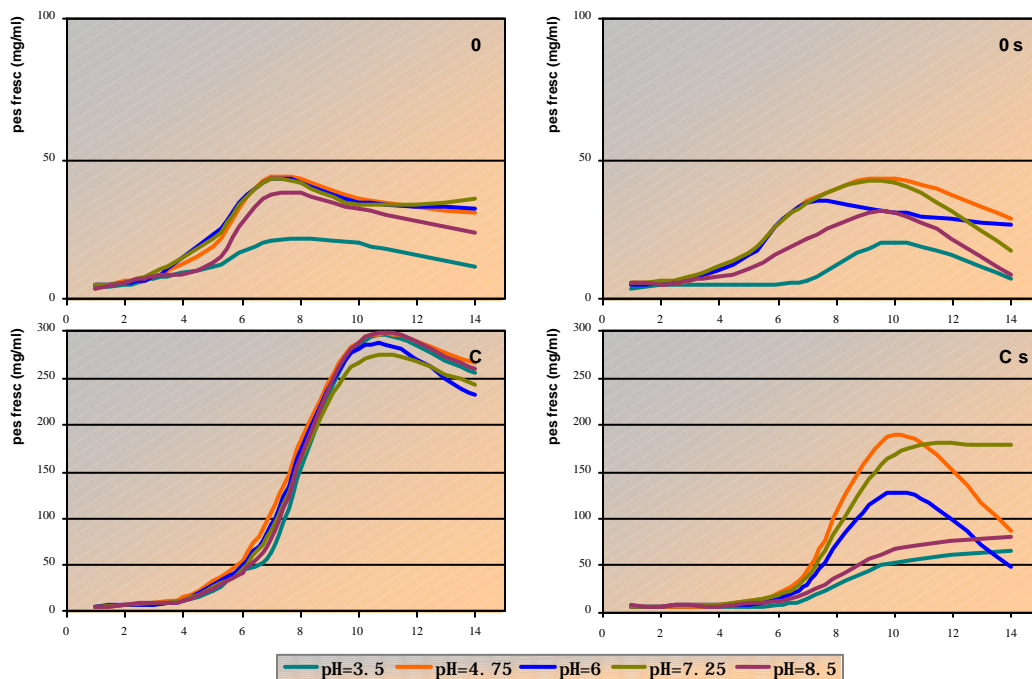
Malgrat l'ampli rang imposat (3.5-8.5) en el pH dels medis preparats, no s'aconsegueix la seva imposició en el cultiu. El procés d'esterilització per autoclau ja en provoca una neutralització per als medis més bàsics, de manera que el rang passa a ser de 3.5-6.75. Per altra banda, es pot observar (gràfics 5.4.3.1) un potent efecte tamponador de la suspensió cel·lular, de manera que per a totes les condicions de pH inicial es tendeix a un mateix valor de pH des de l'inici de la fase de latència. Aquest efecte amortidor provoca que les diferències finals d'aquest paràmetre siguin força menors en totes les condicions, tant de control com d'estrès. Tan sols les condicions més àcides mantenen el pH diferent de la resta, en els casos d'estrès nitrogenat ("0", "0s"). Així doncs, el pH inicial no és decisiu en el pH del medi de cultiu.

En canvi, sí que s'observa un efecte de la situació d'estrès sobre el valor de pH al qual tendeix el cultiu. En les condicions amb estrès de font nitrogenada ("0", "0s") el pH s'estabilitza al voltant de 5; mentre que en les condicions control de nitrogen ("C", "Cs") el pH del medi va augmentant a mesura que avança el creixement. Aquesta diferència

provindria del diferent nivell de creixement entre les dues condicions. En les solucions control el creixement cel.lular és ràpid, i s'assoleix abans la fase estacionària de mort cel.lular. S'observa un emmarroniment del medi quan s'assoleix el màxim de creixement, que correspon a l'alliberament del contingut citoplasmàtic pel procés de necrosi cel.lular i la seva posterior oxidació. Aquests processos comportarien una basificació del medi, que es veu afavorida a més per l'elevada relació entre massa cel.lular: medi de cultiu que té lloc en aquestes condicions. En haver-hi molt creixement, el volum de medi que resta disponible és menor i, per tant, els productes abocats resulten més concentrats.

En canvi, les condicions d'estrès nitrogenat mantenen durant molts dies de cultiu el color vermell característic dels antocians, i en l'etapa estacionària el medi tendeix a acidificar-se.

2) Pes fresc



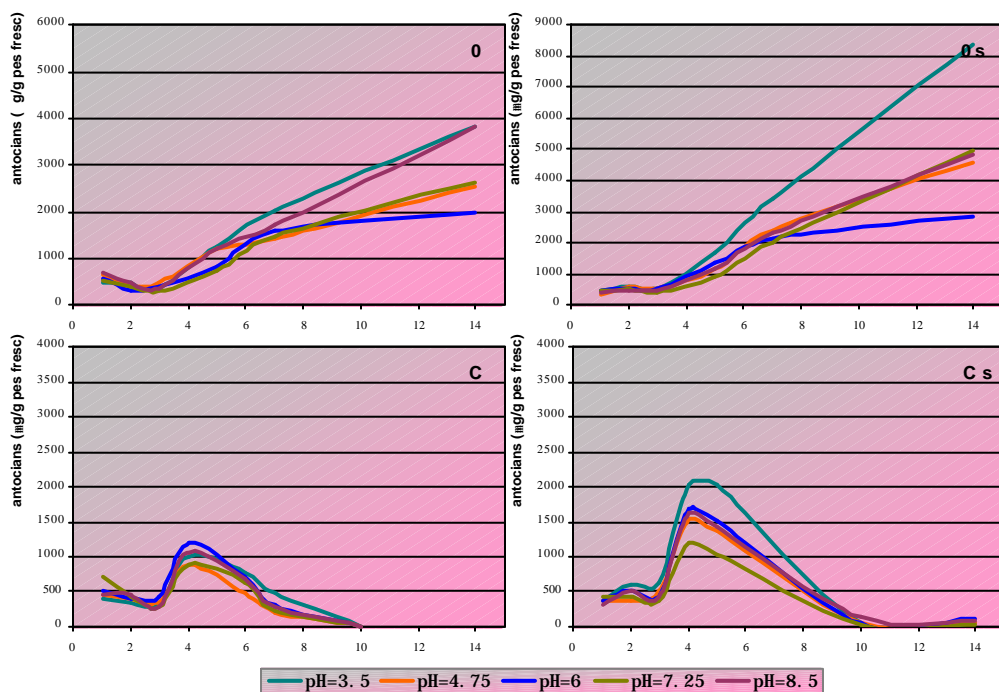
Gràfics 5.4.3.2. Evolució del pes fresc al llarg del temps en cultius en què s'aplica un diferent pH inicial. S'aplica en condicions d'estrès nitrogenat ("0"), control ("C"), d'estrès hídric ("C s") i d'estrès nitrogenat i hídric ("0 s").

En els gràfics de pes fresc (gràfics 5.4.3.2) es constata que per a la situació control ("C"), no hi ha diferències significatives en la corba de creixement respecte al pH inicial, aspecte que coincideix amb les observacions de Zhang *et al.*³⁸⁴.

En canvi, en les condicions d'estrès ("0", "0s", "Cs") es manifesta un efecte del pH sobre el pes fresc. S'inhibeix el creixement en les situacions més dràstiques (pH=3.5 i pH=8.5), però no en les intermitges (pH=4.75, o 7.25).

En els darrers dies, hi ha una disminució del pes fresc en totes les condicions, que correspondria a la situació de necrosi cel·lular ja apuntada. Aquesta situació es manifesta de manera particular si el medi està estressat amb sorbitol ("Cs").

3) Antocians



Gràfics 5.4.3.3. Evolució dels antocians totals al llarg del temps en cultius en què s'aplica un diferent pH inicial. S'aplica en condicions d'estrès nitrogenat ("0"), control ("C"), d'estrès hídric ("Cs") i d'estrès nitrogenat i hídric ("0s").

En les condicions estudiades, hom pot observar (gràfic 5.4.3.3) que l'efecte del pH difereix segons el rigor de l'estrès imposat. En la situació control ("C"), de màxim creixement cel·lular no influeix pel pH inicial, tampoc la producció d'antocians difereix

significativament entre uns casos i els altres, i de fet són superiors per al pH de 6.0, considerat l'estàndard en el nostre medi.

En canvi, per a una situació amb estrès hídric ("Cs"), és la situació de major acidesa (pH=3.5), que causava un menor creixement, la que provoca una major acumulació d'antocians. Aquest és un efecte que no està únicament relacionat amb el creixement del cultiu, ja que les condicions més bàsiques (pH=8.5), malgrat tenir un creixement similar, no comporten una major acumulació dels antocians.

En les situacions d'estrès nitrogenat ("0"), les condicions més extremes (pH=3.5, 8.5) són les que provoquen major contingut d'antocians. I en una situació d'estrès hídric i estrès nitrogenat ("0s") sembla que la biosíntesi està encara més promoguda per a les condicions àcides.

Discussió

El pH és un paràmetre que necessita interaccionar amb algun altre factor d'estrès, com l'estrès nitrogenat o l'estrès hídric, per tal de manifestar influència sobre la síntesi dels antocians i el seu creixement. En les condicions establertes com a control, les variacions en els dos paràmetres són discretes.

En canvi, quan s'imposa un estrès, el pH exerceix certa influència, de manera que en les condicions més àcides causa una disminució del creixement i un augment de la producció d'antocians. Això està d'acord amb les observacions de Suzuki³⁸⁵, que obtenia major producció d'antocians a pH=4.5 que a 7.0 en suspensions d'híbrids de *Vitis* en condicions d'estrès osmòtic causat per sacarosa (30 g/l). Tot i això, en els nostres experiments es necessita d'un pH inferior per aconseguir tal efecte.

Aquests resultats mostren un comportament diferent als obtinguts en cultius de maduixa per part de Zhang i Furusaki³⁸⁴, on es postulen les condicions bàsiques com les que donen una major i més ràpida producció d'antocians.

D'acord amb els nostres resultats i els d'altres autors ^{384, 387}, les suspensions cel·lulars tenen un gran poder tamponador. Això causa que el pH al cap de 3 dies depengui en major mesura de les condicions d'estrès del medi que no pas del pH imposat inicialment. Només en la situació de pH més àcid (3.5) aquesta capacitat tamponadora es veu lleugerament

³⁸⁷ Ho CH; Shanks, JV. (1992). "Effects of initial medium pH on growth and metabolism of *C. Roseus* hairy root cultures". *Biotechnol. Letters*, 14: 959-964

limitada, i no arriba al valor d'equilibri que aconseguen les altres condicions. Si assumim que el valor de pH al qual tendeixen els cultius correspondria amb el valor del pH intrínsec, podem concloure que aquest valor es situa al voltant de pH=5.0 per a les condicions d'estrès, però és lleugerament superior en la situació control.

Aquest efecte esmorteïdor de les cèl·lules en cultiu és similar al descrit per Zhang i Furusaki³⁸⁴ per a cèl·lules de maduixa, tot i que en el seu experiment no treballaven amb condicions d'estrès osmòtic ni nitrogenat.

En alguns treballs, per vèncer aquesta tendència correctora del pH que s'origina en els cultius, s'utilitza com a medi de cultiu una solució tampó³⁸⁸, que evita l'acció amortidora i no sembla provocar canvis en el creixement, però que pot conduir a diferències en la síntesi de compostos d'interès.

Diversos treballs utilitzen els canvis de pH per promoure la lisi cel·lular i provocar l'alliberament dels compostos d'interès en el medi³⁸⁹, fenomen d'indubtable aplicació en processos biotecnològics. En el nostre cas no s'aconsegueix aquest fet, ja que en els casos de major producció, que són els d'estrès nitrogenat, no hi ha aquest alliberament; i en els casos en què sí es produeix, el fenomen té lloc quan aquests ja s'han oxidat. Això concorda amb els treballs de Cormier *et al.*³⁹⁰, que conclouen que l'alliberament dels antocians de les suspensions cel·lulars de *Vitis vinifera* només pot aconseguir-se mitjançant mètodes destructius.

³⁸⁸ Morgan, JA; Barney, CS; Penn, AH; Shanks, JV. (2000). "Effects of buffered media upon growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* hairy roots"; *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 262-265

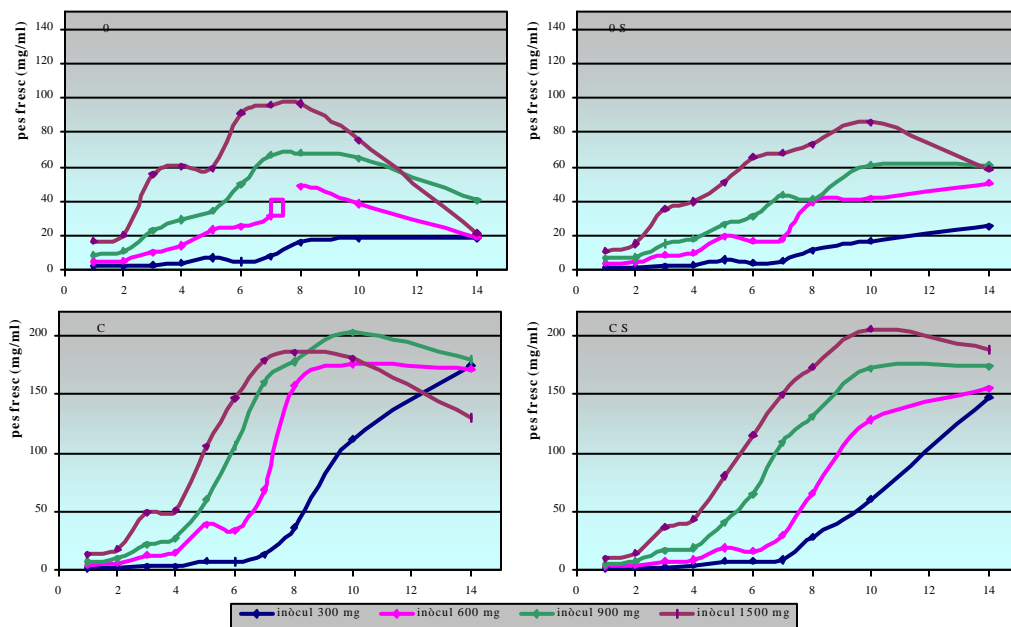
³⁸⁹ Saenz LA; Maldonado, IE; Moreno, O; Ciaú, R; Lopez, M; Oropeza, C; Loyola, VM. (1993). "Effect of the medium pH on the release of secondary metabolites from roots of *Datura stramonium*". *Appl Biochem Biotechnol* 38:257-267

5.4.4) Efecte de l'inòcul

La mida de l'inòcul és també un paràmetre important en els subcultius de suspensions cel·lulars vegetals. Existeix una mida d'inòcul crítica per sota de la qual el subcultiu no prosperarà³⁹¹, i contràriament, s'aconsegueix un increment de la productivitat en augmentar la mida de l'inòcul, tot i que a partir de certs nivells ja no es modifica el màxim de concentració cel·lular³⁹². A més, l'inòcul inicial pot també influir la producció de metabòlits.

Amb aquestes premisses, es va plantejar un experiment amb diferents volums inicials d'inòcul (300 mg, 600 mg, 900 mg i 1500 mg), per veure el seu efecte en suspensions cel·lulars de *Vitis vinifera*. Novament es va treballar amb les condicions d'estrès nitrogenat i estrès hídric. Es va determinar el creixement del cultiu –mitjançant el pes fresc– i el contingut en antocians totals

1) Pes fresc



Gràfics 5.4.4.1. Evolució del pes fresc al llarg del temps en cultius amb diferent mida d'inòcul inicial (300, 600, 900 i 1500 mg). S'aplica en condicions control ("C"), d'estrès nitrogenat ("O"), hídric ("C s") i nitrogenat i hídric ("O s").

³⁹⁰ Cormier, F; Do, CB; Moresoli, C. (1992). "Anthocyanin release from grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension". *Biotechnol Letters*, 14(11): 1029-1034

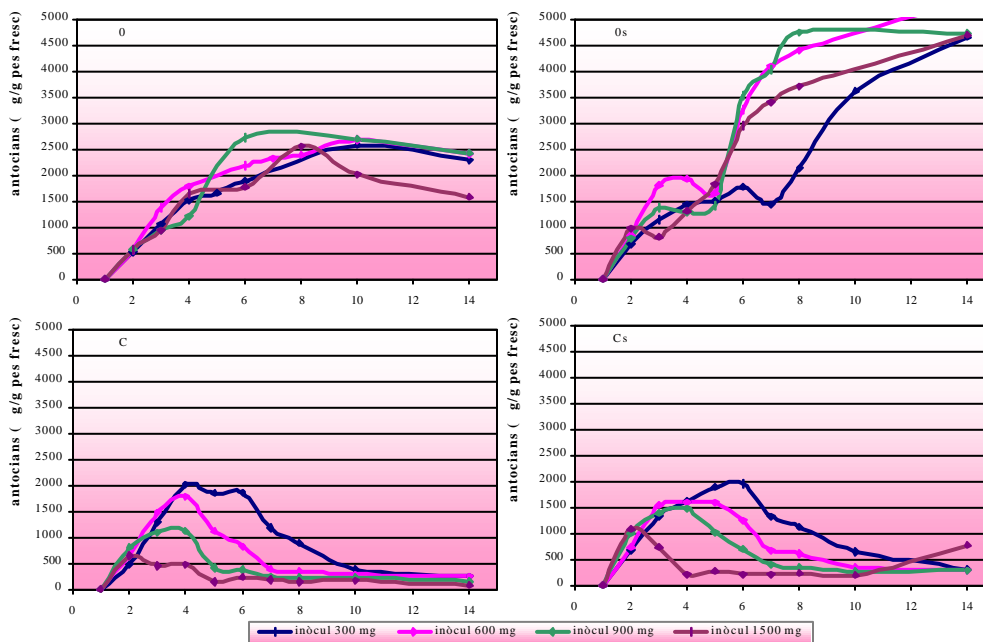
³⁹¹ Su, WW; Lei, F. (1993). "Rosmarinic acid production in perfused *Anchusa officinalis* culture: effect of inoculum size". *Biotechnology letters*, 15, 1035-1038

³⁹² Zhong, JJ; Toshida, T. (1995). "High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size". *Enzyme Microb. Technol.*, 17: 1073-1079

La mida de l'inòcul modifica la corba de creixement en totes les condicions (gràfics 5.4.4.1). Aquesta modificació consisteix a un retard en l'inici de la fase exponencial en disminuir la mida de l'inòcul. Això s'aprecia clarament en la situació control ("C"): l'inòcul de 1500 mg arriba a la fase exponencial el 4t dia, però el de 300 mg triga 8 dies a arribar-hi. L'efecte és similar en les altres condicions.

La mida inicial de l'inòcul també afecta al màxim de població cel.lular que es pot aconseguir en cada condició. En la situació control ("C") no s'observen diferències, ja que tots els inòculs emprats arriben a un pes fresc de 200 mg/ml. En canvi, en les condicions d'estrès hídric ("Cs") i d'estressos nitrogenats ("0", "0s"), hi ha una relació directa: en disminuir el volum inicial que es subcultiva, disminueix el creixement del cultiu. S'arriba a un valor crític en les condicions d'estrès nitrogenat ("0", "0s"): el menor inòcul, de 300 mg, no prospera, el seu creixement cel.lular està gairebé totalment inhibit.

2) Antocians



Gràfics 5.4.4.2. Evolució dels antocians totals endel temps en cultius amb diferent mida d'inòcul inicial (300, 600, 900 i 1500 mg). S'aplica en condicions control ("C"), d'estrès nitrogenat ("0"), hídric ("Cs") i nitrogenat i hídric ("0s").

La influència de la mida de l'inòcul quant a l'acumulació d'antocians (gràfics 5.4.4.2) està molt lligada al creixement cel·lular que possibilita. En les condicions sense estrès nitrogenat ("C", "Cs"), en augmentar la mida de l'inòcul augmenta el creixement i disminueix el màxim d'acumulació d'antocians. Com ja succeïa amb el creixement, l'acumulació també es retarda segons la mida de l'inòcul.

En les situacions d'estrès nitrogenat ("0", "0s"), la mida de l'inòcul no tindria un paper tan rellevant, ja que els valors màxims de concentració són similars independentment de l'inòcul.

Discussió

La mida de l'inòcul inicial determina el creixement i el contingut d'antocians que es poden obtenir en les suspensions cel·lulars. En les nostres condicions d'estudi, un inòcul de 1500 mg en un volum de 100 ml permet la màxima proliferació cel·lular en la situació control, però també la mínima síntesi d'antocians. Inòculs menors provoquen l'efecte contraposat.

Aquest efecte de l'inòcul també l'observen Mori *et al.*³⁹³ en cultius de maduixa: en augmentar-ne la mida, disminueix la productivitat. En canvi, en altres cultius com els de *Perilla frutescens*, la màxima producció d'antocians té lloc com més gran és l'inòcul³⁹². Tanmateix, en ambdós treballs estableixen uns valors crítics per sobre i per sota dels quals no s'estimula la producció. En el nostre experiment no sembla que hàgim assolit aquest valor crític mínim en les condicions sense estrès nitrogenat, ja que l'inòcul menor (300 mg) encara dona un creixement comparable al de la resta d'inòculs i, per altra banda, incrementa notablement l'acumulació d'antocians. Contràriament, en situacions d'estrès resulta ja excessivament reduït aquest volum d'inòcul.

Altres autors³⁵⁰ destaquen que en la producció d'antocians en cultius de raïm no és només important la mida de l'inòcul, sinó també el nombre de subcultius que se n'han fet prèviament. Després d'una sèrie de subcultius en medi nutrient, té lloc una reducció de la producció d'antocians; en canvi, en suspensions fresques iniciades de cal·lus la producció és sensiblement major.





³⁹³ Mori, T.; Sakurai, M.; Shigeta, J.; Yoshida, K.; Kondo, T. (1993). "Formation of anthocyanins from cell cultured from different parts of strawberry plants". *Journal of Food Science*, 58(4): 788-792

5.4.5) Efecte de la font de carboni

Un dels principals requeriments del medi de cultiu en les suspensions cel·lulars és la font de carboni. La majoria dels cultius no són autotròfics, és a dir, no són capaços de fixar el carboni mitjançant la fotosíntesi; i per això és necessari afegir sucres al medi nutrent. S'han provat un gran nombre de fonts de carboni per comprovar-ne la capacitat per suportar el creixement de cultius cel·lulars vegetals.³⁹⁴ D'entre ells, els que donen millors rendiments de producció de biomassa són la sacarosa i la glucosa, però el seu comportament és diferent. Per altra banda, també s'han descrit altres carbohidrats, com la fructosa o la trehalosa, que poden utilitzar-se com a font de carboni. La trehalosa és un disacàrid com la sacarosa, però de paper completament contrari: té un efecte protector contra la deshidratació, les altes i baixes temperatures, i l'estrès osmòtic.³⁹⁵

A més d'influir en la biomassa, un increment en la concentració de sucres pot comportar un increment en el rendiment de producció de metabolisme secundari, a causa de l'estrès hídric que suposa.

Per tal d'estudiar la diferent resposta de les suspensions cel·lulars de *Vitis vinifera* a la font de carboni, es van plantejar les següents condicions d'estudi:

	0	0s	C	Cs
Medi fructosa	 21 g/l fructosa			
Medi glucosa	 21 g/l glucosa			
Medi sacarosa	 20 g/l sacarosa			
Medi trehalosa	 22 g/l trehalosa			

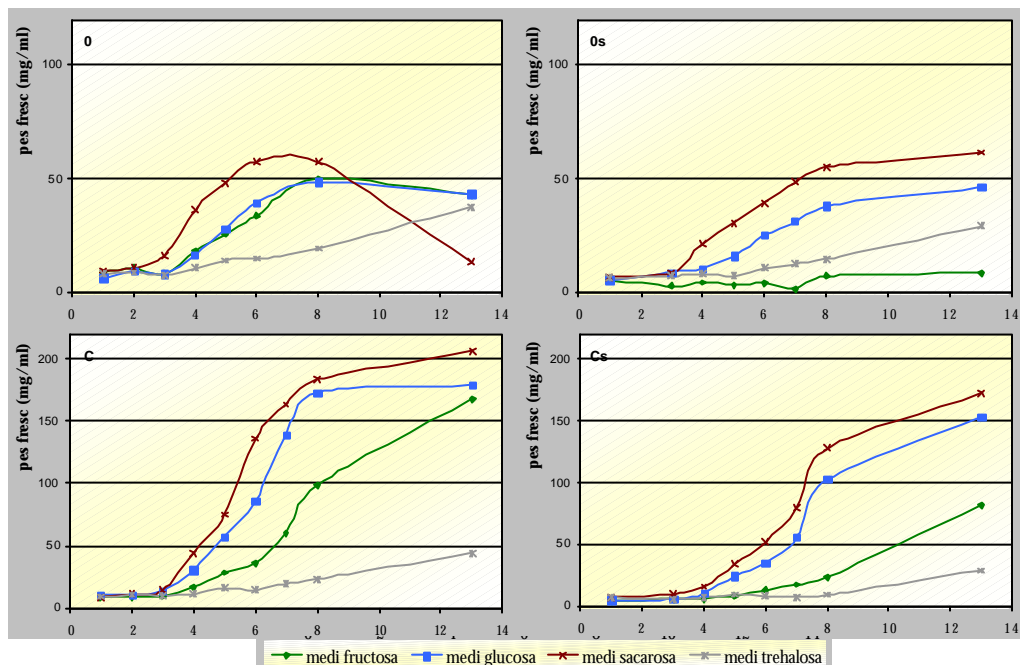
Novament es van plantejar els experiments en 4 situacions diferents, corresponents a la condició control ("C"), d'estrès hídric ("Cs"), d'estrès nitrogenat ("0") i de combinació dels dos estressos ("0s").

³⁹⁴ Fowler, MW; Stepan-Sarkissian, G. (1985). "Carbohydrate source, biomass productivity and natural product yield in cell suspension cultures"; a "Primary and secondary metabolism of plant cell cultures", KH Neumann, W Barz & E Reinhard, Ed Springer-Verlag

³⁹⁵ Novo, MT; Beltran, G; Torija, MJ; Poblet, M; Rozès, N; Guillamón, JM; Mas, A; . (2003). "Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentations"; *Int. J. Food Microbiology* 86: 153-161

1) Pes fresc

En primer lloc, analitzem la influència de la font de carboni sobre el creixement en cada condició (gràfics 5.4.5.1):



Gràfics 5.4.5.1. Evolució del pes fresc al llarg del temps en cultius amb diferents fonts de carboni (fructosa, glucosa, sacarosa i trehalosa). S'aplica en condicions control ("C"), d'estrès nitrogenat ("0"), hídric ("Cs") i hídric amb sacarosa ("Cs").

La utilització de sacarosa com a substrat promou en totes les condicions estudiades un creixement superior i un inici de la fase exponencial més precoç. En l'altre extrem es situa la trehalosa, que retarda el creixement en totes les condicions, de manera que no s'arriba a establir clarament una fase exponencial. Però en contraposició, el creixement en medi trehalosa és el que resulta més independent de les condicions del medi.

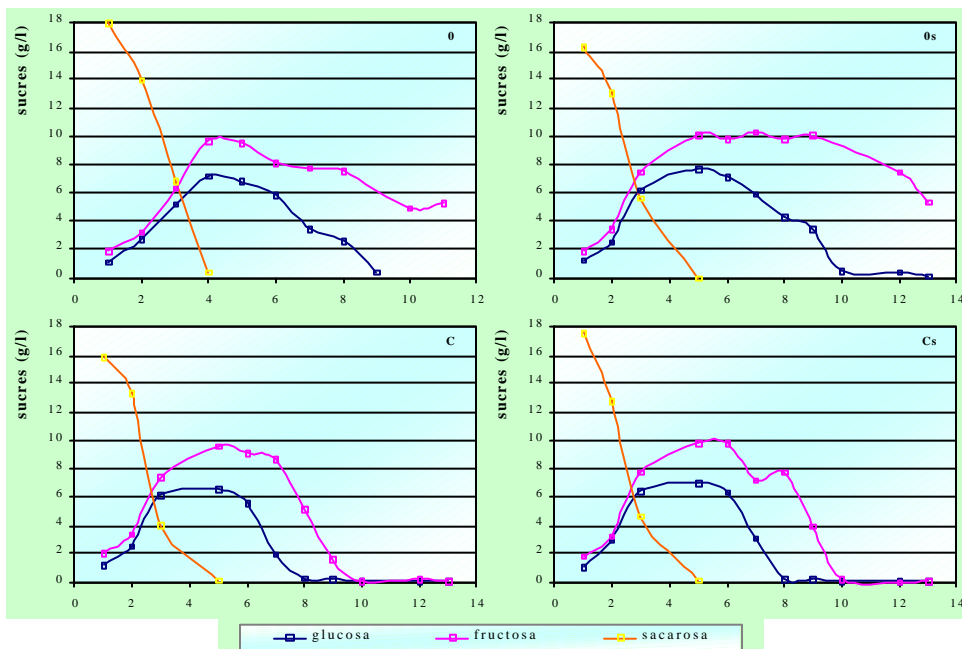
La glucosa i la fructosa tenen un comportament intermediari entre els dos extrems. D'entre les dues, la glucosa és el substrat més aprofitable per al creixement. La fructosa és força menys utilitzable, sobretot en les condicions d'estrès hídric ("0s", "Cs"); i de fet en la situació "0s" inhibeix completament el creixement.

És ressaltable que en les condicions control ("C"), a excepció de la trehalosa, tots els carbohidrats utilitzats condueixen a un creixement similar. En canvi, en les situacions d'estrès hídric ("0s", "Cs") s'estableixen clarament diferències en aquest creixement final en el sentit de màxim creixement en medi sacarosa.

2) Consum de sucres

Les següents gràfiques recullen la dinàmica de metabolització dels sucres durant els dies de cultiu. Es presenten, per cada medi, les 4 condicions d'estrès amb què s'ha treballat.

a) Medis sacarosa



Gràfics 5.4.5.2. Dinàmica dels hidrats de carboni en els medis sacarosa en les diferents condicions d'estudi.

"0" = estrès nitrogenat; "0s" = estrès nitrogenat+estrès hídric; "C" = control; "Cs" = estrès hídric

Els gràfics 5.4.5.2 mostren els canvis dinàmics de la sacarosa, la glucosa i la fructosa durant el cultiu en els medis preparats amb sacarosa com a font de carboni. En totes les condicions, la sacarosa és hidrolitzada extracel.lularment a glucosa i fructosa. Aquest fet es posa de manifest per la disminució en la concentració de sacarosa i el concomitant augment de les concentracions de glucosa i fructosa. Aquest sistema de captació de sacarosa està descrit en un rang ampli de cultius cel.lulars, com per exemple cultius de maduixa, de teix o de rosa^{394,396}, i s'han desenvolupat models matemàtics que relacionen aquesta conversió amb el creixement del cultiu i la producció de metabòlits secundaris^{397,398}.

³⁹⁶ Zhang, W; Seki, M; Furusaki, S; Middelberg, AP. (1998). "Anthocyanin synthesis, growth and nutrient uptake in suspension cultures of strawberry cells". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(1): 72-78

³⁹⁷ Pépin, MF; Archambault, J; Chavarie, C; Cormier, F. (1995). "Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspension cultures: I. Shake Flask Cultures". *Biotechnology and bioengineering*, 47: 131-138

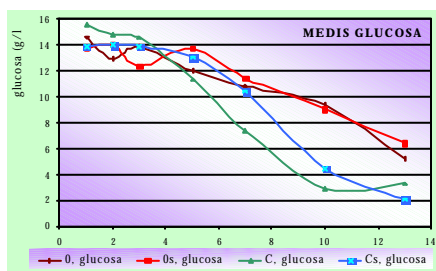
³⁹⁸ Guardiola, J; Iborra, JL; Cánovas, M. (1995). "A model that links growth and secondary metabolite production in plant cell suspension cultures". *Biotechnology and Bioengineering*, 46: 291-297

En essència, la conversió consisteix a la hidròlisi de la sacarosa en el medi extern, en la superfície de la paret cel·lular o en l'interior de la paret. Els monosacàrids obtinguts entrarien posteriorment al citosol per incorporar-se a les vies metabòliques. Aquesta activitat invertasa també ha estat descrita en cultius d'òrgans –concretament de baia- de raï m, i Pérez *et al.* han comprovat³⁹⁹ que augmenta amb la concentració de sacarosa del medi. Aquesta activitat està establerta també *in vivo*, associada al desenvolupament de la baia. Així, arriba a un valor màxim quan ha començat l'acumulació de sucres, i posteriorment decreix lleument⁴⁰⁰.

Durant els primers dies, i coincidint amb la fase de latència del cultiu, augmenta el contingut de glucosa i fructosa en el medi, productes de la hidròlisi de la sacarosa. Posteriorment, però, són metabolitzats, i s'inicia la fase de creixement exponencial dels cultius. Els nivells de glucosa són en tot moment inferiors que els de fructosa, cosa que indica que la primera es metabolitza preferentment. En el moment que s'esgota, s'inicia el consum actiu de la fructosa.

Les úniques diferències que comporten les diferents situacions d'estrès consisteixen a retardar aquests processos. Així doncs, no semblen afectar l'activitat invertasa, però l'esgotament dels sucres esdevé més tard. De fet, en les condicions d'estrès nitrogenat ("0", "0s"), quan s'interromp l'estudi encara es disposa de fructosa metabolitzable al medi, ja que la lentitud del creixement permet que no es consumeixi completament.

b) Medis Glucosa



Gràfics 5.4.5.3. Consum de glucosa en els medis en què aquesta era l'única font de carboni, per a les diferents condicions d'estudi. "0" = estrès nitrogenat; "0s" = estrès nitrogenat+estrès hídric; "C" = control; "Cs" = estrès hídric

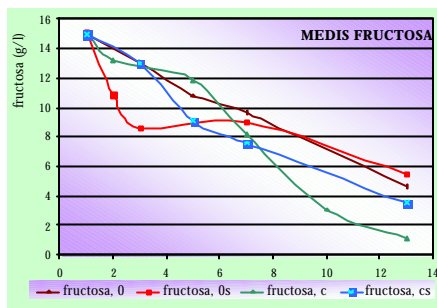
Si es substitueix la sacarosa del medi per glucosa, després de la fase de latència en comença el consum (gràfics 5.4.5.3). En condicions sense estrès nitrogenat ("C", "Cs"), de major creixement, la glucosa és més ràpidament consumida, tot i no arribar a l'esgotament. En aquest punt s'haurà arribat a un màxim de densitat cel·lular, i la glucosa residual indicaria un excés inicial.

En canvi, en situació d'estrès nitrogenat ("0", "0s"), els nivells de glucosa encara romanen elevats al darrer dia d'estudi, ja que el creixement ha estat molt inferior.

³⁹⁹ Pérez, FJ; Meza, P; Berti, M; Pinto, M. (2000). "Effect of carbon source and sucrose concentration on growth and hexose accumulation of grape berries cultured *in vitro*". *Plant, cell, tissue and organ culture*, 61:37-40

⁴⁰⁰ Ruffner, HP; Adler, S; Rast, DM (1990). "Soluble and wall associated forms of invertase in *Vitis vinifera* L.". *Phytochemistry* 29:2083-2086

c) Medis fructosa

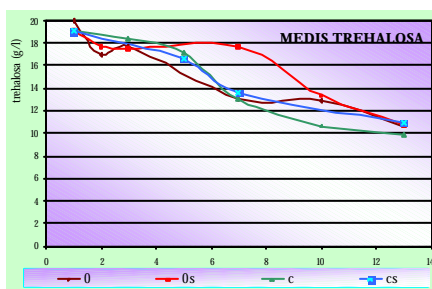


Gràfics 5.4.5.4. Consum de fructosa en els medis fructosa en les diferents condicions d'estudi. "0"= estrès nitrogenat; "0s"= estrès nitrogenat+estrès hídric; "C"= control; "Cs"= estrès hídric

produeix un consum similar d'ambdues. Tenint en compte que el creixement era major en el cas del medi amb glucosa, podem concloure que la fructosa es metabolitza d'una manera menys eficient. La glucosa es pot incorporar a la via glucolítica via hexoquinasa, i d'aquí s'obté energia que la cèl.lula pot consumir en el creixement. L'afinitat de l'hexoquinasa per la fructosa és menor, però podria incorporar-se al metabolisme mitjançant una fructoquinasa específica.

El fet que tant en el medi amb glucosa com en el medi amb fructosa no s'escurci el període de latència sinó que, ans al contrari, aquest es perllongui, és indicador que aquesta fase no està determinada únicament per l'acció de les invertases que hidrolitzen la sacarosa als seus components.

d) trehalosa



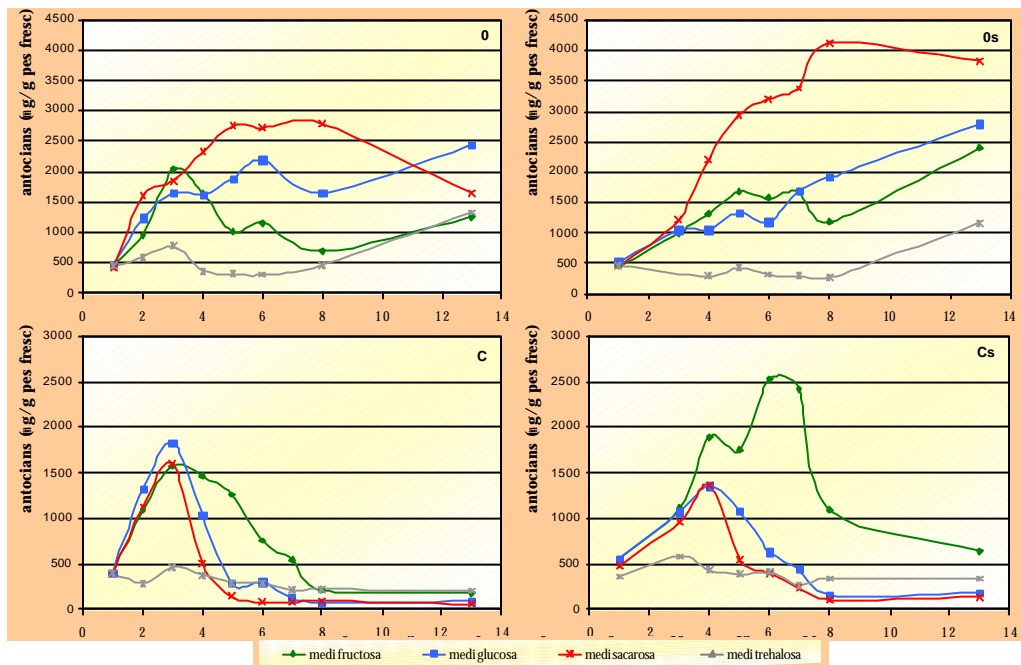
Gràfics 5.4.5.6. Consum de trehalosa en els medis en què aquesta és la única font de carboni, per les diferents condicions d'estudi. "0"= estrès nitrogenat; "0s"= estrès nitrogenat+estrès hídric; "C"= control; "Cs"= estrès hídric

Amb un medi en què la font de carboni és exclusivament fructosa, el consum d'aquest sucre és similar del medi amb glucosa. La metabolització de la fructosa resulta també superior en les condicions sense estrès nitrogenat, però en cap dels casos s'arriba a esgotar (Gràfics 5.4.5.4).

Si comparem les corbes de glucosa i fructosa, podem observar que quan al medi només hi ha presència de glucosa o fructosa, es

Els nivells de trehalosa es mantenen força elevats durant tot l'estudi i de manera similar en totes les condicions, cosa que justifica el poc creixement cel.lular obtingut en medis que utilitzen aquesta font de carboni (Gràfics 5.4.5.6). De fet, la trehalosa no és un carbohidrat energètic, sinó de reserva i protecció en situacions de dessecació.

3) Antocians



Gràfics 5.4.5.1. Dinàmica d'acumulació d'antocians al llarg del temps en cultius amb diferents font de carboni (fructosa, glucosa, sacarosa i trehalosa). S'aplica en condicions control ("C"), d'estrès nitrogenat ("0"), hídric ("Cs") i nitrogenat i hídric ("0s").

En el cas de les fonts de carboni, no es compleix l'observació d'altres experiments conforme als quals corresponia una major productivitat d'antocians en aquells casos d'inhibició del creixement. En condicions d'estrès nitrogenat ("0", "0s"), la sacarosa és el substrat que dona uns rendiments superiors d'antocians per pes fresc. Tenint en compte que aquesta era també la situació que permetia un major creixement, podem concloure que la sacarosa resulta el substrat que sosté una major productivitat. Contràriament, la trehalosa ofereix els nivells més baixos d'antocians, tot i que tolerava el mínim creixement del cultiu.

En les condicions sense estrès nitrogenat ("C", "Cs"), es manté el comportament de la trehalosa, però no així el de la sacarosa. De fet, els nivells d'antocians que s'obtenen amb medi sacarosa no difereixen gaire dels que s'obtenen en medi glucosa. Sembla, doncs, que en aquestes concentracions la sacarosa actuaria més com a metabòlit energètic, permetent el creixement, que com a agent osmòtic promotor de la síntesi d'antocians. En canvi, la fructosa permet una major síntesi d'antocians, especialment en el cas de l'estrès osmòtic ("Cs"). Però en aquesta ocasió, sembla clar que el comportament és a causa de la inhibició del creixement.

Discussió

D'entre totes les fonts de carboni testades, la sacarosa resulta la que proporciona major creixement en totes les condicions, i malgrat això, la que proporciona més elevades produccions d'antocians. Altres autors arriben a la mateixa conclusió en altres cultius, com Narayan i Venkataraman⁴⁰¹ en pastanaga, o Mori i Sakurai³⁸¹ en maduixa. En aquests treballs també es posa de manifest que la glucosa condueix a uns creixements i produccions similars, però els resultats dels nostres experiments precisen que en situacions d'estrès, els medis amb glucosa veuen repercutit negativament tant el creixement com la biosíntesi d'antocians. La fructosa sembla inhibir el creixement i aportar una major concentració antocianica en situacions sense estrès nitrogenat. Nagarajan *et al.*⁴⁰² van destacar els millors rendiments que obtenien en cultius de pastanaga de la utilització de fructosa, per sobre que la de sacarosa. En els treballs de Mori i Sakurai³⁸¹ no s'observa aquest efecte beneficiós de la fructosa; i en els treballs de Narayan i Venkataraman⁴⁰² fins i tot inhibeix tant el creixement com la producció d'antocians. De fet, la fructosa té una metabolització més lenta que la glucosa, especialment quan es troben ambdós combinats en el medi, a causa del menor rendiment energètic que sembla treure la cèl.lula del seu consum.

La trehalosa no és un substrat energètic per les cèl.lules en suspensió. Hi ha altres sucres que es descriuen com a no metabolitzables en altres suspensions productores d'antocians, com la rafinosa⁴⁰¹; i d'altres que ho són en molt baixa proporció, com la xilosa, la manosa, la ramnosa i l'arabínosa³⁸¹. Però de fet, la trehalosa juga altres papers que no desenvolupen les citades molècules: aquest disacàrid s'acumula en les vacuoles com a carbohidrat de reserva, i dóna resistència a la planta enfront la dessecació⁴⁰³. Per tant, tindria una funció protectora i no pas energètica, motiu pel qual s'havia pensat en ella com a protector front a l'estrès osmòtic. Tanmateix, no promou la síntesi d'antocians, tot i que la seva acció alentint el metabolisme es perfila de molta utilitat en la complicada labor de la criopreservació de cèl.lules⁴⁰⁴, encara que no s'han efectuat estudis concrets al respecte. Per altra banda, també pot ser important en la regulació de la utilització de carbohidrats i, en conseqüència, del control de la via glucolítica⁴⁰³.

⁴⁰¹ Narayan, MS; Venkataraman, L.V. (2002). "Effect of sugar and nitrogen on the production of anthocyanin in cultured carrot (*Daucus carota*) cells", *J Food Science*, 67(1):84-86

⁴⁰² Nagarajan, RP; Keshavarz, E; Gerson, DF. (1989). "Optimization of anthocyanin yield in a mutated carrot cell line (*Daucus carota*) and its implications in large scale production". *J. Ferment. Bioeng* 68:102-106

⁴⁰³ Schluempmann, H; Pellny, T; van Dijken, A; Smeekens, S; Paul, M. (2003). "Trehalose-6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*". *Plant Biology*, 100(11): 6849-6854

⁴⁰⁴ Crowe, JH; Crowe, LM; Oliver, AE; Tsvetkova, N; Wolkers, W; Tablin, F. (2001). "The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state". *Cryobiology*, 43: 89-105

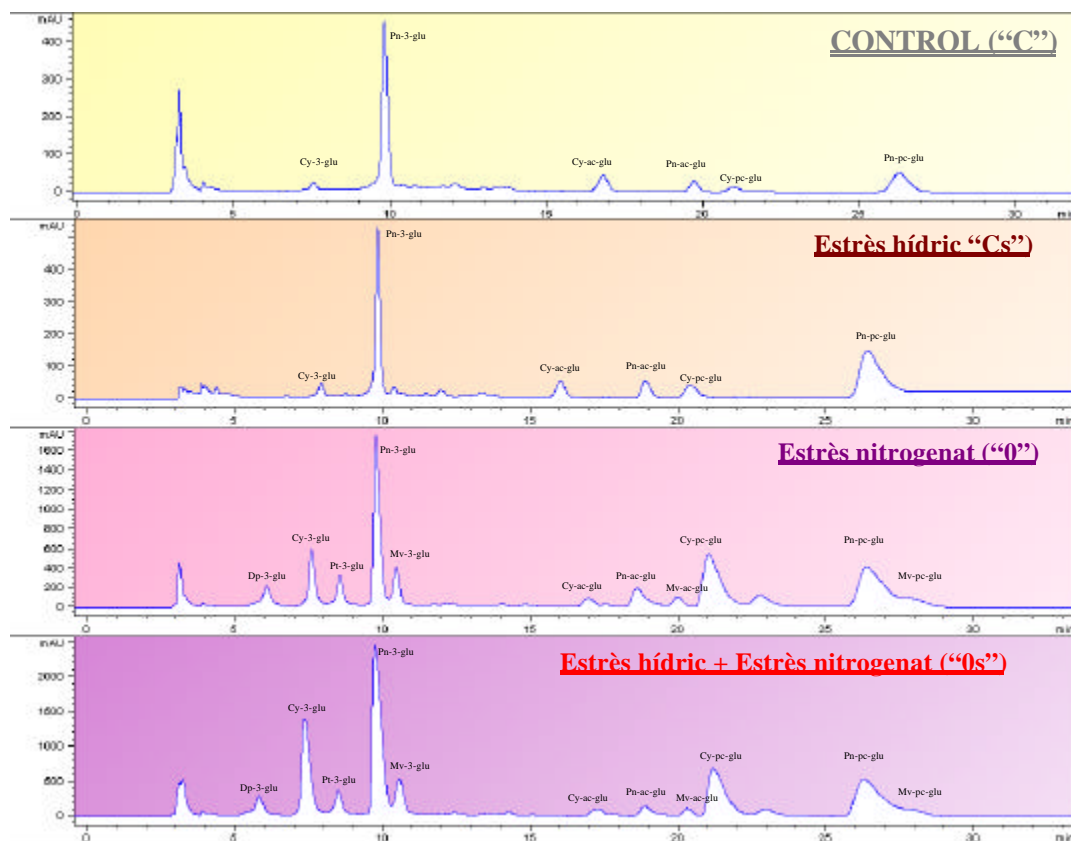
II. DETERMINACIÓ DELS ANTOCIANS INDIVIDUALS

Amb l'evidència que les diferents condicions aplicades sobre els cultius cel·lulars impliquen grans diferències en el contingut total d'antocians, es va plantejar analitzar si les diferents condicions conduï en a diferències també en el perfil antociànic.

5.4.6) Efectes dels estressos

La composició dels medis d'estrès s'efectuà seguint les pautes ja exposades en el punt 5.4.1 d'aquest capítol. L'extracció, separació i identificació d'antocians es va efectuar de la mateixa manera que pels antocians de les pells, metodologia ja descrita en el capítol 1.

Els cromatogrames 5.4.6.1 recullen els perfils en diferents condicions d'estrès al 7è dia de cultiu.



Cromatogrames 5.4.6.1. Modificació del perfil antociànic de les suspensions cel·lulars en funció de l'estrès aplicat al medi. Dp=delfinidina; Cy=cianidina; Pt=petunidina; Pn=peonidina; Mv=malvidina; ac=acil; pc=p-cumaroil

En les suspensions cel·lulars de Gamay Freaux l'antocià majoritari és la peonidina, seguit de la cianidina. Això representa un tret diferencial respecte els antocians de les pells, que fonamentalment eren malvidínics. Es pot constatar que les condicions d'estrès, a més de conduir a un increment net dels antocians totals, també són responsables de canvis en la seva composició, especialment en els casos d'estrès nitrogenat. Així doncs, malgrat que es produeix un increment de concentració en tots els antocians, composicionalment no augmenten tots de la mateixa manera.

S'estableix una diferència en el contingut d'antocians acilats en el residu glucosídic. Com s'observa als cromatogrames 5.4.6.1 i es representa a la figura 5.4.6.1, les situacions d'estrès comporten un increment composicional de les formes p-cumaroilades, i una disminució de les acetilades i les no acilades respecte la situació control. Tant en la situació d'estrès hídric ("Cs") com en la d'estrès nitrogenat ("0") s'aconsegueixen unes proporcions del 49% en antocians p-cumaroilats, i una disminució significativa dels no acilats. La combinació dels dos estressos ("0s") no té un efecte sinèrgic, ja que els nivells d'antocians no acilats es mantenen paradoxalment més estables sota l'efecte d'ambdós estressos.

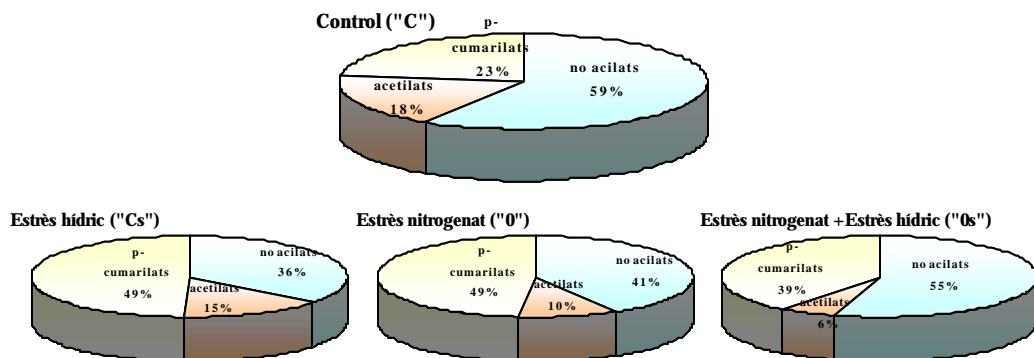


Figura 5.4.6.1. Percentatges composicionals dels antocians no acilats, dels acetilats i dels p-cumarilats segons les condicions d'estrès imposades al medi.

En altres capítols ja hem destacat la importància de l'acilació en l'estabilització del color mitjançant el procés de copigmentació. Però a més, en l'àmbit dels cultius cel·lulars, resulta interessant perquè està presumiblement involucrada en el transport d'antocians cap a les vacuoles⁴⁰⁵, en les quals hi ha una acumulació preferent d'aquests antocians respecte els no acilats⁴⁰⁶.

⁴⁰⁵ Springob, K; Nakajima, J; Yamakazi, M; Saito, K. (2003). "Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins". *Nat Prod Rep*, 20: 288-303

⁴⁰⁶ Conn, S; Zhang, W; Franco, C. (2003). "Anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) selectively bind acylated anthocyanins in *Vitis vinifera* L. (grapevine) suspension culture". *Biotechnology Letters*, 25:835-839

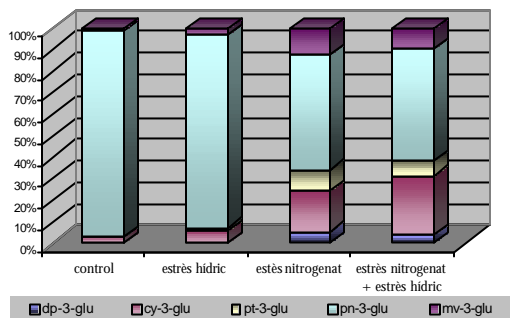


Figura 5.4.6.2. Percentatges composicionals dels 5 antocians no acilats, segons les condicions d'estrès imposades al medi.

aquestes condicions augmenten les concentracions de delphinidina, petunidina i malvidina, que en les condicions control i d'estrès hídric són quasi indetectables.

L'increment de concentració, així com el diferent perfil d'antocians, és el que justifica l'aspecte que presenten les cèl·lules crescudes en condicions d'estrès nitrogenat, que són d'una tonalitat vermell intens molt més acusada que les condicions control, en què el cultiu adquireix tonalitats rosades.

Aquests resultats ens porten a establir les següents consideracions sobre les rutes biosintètiques en cultius cel·lulars (figura 5.4.6.3):

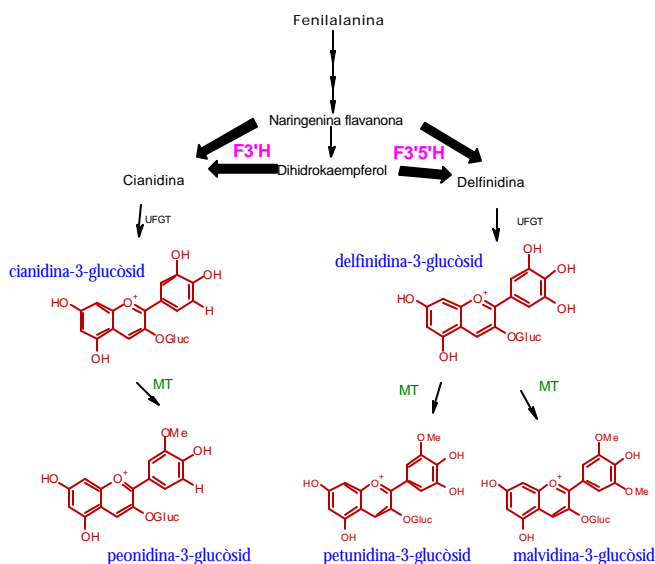


Figura 5.4.6.3. Ruta biosintètica de formació dels antocians. F3'H=flavonoid-3' hidroxilasa; F3'5'H= flavonoid 3'5' hidroxilasa; MT=metiltransferasa; UFGT: UDP flavonoid glucodil transferasa

També s'estableixen diferències quant als 5 antocians monoglucòsids. Com es pot veure en el cromatograma 5.4.6.1 i com es plasma en la figura 5.4.6.2, l'estrès nitrogenat causa un increment dels antocians totals, però a nivell composicional hi ha una disminució relativa de les quantitats de peonidina, tot i que continua sent l'antocià majoritari, i un increment en els nivells de cianidina. També en

El fet que en les condicions d'estrès hídric no hi hagi un increment concomitant tant dels nivells de Pn-pc-glu com de Pn-3-glu, suggereix que l'acilació de l'antocià és un procés posterior a la formació de l'antocianidina.

Els antocians, segons el model de Roggero, es sintetitzen a partir de metilació seguint dues vies:

- a) Cianidina → Peonidina
- b) Delphinidina → Petunidina → Malvidina

Sembla, doncs, que en els cultius la via que predomina és la primera. Això implica que en les cèl·lules mutants de la varietat Gamay Freaux estaria inhibida l'activitat de la flavanoid-3'5'-hidroxilasa, que és la que condueix a la síntesi de delphinidina. En canvi, les condicions d'estrès permeten l'activació dels enzims de la segona via, i això condueix a la síntesi d'aquests 3 antocians.

En treballs de Nakamura⁴⁰⁷, postulen un increment de la metilació en limitar el creixement en cultius de maduixa. En condicions de baixos nivells d'auxina -concretament, l'àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4-D) – s'inhibeix el creixement, i hi ha un increment del ratio peonidina:cianidina. Això fa que els autors suggereixin un efecte d'activació de l'antocian-metiltransferasa (MT), que és l'enzim responsable, per metilació de l'anell B de l'antocià, de la transformació de cianidina a peonidina. Els resultats que observem en el nostre cas, és a dir, l'increment en els nivells de cianidina, indicarien un altre mecanisme d'actuació i que, per tant, la inhibició del creixement seria una altra conseqüència, i no pas la causa, del canvi en les vies biosintètiques d'antocians.

Convé mencionar que es van efectuar determinacions similars per als altres factors que influeixen el contingut total d'antocians (pH, mida de l'inòcul i font de carboni). Tanmateix, i tot i que en alguns treballs amb altres cultius s'han manifestat diferències⁴⁰⁸, en cap cas s'apreciava una variació respecte la corresponent condició (control, estrès nitrogenat o estrès hídric) de referència.

1b. Reaccions de biotransformació per produir antocians acilats

La constatació que el perfil d'antocians pot ser modificat en funció de les condicions del medi ens va portar a plantejar un experiment de biotransformació. S'entén com a Biotransformació l'aprofitament de la maquinària dels cultius vegetals per tal de modificar substrats que s'afegeixen al medi en nous productes de superior valor afegit. En el nostre cas, preteníem que subministrant al medi un agent acilant es dugués a terme la reacció d'acilació en els cultius cel·lulars, i obtenir antocians substituïts en el residu glucosídic amb diferents agents acilants. Els antocians acilats són molt apreciats en l'àmbit de la indústria alimentària com a additius colorants, ja que presenten una major estabilitat que els

⁴⁰⁷ Nakamura, M; Seki, M; Furusaki, S. (1998). "Enhanced anthocyanin methylation by growth limitation in strawberry suspension culture"; *Enzyme Microb. Technol.*, vol 22, 404-408

⁴⁰⁸ Sakurai, M; Mori, T; Seki, M; Furusaki, S. (1996). "Changes of anthocyanin composition by conditioned medium and cell inoculum size using strawberry suspension culture". *Biotechnology letters*, 18(10): 1149-1154













corresponents antocianidin-glucòsids i, per tant, retenen millor el color. Similars experiments s'havien dut a terme amb èxit en cultius de pastanaga⁴⁰⁹ i de patata⁴¹⁰, en què s'introduï en a la molècula d'antocià àcids benzoics i àcids cinnàmics, com l'àcid p-cumàric.

En la nostra metodologia, es va decidir d'abordar aquestes reaccions de biotransformació utilitzant com a possibles agents acilants l'àcid acètic, el p-cumàric i el cafeic, ja que en *Vitis vinifera* es poden detectar de forma natural els antocians acilats corresponents a tots tres, i l'àcid ferúlic i l'àcid cinnàmic, que també es troben presents en quantitats importants en les cèl.lules de raï m.

Procediment experimental: Per tenir una concentració 150 µM en el medi de cada àcid, es van preparar solucions stock 15 mM en tampó MES 1% (p/v), que és un tampó comunament utilitat en cultius cel·lulars vegetals. Per a totes les solucions, es va ajustar el pH a 6.0 amb KOH 2N i es van esterilitzar per filtració de 22µm. En cada medi autoclavat s'afegia 1 ml d'aquestes solucions, i es procedia a fer el cultiu de la forma habitual.

Resultats i discussió

En la taula es recull la producció final en grams de cada cultiu i la seva concentració en antocians:

	control	acètic	cafeic	cinnàmic	cumàric	ferúlic
Estrès nitrogenat ("0")	 7.0 g pes fresc 4.6 mg ant/g	 8.4 g pes fresc 3.4 mg ant/g	 8.1 g pes fresc 3.5 mg ant/g	 8.0 g pes fresc 4.1 mg ant/g	 7.9 g pes fresc 3.5 mg ant/g	 7.7 g pes fresc 3.7 mg ant/g
Control	 16.9 g pes fresc 0.20 mg ant/g	 17.1 g pes fresc 0.13 mg ant/g	 14.1 g pes fresc 0.14 mg ant/g	 14.6 g pes fresc 0.18 mg ant/g	 15.5 g pes fresc 0.20 mg ant/g	 15.3 g pes fresc 0.15 mg ant/g

L'addició d'un àcid sembla estimular lleugerament el creixement dels cultius i, a la vegada, inhibir la síntesi d'antocians. Sembla que la via de síntesi de compostos fenòlics presenta un efecte de retroinhibició per formació de producte, de manera que el fet que hi

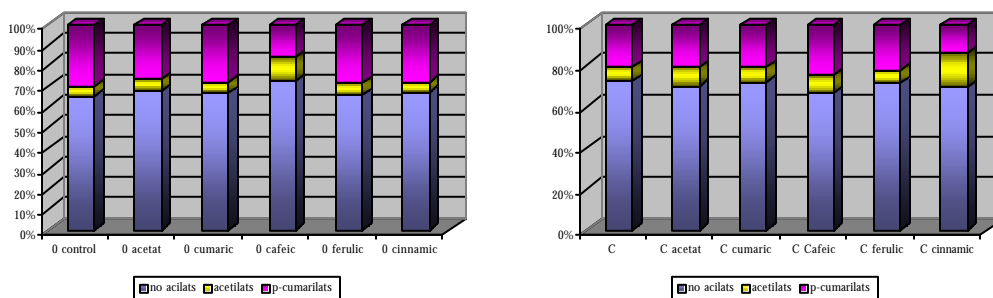
⁴⁰⁹ Dougall, DK; Baker, DC; Gakh, EG; Redus, MA; Whittemore, NA. (1998). "Anthocyanins from wild carrot suspension cultures acylated with supplied carboxylic acids". *Carbohydrate research*, 310:177-189

⁴¹⁰ Plata, N; Konczak-Islam, I; Jayram, S; McClelland, K; Woolford, T; Franks, P. (2003). "Effect of methyl jasmonate and p-coumaric acid on anthocyanin composition in a sweet potato cell suspension culture". *Biochemical Engineering Journal*, 14: 171-177

hagi excés de compostos fenòlics pot inhibir la síntesi, amb la qual cosa la fenilalanina no s'incorpora a aquesta ruta biosintètica i pot destinar-se al metabolisme primari.

En les condicions de treball, no tingué lloc la reacció de biotransformació. La determinació cromatogràfica no va revelar la presència de cap nou pic en el cas dels medis en què s'havia afegit un àcid no present anteriorment com a agent acilant dels antocians sintetitzats per les cèl.lules (cinnàmic, ferúlic). Per tal d'assegurar aquestes observacions, es va fer una determinació mitjançant HPLC-MS en mode SIM, per localitzar els pics M^r corresponents als antocians amb l'agent acilant. El resultat negatiu ens va confirmar que no havia tingut lloc el procés de transformació. Tampoc va donar increment dels pics en el cas dels antocians acilats ja presents de forma natural en les cèl.lules de la varietat d'estudi (acètic, cafeic, p-cumàric).

En la gràfica 5.4.6.3 es presenta la composició antociànica quant a antocians acilats en les diferents condicions d'estudi. Com es pot observar, aquesta roman inalterable malgrat l'addició d'agents acilants, especialment en el cas de l'àcid acètic i l'àcid cumàric. Només s'observen dues variacions. La primera, un augment de la proporció dels antocians acetilats en el cas del cafeic en la condició d'estrès, però que no fou deguda a una síntesi neta dels mateixos sinó a una disminució en el contingut dels derivats p-cumarilats. I la segona, l'increment del contingut de peonidina-acetilglucòsid en la situació control amb cinnàmic, tot i que resulta difícil establir una relació que expliqui aquest fenomen.



Gràfica 5.4.6.3. Percentatges dels antocians acilats i no acilats en suspensions cel.lulars de *Vitis vinifera* en medis suplementats amb àcids

En conclusió, a diferència de les cèl.lules en suspensió d'altres varietats, els cultius de *Vitis vinifera* són resistents a les reaccions de biotransformació.

5.4.7) Efecte de fitohormones

Les fitohormones, en el seu paper de substàncies reguladores del creixement, poden també afectar la biosíntesi d'antocians. La quantitat d'aquests factors presents en el medi i, sobretot, el ratio que s'estableix entre ells, són determinants per la morfogènesi, que determina que un cultiu vagi a un estadi de dediferenciació (com les suspensions cel·lulars) o que es decanti per la diferenciació i organització tissular del teixit. Òbviament, això també afecta a altres característiques del cultiu. El rang de combinacions hormonals i llur concentració afecta la formació de productes secundaris. De fet, el tipus i la concentració de fitohormones disponibles pels cultius cel·lulars és probablement el factor més important que influeix en el seu potencial per la síntesi de productes secundaris. Així per exemple, el 2,4-D és una auxina sintètica inclosa en molts medis; pot estimular la divisió cel·lular i l'expansió cel·lular en molts sistemes, però també pot comportar una suspensió dramàtica de la síntesi de productes secundaris. La utilització de 2,4-D era un dels principals factors que provocava un baix rendiment en els productes secundaris en cultius cel·lulars abans del 1970.

Les principals classes de factors de creixement utilitzats en els cultius vegetals són les auxines, les citoquinines, les giberil·lines i l'àcid abscísic.

En els cultius de Murashige-Skoog, habitualment, es subministren auxines (ex. àcid naftalenacètic) i citoquinines (ex. kinetina). Les auxines es requereixen per la inducció de la divisió cel·lular; mentre que les citoquinines tenen un paper essencial en la diferenciació.

Per tal d'estudiar les repercussions que pot comportar el balanç hormonal en la síntesi d'antocians, es va decidir treballar amb els altres dos grups de reguladors que no es trobaven originalment en el medi de cultiu.

Les giberil·lines tenen un ampli espectre d'efectes fisiològics en les plantes. Estan implicades en la floració, el desenvolupament del fruit, el creixement, la formació de la paret cel·lular, l'expansió cel·lular i la germinació de les llavors.⁴¹¹ A més, també poden potenciar l'activitat metabòlica cap a vies de producció de metabòlits secundaris en respostes relacionades amb la defensa i l'estrès. Això implica que activen la biosíntesi d'antocians.⁴¹²













⁴¹¹ Huttly AK; Philips, AL. (1995). "Gibberellin-regulated plant genes"; *Physiologia Plantarum*, 100:241-254

⁴¹² Ohlsson, AB; Berglund, T. (2001). "Gibberellic acid-induced changes in glutathione metabolism and anthocyanin content in plant tissue"; *Plant, cell, tissue and organ culture* 64:77-80

L'àcid abscísic participa en el control de molts aspectes crucials en el creixement i desenvolupament de la planta. Redueix la divisió cel·lular, inhibeix el creixement promogut per les auxines i les gibberel·lines, i dona tolerància a la dessecació, entre d'altres efectes.⁴¹³

En l'experiment, es va suplementar el medi amb concentracions de cada hormona (àcid abscísic i àcid giberèl·lic) de 10 mg/l, a partir de solucions stocks d'àcid abscísic (ABA) (Sigma) de 1 mg/ml, i d'àcid giberèl·lic (Sigma), de 10 mg/ml. Aquestes solucions es van esterilitzar per filtració amb filtres de 0,22 µm de porus (Millipore). Es va treballar també en condicions d'estrès nitrogenat i en condicions d'estrès hídric.

En la següent taula es recullen els valors finals en pes fresc i producció d'antocians en cada condició de cultiu.

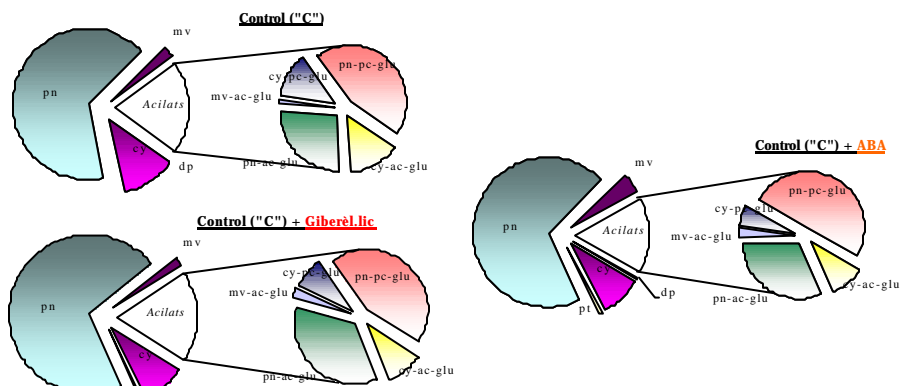
	control	ABA	Gibberèl·lic
Estrès nitrogenat ("0")	 4.8 g pes fresc 1.24 mg ant/g	 5.2 g pes fresc 0.28 mg ant/g	 5.0 g pes fresc 1.54 mg ant/g
Estrès nitrogenat i hídric ("0s")	 2.73 g pes fresc 2.04 mg ant/g	 2.33 g pes fresc 0.94 mg ant/g	 2.51 g pes fresc 1.96 mg ant/g
control	 9.08 g pes fresc 0.162 mg ant/g	 8.60 g pes fresc 0.372 mg ant/g	 10.20 g pes fresc 0.223 mg ant/g
Estrès hídric "0s"	 7.0 g pes fresc 0.134 mg ant/g	 4.45 g pes fresc 0.657 mg ant/g	 6.38 g pes fresc 0.396 mg ant/g

Com pot observar-se, l'àcid giberèl·lic provoca un increment en la síntesi d'antocians, mentre que l'àcid abscísic té un efecte diferent segons les condicions del medi: en una situació control, produeix una major síntesi, mentre que en una situació d'estrès inhibeix la síntesi de compostos fenòlics.

⁴¹³ Chajtir, MB. (1998). "Estudio de los mecanismos implicados en la adaptación a la reducción de la disponibilidad de agua en *Vitis vinifera*"; Tesi Doctoral. URV.

Les següents gràfiques recullen la composició en antocians en les diferents condicions.

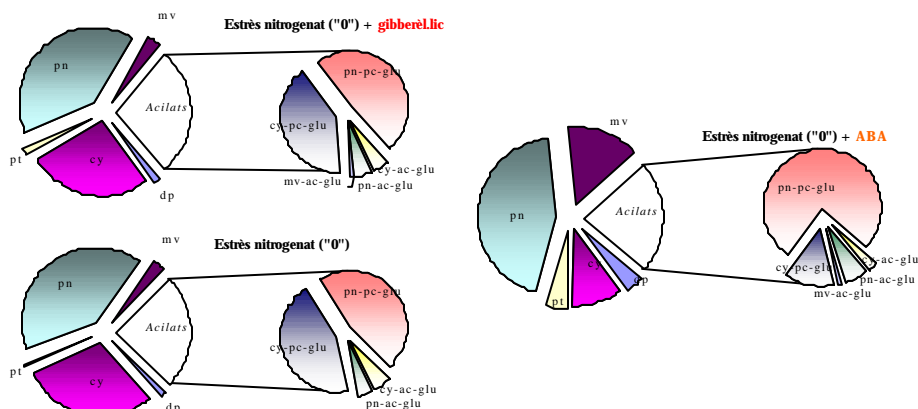
a) Situació control



Gràfic 5.4.7.1. Composició d'antocians en situació control sota l'efecte de les hormones Àcid gibberèlic i Àcid abscísic

La situació control (Gràfic 5.4.7.1) ofereix poques variacions quant a l'acció de les fitohormones. Només és destacable que sota l'efecte de l'àcid abscísic, hi ha un lleuger increment de la síntesi de malvidina-3-glucòsid i una disminució en els nivells d'antocians acilats.

b) Estrès nitrogenat

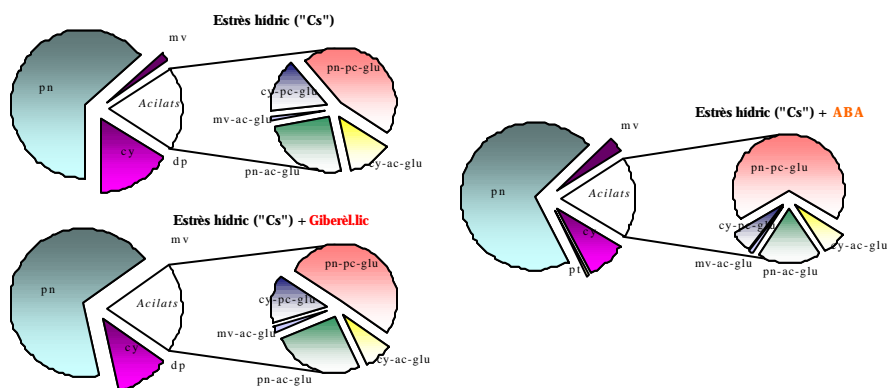


Gràfic 5.4.7.2. Composició d'antocians en situació d'estrès nitrogenat sota l'efecte de les hormones Àcid gibberèlic i Àcid abscísic

La situació d'estrès nitrogenat, en canvi, ofereix variacions substancials quan s'aplica àcid abscísic (Gràfic 5.4.7.2). En aquest cas, augmenta molt considerablement la quantitat de malvidina dels cultius. A més, també es detecten augments de peonidina i, en menor mesura, de petunidina i delfinidina. Aquestes dues últimes eren molt minoritàries en el cultiu sense l'acció de l'abscísic. En canvi, els nivells de cianidina disminueixen notablement. Malgrat que els nivells en antocians acilats romanen força constants, el contingut en peonidina-p-coumarilada i acetilada esdevé també superior que el de les corresponents cianidines acilades. En canvi, l'àcid giberèlic no produeix aquestes divergències.

L'estrès nitrogenat ja tenia un efecte d'incrementar els ratios d'acilació, de delfinidina, petunidina i malvidina. Però resulta clar que l'àcid abscísic tindria un efecte sinèrgic positiu en aquest sentit, ja que potencia aquest efecte.

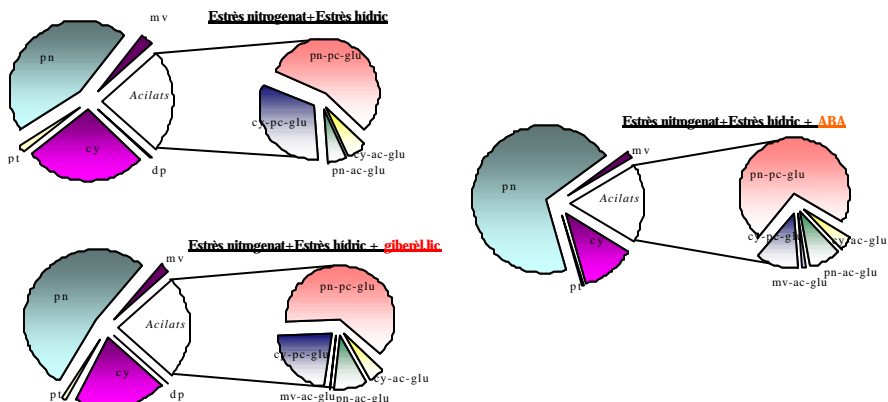
c) Estrès hídric



Gràfic 5.4.7.3. Composició d'antocians en situació d'estrès hídric sota l'efecte de les hormones Àcid giberèlic i Àcid abscísic

En una condició d'estrès hídric, l'àcid abscísic torna a produir els mateixos efectes, tot i que amb menor abast (Gràfic 5.7.4.3): incrementa el contingut de malvidina i de peonidina, tot disminuint el de cianidina. L'augment és força més considerable si es consideren els antocians p-coumarilats. En aquestes condicions, l'àcid giberèlic té un efecte similar, però no tan marcat.

d) Estrès hídric + Estrès nitrogenat



Gràfic 5.4.7.4. Composició d'antocians en situació d'estrès nitrogenat + estrès hídric sota l'efecte de les hormones Àcid giberèl·lic i Àcid abscísic

Si es combinen els efectes de l'estrès nitrogenat i l'estrès hídric, es produeix un efecte equivalent al de l'estrès nitrogenat sol, però en menor extensió (Gràfic 5.4.7.4).

En resum, es constaten els següents efectes:

- L'àcid giberèl·lic estimula la síntesi d'antocians, però té poc efecte en la composició antociànica
- L'àcid abscísic provoca en totes les condicions una disminució de la cianidina i un increment dels altres antocians. Això té lloc en major o menor grau segons les condicions d'estrès del cultiu. En estrès nitrogenat és quan més es manifesta l'efecte. Si recordem el model biosintètic dels antocians, podem arribar a la conclusió que l'acció de l'àcid abscísic està activant la transformació de la cianidina en els altres antocians i, per tant, semblaria causar una activació de la metiltransferasa, que provoca la conversió de cianidina en peonidina, i l'acció de la flavanoid 3',5'-hidroxilasa, que condueix a la síntesi de delphinidina que desemboca en la formació de malvidina i petunidina. Aquest pas és important perquè, com ja

s'ha comentat, aquesta branca de la via biosintètica sembla inhibida en la suspensió cel·lular de Gamay Freaux.

Per tant, el treball amb suspensions cel·lulars i l'acció d'hormones com l'àcid abscísic ofereixen valuoses perspectives de treball per estudiar més detalladament aquesta via biosintètica.

En diversos treballs es contempla la possibilitat de canviar la composició antociànica mitjançant el control sobre les fitohormones. Així per exemple, l'equip dirigit pel Dr. Méryllon⁴¹⁴ observa que l'efecte de les auxines 2,4-diclorofenoxiacètic 2,4-D i Àcid naftalenacètic és oposat, ja que la primera reprimeix tant el creixement com la producció d'antocians, i a més causa una disminució dels nivells de malvidina-3-glucòsid. En canvi, els treballs de Mori⁴¹⁵ mostren que un increment d'auxines i citoquinines provoca un augment de la concentració de cianidina-3-glucòsid i una disminució de la peonidina-3-glucòsid, en un efecte que estaria lligat a la inhibició de l'enzim metiltransferasa. En treballs de Curtin *et al.*, altres reguladors, com l'àcid jasmònic, han demostrat promoure la síntesi d'antocians, amb preferència de la peonidina⁴¹⁶. Tanmateix, en ocasions les fitohormones no promouen canvis significatius⁴¹⁷ ni en la composició ni en el contingut antociànic.

⁴¹⁴ Kriisa, S; Vitrac, X; Décendit, A; Larronde, F; Deffieux, G; Méryllon, JM. (1999). "Obtaining *Vitis vinifera* cell cultures producing higher amounts of malvidin-3-O- β -glucoside"; *Biotechnology Letters*, 21:497-500

⁴¹⁵ Mori, T; Sakurai, M; Seki, M; Furusaki, S. (1994). "Use of auxin and cytokinin to regulate anthocyanin production and composition in suspension cultures of strawberry cells"; *J Sci Food Agric* 65:271-276

⁴¹⁶ Curtin, C; Zhang, W; Franco, C. (2003). "Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation". *Biotechnology letters*, 25(14):1131-1135

⁴¹⁷ Kim, SH; Kim, SY. (2002). "Effects of 2,4-D, BA, and sucrose on growth, production of anthocyanin, pH, and sugar content in "Sheridan" grape cell suspension cultures". *J Plant Biotechnol*, 4(2): 77-82

5.5. CONCLUSIONS

1. D'entre els factors que incideixen en la biosíntesi d'antocians *in vitro*, l'estrès hídric i l'estrès nitrogenat són els que provoquen una major estimulació de la biosíntesi. Les situacions de carència de nitrat en provoquen un augment espectacular, molt superior al de l'estrès osmòtic.
2. L'alteració de paràmetres com el pH o la mida de l'inòcul inicial tenen una repercussió molt menor sobre el creixement i la síntesi d'antocians.
3. La sacarosa és una font de carboni que ocasiona major creixement i major producció d'antocians que la glucosa o la fructosa, especialment en les condicions d'estrès nitrogenat.
4. Les condicions d'estrès nitrogenat i estrès hídric alteren la composició antociànica dels cultius *in vitro*, promovent un increment de l'acilació i l'activació de la branca de la delphinidina en la via biosintètica dels antocians.
5. L'addició de fitohormones com l'àcid abscísic pot alterar també la composició antociànica activant la branca de síntesi dels derivats 5'-hidroxilats. L'efecte de la fitohormona interaccionaria amb els efectes d'estrès.
6. No s'han pogut establir reaccions de biotransformació entre els antocians i els agents acilants. Això suggereix que els mecanismes en *Vitis* i en altres cultius que permeten aquestes reaccions són diferents.

5.6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. **Ramachandra, S., Ravishankar, G.A.** (2002). "Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites". *Biotechnology Advances* 20 101–153
2. **DiCosmo, F; Misawa, M.** (1995). "Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production". *Biotechnology advances*, 13 (3): 425-453
3. **Wink, M.** (1987). "Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids"; a "Cell culture and somatic cell genetics of plants", ed F Constabel i IK Vasil; Academic Press
4. **Banthorpe, DK.** (1988). "Monoterpenes and sesquiterpenes"; a "Cell culture and somatic cell genetics of plants. Volume 5: Phytochemicals in plant cell cultures"; Ed F. Constabel; IK Vasil; Academic Press
5. **Koblitz, H.** (1988). "Anthraquinones"; a "Cell culture and somatic cell genetics of plants. Volume 5: Phytochemicals in plant cell cultures"; Ed F. Constabel; IK Vasil; Academic Press
6. **Yazaki, K; Yoshida, T; Okuda, T.** (1991). "Tannin production in cell suspension cultures of *Geranium thumbergii*". *Phytochemistry*, 30 (2): 501-503
7. **Prusky, D; Hamdan, H; Ardi, R; Keen, NT.** (1996). "Induction of biosynthesis of epicatechin in avocado suspension cells treated with an enriched CO₂ atmosphere". *Physiological and molecular plant pathology*, 48, 171-176
8. **Funk, C; Brodelius, PE.** (1992). "Phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia* Andr. IV. Induction of vanillic acid formation". *Plant Physiol* 99, 256-262
9. **Bourgaud, F.; Gravot, A; Milesi, S.; Gontier, E.** (2001). "Production of plant secondary metabolites: a historical perspective". *Plant Science* 161: 839–851
10. **Castonguay, A; Gali, H; Perchellet, E; Gao, X; Boukharta, M; Jalbert, G; Okuda, T; Yoshida, T; Hatano, T; Perchellet, JP.** (1997). "Antitumorigenic and antipromoting activities of ellagic acid, ellagitannins, and oligomeric anthocyanin and procyanidin". *Int. J. Oncol.* 10, 367-373
11. **Espin, JC; Soler-Rivas, C; Winchers, HJ; Garcia-Viguera, C.** (2000). "Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff". *J Agric Food Chem*, 48, 1588-1592
12. **Magnuson, BA.** (2002). "Evidence of cancer inhibition by anthocyanin-rich extracts". a I Koneczak-Islam (ed.), Proceedings of the International Workshop on anthocyanins resresearch and development in anthocyanins, Australia, p 23.
13. **Koneczak-Islam, I; Okuno, S.; Yoshimoto, M; Yamakawa, O.** (2003); "Composition of phenolics and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture", *Biochemical Engineering Journal*, 14 (3): 155-161
14. **R. Filippini, R. Caniato, A. Piovan and E. M. Cappelletti .** (2003). "Production of anthocyanins by *Catharanthus roseus*", *Fitoterapia*, 74 (1-2), 62-67
15. **Ozeki, Y.** (1996). "Regulation of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultured cells"; *J Plant Res*, 109: 343-351
16. **Wei, Z; Seki, M; Furusaki, S.; Middelberg, APJ.** (1998). "Anthocyanin Synthesis, Growth and Nutrient Uptake in Suspension Cultures of Strawberry Cells", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86 (1), 72-78
17. **Hirasuna, T.J; Shuler, M.L.; Lackney, VK; Spanswick, R.M.** (1991). "Enhanced anthocyanin production in grape cell cultures", *Plant Science*, 78 (1): 107-120

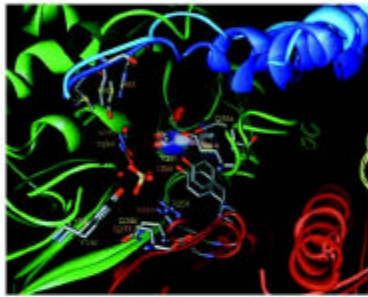
18. **Meyer, J.E; Pépin, MF; Smith, M.A.** (2002). "Anthocyanin production from *Vaccinium pahalae*: limitations of the physical microenvironment". *Journal of Biotechnology*, 93 (1), 45-57
19. **Callebaut, A.; Hendrickx, G.; Voets, A. M; Motte, J. C..** (1990). "Anthocyanins in cell cultures of *Ajuga reptans*". *Phytochemistry*, 29(7): 2153-2158
20. **Zhong J, Yoshida, T.** (1993). "Effects of temperature on cell growth and anthocyanin production in suspension cultures of *Perilla frutescens*". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76 (6), 530-531
21. **Wellmann, E; Hrazdina, G; Grisebach, H;** (1976) "Induction of anthocyanin formation and of enzymes related to its biosynthesis by UV light in cell cultures of *Haplopappus gracilis*". *Phytochemistry*, 15(6): 913-915
22. **Kakegawa, K; Hattori, E; Koike, K; and Takeda, K.** (1991). "Induction of anthocyanin synthesis and related enzyme activities in cell cultures of *Centaurea cyanus* by UV-light irradiation". *Phytochemistry*, 30 (7): 2271-2273
23. **Hall, RD; Yeoman, MM.** (1986). "Temporal and spatial heterogeneity in the accumulation of anthocyanins in cell cultures of *Catharanthus roseus*". *J Exp Botany*, 37, 486-498
24. **Hall, RD; Yeoman, MM.** (1987). "Intercellular and intercultural heterogeneity in secondary metabolite accumulation in cultures of *Catharanthus roseus* following cell line selection". *J Exp Botany*, 38(193):1391-1398
25. **Marshall, Smith, MA; Lee, C; Deroles, S; Davies, KM.** (2002). "Differential gene expression between pigmented and non-pigmented cell culture lines of *Daucus carota*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70:91-97
26. **Seitz, HU; Hinderer, W.** (1988). "Anthocyanins"; a "Cell culture and somatic cell genetics of plants. Volume 5: Phytochemicals in plant cell cultures"; Ed F. Constabel; IK Vasil; Academic Press
27. **Waffo, T; Decendit, A; Vercauteren, J; Deffieux, G; Mérillon, JM** (1996). "Trans-resveratrol-3-O- β -glucoside (piceid) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*"; *Phytochemistry*, 42(6), 1591-1593
28. **Decendit, A; Gopal, K; Waffo, P; Deffieux, G; Badoc, A; Mérillon, JM** (1996). "Anthocyanins, catechins, condensed tannins and piceid production in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures". *Biotechnology letters*, 6: 659-662
29. **Waffo, P; Fauconneau, B; Déffieux, G; Huguet, F; Vercauteren, J; Mérillon, JM.** (1998). "Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures". *J Nat Prod*, 61: 655-657
30. **Krisa, S; Waffo, P; Décendit, A; Deffieux, G; Vercauteren, J; Mérillon, JM** (1999). "Production of ¹³C-labelled anthocyanins by *Vitis vinifera* cell suspension cultures". *Phytochemistry*, 51: 651-656
31. **Bailly, C; Cormier, F; Do, CB.** (1997). "Characterization and activities of S-adenosyl-L-methionine: cyanidin 3-glucoside 3'-O-methyltransferase in relation to anthocyanin accumulation in *Vitis vinifera* cell suspension cultures". *Plant Science* 122:81-89
32. **Lofty, S; Fleuriet, A; Ramos, T; Macheix, JJ.** (1989). "Biosynthesis of phenolic compounds in *Vitis vinifera* cell suspension cultures: study on hydroxycinnamoyl CoA:ligase". *Plant Cell Reports*, 8:93-96
33. **Suzuki, N; Sakuta, M; Shimizu, S; Komamine, A.** (1995). "Changes in the activity of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase in suspension-cultured cells of *Vitis*". *Physiologia Plantarum*, 94: 591-596

34. **Deswarte, C; Canut, H; Klaebe, A; Roustan, JP; Fallot, J.** (1996). "Transport, cytoplasmatic accumulation and mechanism of action of the toxin eutypine in *Vitis vinifera* cells". *J Plant Physiol*, 149: 336-342
35. **Morales, M; Bru, R; García-Carmona, F; Ros-Barceló, A; Pedreño, MA.** (1998). "Effect of dimethyl- β -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus ampelinus*". *Plant, cell, tissue and organ culture*, 53:179-187
36. **Cabrita, L; Fossen, T; Andersen, MO.** (2000). "Colour and stability of the six common anthocyanidin-3-glucosides in aqueous solutions"; *Food Chem.* 68: 101-107
37. **Xiong, L. Zhu, JK.** (2002). "Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress". *Plant, Cell and Environment*, 25: 131-139
38. **Wang, HL; Lee, PD; Liu, LF; Su, JC.** (1999). "Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures". *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40:219-225
39. **King, PJ; Street, HE.** (1977). "Growth patterns in cell cultures"; a "Plant tissue and cell culture"; edited by HE Street; Blackwell Scientific Publications
40. **Stepan-Sarkissian, G; Grey, D.** (1990). "Growth and determination and medium analysis" a "Methods in Molecular Biology. Plant Cell and Tissue Culture, vol 6; JW Pollard & JM Walker; The Humana Press
41. **Cormier, F; Couture, R; Do, CB; Pham, TQ; Tong, VH.** (1997). "Properties of anthocyanins from grape cell culture"; *J. Food Science*, 62 (2), 246-248
42. **Do, CB; Cormier, F.** (1990). "Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions". *Plant cell Reports*, 9:143-146
43. **Cormier, F; Crevier, H; Do, CB.** (1990) "Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension.". *Can J Bot*, 68: 1822-1825
44. **Kakegawa, K; Suda, J; Sugiyama, M; Komamine, A.** (1995). "Regulation of anthocyanin biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis* in relation to cell division". *Physiologia plantarum* 94:661-666
45. **Tholalakabavi, A; Zwiazek, J; Thorpe, T** (1997). "Osmotically-stressed poplar cell cultures: anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition". *J. Plant Physiol*, 151: 489-496
46. **Mori, T; Sakurai, M.** (1995). "Effects of riboflavin and increased sucrose on anthocyanin production in suspended strawberry cell cultures". *Plant Science* 110: 147-153
47. **Do, CB; Cormier, F.** (1991). "Effects of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension cultured in a product medium". *Plant, cell, tissue and organ culture*, 27:169-174
48. **Mori, T; Sakurai, M.** (1994). "Production of anthocyanin from strawberry cell suspension cultures; Effects of sugar and nitrogen". (1994). "*Journal of food science*, 59(3): 588-593
49. **Kim, S; Kim, S.** (2002): "Effect of nitrogen source on cell growth and anthocyanin production in callus and cell suspension cultures of "Sheridan" grapes". *J Plant Biotechnology*, 42:83-89
50. **Keller, M; Hrazdina, G.** (1998). "Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening". *Am J Enol and Vitic*, 49(3): 341-349

51. **Zhang, W; Furusaki, S** (1997). "Regulation of anthocyanin synthesis in suspension cultures of strawberry cell by pH"; *Biotechnology Letters*, 19 (11), 1057-1061
52. **Suzuki, M.** (1995). "Enhancement of anthocyanin accumulation by high osmotic stress and low pH in grape cells (*Vitis* hybrids); *J. Plant. Physiol.* 147, 152-155
53. **Jardin, B; Tom, R; Chavarie, C; Rho, D; Archambault, J.** (1995). "Stimulated indole alkaloid release from *Catharanthus roseus* immobilized cultures. Initial studies"; *J Biotechnol* 21: 43-62
54. **Ho CH; Shanks, JV.** (1992). "Effects of initial medium pH on growth and metabolism of *C. Roseus* hairy root cultures". *Biotechnol. Letters*, 14: 959-964
55. **Morgan, JA; Barney, CS; Penn, AH; Shanks, JV.** (2000). "Effects of buffered media upon growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* hairy roots"; *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 262-265
56. **Saenz LA; Maldonado, IE; Moreno, O; Ciau, R; Lopez, M; Oropeza, C; Loyola, VM.** (1993). "Effect of the medium pH on the release of secondary metabolites from roots of *Datura stramonium*". *Appl Biochem Biotechnol* 38:257-267
57. **Cormier, F; Do, CB; Moresoli, C.** (1992). "Anthocyanin release from grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension". *Biotechnol Letters*, 14(11): 1029-1034
58. **Su, WW; Lei, F.** (1993). "Rosmarinic acid production in perfused *Anchusa officinalis* culture: effect of inoculum size"; *Biotechnology letters*, 15, 1035-1038
59. **Zhong, JJ; Toshida, T,** (1995). "High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size"; *Enzyme Microb. Technol.*, 17: 1073-1079
60. **Mori, T; Sakurai, M; Shigeta, J; Yoshida, K; Kondo, T.** (1993). "Formation of anthocyanins from cell cultured from different parts of strawberry plants". *Journal of Food Science*, 58(4): 788-792
61. **Fowler, MW; Stepan-Sarkissian, G.** (1985). "Carbohydrate source, biomass productivity and natural product yield in cell suspension cultures"; a "Primary and secondary metabolism of plant cell cultures", KH Neumann, W Barz & E Reinhard, Ed Springer-Verlag
62. **Novo, MT; Beltran, G; Torija, MJ; Poblet, M; Rozès, N; Guillamón, JM; Mas, A; .** (2003). "Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentations"; *Int.J. Food Microbiology* 86: 153-161
63. **Zhang, W; Seki, M; Furusaki, S; Middelberg, AP.** (1998). "Anthocyanin synthesis, growth and nutrient uptake in suspension cultures of strawberry cells". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(1): 72-78
64. **Pépin, MF; Archambault, J; Chavarie, C; Cormier, F.** (1995). "Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspension cultures: I. Shake Flask Cultures"; *Biotechnology and bioengineering*, 47: 131-138
65. **Guardiola, J; Iborra, JL; Cánovas, M.** (1995). "A model that links growth and secondary metabolite production in plant cell suspension cultures". *Biotechnology and Bioengineering*, 46: 291-297
66. **Pérez, FJ; Meza, P; Berti, M; Pinto, M.** (2000). "Effect of carbon source and sucrose concentration on growth and hexose accumulation of grape berries cultured *in vitro*". *Plant, cell, tissue and organ culture*, 61:37-40
67. **Ruffner, HP; Adler, S; Rast, DM** (1990). "Soluble and wall associated forms of invertase in *Vitis vinifera* L.". *Phytochemistry* 29:2083-2086

68. **Narayan, MS; Venkataraman, LV.** (2002). "Effect of sugar and nitrogen on the production of anthocyanin in cultured carrot (*Daucus carota*) cells", *J Food Science*, 67(1):84-86
69. **Nagarajan, RP; Keshavarz, E; Gerson, DF.** (1989). "Optimization of anthocyanin yield in a mutated carrot cell line (*Daucus carota*) and its implications in large scale production". *J. Ferment. Bioeng* 68:102-106
70. **Schluepmann, H; Pellny, T; van Dijken, A; Smeekens, S; Paul, M.** (2003). "Trehalose-6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*". *Plant Biology*, 100(11): 6849-6854
71. **Crowe, JH; Crowe, LM; Oliver, AE; Tsvetkova, N; Wolkers, W; Tablin, F** (2001). "The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state". *Cryobiology*, 43: 89-105
72. **Springob, K; Nakajima, J; Yamakazi, M; Saito, K** (2003). "Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins". *Nat Prod Rep*, 20: 288-303
73. **Conn, S; Zhang, W; Franco, C.** (2003). "Anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) selectively bind acylated anthocyanins in *Vitis vinifera* L. (grapevine) suspension culture". *Biotechnology Letters*, 25:835-839
74. **Nakamura, M; Seki, M; Furusaki, S.** (1998). "Enhanced anthocyanin methylation by growth limitation in strawberry suspension culture"; *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 404-408
75. **Sakurai, M; Mori, T; Seki, M; Furusaki, S.** (1996). "Changes of anthocyanin composition by conditioned medium and cell inoculum size using strawberry suspension culture". *Biotechnology letters*, 18(10): 1149-1154
76. **Dougall, DK; Baker, DC; Gakh, EG; Redus, MA; Whittemore, NA.** (1998). "Anthocyanins from wild carrot suspension cultures acylated with supplied carboxylic acids". *Carbohydrate research*, 310:177-189
77. **Plata, N; Konczak-Islam, I; Jayram, S; McClelland, K; Woolford, T; Franks, P.** (2003) "Effect of methyl jasmonate and p-coumaric acid on anthocyanin composition in a sweet potato cell suspension culture". *Biochemical Engineering Journal*, 14: 171-177
78. **Huttly AK; Philips, AL;** "Gibberellin-regulated plant genes". (1995) *Physiologia Plantarum*, 100:241-254.
79. **Ohlsson, AB; Berglund, T;** "Gibberellic acid-induced changes in glutathione metabolism and anthocyanin content in plant tissue"; *Plant, cell, tissue and organ culture* 64:77-80, 2001
80. **Chajtir, MB.** (1998) "Estudio de los mecanismos implicados en la adaptación a la reducción de la disponibilidad de agua en *Vitis vinifera*"; Tesi Doctoral. URV.
81. **Krisa, S; Vitrac, X; Décendit, A; Larronde, F; Deffieux, G; Mérillon, JM.** (1999). "Obtaining *Vitis vinifera* cell cultures producing higher amounts of malvidin-3-O- β -glucoside"; *Biotechnology Letters*, 21:497-500
82. **Mori, T; Sakurai, M; Seki, M; Furusaki, S.** (1994). "Use of auxin and cytokinin to regulate anthocyanin production and composition in suspension cultures of strawberry cells"; *J Sci Food Agric* 65:271-276
83. **Curtin, C; Zhang, W; Franco, C.** (2003). "Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation". *Biotechnology letters*, 25(14):1131-1135
84. **Kim, SH; Kim, SY.** (2002). "Effects of 2,4-D, BA, and sucrose on growth, production of anthocyanin, pH, and sugar content in "Sheridan" grape cell suspension cultures". *J Plant Biotechnol*, 4(2): 77-82

Capítol 6



ACTIVITAT IN VITRO DE LA FENILALANINA AMONIO LIASA (PAL)

6.1. INTRODUCCIÓ

1. PAL

La fenilalanina amonio liasa (PAL) (E.C.4.3.1.5.) catalitza la desaminació no oxidativa de la L-fenilalanina per donar àcid trans-cinnàmic (figura 6.1). Aquest és el primer pas de la biosíntesi de l'esquelet fenilpropanoide que genera els compostos fenòlics en les plantes superiors.⁴¹⁸

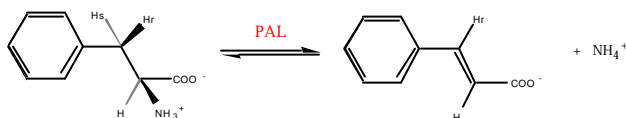


Figura 6.1. Reacció de desaminació de la fenilalanina per donar àcid cinnàmic i amoni, catalitzada per l'enzim fenilalanina amonio liasa (PAL)

La PAL és, doncs, un enzim implicat en la biosíntesi de precursors dels flavonoides. Posteriorment, a partir de l'àcid cinnàmic es genera l'àcid p-cumàric, que s'activa en forma de 4-cumaroil-CoA per, en una reacció de condensació amb 3 molècules de malonil-coA catalitzada per l'enzim calcona sintasa, generar la molècula de calcona, a partir de la qual es generen els compostos flavonoides. La via principal de la biosíntesi de flavonoids va ser deduïda fa 20 anys utilitzant dades d'estudis químic-genètics i d'estudis amb precursors marcats radioactivament (figura 6.2).⁴¹⁹

Els enzims implicats en la biosíntesi de flavonoides es classifiquen en 3 grups generals:

- * enzims implicats en la biosíntesi de precursors. Ex. PAL
- * enzims implicats en la síntesi de les classes de flavonoides. Ex. calcona isomerasa
- * enzims responsables de la modificació de flavonoides. Ex. glicosiltransferases

⁴¹⁸ Camm, EL; Towers, GHN. (1973). "Phenylalanine ammonia lyase", *Phytochemistry*, 12:961-973

⁴¹⁹ Lister; Lancaster; Walker (1996). "Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars", *J Sci Food Agric* 71: 313-320

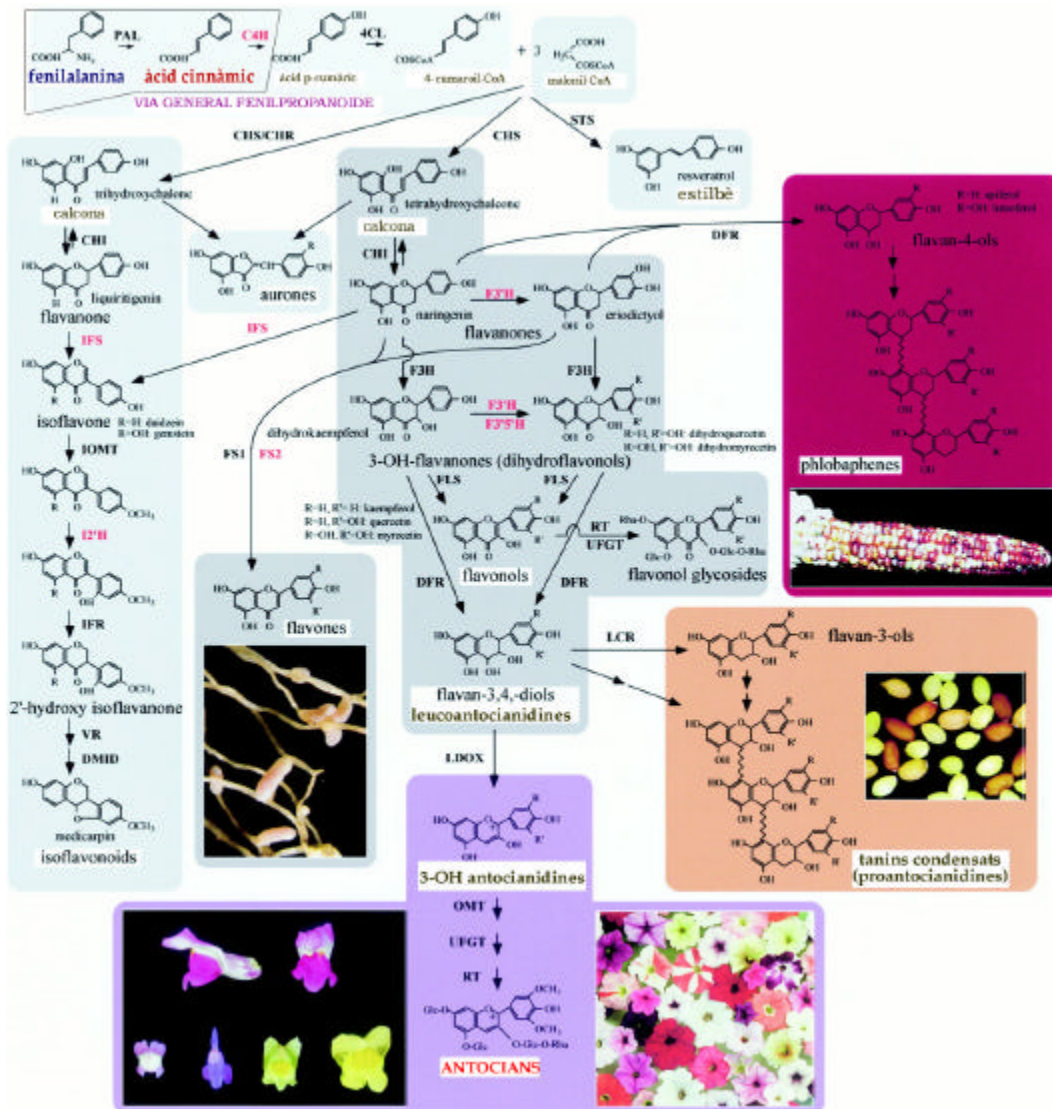


Figura 6.2. Via general fenilpropanoide

La fenilalanina amonio liasa és considerada l'enzim clau relacionat amb el metabolisme secundari de les plantes, ja que dirigeix el flux dels àtoms de Carboni de la Fenilalanina cap a la síntesi de compostos fenòlics en lloc de cap a síntesi proteica⁴²⁰ i per això es considera de manera general com un punt clau en què es controla el flux de carboni dintre de la via.

⁴²⁰ Zucker, W. (1965) "Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue"; Plant Physiology, 40 (5): 779-784

Els nivells d'activitat d'aquest enzim depenen del genotip i també de l'edat, l'estadi de desenvolupament, l'òrgan o el tipus de teixit. Els canvis en la seva activitat estan associats a processos de diferenciació, xilogènesi, i estadis específics de desenvolupament dels teixits⁴²¹.

La PAL ha estat caracteritzada en gran nombre de fruits, com el raï m⁴²², la poma⁴²³, la maduixa⁴²⁴ o la llimona⁴²⁵. En tots ells, un increment en l'activitat d'aquest enzim es relaciona amb la formació de compostos fenòlics en la maduració. Els patrons dels seus canvis durant el desenvolupament del fruit són força similars en els diversos fruits: partint d'uns valors relativament alts quan es comença a desenvolupar, s'assoleixen uns nivells d'activitat molt baixos quan el fruit encara és verd, i els nivells incrementen durant la maduració, en un efecte força coincident amb l'acumulació d'antocians en el raï m^{426,427}, la poma, o la maduixa^{428,429}.

L'activitat PAL està afectada per la llum, la temperatura, els reguladors del creixement, els inhibidors de la síntesi de RNA i de proteïnes⁴³⁰, les lesions i la nutrició mineral^{431,428}. Aquests factors que influeixen la inducció de la PAL normalment estimulen la producció de compostos fenòlics.

En el raï m, l'activitat disminueix amb les altes temperatures. Així, per exemple, s'obté una major activitat a 20°C que a 30°C.⁴³⁵ En alguns casos, s'ha vist que aquest efecte té lloc per una disminució dels nivells de proteïnes inhibidores de la PAL.

La llum sembla indispensable per a la síntesi d'antocians, tot i que la foscor no suprimeix completament l'activitat de la PAL^{435, 432}. Però la seva activitat respon positivament a la llum

⁴²¹ Jones, DH. (1984). "Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development"; *Phytochemistry* 23(7): 1349-1359

⁴²² Roubelakis-Angelakis, KA; Kliewer, WM. (1985). "Phenylalanine ammonia-lyase in berries of *Vitis vinifera* L.: extraction and possible sources of error during assaying"; *Am J Enol Vitic* 36: 314-315

⁴²³ Faragher, JD; Brohier, RL. (1984). "Anthocyanin accumulation in apples skin during ripening: Regulation by ethylene and phenylalanine ammonia-lyase" *Sci Hortic* 22:89-96

⁴²⁴ Given, NK; Venis, MA; Grierson, D. (1988). "Purification and properties of phenylalanine-ammonia lyase from strawberry fruit and its synthesis during ripening"; *J Plant Physiol* 133:31-37(1988)

⁴²⁵ Dubery, IA; Schabert, JC. (1986). "Phenylalanine ammonia lyase from *Citrus sinensis*: purification hydrophobic interaction chromatography and physical characterization"; *Biochem Int* 13: 579-589

⁴²⁶ Kataoka, I; Kubo, Y; Sugiura, A; Tomana, T (1983). "Changes in L-phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis during berry ripening of three grape cultivars"; *J Japan Soc Hort Sci* 33, 213-220

⁴²⁷ Hrazdina, G; Parsons, GF; Mattick, LR. (1984). "Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries"; *Am J Enol Vitic* 35:220-227 (1984)

⁴²⁸ Lister, C; Lancaster, J. (1996). "Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity and its relationship to anthocyanin and flavonoid levels in New Zealand-grown apple cultivars"; *J Amer Soc Hort Sci* 121 (2): 281-285 (1996)

⁴²⁹ Cheng GW; Breen, PJ. (1991). "Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit"; *J Am Soc Hortic Sci* 116:865-869

⁴³⁰ Hahlbrock, K; Ragg, H. (1973). "Light-Induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures: effects of inhibitors of RNA and protein synthesis"; *Archiv Biochem Biophysics* 166, 41-46

⁴³¹ Shye Tan; "Relationships and interactions between phenylalanine ammonia-lyase, phenylalanine ammonia-lyase inactivating system, and anthocyanin in apples". (1979). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104(5):581-586

⁴³² Roubelakis-Angelakis, KA; Kliewer, WM. (1986). "Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grape berries"; *Am J Enol Vitic*, 37 (4) 275-280

blanca⁴³³ i a la llum UV⁴³⁴, encara que en aquest cas s'ha descrit que pot establir-se una inhibició d'altres enzims de la via i, per tant, no observar-se un increment en el contingut en fenòlics totals.⁴³⁹

Els factors de creixement també afecten l'activitat d'aquest enzim. El tractament amb àcid abscíssic al començament de la maduració estimula tant l'acumulació d'antocians com l'activitat PAL, mentre que l'àcid naftalenacètic els suprimeix⁴³⁵. També té un efecte potenciador l'àcid gibberèlic en maduixes⁴³⁶, encara que és un efecte dependent de la dosi; o l'àcid indolacètic en l'arrel de naps i xirivies. Més controvèrsia suscita el paper de l'etilè, ja que està generalment descrit que estimula l'activitat PAL⁴³⁷, però en alguns casos no l'afecta⁴³⁸. De fet, la síntesi d'etilè i l'activitat PAL es desenvolupen quasi simultàniament⁴³⁸. El fet que ambdós (PAL i etilè) siguin induïts en situacions d'estrès fa que se'ls consideri com a mecanismes defensius de les plantes. En aquest sentit, la PAL participa en els processos de formació de dipòsits de lignina en lesions en les plantes⁴³⁹; i també s'estimula en infeccions per microorganismes com *Botrytis cinerea*⁴⁴⁰.

En l'àmbit alimentari, la PAL no és només important pel seu paper en la maduració del fruit. Aquest enzim també pot actuar al llarg de l'emmagatzematge de verdures i fruits, causant l'aparició de taques colorejades en els mateixos⁴⁴¹, ja que promou la síntesi de compostos fenòlics que són després oxidats per les polifenol oxidases, donant coloracions marronoses. En aquestes situacions, induïdes per l'acció de l'etilè, la utilització d'una atmosfera enriquida en CO₂ sembla inhibir la seva activitat i, per tant, disminuir l'abast d'aquestes lesions⁴⁴², encara que alguns autors sostenen que la inhibició de la lesió no ve activada per la PAL, sinó per altres enzims de la via^{443, 444}, especialment les polifenol

⁴³³ Hrazdina, G; Parsons, GF. (1982). "Induction of flavonoid synthesizing enzymes by light in etiolated pea (*Pisum sativum* cv. Midfreezer) seedlings"; *Plant Physiol.* (1982), 506-510

⁴³⁴ Kakegawa, K; Hattori, E; Koike, K; Takeda, K. (1991). "Induction of anthocyanin synthesis and related enzyme activities in cell cultures of *Centauria cyanus* by UV-light irradiation"; *Phytochemistry*, 30 (7): 2271-2273

⁴³⁵ Kataoka, I; Kubo, Y; Sugiura, A; Tomana, T. (1984). "Effects of temperature, cluster shading and some growth regulators on L-phenylalanine-ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in black grapes"; *Mem Cvoll Agric Kyoto Univ*, 124: 35-44

⁴³⁶ Montero, T; Mollá, E; Martín-Cabrejas, M; López-Andreu, F. (1988). "Effects of gibberellic acid (GA3) on strawberry PAL and TAL enzyme activities"; *J Sci Food Agric* ; 77: 230-234

⁴³⁷ Rhodes, MJC; Wooltronton, LSC;. (1971). "The effect of ethylene on the respiration and on the activity of Phenylalanine ammonia lyase in swede and parsnip root tissue"; *Phytochem* , 10:1989-1997

⁴³⁸ Blankenship, SM; Unrath, CR; "PAL and ethylene content during maturation of red and golden delicious apples". (1988). *Phytochemistry*, vol 27 (4): 1001-1003

⁴³⁹ Ramamurthy, M; Maii, B; Thomas, P; Madhusudan, P. (1992). "High-performance liquid chromatography determination of phenolic acids in potato tubers (*Solanum tuberosum*) during wound healing"; *J Agric Food Chem*, 40, 569-572

⁴⁴⁰ McLeod, L; Poole, PR. (1994). "Changes in enzymic activities after harvest and in early stages of *Botrytis cinerea* infection of kiwifruit"; *J Sci Food Agric*, 64, 95-100

⁴⁴¹ Dangyang, K; Saltveit, ME; (1989); "Developmental control and russet spotting, phenolic enzymes, and IAA oxidase in cultivars of iceberg lettuce"; *J Amer Soc Hort Sci* 114(3)472-477

⁴⁴² Holcroft, D; Gil, M; Kader, A. (1988). "Effect of carbon dioxide on anthocyanins, phenylalanine ammonia lyase and glucosyltransferase in the arils of stored pomegranates"; *J Amer Soc Hort Sci* 123(1)136-140

⁴⁴³ Hamza, F; Castaigne, F; Couture, R; Makhoulouf, J;. (1994). "Effet d'une atmosphère riche en CO₂ sur la teneur en phénols et l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase de la laitue romaine"; *Sciences des Aliments* 14:311-320

oxidases, ja que en alguns casos no s'observa un increment de fenòlics totals concomitant a l'increment de l'activitat PAL.

2. Expressió gènica

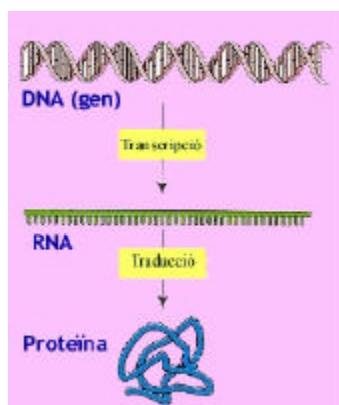


Figura 6.3.

L'activitat d'un determinat enzim, com la PAL, encara que també pot estar modulada per l'acció d'activadors i inhibidors, depèn de la concentració d'enzim que s'hagi sintetitzat. Per a això, és fonamental que s'activi l'expressió del gen que codifica la informació per a sintetitzar aquest enzim. L'expressió de la informació genètica o expressió gènica d'un gen determinat que codifica per a una proteïna comporta sempre un primer pas de transcripció d'aquest gen en una molècula de RNA missatger complementari, que després promourà la síntesi de la proteïna corresponent. En estudis d'expressió gènica, s'analitza la quantitat de

RNA corresponent al gen d'interès sintetitzada en unes condicions determinades, ja que això indicarà la quantitat de proteïna d'interès present en la cèl·lula (figura 6.3).

Sembla existir una correlació entre l'acumulació d'antocians i l'expressió dels gens que codifiquen els enzims de la via dels flavonoides al llarg de la maduració de les baies dels fruits⁴⁴⁵. En el cas de les maduixes, s'ha detectat que en aquest període hi ha una inducció de l'expressió de l'activitat de la PAL, primer enzim de la via, i del darrer, la UDP-Glc:flavonoid O-glucosiltransferasa (UFGT)^{446, 447}.

En el cas dels raïms, en un estudi amb la varietat Syrah s'ha constatat que l'expressió dels gens de la PAL, la calcona sintasa (CHS), la calcona isomerasa (CHI), la flavanona-3-hidroxilasa (F3H), la dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), i la leucoantocianidin dioxigenasa (LDOX) a les pells ja té lloc 4 setmanes després de la floració. En canvi, en aquesta etapa no es detecta el gen de la UFGT. L'expressió de tots ells s'incrementa en una inducció coordinada a les 10 setmanes de la floració, coincidint amb la biosíntesi d'antocians, excepte

⁴⁴⁴ Ritenour, MA; Ahrens, MJ; Saltveit, ME. (1995). "Effects of temperature on ethylene-induced phenylalanine ammonia lyase activity and russet spotting in harvested iceberg lettuce"; *J Amer Soc Hort Sci* 120(1):84-87

⁴⁴⁵ Jaakola, L; Määtä, K; Pirttilä, AM; Törrönen, R; Kärenlampi, S; Hohtola, A. (2002). "Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin and flavonol levels during bilberry fruit development"; *Plant Physiology*, vol 130, 729-739

⁴⁴⁶ Perkin-Veazie, P. (1995). "Growth and ripening of strawberry fruit"; *Hortic Rev* 17: 267-297

en el cas de la PAL, per la qual també s'observa un increment, però que no comença fins a la 12^a setmana. Totes aquestes observacions fan pensar que el pas clau que regula la biosíntesi d'antocians en *Vitis* és l'activitat UFGT, ja que no és fins el moment de la seva activació que es produeix la biosíntesi d'antocians, malgrat que la resta d'enzims de la via ja estiguin expressant-se. També reforça aquesta hipòtesi el fet que no s'ha detectat l'expressió d'aquest gen en la polpa, on no es produeixen antocians. Tot això suggereix un mecanisme de regulació en què participarien dos tipus de gens reguladors: uns que s'expressen abans i que regularien tots els gens excepte el de l'UFGT; i uns altres que s'expressen en la maduració i que indueixen l'expressió de tots aquest gens estructurals. Un altre possible mecanisme implicaria un gen regulador que controlaria tots els enzims excepte l'UFGT i que s'expressaria contínuament, i un gen regulador que controlaria l'UFGT i que només actuaria en l'etapa de la maduració.⁴⁴⁸ Aquest mecanisme regulador proposat no és universal, ja que tot i que s'assembla força amb el del nabiu⁴⁴⁵, difereix de l'establert per a altres espècies com el blat de moro⁴⁴⁹, o la petúnia⁴⁵⁰, en què sembla que la regulació actua en una etapa anterior a la de l'UFGT, concretament a nivell de la F3H i la DFR, respectivament.

La PAL sembla existir de manera universal en les plantes superiors com una família de gens amb elevada similitud de seqüència⁴⁵¹, de manera que s'observa la presència de diferents isoformes d'aquest enzim.⁴⁵² En cultius de pastanaga, per exemple, s'han establert dos gens de la PAL; però només un d'ells està involucrat en la biosíntesi d'antocians⁴⁵³, mentre que l'altre s'activa en situacions d'estrès⁴⁵⁴. En el julivert se'n detecten quatre⁴⁵¹, i en nabiu, dos⁴⁵².

Els gens de la PAL poden ser induïts per la llum^{451, 455}, l'ús d'el·licitors fúngics^{456, 451}, les baixes temperatures⁴⁵⁷, les lesions i l'estrès amb clorur de mercuri⁴⁵⁵, situacions per a les quals també estava descrit un augment en la seva activitat.

⁴⁴⁷ Moyano, E; Portero-Robles, I; Medina-Escobar, N; Valpuesta, V; Muñoz-Blanco, J; Caballero, JL. (1998). "A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during ripening process"; *Plant Physiol*, 117: 711-716

⁴⁴⁸ Boss, PK; Davies, C; Robinson, SP. (1996). "Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. Cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation"; *Plant Physiol*, 11:1059-1066

⁴⁴⁹ Larson, L; "Genetics, precursors and enzymes in flavanoid biosynthesis in maize" a "The Genetics of Flavanoids", ed Styles; Unicopli.

⁴⁵⁰ Quattrocchio, F; Wing, JF; Leppen, HTC; Mol, JMN; Koes, RE. (1993). "Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct set of target genes"; *Plant cell*, 5: 1497-1512

⁴⁵¹ Lois, R; Dietrich, A; Hahlbrock, K; Schulz, W. (1989). "A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements"; *The EMBO Journal*, vol 8, n^o6, 1641-1648

⁴⁵² Kumar, A; Ellis, BE. (2001). "The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression and evolution"; *Plant Physiology*, (127), 230-239

⁴⁵³ Ozeki, Y; Takeda, J. (1994). "Regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes in carrot suspension cultured cells"; *Plant, cell, tissue and organ culture*, 38: 221-225

⁴⁵⁴ Ozeki, Y. (1996). "Regulation of anthocyanin synthesis in carrot suspension cells"; *J. Plant Res* 109:343-351

⁴⁵⁵ Ohl, S; Hedrick, S; Chory, J; Lamb, CJ. (1990). "Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*"; *The Plant Cell*, vol 2, 837-848

⁴⁵⁶ Melchior, F; Kindl, H. (1991). "Coordinate and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis cv. Optima*"; *Arch Bioch and Bioph.*, vol 288, n^o2, 552-557

⁴⁵⁷ Leyva, A; Jarillo, JA; Salinas, J; Martinez-Zapater, JM. (1995). "Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner"; *Plant Physiol*, 108: 39-46

Existeixen diverses tècniques per analitzar l'expressió gènica. Una de les més utilitzades per a l'estudi dels enzims implicats en la biosíntesi d'antocians ha estat el Northern blot o hibridació *in situ* del mRNA^{448, 451, 453, 456, 457}. En aquest cas, el RNA missatger és aïllat, separat mitjançant electroforesi, hibridat en una membrana i posteriorment, enfrontat a una sonda del gen d'interès marcada, sigui radioactivament o amb altres agents (com la digoxigenina) que permetin la detecció i l'estimació de la quantitat d'hibridació. Aquesta tècnica presenta complicacions de tipus operatiu, i a més resulta difícil quan s'analitzen gens específics de cèl·lules o teixits en què l'abundància del RNA missatger és baixa o quan la quantitat de material de partida és un factor limitant⁴⁵⁸.

En el treball de Jaakola *et al*⁴⁴⁵ la hibridació no s'efectua directament amb el RNA, ja que els antocians causen problemes en la detecció amb el seu sistema, fonamentat en la digoxigenina. Per aquest motiu efectuen la hibridació amb el cDNA corresponent al RNA aïllat. En aquest punt la metodologia s'assembla a una altra de les eines per determinar l'expressió gènica: la RT-PCR.

La tècnica de la RT-PCR quantitativa consisteix a realitzar una retrotranscripció (RT) del RNA missatger aïllat, per tal d'obtenir una molècula de DNA complementari (cDNA) a la seqüència del RNA, i posteriorment efectuar una amplificació per PCR del cDNA obtingut. La quantitat de cDNA corresponent a un gen d'interès dependrà del seu nivell d'expressió, és a dir, del nombre de molècules de RNA que la cèl·lula hagi sintetitzat en les condicions d'estudi. En diferents nivells d'expressió gènica, s'obtenen, doncs, diferents quantitats de mRNA corresponent a un gen donat. Posteriorment, la PCR específica amplificarà selectivament el cDNA corresponent al RNA del gen d'interès. Per a això és necessari que en la reacció de PCR s'utilitzin uns cebadors específics que amplifiquin només el cDNA corresponent al gen d'interès, i no d'altres.

Per tal de normalitzar els resultats i així evitar incorreccions derivades d'una diferent eficàcia dels processos de retrotranscripció, s'escull un gen de referència que es retrotranscriu en les mateixes condicions i que després també és amplificat amb uns altres primers específics. Per a l'elecció d'aquest gen de referència existeixen diferents possibilitats, però la més àmpliament utilitzada és l'elecció d'un gen constitutiu, l'expressió del qual sigui independent de les condicions. Normalment s'empren els gens de l'actina o la tubulina com a gens de referència, ja que es considera que la seva expressió no resulta induïda ni inhibida

⁴⁵⁸ Baiges, I. (2000). "Identificación y caracterización de acuaporinas en *Vitis* (Richter-110); Tesi doctoral, Dept Bioquímica i Biotecnologia, URV

segons les condicions de treball. No obstant això, cal tenir en compte que en segons quines circumstàncies, l'expressió d'aquests gens pot deixar de ser constitutiva.

L'aparició de termocicladors a temps real ha permès perfeccionar la tècnica de RT-PCR quantitativa, ja que en permetre el seguiment per a cada cicle del producte de PCR format, fan possible obtenir unes acurades corbes d'amplificació, a partir de les quals es pot extrapolar la concentració inicial de cDNA del gen d'interès.

La tècnica de RT-PCR ha estat utilitzada en l'estudi de l'expressió gènica de la PAL al gerd⁴⁵², però per al nostre coneixement, no ha estat aplicada per a l'estudi de l'expressió d'aquest enzim en *Vitis*.

6.2. OBJECTIUS

L'observació, comentada en l'anterior capítol, que els cultius cel·lulars sintetitzen antocians, i la descripció que en altres treballs indica que aquesta biosíntesi va lligada a un increment en l'activitat de la PAL⁴⁵⁹, ens va portar a plantejar un experiment d'expressió gènica d'aquest enzim en *Vitis vinifera*. Això implicava dos objectius:

- 1) Disseny d'uns primers adequats que permetin l'amplificació selectiva del gen de la PAL en *Vitis vinifera*
- 2) Estudi de l'expressió gènica en condicions d'estrès en suspensions cel·lulars

⁴⁵⁹ Mori, T; Sakurai, M; Sakuta, M. (2001). "Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*"; Plant Science 160: 355-360

6.3. MATERIALS I MÈTODES

1) Extracció de RNA total

L'obtenció d'un RNA pur és primordial per tal d'assegurar l'èxit en una anàlisi d'expressió gènica. El RNA és una molècula extremadament làbil, i per això al llarg de tot el procés s'ha de minimitzar el seu contacte amb les RNAses alliberades durant la ruptura de la cèl.lula, així com evitar la introducció de RNAses externes. Per a això, totes les solucions aquoses es tracten amb dietilpirocarbonat (DEPC) (Sigma) 0.1% durant una nit, i després s'autoclaven per tal de destruir el DEPC. Les solucions de Tris reaccionen amb el DEPC, i per tant es preparen a posteriori amb aigua prèviament tractada amb DEPC. El material no metàl·lic és tractat amb la solució RNasa® Zap.

El protocol d'aï llament està adaptat de Steenkamp et al.⁴⁶⁰:

- 1) S'homogenitza el material pulveritzant-lo amb nitrogen líquid
- 2) Es pesen aproximadament 0.1 g de mostra
- 3) S'afegeixen 500 µl de tampó CTAB (3% CTAB, 1.4M NaCl, 20 mM EDTA, 1 M Tris-HCl pH=8,6; esterilitzat per filtració) i 1 µl de 2-mercaptoetanol
- 4) S'agita en vòrtex durant 5 minuts, i s'incuba a 60°C durant 30 minuts, tot agitant periòdicament
- 5) S'afegeix 1 volum de cloroform: Alcohol isoamílic (24:1)
- 6) S'agita vigorosament durant 5 minuts
- 7) Es centrifuga a 10000g durant 40 minuts a temperatura ambient
- 8) Es transfereix el sobrenedant a un nou tub, procurant no arrossegar la interfase, i s'afegeixen 0.7 volums d'isopropanol
- 9) S'agita suaument per inversió el tub
- 10) Es centrifuga a 10000g durant 5 minuts a 4°C
- 11) S'elimina el sobrenedant
- 12) Es renta el precipitat amb 150 µl d'etanol 76% fred.
- 13) Es centrifuga 1 minut i s'elimina tot l'etanol possible
- 14) S'asseca el precipitat durant 20 minuts en el Speed-Vac.

El precipitat net conté tant DNA com RNA. El següent pas seria, doncs, l'eliminació del DNA de la mostra. Hi ha diferents metodologies per assolir aquest objectiu, com la precipitació selectiva amb clorur de liti o el tractament amb DNAsa.

En les nostres mostres, la presència elevada de compostos fenòlics complicava l'obtenció d'un RNA prou pur per tal que ambdós tractaments fossin efectius. Per aquest

⁴⁶⁰ Steenkamp, J; Wiid, I; Lourens, A; van Helden, P. (1994). "Improved method for DNA extraction from *Vitis vinifera*". Am J Enol Vitic. 45(1):102-106

motiu, per tal de purificar el RNA, es va escollir la utilització del kit d'aïllament de RNA de Sigma-Roche:

- 15) El pellet obtingut amb la metodologia anterior es resuspen en 400 μ l de tampó de trencament/unió (4.5M hidrocloreur de guanidina, 50 mM Tris-HCl, 30% Triton X-100, pH 6.6)
- 16) Es diposita la suspensió a sobre de la columna de fibra de llana de vidre i s'adapta el tub col·lector
- 17) Es centrifuga 15 segons a 8000 g i es descarta l'eluí t
- 18) Es pipeteja sobre la columna una mescla de 90 μ l de tampó d'incubació de la DNAsa (1M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl₂, pH 7.0) i 10 μ l de DNAsa I (20 KU/ml, Roche). S'incuba durant 15-25 minuts
- 19) S'afegeixen 500 μ l del tampó de rentat I (5M hidrocloreur de guanidina, 20 mM Tris-HCl, 10% etanol, pH 6.6), i es centrifuga durant 15 segons a 8000g
- 20) Es descarta l'eluí t, s'afegeixen 500 μ l del tampó de rentat II (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, 80% etanol, pH 7.5) i es torna a centrifugar com en el pas anterior
- 21) S'afegeixen 200 μ l de tampó de rentat II i es centrifuga 2 minuts a màxima velocitat per tal d'eliminar tot el tampó de rentat residual
- 22) S'elimina l'eluí t
- 23) El RNA s'elueix amb 50-100 μ l d'aigua-DEPC, centrifugant 1 minut a 10 000 rpm.

El RNA ja està llest per a la retrotranscripció o, si es vol guardar, es conserva a -80°C .

2) Extracció de DNA

El protocol següent és el mateix que per a l'extracció de RNA, però en lloc d'utilitzar el kit de Roche, es prossegueix a partir del pas 15 (obtenció del precipitat) de la manera següent:

- 15b) Es resuspen el precipitat en 200 μ l de tampó TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8)
 - 16b) S'afegeix 1 μ l de ribonucleasa A (10 mg/ml) per cada 100 μ l de solució, i s'incuba a 37°C durant 15 minuts.
- El DNA es pot conservar a -20°C fins la seva utilització.

Tant el DNA com el RNA extrets es quantificaven a partir de la lectura d'absorbància a 260 nm; i la puresa es comprovava en un gel d'agarosa al 1% amb tinció amb bromur d'etidi.

3) Retrotranscripció

Aquest pas consisteix a l'obtenció del cDNA corresponent al RNA extret, en una reacció catalitzada per l'enzim retrotranscriptasa o transcriptasa inversa.

- 1) Es dilueix la mostra a una concentració inicial de RNA de 1000 ng/ μ l amb aigua DEPC
- 2) Es preparen 2 eppendorfs
- 3) Afegim als eppendorfs:

A	B
2,5 μ l de mostra	2,5 μ l de mostra
1 μ l oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (Gibco)	1 μ l aigua DEPC
8,5 μ l aigua DEPC	8,5 μ l aigua DEPC
- 4)
- 5) Es deixa 1 minut en gel
- 6) A cada eppendorf s'afegeix: 4 μ l de tampó de PCR 5X (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8.3), 1 μ l de dNTPS i 1 μ l de Ditiotriol (DTT, Gibco)
- 7) S'incuba 5 minuts a 42 °C
- 8) A l'eppendorf A s'afegeix 1 μ l de l'enzim, Superscript (Gibco)
- 9) S'aplica el següent programa al termociclador: 50 minuts a 42°C, 15 minuts a 72°C per aturar la reacció

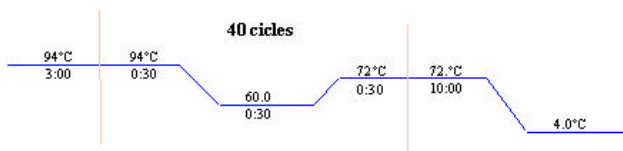
4) Realització de la PCR

En aquest pas s'amplifica el cDNA producte de la retrotranscripció mitjançant la utilització de cebadors específics, de manera que només s'amplifica la regió concreta de DNA que flanqueja ambdós cebadors.

Es disposen en tubs eppendorfs de PCR

- 2,5 μ l de Tampó 10X
- 1,5 μ l de Mg Cl₂
- 1 μ l dNTPS 10 mM
- 1 μ l de cada cebador, en concentració 0,3 μ M. Es treballa amb 4 cebadors; dos corresponents al gen d'interès, i dos corresponents al gen de referència
- 5 μ l de mostra (cDNA)
- 13,5 μ l aigua bidestil.lada
- 0,5 μ l de Taq Polimerasa

Condicions de termociclació:



5. Realització de la PCR quantitativa del DNA

El fonament de la tècnica és el mateix que el de la PCR, però en aquest cas es fa un seguiment de la reacció a temps real mitjançant la monitorització del senyal de fluorescència que emet el SYBR Green I (Applied Biosystems), un compost que s'intercala específicament al DNA de doble cadena i en aquestes condicions emet fluorescència. Per tant, el senyal emès és proporcional a la quantitat de molècules de doble cadena formades en el cicle de PCR.

L'aparell que s'utilitza per fer el seguiment és el Gene Amp 5700 Sequence Detection System. Es treballa amb 4 tipus de mostra:

STD: estàndards, preparats per amplificació de DNA extrets de *Vitis* amb els cebadors específics. La quantificació de la concentració s'efectua a partir de la lectura d'absorbència a 260 nm en l'espectrofotòmetre GeneQuant pro.

UNK: mostres problemes (cDNA)

NAC: mostres problema sense haver fet la reacció de retrotranscripció

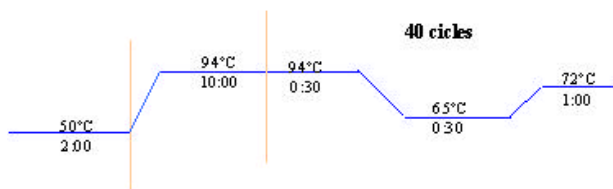
NTC: blancs

En aquest cas, interessa que la PCR sigui específica i doni només un amplicó, ja que la lectura de fluorescència no és discriminant. Per tant, en cada tub de reacció només s'ha de posar una parella de cebadors, de manera que només es formarà un producte d'amplificat: el corresponent al gen de la PAL o el corresponent al gen de la tubulina, segons quina hagi estat la parella de cebadors que s'hagin utilitzat en la reacció. Això significa que es duplica el nombre de mostres respecte a les utilitzades en la reacció de PCR convencional.

En l'inici de la reacció de PCR, el comportament s'ajusta a l'ideal, que segueix un caràcter exponencial, mentre que posteriorment la reacció assoleix un estat de saturació. Pot demostrar-se que el cicle al qual comença l'amplificació (Ct) depèn de la concentració de DNA present en la mostra. L'establiment d'aquesta Ct s'ha de fer dintre de la primera fase exponencial, i vindrà condicionada per un valor umbral de a partir del qual es considera que es produeix amplicat. La gràfica que ens representa el nivell de fluorescència respecte el nombre de cicle ens permet establir a quin cicle (Ct) s'ha assolit aquest valor umbral per cada mostra. Un cop determinada aquesta Ct, es pot esbrinar la concentració del cDNA que s'ha amplificat a partir de la comparació amb mostres estàndards de concentració coneguda. A partir d'aquests valors, es pot avaluar l'expressió gènica en diferents condicions. Per corregir

els errors propis del mètode, s'utilitza com a factor corrector la Ct corresponent a un gen de referència.

El protocol d'amplificació que es va utilitzar fou anàleg al de l'amplificació per PCR:



El pas de 10 minuts a 94 °C serveix per activar la Taq polimerasa Gold, que és l'enzim subministrat per Applied per fer la reacció.

En la majoria de protocols que utilitzen aquest aparell termociclador, en els cicles no s'utilitza el pas d'extensió a 72°C, ja que s'acostuma a treballar amb amplicons petits, que són amplificats en poc temps, de manera que amb el que es triga en pujar i baixar les temperatures ja és més que suficient per assegurar-ne l'extensió completa. Tanmateix, en les nostres condicions de treball, un protocol d'aquest tipus condueix a una no amplifiació dels fragments d'interès, sinó a la de dímers de primers, motiu pel qual es va adaptar el protocol de PCR, que havia mostrat èxit. Pel mateix motiu es va augmentar la temperatura d'hibridació de 60 a 65°C, ja que en condicions més restrictives disminueixen les amplifiacions inespecífiques.

6.4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.4.1. Disseny de primers

A l'hora de realitzar l'anàlisi de l'expressió mitjançant RT-PCR, és necessari fer un disseny de primers per tal que tingui lloc la reacció en cadena de la polimerasa. Aquest pas és crucial, ja que determinarà que el cebador dissenyat es pugui unir a la cadena motllo de DNA i generar un amplicó, que és el resultat de la PCR.

Per altra banda, en els experiments d'expressió gènica es requereix, a més del gen diana, un gen constitutiu o de referència, l'expressió del qual sigui constant en qualsevol situació de la cèl.lula. En el nostre cas, vam escollir com a gen de referència el de la tubulina.

Per efectuar el disseny de primers, es va efectuar una cerca a la base de dades d'àcids nucleics EMBL (European Molecular Biology Laboratory) d'entrades corresponents a seqüències nucleotídiques de RNA de la PAL.

Per tal d'assegurar un bon disseny, es va decidir fer un multialiniament d'aquesta seqüència amb la d'altres seqüències de PAL d'altres organismes, utilitzant l'algoritme ClustalW⁴⁶¹. Els resultats d'aquest multialiniament es presenten a la figura 6.4.1.

Les regions en vermell indiquen un 100% d'homologia en la seqüència de totes les espècies. Aquestes són les zones que convé seleccionar per tal d'establir-hi els cebadors. Malauradament, cap d'aquestes regions resulta prou llarga perquè no hi hagi cap "mismatch" (desaparellament). En el cas de no disposar de seqüències corresponents a l'organisme, una opció és el disseny de primers degenerats, és a dir, una barreja de primers en què per cada mismatch hi hagi les 4 possibles combinacions de base nitrogenada. El problema dels primers degenerats és que disminueix l'especificitat de la unió amb el DNA. Com que es disposava d'una seqüència de RNA de PAL de *Vitis*, així com d'un fragment del DNA genòmic, es va escollir seleccionar les regions que presentaven major homologia per a aquestes dues molècules, procurant que també presentessin una alta homologia amb altres seqüències, i es van dissenyar els primers de tal manera que s'anellessin en aquella zona.

⁴⁶¹ Thompson,JD; Higgins, DG; Gibson, TJ (1994); "CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice"; Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680

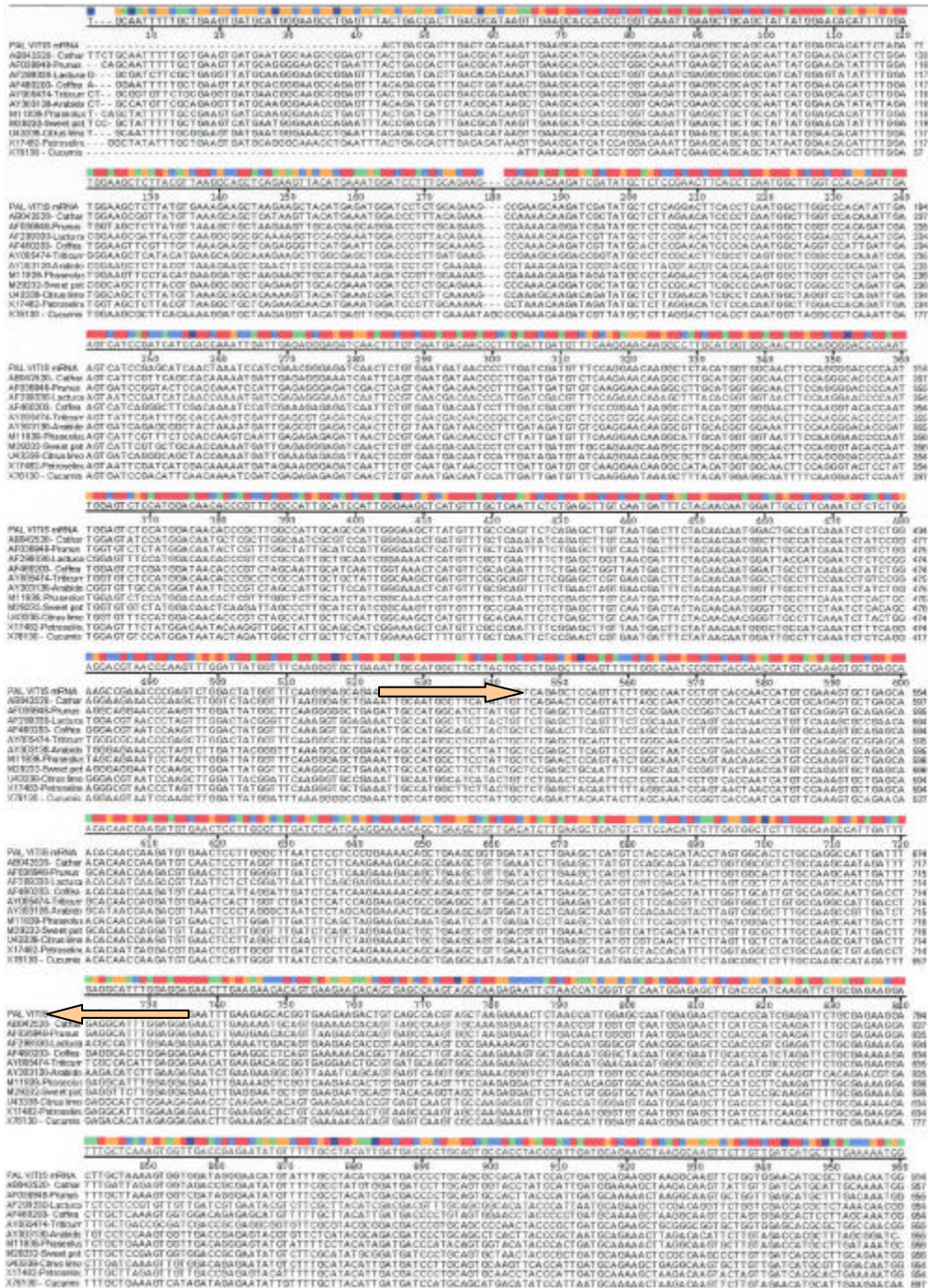


Figura 6.4.1. Multialiniament de seqüències de RNA corresponents a la PAL de diferents organismes. Les flexes indiquen el lloc on s'hibrida cada primer dissenyat.

Convenia també buscar 2 regions d'hibridació, una perquè s'hibridés el cebador a la cadena en direcció 3'-5'; i l'altra perquè ho fes en la cadena complementària, de sentit 5'-3'. La distància entre ambdós havia de ser prou gran perquè l'amplicó fos fàcilment detectable en un gel d'agarosa. Per això es va escollir la zona entre el nucleòtid 400 i el 800, ja que era la que presentava un grau d'homologia entre espècies més gran i, per altra banda, generava una mida d'amplicó suficient.

A partir d'aquí, es van buscar zones de 20 parells de bases (mida estàndard dels cebadors utilitzats en PCR) que poguessin complir els nostres requisits. Era especialment important assegurar la hibridació dels extrems del cebador, ja que és a partir d'on actua la DNA polimerasa.

Els primers escollits van ser els següents:

PAL1: 5'- ATT GCC ATG GCT TCC TAC TG - 3'

PAL2: 5'- TCC TCC AAA TGC CTC AAA TC - 3'

Posteriorment es va avaluar mitjançant el servidor GeneWalker quin era l'amplicó que generaven, així com la possible formació de dímers de primers (figura 6.4.2), és a dir, de productes d'hibridació entre parelles de primers o d'autoassociació del mateix primer. Aquestes estructures compliquen l'eficiència de la reacció de PCR, i és per tant necessària la seva minimització.



Figura 6.4.2. Estructures de dímers de primer possibles amb els cebadors dissenyats

Els resultats oferien poques combinacions de dímers de primers possibles, i a més les que es generaven resultaven estructuralment complicades, de manera que es considerà que la formació d'aquestes estructures estaria poc afavorida i per tant, no esdevendria una limitació del mètode.

Finalment, per tal d'assegurar que aquesta parella de primers eren específics del gen de la PAL i, per tant, no hi hauria interferències causades per l'amplificació d'altres regions del genoma, es va executar el programa blastN per tal d'efectuar una comparació d'aquestes seqüències de 20 parells de bases amb el conjunt de seqüències presents a les bases de dades⁴⁶². Els resultats oferiren poca homologia amb altres seqüències que no fossin de fenilalanina amonio liases d'altres organismes, motiu pel qual es concloué que eren uns primers suficientment específics.

Un estudi similar es va efectuar per al gen de referència, la tubulina. En aquest cas, la seqüència de partida fou la d'un fragment de mRNA de *Vitis*. Els primers escollits en aquest cas foren:

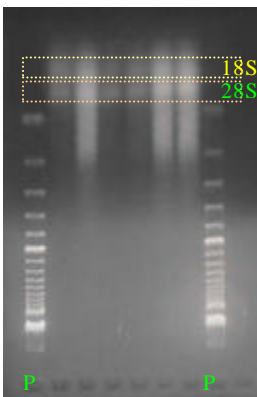
tub1: 5'- ATG ATG TGT GCT GCT GAT CC – 3'

tub2: 5'- TCC ACT TCC TTG GTG CTC ATC – 3'

⁴⁶² Altschul, SF; Madden, TL; Schaeffer, AA; Zhang, J; Zhang, Z; Miller, W; Lipman, DJ (1997); "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res. 25:3389-3402

6.4.2) Determinació de l'expressió gènica.

a) Extracció del RNA



Fotografia 6.4.1. Extracció de RNA total. P= Marcador de pesos moleculars (DNA ladder)

La fotografia 6.4.1 mostra l'electroforesi en gel d'agarosa (1.5%) de diversos extractes de RNA. La integritat del RNA missatger es suposa quan s'observen clarament les bandes corresponents al RNA ribosomal 28S i 18S. Això significa que no hi ha hagut degradació del RNA i, per tant, es pot procedir a la seva quantificació i a la realització de la reacció de retrotranscripció.

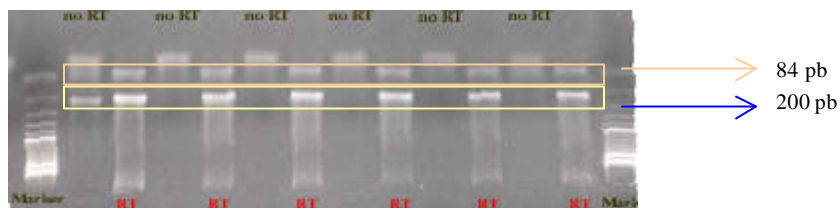
En la següent taula es presenta el resultat de l'extracció de RNA per a mostres corresponents a suspensions cel·lulars de *Vitis vinifera* corresponents al 5è dia de cultiu:

	RNA (mg/ml)	A 230	A 260	A 280	260/230	260/280
0	1.45	0.691	0.453	0.292	0.656	1.551
0s	1.95	0.760	0.375	0.375	0.803	1.627
C	2.50	0.832	0.774	0.453	0.93	1.709
C s	2.52	0.854	0.787	0.459	0.922	1.715
50	2.96	0.907	0.924	0.528	1.019	1.75
50 S	2.80	0.891	0.874	0.498	0.981	1.755

La mesura d'absorbància a 260 correspon a l'absorció d'àcids nucleics, mentre que les de 280 i 230 indiquen contaminació de proteïnes (280) o de polisacàrids i compostos fenòlics (230). Curiosament, no resulten ser les mostres en què inicialment hi havia més quantitat d'antocians (les corresponents a les condicions "0" i "0s") les que presenten una major contaminació per aquests compostos. Sembla, doncs, que en el procés de purificació s'eliminen en gran mesura els antocians d'aquestes mostres, però no sembla que succeeixi el mateix amb les situacions control ("C" i "Cs") i d'excés de nitrogen ("50" i "50s"). De fet, el procés d'extracció i aïllament de RNA total resulta poc reproducible, i per això és necessari efectuar la quantificació de les molècules de RNA abans de procedir a la reacció de retrotranscripció, per tal d'ajustar les concentracions de manera que sigui iguals.

b) RT-PCR

Un cop feta la retrotranscripció (RT), convenia veure si els primers dissenyats funcionaven i amplificaven aquest cDNA obtingut. En la fotografia 6.4.2 es presenten els resultats corresponents a l'amplificació del cDNA per les mostres del 5è dia de cultiu, en les condicions anteriorment descrites:



Fotografia 6.4.2. Amplificats obtinguts en la reacció de RT-PCR.

S'obtenen 2 amplificats, la mida dels quals es correspon amb la mida dels fragments teòrics (200 i 84, respectivament) calculada a partir de les seqüències nucleotídiques de la base de dades. La banda de 200 pb correspon a l'amplicó generat per a la determinació de la PAL; i el de 84 pb, al de la tubulina. A falta d'estudis de seqüenciació que confirmin aquests resultats, es pot sostenir que els primers dissenyats s'hibriden a la cadena de DNA i l'amplifiquen.

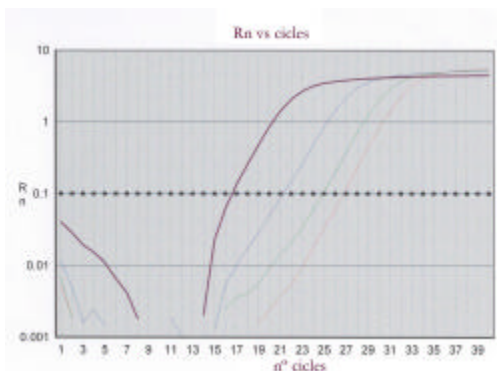
En les mostres que no han experimentat la reacció de retrotranscripció ("no RT"), no s'observen aquestes bandes, la qual cosa és indicadora de l'absència de DNA genòmic contaminant. Sí que s'observen amplificats inespecífics de baixa longitud de seqüència, que podem atribuir a la formació de dímers de primers. En casos que no hi ha cadena de DNA motllo, augmenta la probabilitat que les molècules de cebador s'uneixin entre elles i puguin formar aquestes estructures que, per altra banda, no es formen en presència del DNA motllo.

Abans de l'aparició dels termocicladors que segueixen les reaccions de PCR a temps real, la tècnica descrita es feia servir per a l'anàlisi de l'expressió gènica. La metodologia consistia a efectuar diferents vegades la reacció de PCR, aturant-la en diferents cicles. A partir de la visualització dels àcids nucleics en gels d'electroforesi, es podia determinar en quin cicle es formava el producte i, a partir d'aquí, fer una estimació de l'expressió comparada del gen d'estudi en una situació control respecte d'altres situacions, utilitzant sempre un gen de referència. Tanmateix, aquesta metodologia implica un gast elevat de mostra i una quantificació relativament imprecisa.

Per aquest motiu, es va provar d'efectuar la reacció de PCR en un termociclador a temps real que permetés enregistrar la gràfica de producte de PCR respecte el nombre de cicle.

c) RT-PCR a temps real

La recta es va fer a partir de fragments d'amplicó en concentracions corresponents a 10^5 - 10 molècules/ ml. Es van efectuar dues rectes, una per a cada parella de primers.



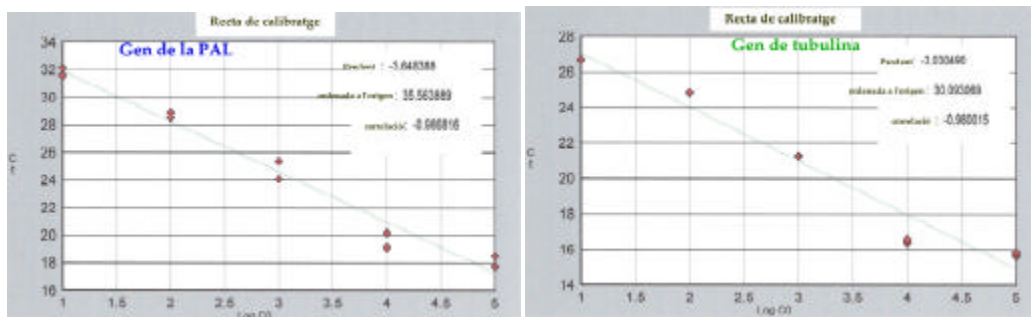
Gràfica 6.4.1. Corbes d'amplificació per diferents concentracions de cDNA inicial. Es representa la fluorescència per cada cicle

La gràfica 6.4.1. recull la lectura de fluorescència enfront el cicle de PCR. Es fixa un valor llindar de fluorescència de 0.1, que correspon a la zona de comportament exponencial de les corbes d'amplificació.

El punt de tall de les corbes d'amplificació amb aquest valor llindar ens dóna el valor de Ct de la mostra, és a dir, el n^o de cicle al qual es considera que ha començat l'amplificació. Aquest nombre de cicle depèn de la concentració de cDNA inicial de la mostra, de manera que a una major

concentració de cDNA li correspon un menor n^o de cicle.

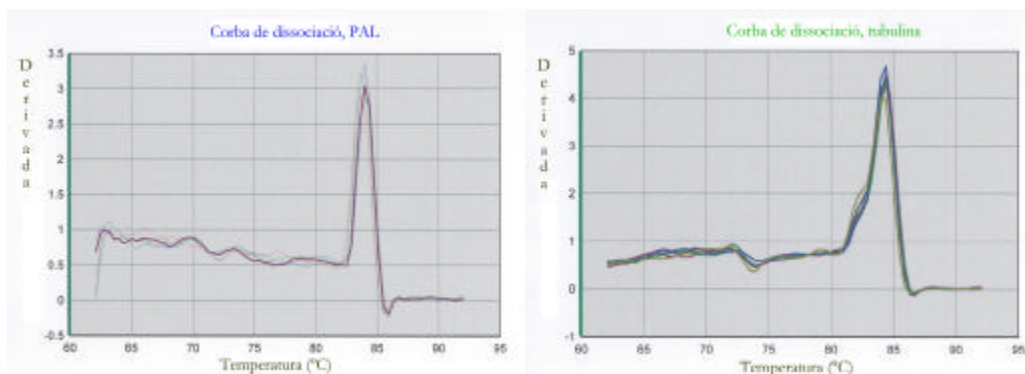
La relació lineal que s'estableix entre el nombre de cicle i la concentració inicial de DNA per cadascun dels gens d'interès (PAL i tubulina) es recull en les gràfiques 6.4.2:



Gràfica 6.4.2. Rectes de calibratge de la Ct (cicle al qual s'arriba al valor umbral de fluorescència) respecte el logaritme de la concentració de cDNA inicial. Es presneten els valors per al gen de la PAL i per al gen de referència.

El rang de linialitat s'estableix per a unes concentracions entre 10^5 - 10^0 molècules de DNA/ μ l.

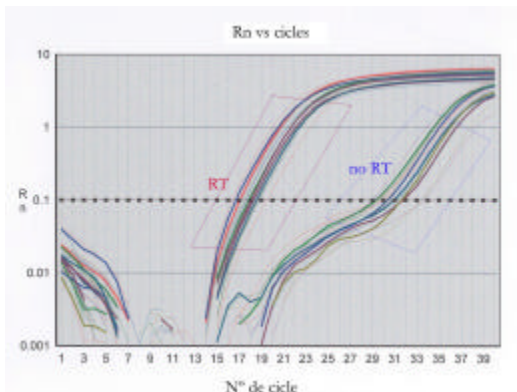
Per descartar la presència d'amplificacions inespecífiques que alterin la determinació, resulta útil l'enregistrament de les corbes de dissociació (gràfica 6.4.3). En aquest cas, el termociclador efectua, quan acaba el darrer cicle de la PCR, una calorimetria d'escombrat, que permet determinar si s'ha format un únic producte d'amplificació. La calor aplicada servirà per anar augmentant la temperatura de la barreja de reacció, i en el moment que s'assoleixi la temperatura de dissociació del producte amplificat, de doble cadena, s'alliberarà el substrat fluorescent (SYBR Green), de manera que s'enregistrerà una disminució de la fluorescència. La representació de la derivada del canvi de fluorescència respecte la temperatura ens dóna una corba de dissociació, amb un màxim corresponent a la temperatura de dissociació de l'amplicó, que indica la presència d'un sol producte



Gràfica 6.4.3. Corbes de dissociació de l'amplicó generat mitjançant la RT-PCR. S'obté un sol màxim per cada gen d'estudi, cosa que suposa l'existència d'un únic producte d'amplificació

d'amplificació. Si en el procés de PCR haguessin tingut lloc altres amplificacions que no la del gen d'interès, s'apreciarrien diversos pics en la corba de dissociació. En el nostre cas, tant l'amplicó de la tubulina com el de la PAL tenen una temperatura de dissociació similar, però això no té perquè ser així.

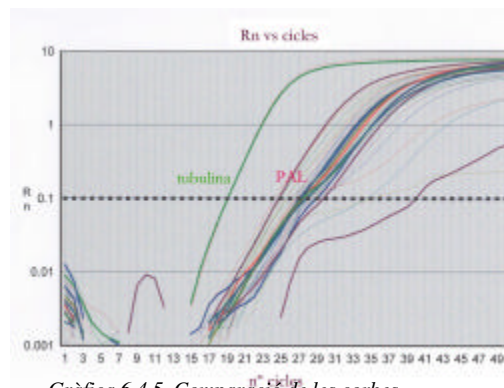
La gràfica 6.4.4 recull les amplificacions registrades per les mostres corresponents al gen de tubulina. Es presenten les corbes corresponents a mostres (UNK) en què s'ha efectuat la reacció de retrotranscripció i les mostres (NAC), en les quals no s'ha efectuat la reacció de retrotranscripció i, per tant, no haurien de donar senyal. La presència de senyal indicaria que en el procés d'extracció el RNA no hauria quedat aïllat del tot, i restaria contaminat amb restes de DNA genòmic. Dels valors de Ct observats podem concloure que no hi ha aquesta contaminació, ja que els valors s'assimilen als del control negatiu (NTC) i, a més, les corbes de dissociació no coincideixen amb les del gen de la tubulina, sinó que correspondrien a altres estructures inespecífiques, segurament dímers de primers.



Gràfica 6.4.4. Corbes d'amplificació de les mostres RT, en les quals ha tingut lloc la retrotranscripció, i els blancs no RT, en què aquesta no ha tingut lloc

Per a determinar l'expressió relativa, s'interpol·la en la recta de calibratge per determinar la Ct corresponent. Es calcula el quocient entre el nombre de molècules del gen d'interès i el nombre de molècules del gen de referència. Aquest valor ens indicaria els nivells d'expressió del gen d'interès.

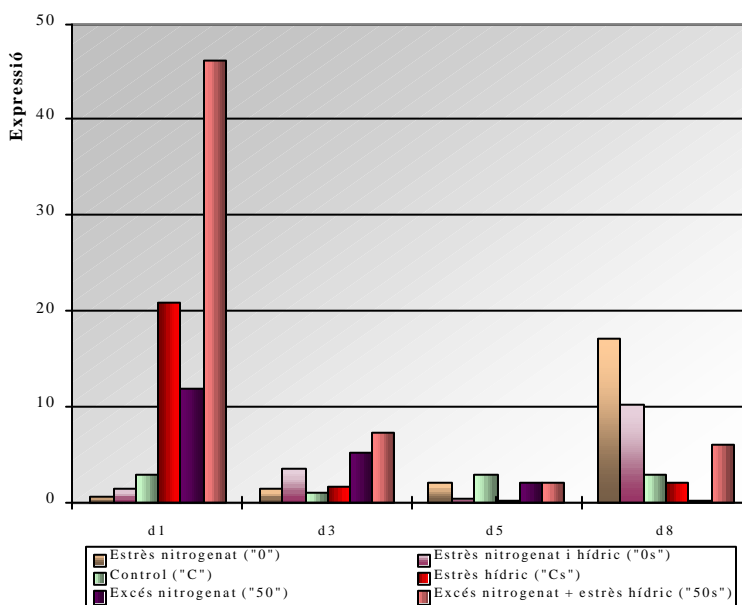
Del càlcul d'aquest quocient, es va poder constatar que el gen d'interès està poc expressat en comparació al gen de referència. Com es pot apreciar en la gràfica 6.4.5, l'amplificació del cDNA del gen de la PAL apareix gairebé 10 cicles després de la de tubulina, cosa que significa unes diferències de concentració de l'ordre d'un factor de 1000. Per aquesta relativament baixa expressió del gen de la PAL, i a fi de poder observar les diferències, es va optar per allargar els cicles de PCR fins a 50.



Gràfica 6.4.5. Comparació de les corbes d'amplificació del gen de tubulina respecte les del gen de la PAL. Es pot apreciar una diferència d'al voltant de 10 cicles entre ambdues.

Posteriorment, es refereixen aquests valors a una situació determinada. En el nostre estudi, es va triar com a aquesta condició de referència la corresponent al medi control, en el 3r dia.

La gràfica 6.4.6. recull les variacions en l'expressió. Es pot observar que el gen de la PAL s'expressa fortament en els primers moments del cultiu (el 1r dia), i és quantitativament més important en les condicions d'estrès hídric ("Cs", "50s"). Aquesta expressió comença, doncs, amb anterioritat a l'acumulació d'antocians. Cal tenir en compte que la fenilalanina amonio liasa catalitza el primer pas de la via, però posteriorment hi ha tota una sèrie de passos complexos abans d'arribar a la formació de l'antocià.



Gràfica 6.4.6. Expressió relativa del gen de la PAL en diferents dies de cultiu i en diferents condicions d'estrès.

Aquests resultats estan d'acord amb els observats en altres suspensions cel·lulars. Ozeki i Takeda⁴⁵³ mostren un increment de l'expressió d'aquest gen després de transferir-lo a un nou medi, per disminuir a continuació. En els darrers dies de cultiu, torna a haver-hi un increment associat a la biosíntesi d'antocians. A més, els mateixos autors exposen que hi ha una estimulació de l'expressió del gen just després del moment d'aplicar llum UV al cultiu. Té el mateix efecte sobre l'expressió del gen de la PAL l'ús d'el·licitors en suspensions de *Vitis*⁴⁵⁶ i

de julivert⁴⁵¹. Sembla, doncs, que l'acció d'un estrès osmòtic actuaria de la mateixa manera, promovent de manera ràpida l'expressió del gen de la PAL.

El fet que les situacions d'estrès nitrogenat no promoguin una expressió de la PAL en els primers estadis resulta estrany, si es té en compte l'elevada síntesi d'antocians que promouen aquestes condicions. Tanmateix, en el darrer dia hi ha una forta expressió en aquestes condicions que no té lloc en les situacions sense carència de nitrogen. Ozeki⁴⁵⁴ descriu en pastanaga la presència de dues isoformes de la PAL, una que és la que s'expressa en produir-se la transferència a un nou medi fresc, i l'altra, més relacionada amb la síntesi d'antocians, que és la que esdevindria un cop ha cessat la divisió cel.lular. Això justificaria el manteniment del color que s'observa en les cèl.lules sotmeses a estrès nitrogenat. Roman, però, la incògnita sobre com s'estimula la síntesi d'antocians en les primeres fases del cultiu. En aquest sentit, cal remarcar que la PAL és el primer enzim de la via, però molts d'altres participen en la formació d'antocians. De fet, en alguns treballs efectuats en raïms *in vivo*^{448, 445}, a partir del moment del verolament, la PAL resulta molt menys expressada que la calcona sintasa, la dihidroflavonol 4-reductasa, la flavanona-3'-hidroxilasa o la UDP Glc-flavonoid 3-o-glucosil transferasa. Per tant, serien aquests enzims els qui determinarien la producció d'antocians. Això significa que, per comprendre bé el mecanisme de síntesi d'antocians, convindria ampliar el present estudi a d'altres enzims de la via.

6.5. CONCLUSIONS

1. Mitjançant la metodologia de RT-PCR quantitativa a temps real, pot posar-se de manifest l'expressió gènica de l'enzim fenilalanina amonio liasa (PAL) en diferents condicions. Així, es pot observar una expressió a causa de la transferència del medi, que resulta més important en les condicions d'estrès hídric. Per altra banda, en situacions d'estrès nitrogenat, s'observa una sobreexpressió del gen en els darrers dies del cultiu.

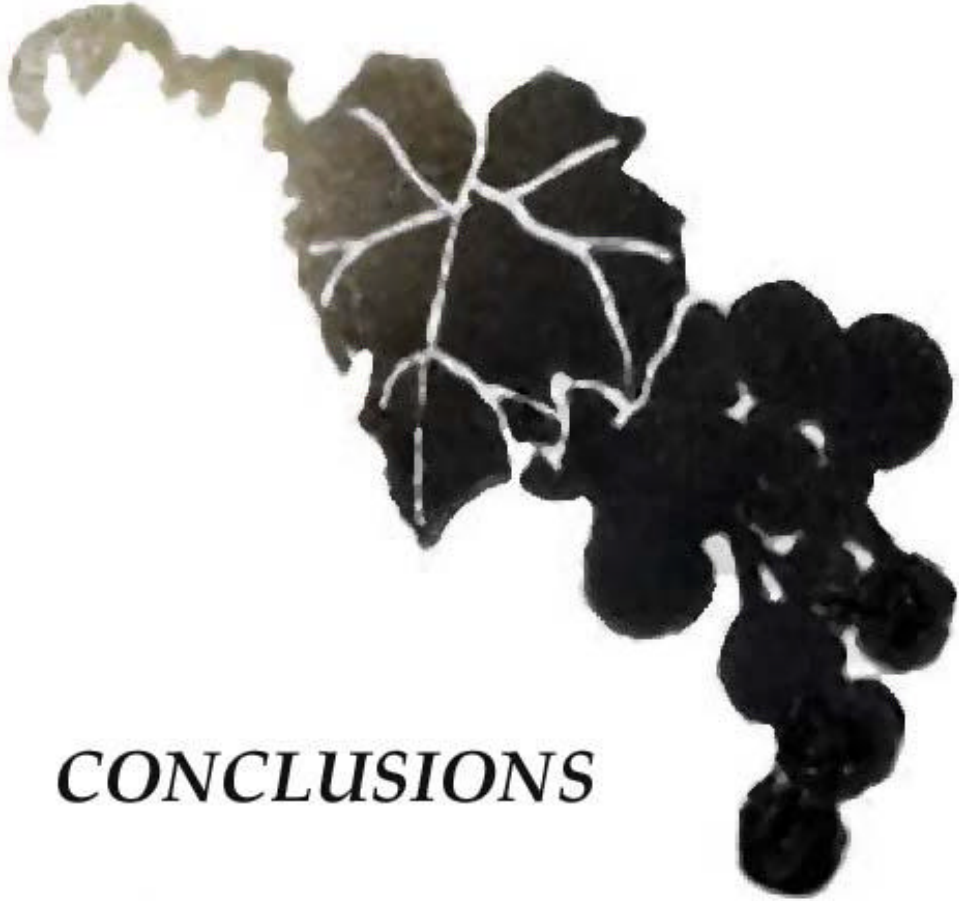
2. L'expressió d'aquest gen resulta relativament baixa, especialment si se la compara amb la del gen de la tubulina.

6.6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. **Camm, EL; Towers, GHN.** (1973). "Phenylalanine ammonia lyase", *Phytochemistry*, 12:961-973
2. **Lister, C; Lancaster, J; Walker, J** (1996). "Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars", *J Sci Food Agric* 71: 313-320
3. **Zucker, W.** (1965) "Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue"; *Plant Physiology*, 40 (5): 779-784
4. **Jones, DH.** (1984). "Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development"; *Phytochemistry* 23(7): 1349-1359
5. **Roubelakis-Angelakis, KA; Kliwer, WM.** (1985). "Phenylalanine ammonia-lyase in berries of *Vitis vinifera* L.: extraction and possible sources of error during assaying"; *Am J Enol Vitic* 36: 314-315
6. **Faragher, JD; Brohier, RL.** (1984). "Anthocyanin accumulation in apples skin during ripening: Regulation by ethylene and phenylalanine ammonia-lyase" *Sci Hortic* 22:89-96
7. **Given, NK; Venis, MA; Grierson, D.** (1988). "Purification and properties of phenylalanine-ammonia lyase from strawberry fruit and its synthesis during ripening"; *J Plant Physiol* 133:31-37(1988)
8. **Dubery, IA; Schabort, JC.** (1986). "Phenylalanine ammonia lyase from *Citrus sinensis*: purification hydrophobic interaction chromatography and physical characterization"; *Biochem Int* 13: 579-589
9. **Kataoka, I; Kubo, Y; Sugiura, A; Tomana, T** (1983). "Changes in L-phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis during berry ripening of three grape cultivars"; *J Japan Soc Hort Sci* 33, 213-220
10. **Hrazdina, G; Parsons, GF; Mattick, LR.** (1984). "Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries"; *Am J Enol Vitic* 35:220-227 (1984)
11. **Lister, C; Lancaster, J.** (1996). "Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity and its relationship to anthocyanin and flavonoid levels in New Zealand-grown apple cultivars"; *J Amer Soc Hort Sci* 121 (2): 281-285 (1996)
12. **Cheng GW; Breen, PJ.** (1991). "Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit"; *J Am Soc Hortic Sci* 116:865-869
13. **Hahlbrock, K; Ragg, H.** (1973). "Light-Induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures: effects of inhibitors of RNA and protein synthesis"; *Archiv Biochem Biophysics* 166, 41-46
14. **Shye Tan.** "Relationships and interactions between phenylalanine ammonia-lyase, phenylalanine ammonia-lyase inactivating system, and anthocyanin in apples". (1979). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104(5):581-586
15. **Roubelakis-Angelakis, KA; Kliwer, WM.** (1986). "Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grape berries"; *Am J Enol Vitic*, 37 (4) 275-280
16. **Hrazdina, G; Parsons, GF.** (1982). "Induction of flavonoid synthesizing enzymes by light in etiolated pea (*Pisum sativum* cv. Midfreezer) seedlings"; *Plant Physiol.* (1982), 506-510
17. **Kakegawa, K; Hattori, E; Koike, K; Takeda, K.** (1991). "Induction of anthocyanin synthesis and related enzyme activities in cell cultures of *Centaurea cyanus* by UV-light irradiation"; *Phytochemistry*, 30 (7): 2271-2273

18. **Kataoka, I; Kubo, Y; Sugiura, A; Tomana, T.** (1984). "Effects of temperature, cluster shading and some growth regulators on L-phenylalanine-ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in black grapes"; Mem Cvoll Agric Kyoto Univ, 124: 35-44
19. **Montero, T; Mollá, E; Martín-Cabrejas, M; López-Andreu, F.** (1988). "Effects of gibberellic acid (GA3) on strawberry PAL and TAL enzyme activities"; J Sci Food Agric ; 77: 230-234
20. **Rhodes, MJC; Wooltronton, LSC.** (1971). "The effect of ethylene on the respiration and on the activity of Phenylalanine ammonia lyase in swede and parsnip root tissue"; Phytochem , 10:1989-1997
21. **Blankenship, SM; Unrath, CR.** (1988) "PAL and ethylene content during maturation of red and golden delicious apples". Phytochemistry, vol 27 (4): 1001-1003
22. **Ramamurthy, M; Maiti, B; Thomas, P; Madhusudan, P.** (1992). "High-performance liquid chromatography determination of phenolic acids in potato tubers (*Solanum tuberosum*) during wound healing"; J Agric Food Chem, 40, 569-572
23. **McLeod, L; Poole, PR.** (1994). "Changes in enzymic activities after harvest and in early stages of Botrytis cinerea infection of kiwifruit"; J Sci Food Agric, 64, 95-100
24. **Dangyang, K; Saltveit, ME.** (1989); "Developmental control and russet spotting, phenolic enzymes, and IAA oxidase in cultivars of iceberg lettuce"; J Amer Soc Hort Sci 114(3)472-477
25. **Holcroft, D; Gil, M; Kader, A.** (1988). "Effect of carbon dioxide on anthocyanins, phenylalanine ammonia lyase and glucosyltransferase in the arils of stored pomegranates"; J Amer Soc Hort Sci 123(1)136-140
26. **Hamza, F; Castaigne, F; Couture, R; Makhlof, J.** (1994). "Effet d'une atmosphère riche en CO2 sur la teneur en phénols et l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase de la laitue romaine"; Sciences des Aliments 14:311-320
27. **Ritenour, MA; Ahrens, MJ; Saltveit, ME.** (1995). "Effects of temperature on ethylene-induced phenylalanine ammonia lyase activity and russet spotting in harvested iceberg lettuce"; J Amer Soc Hort Sci 120(1):84-87
28. **Jaakola, L; Määttä, K; Pirttilä, AM; Törrönen, R; Kärenlampi, S; Hohtola, A.** (2002). "Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin and flavonol levels during bilberry fruit development"; Plant Physiology, vol 130, 729-739
29. **Perkin-Veazie, P.** (1995). "Growth and ripening of strawberry fruit", Hortic Rev 17: 267-297
30. **Moyano, E; Portero-Robles, I; Medina-Escobar, N; Valpuesta, V; Muñoz-Blanco, J; Caballero, JL.** (1998). "A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during ripening process"; Plant Physiol, 117: 711-716
31. **Boss, PK; Davies, C; Robinson, SP.** (1996). "Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. Cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation"; Plant Physiol., 11:1059-1066
32. **Larson, L** "Genetics, precursors and enzymes in flavanoid biosynthesis in maize" a "The Genetics of Flavanoids", ed Styles; Unicopli.
33. **Quattrocchio, F; Wing, JF; Leppen, HTC; Mol, JMN; Koes, RE,.** (1993). "Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct set of target genes"; Plant cell, 5: 1497-1512
34. **Lois, R; Dietrich, A; Hahlbrock, K; Schulz, W.** (1989). "A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements; The EMBO Journal, vol 8, n°6, 1641-1648

35. **Kumar, A; Ellis, BE.** (2001). “The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression and evolution”; *Plant Physiology*, (127), 230-239
36. **Ozeki, Y; Takeda, J.** (1994). “Regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes in carrot suspension cultured cells”; *Plant, cell, tissue and organ culture*, 38: 221-225
37. **Ozeki, Y.** (1996). “Regulation of anthocyanin synthesis in carrot suspension cells”; *J. Plant Res* 109:343-351
38. **Ohl, S; Hedrick, S; Chory, J; Lamb, CJ.** (1990). “Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*”; *The Plant Cell*, vol 2, 837-848
39. **Melchior, F; Kindl, H.** (1991). “Coordinate and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis cv. Optima*”; *Arch Bioch and Bioph.*, 288(2) 552-557
40. **Leyva, A; Jarillo, JA; Salinas, J; Martínez-Zapater, JM.** (1995). “Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner”; *Plant Physiol*, 108: 39-46
41. **Baiges, I.** (2000). “Identificación y caracterización de acuaporinas en *Vitis* (Richter-110); Tesi doctoral, Dept Bioquímica i Biotecnologia, URV
42. **Mori, T; Sakurai, M; Sakuta, M.** (2001). “Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*”; *Plant Science* 160: 355-360
43. **Steenkamp, J; Wiid, I; Lourens, A; van Helden, P.** (1994). “Improved method for DNA extraction from *Vitis vinifera*”. *Am J Enol Vitic.* 45(1):102-106
44. **Thompson, JD; Higgins, DG; Gibson, TJ** (1994); “CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice”; *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680
45. **Altschul, SF; Madden, TL; Schaeffer, AA; Zhang, J; Zhang, Z; Miller, W; Lipman, DJ** (1997); “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”; *Nucleic Acids Res*



CONCLUSIONS

La composició antociànica d'una varietat és un caràcter fenotípic fortament determinat per la varietat vinífera, de manera que pot establir-se com a diferent i característica, i erigir-se com a identificador varietal. En la present tesi s'han caracteritzat 8 varietats negres de *Vitis vinifera* a partir de la seva composició en antocians. No obstant això, una sèrie de factors poden modificar en major o menor grau aquesta composició. Si ens cenyim a condicions *in vitro*, s'ha pogut constatar que en situacions en què es promogui una inhibició del creixement, com són la limitació de nutrients (estrès nitrogenat), o la limitació d'aport d'aigua (estrès hídric), s'aconsegueix generalment incrementar la síntesi d'antocians per part de la cèl.lula, i fins i tot en pot variar la composició final, promovent la reacció d'acilació sobre el residu glucosídic. En camp, efectes equivalents es manifesten segons l'anyada i la climatologia, i per pràctiques com la irrigació de les vinyes. Aquelles condicions que limiten el vigor de la planta, de manera anàloga al que succeeix en cultius *in vitro*, condueixen normalment a majors acumulacions d'antocians, i a un major percentatge d'acilació dels mateixos. Òbviament, els estressos que es poden provocar en el camp són molt menys dràstics que en l'àmbit dels cultius *in vitro*, ja que la planta és una estructura organitzada que necessita una funcionalitat en tots els seus òrgans per poder donar fruit; i per tant les variacions que es poden observar són molt menors, i sovint no són estadísticament significatives.

De la mateixa manera que hi ha una composició antociànica varietal, també es pot establir aquest fenomen en referència a les proantocianidines dels pinyols del raï m. La composició tànica del raï m és força més complexa que la d'antocians, en el sentit abarca una major quantitat d'estructures. En antocians, només estan descrits 5 antocianidin-monoglucòsids i els corresponents derivats acilats. En canvi, entre les proantocianidines hi ha un gran espectre de molècules (dímers, trímers, tetràmers, polímers). En la present tesi, hem pogut analitzar l'evolució al llarg de la maduració en els pinyols els principals d'aquests dímers, i establir un grau de polimerització mitjà que augmenta segons el moment de la maduració del raï m. Però la problemàtica és encara més complexa i variada, ja que, a diferència dels antocians, que només es localitzen en les pells, les proantocianidines poden tenir el seu origen en pells i pinyols, i de fet les composicions en unes parts i altres són diferents.

Ambdues famílies de molècules juguen un paper clau en la qualitat dels vins negres; els antocians, per les seves propietats cromàtiques; les proantocianidines, per

la seva tanicitat. Per això resulten clau els rendiments que se n'obtinguin en el procés de maceració. En la present tesi hem pogut comprovar com, per a diferents varietats, l'extracció d'antocians és diferent. L'extracció és depenent de l'estructura química de l'antocià, i així els mostos obtinguts en sistemes tradicionals de maceració es revelen com a empobrits en el contingut d'antocians p-cumarilats. La presència d'antocians acilats és important en els vins negres, ja que poden participar en processos de copigmentació intramolecular, així com en reaccions d'estabilització del color per la formació de noves estructures. En la tesi s'han abordat aquestes temàtiques mitjançant solucions model. S'ha pogut constatar que els antocians acilats no presenten una major reactivitat, i de fet, aquests tipus de molècules acilades es consideren més estables que els corresponents antocians no acilats. L'eficient extracció de la malvidina-3-glucòsid, fruit de ser el compost majoritari en la pell del raï m, unit a la seva relativament baixa reactivitat, implica que, en la majoria de vins elaborats amb *Vitis vinifera*, sigui l'antocià majoritari, mentre que les concentracions de la resta d'antocians van disminuint i són sovint inapreciables. Però un menor contingut antociànic no es tradueix necessàriament en una més feble intensitat cromàtica, ja que és menester que els antocians evolucionin per donar formes més resistents a la decoloració. Alguns d'aquests processos els mitjança l'acetaldehid, que en proves amb vins joves ha mostrat una evolució del color cap a tonalitats teula similars a les dels vins envellits. El propi acetaldehid pot també conduir a la formació de pigments de condensació entre els antocians i les catequines, en una reacció afavorida a pH àcid. Això condueix a una evolució en la composició fenòlica en el vi i a una conseqüent evolució del color. No són, però, els únics processos que provoquen un canvi cromàtic, ja que diversitat de molècules poden promoure efectes hipercròmics i modular la tonalitat dels vins.

A l'hora d'investigar sobre els factors que influeixen en la composició fenòlica, les suspensions cel·lulars de *Vitis* conformen una eina útil de treball, ja que constitueixen un sistema aïllat i controlat de senzill manipulació. Però a més, permeten l'obtenció de metabòlits secundaris d'interès, ja que es poden produir en grans quantitats de manera ràpida i senzilla. Tanmateix, hem comprovat que esdevé complicat d'aconseguir estimular aquestes cèl·lules per realitzar processos de biotransformació, ja que sembla que no són capaces de generar noves molècules, sinó d'optimitzar la producció d'aquelles que ja sintetitzen de manera natural. Poden també aplicar-se en estudis bioquímics, tot i que els resultats obtinguts poden divergir respecte la situació de la planta completa, en què hi ha una organització, una compartimentació i una comunicació entre teixits que modifiquen el comportament metabòlic de l'organisme. Així, per exemple, en estudiar els factors enzimàtics que regeixen la composició fenòlica s'observa que els nivells d'expressió del gen de la fenilalanina amonio liasa, descrit com a clau en la síntesi de compostos fenòlics, són

relativament baixos en el cas dels cultius, ja que la resposta cel·lular pot ser magnificada amb poca senyal; és a dir, en aquestes condicions *in vitro*, un petit increment d'expressió ja pot ser suficient per produir l'efecte buscat.

A continuació s'exposen les conclusions considerades més rellevants de la present tesi:

1. La composició fenòlica és diferent segons la varietat, l'anyada, i el grau de maduració del raïm.
2. Quant a la composició antociànica, en data de verema l'anàlisi de components principals classifica clarament totes les varietats. El grau d'acilació i la identitat de l'agent acilant són les variables que més discriminen les varietats.
3. La composició antociànica evoluciona al llarg de la maduració: globalment hi ha un increment de l'acilació i dels nivells de malvidina-3-glucòsid. Aquest fet confirma els models que ubiquen la malvidina com el darrer producte antociànic format en la via.
4. L'anyada té un fort efecte en les concentracions finals dels antocians per gram de baia, encara que resulta difícil assignar un patró concret a aquest efecte. Sembla que el comportament varietal és diferent; així, mentre en ull de llebre la síntesi d'antocians s'estimula en un any plujós, en cabernet succeeix el contrari.
5. En la nostra zona d'estudi, el reg té poc efecte tant en les concentracions finals com en la composició antociànica de les baies. Sembla, però, que la situació de no reg condueix a unes concentracions majors.
6. Els continguts i concentracions dels flavan-3-ols i tanins dels pinyols també es diferencien entre varietats.
7. L'evolució d'aquests compostos al llarg de la maduració comporta una disminució dels monòmers (catequina, epicatequina, epicatequina-3-gal·lat), una estabilització dels dímers i trímers, i un increment del grau de polimerització.
8. L'extracció d'antocians al llarg del procés maceratiu depèn de l'estructura química de l'antocià i de la seva concentració, cosa que significa que s'estableixen diferents extractabilitats per varietat segons la seva composició antociànica característica. Les varietats

amb majors concentracions d'antocians són les que permeten una major velocitat d'extracció macerativa.

9. Els antocians p-cumarilats són els que s'extreuen en menor nivell i velocitat, de manera que les seves recuperacions al final de la maceració són menors que les dels antocians-3-monoglucòsids aï llats.

10. En solucions model en què es combinen antocians, acetaldehid i catequines, hi ha una evolució del color cap a tonalitats violàcies, que impliquen la desaparició dels antocians per formar nous productes. En vins amb addició d'acetaldehid, malgrat que també hi ha desaparició d'antocians, el color no evoluciona a tonalitats violàcies, cosa que indica que només els vins fortament tàncics poden donar aquesta evolució del color. En cas contrari, l'evolució del color es dirigeix a tonalitats vermell-teula, en què també participen noves formes antociàniques.

11. Diversos àcids poden alterar l'espectre cromàtic en vins joves; principalment els àcids fenòlics (i en especial l'àcid ferúlic) i també l'àcid làctic.

12. En cultius cel.lulars, es posa de manifest l'increment de síntesi d'antocians en els casos d'estrès hídric i d'estrès nitrogenat. Aquest darrer és el que provoca majors concentracions d'antocians per pes fresc. Altres variables, com el pH, o la mida d'inòcul, també afecten, però en menor mesura.

13. En cultius cel.lulars, la composició antociànica varia també en les condicions amb estrès, de manera que es sintetitzen més antocians acilats.

14. Igualment, les fitohormones poden tenir algun paper en la via biosintètica, ja que l'àcid abscísic promou la síntesi de malvidina, antocià minoritari en les suspensions cel.lulars de Gamay Fréaux.

15. No s'han pogut establir reaccions de biotransformació entre els antocians i els agents acilants. Això suggereix que els mecanismes en *Vitis* i en cultius en què sí s'han pogut establir aquests productes, com la pastanaga, poden ser diferents.

16. S'han dissenyat uns primers que permeten amplificar selectivament les regions del gen de la fenilalanina amonio liasa i de la tubulina en *Vitis*, cosa que es comprova mitjançant la reacció de RT-PCR. No obstant això, utilitzant aquesta metodologia amb l'ús de termocicladors a temps real per determinar l'expressió gènica en cultius cel.lulars, es posa de manifest una baixa expressió de la PAL en totes les condicions.

