



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Máster en Ingeniería Agronómica

ELABORACIÓN DE VINOS TINTOS
CON DERIVADOS DE LEVADURA
RICOS EN GLUTATIÓN

Alumno: Borja Mazuelas Cuevas

Tutor: José Manuel Rodríguez Nogales.
Cotutores: Encarnación Fernández Fernández,
Josefina Vila Crespo.

Septiembre 2015

Copia para el tutor

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1. Mecanismos de oxidación en mostos y vinos	8
2.1.1. Compuestos fenólicos.....	8
2.1.2. Mecanismos de pardeamiento oxidativo en vino	9
2.1.2.1. Pardeamiento enzimático	9
2.1.2.2. Pardeamiento no enzimático	11
2.1.2.2.1. La oxidación de los fenoles del vino	11
2.1.2.2.2. Las vías de pardeamiento que involucran acetaldehído y ácido glioxílico	14
2.1.2.2.2.1. El acetaldehído	14
2.1.2.2.2.2. El ácido glioxílico	15
2.1.2.2.3. Otros posibles mecanismos de pardeamiento no enzimático	17
2.1.3. Papeles centrales de metales en oxidación no enzimática de vino.....	18
2.1.3.1. La activación del oxígeno en vino	18
2.1.3.2. Los iones hierro y cobre en el vino	19
2.2. Principales antioxidantes en enología.....	21
2.2.1. El dióxido de azufre	21
2.2.2. El ácido ascórbico.....	23
2.2.3. El glutatión	24
2.3. Levaduras secas inactivas	27
2.3.1. Principales aplicaciones de los preparados de LSI durante la vinificación	28

2.3.1.1. Efecto en la fermentación.....	28
2.3.1.2. Efecto en la composición y en las características organolépticas de los vinos.....	31
2.3.1.2.1. Efecto de los polisacáridos en el color y en la astringencia de los vinos tintos.....	31
2.3.1.2.2. Otros efectos del empleo de preparaciones de LSI en las características organolépticas de los vinos.....	32
2.3.1.3. Efecto en la seguridad del vino.....	33
2.3.1.4. Levaduras secas inactivas ricas en glutatión.....	34
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
3.1. Desarrollo de la vinificación.	38
3.2. Control analítico.....	41
3.3. Tratamiento estadístico de los resultados.....	60
4. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	61
4.1. Objetivo.....	62
4.2. Plan de trabajo.....	62
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
5.1. Efecto de los derivados de levadura ricos en glutatión en la cinética de fermentación.....	65
5.2. Efecto de los derivados de levadura ricos en glutatión sobre los parámetros enológicos del vino fermentado.	68
5.2.1. Parámetros básicos.	68
5.2.2. Compuestos fenólicos.....	71
5.2.3. Características de color.....	75
5.3. Estudio multivariante de la influencia de las LSI rica en glutatión.....	78
5.4. Efecto de los derivados de levadura ricos en glutatión sobre el envejecimiento de los vinos (Test acelerado de oxidación).....	81

5.5. Estudio multivariante de la influencia del tipo de derivado de levadura rico en glutatión sobre el envejecimiento de los vinos.	89
6. CONCLUSIONES.....	92
7. BIBLIOGRAFÍA	95

1. INTRODUCCIÓN

El glutatión (GSH) es un componente natural de muchas frutas, clásicamente descrito como inhibidor de oxidaciones enzimáticas y no enzimáticas en jugos de frutas y otros alimentos (Friedman, 1996; Roussis et al., 2007) y cuyo término es usado indistintamente para referirse a sus formas reducidas y diméricas, ambas presentes en el mosto/vino. El glutatión monomérico es conocido como glutatión reducido y su dímero como glutatión oxidado o disulfítico. Es una molécula relativamente grande comparada con otros iones del vino y su característica principal es la presencia de un grupo sulfhidrilo (SH), un fuerte donador de electrones, que le otorga sus propiedades antioxidantes y la capacidad de mantener en forma reducida muchas otras moléculas en la matriz del mosto/vino. Desde el punto de vista estrictamente químico es un tripéptido, siendo sus aminoácidos estructurales la cisteína, el ácido glutámico y la glicina.

En la actualidad, están siendo utilizadas preparaciones de levadura seca inactiva rica en glutatión (LSI-GSH), en la industria de elaboración del vino. Estas preparaciones se obtienen por el cultivo de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en un medio rico en azúcar. Después, las levaduras son autolisadas y secadas, el producto final se obtiene en forma de polvo. Uno de los motivos para la producción de este tipo de preparaciones es la prohibición por parte la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) de la adición directa de glutatión. Además estas preparaciones pueden ayudar a disminuir la adición de anhídrido sulfuroso en la vinificación ya que este compuesto está teniendo cada vez más detractores debido a su influencia en posibles problemas sobre la salud de los consumidores, alergias, etc.

Hasta ahora existen estudios que hacen entender que la adición directa de GSH influye positivamente tanto en el aroma como en el color y la conservación del vino tinto durante su envejecimiento en botella, pero nada concreto en cuanto a la acción que pueden tener los productos presentes en el mercado sobre estos aspectos.

Pues bien, en este estudio trataremos de ver cómo estas preparaciones comerciales de LSI-GSH, pueden ayudar a conservar las propiedades del vino tinto reduciendo la oxidación de los compuestos que hacen que el vino conserve su calidad.

Tras realizar el trabajo de laboratorio y analizar minuciosamente los datos de los parámetros medidos, se puede concluir que no existen suficientes evidencias de que la adición de LSI-GSH puede disminuir la evolución oxidativa de los vinos tintos durante su almacenamiento, si bien si parece que ayudan a conservar el color tras la fermentación del vino. Se desconoce su acción en condiciones normales de oxidación en bodega, por lo que son necesarias más investigaciones para poder corroborar estos resultados, y ver su efecto sobre la calidad del vino durante su envejecimiento en botella.

2. ANTECEDENTES

2.1. Mecanismos de oxidación en mostos y vinos.

El pardeamiento es un proceso oxidativo en el que están implicados azúcares, lípidos, aminoácidos o compuestos fenólicos de los alimentos. Es uno de los principales problemas encontrados durante la vinificación de vino, ya que por un lado, afecta adversamente a las propiedades sensoriales de vino (pérdida de color, sabor y aroma, y el incremento de la astringencia) (Escudero et al., 2002) y por otro, resulta en la pérdida de valor nutricional del vino (Sioumis et al., 2005)

El pardeamiento oxidativo es un problema de hace mucho tiempo en la elaboración del vino y el dióxido de azufre (SO₂) es el antioxidante que se utiliza generalmente para controlar el pardeamiento del vino. Sin embargo, las preocupaciones sobre su capacidad para inducir reacciones alérgicas graves han creado una gran necesidad de su reducción o sustitución en los últimos años. Además, el ácido ascórbico parece infructuoso como antioxidante alternativo en la elaboración del vino. Así que una amplia comprensión de la química de pardeamiento del vino es esencial para estudiar nuevo o nuevos antioxidantes con el objetivo de proteger al vino de las oxidaciones.

2.1.1. Compuestos fenólicos:

Algunos iones metálicos, SO₂, ácidos orgánicos, etanol, y compuestos fenólicos presentes en el mosto de uva y vino, son susceptibles a la oxidación, y entre ellos los compuestos fenólicos se consideran las principales sustancias que causan pardeamiento (Vivas et al., 2001). Sin embargo, el mecanismo de oxidación de los fenoles es complejo, ya que depende en gran medida de las composiciones fenólicas, sus niveles, y que los o-difenoles son los más oxidables (Toit et al., 2006). En resumen, las capacidades regenerativas de los fenoles en la oxidación junto con otros compuestos y sus reacciones de pardeamiento no oxidantes constituyen la razón principal del pardeamiento (Boulton et al., 2001). El SO₂, ácido ascórbico y algunos metales de transición son factores importantes que afectan al proceso (Sioumis et al., 2005).

Singleton (1987) estudió el proceso de oxidación en el vino, y consideró que la regeneración de los fenoles está involucrada en el proceso de oxidación acoplada y que el sistema funciona como un "amortiguador" en la oxidación debido a que los fenoles regenerados se oxidan más fácilmente que sus correspondientes originales, lo que previene la oxidación completa de los fenoles iniciales. Cheynier et al. (1995) examinaron los mecanismos de las reacciones principales responsables del pardeamiento del mosto de uva y las consecuencias de tales reacciones para el vino en sistemas modelo. Revelaron que las reacciones de pardeamiento en vinos aparecían relacionadas con el contenido en flavanoles. La autooxidación de flavanoles (por ejemplo, catalizadas por Fe²⁺) es responsable de la decoloración del vino, pero las reacciones espontáneas de hidrólisis y polimerización catalizadas en medio ácido de los oligómeros flavan-3-ol (proantocianidinas) podría dar lugar a compuestos coloreados más grandes y menos solubles.

2.1.2. Mecanismos de pardeamiento oxidativo en vino:

Como se describió anteriormente, especialmente los o-difenoles son responsables del pardeamiento oxidativo del vino. El pardeamiento de los vinos se puede clasificar en pardeamiento enzimático y no enzimático en términos del mecanismo de inicio: el primero se presenta casi exclusivamente en los mostos de uva; el último puede ocurrir tanto en mostos como en vinos, aunque como resultado de la fermentación y de algunas operaciones, prevalece en el vino (Es-Safi et al., 2003b).

2.1.2.1. Pardeamiento enzimático:

La oxidación enzimática de los fenoles, particularmente en presencia de oxígeno atmosférico y polifenoloxidasas (PPO), tiene lugar en las primeras etapas de procesamiento y es bien conocido por ser una causa de pardeamiento en los productos alimenticios (Wang, 1990). En las células intactas de los tejidos de frutas u hortalizas frescas, los fenoles ubicados predominantemente en la vacuola y las oxidorreductasas situadas en el citoplasma no pueden contactar debido a los diferentes sistemas de membrana celular, mientras que el pardeamiento enzimático surgirá una vez que las células sufran daños y contacten con el aire (Wang, 1990). Las principales oxidorreductasas responsables de pardeamiento durante el procesamiento de uva son la PPO y la peroxidasa (POD) (Li et al., 2005). La PPO es una enzima que contiene cobre y es capaz de oxidar sustratos característicos de la tirosinasa y lacasa. La tirosinasa, también llamado catecolasa, se produce naturalmente en la uva y puede catalizar la oxidación de monofenoles y o-difenoles (Singleton, 1987). Sin embargo, la lacasa es producida por mohos y es capaz de oxidar un gran número de sustratos, especialmente 1,2- y 1,4-dihidroxibenceno (Li, 2000; Toit et al., 2006.). La POD es una enzima que contiene Fe y su actividad depende del peróxido de hidrógeno disponible (H_2O_2) en el medio. Sin embargo, el pardeamiento causado por la POD parece insignificante en frutas, con pocas excepciones como el lichi y la piña (Robards et al., 1999), aunque algunos investigadores encontraron que hizo aumentar la degradación de fenoles cuando coexiste con la PPO (Robards et al., 1999).

En el mosto de uva, el pardeamiento enzimático se correlaciona en gran medida con el contenido de hidroxilcinamatos tales como ácido cafeoiltartárico (ácido caftárico) y ácido p-cumariltartárico (ácido cutárico), y es promovido por flavanoles (Oszmianski et al., 1996). El ácido caftárico es oxidado por la PPO para producir una o-quinona del ácido cafeoiltartárico (CTAQ), que son oxidantes poderosos y capaces de oxidar otros compuestos en el vino para provocar grandes cambios en el tono y la intensidad del color de este en función de los fenoles y la situación de los reactivos (Cheynier et al., 1995).

Mientras tanto, las o-quinonas producidas en la oxidación enzimática continuarán con reacciones adicionales de acuerdo a sus propiedades redox y afinidades electrónicas. En primer lugar, la hidroxilación de monofenoles en o-difenoles y difenoles en o-quinonas se produce con rápidas oxidaciones acopladas de las quinonas con otra molécula de fenol que conduce a la formación de dímeros o

regeneración de los fenoles originales, catalizada por el ácido (**Fig. 1**) (Wang, 1990). En segundo lugar, las quinonas producidas también pueden polimerizar y condensar con muchos otros compuestos (incluyendo especies fenólicas y no-fenólicas), y finalmente forma pigmentos de pardeamiento, lo cual es acelerado por un pH alto (**Fig. 1**) (Robards et al., 1999). Siendo oxidantes, las o-quinonas pueden oxidar casi cualquier sustrato con potenciales menores, tales como otros fenoles, ácido ascórbico y SO_2 , y estas quinonas se reducen a sus fenoles iniciales en el proceso; como electrófilos, pueden reaccionar con derivados de aminoácidos y agua. Por otro lado, las o-quinonas pueden reaccionar con las hidroquinonas apropiadas, y probablemente experimentar lentamente reacciones de condensación y polimerización, lo que conduce a la formación de pigmentos de pardeamiento (**Fig. 1**) (Robards et al., 1999).

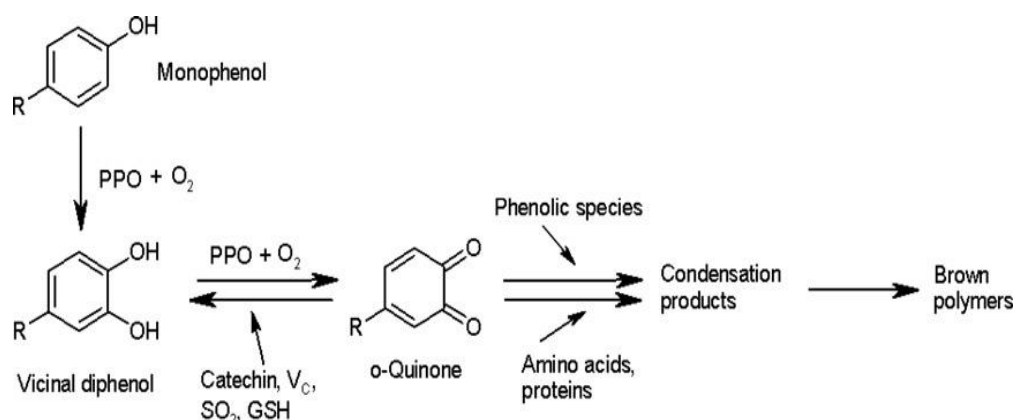


Figura 1: Proceso de pardeamiento enzimático en mosto de uva (Robards et al., 1999).

El glutatión (GSH), sin embargo, afectará al proceso de oxidación del mosto, a través de su reacción con CTAQ para producir ácidos 2-S-glutationil caftárico (GRP). GRP no puede ser oxidado por catecolasa y limitará el pardeamiento oxidativo en cierta medida, lo que implica que suficiente GSH en mosto de uva puede atrapar las quinonas producidas durante la oxidación enzimática, y disminuir la cantidad de pigmentos de pardeamiento (Toit et al., 2006).

Por otro lado, la interacción entre la catecolasa y el SO_2 puede impedir la producción de GRP, que mantendrá mucho más ácidos caftárico y p-cutárico libres con alto potencial de pardeamiento. Además, el GRP está listo para la oxidación por la lacasa o el CTAQ para producir pardeamiento (Main, 1992). El cobre también reacciona con GSH y compite con CTAQ, y hasta cierto punto, disminuye el contenido efectivo de GSH y aumenta el pardeamiento de mosto de uva (Rigaud et al., 1991).

En general, no toda la oxidación enzimática que ocurre en mosto de uva blanca es mala para el producto final. Por ejemplo, la hiperoxigenación del mosto disminuye el potencial de pardeamiento del vino de dos maneras: la desaparición de la tirosinasa y el agotamiento de sustratos fenólicos oxidables durante las reacciones de oxidación (Ribéreau-Gayon et al., 2006a); y la formación de GRP que es resistente a más pardeamiento (Main, 1992). Esto da lugar a vinos con menor contenido en polifenoles

y alto contenido de GRP y estos vinos son más estables que los vinos elaborados a partir de mosto no oxidado, en el que los polifenoles se mantienen con un alto potencial de pardeamiento. Sin embargo, durante el procesamiento de vino tinto el impacto de la oxidación enzimática endógena es limitada, pero por otro lado la oxidación química (oxidación no enzimática) afecta fuertemente el proceso de envejecimiento del vino (Cheynier et al., 2000).

Se acepta que la catecolasa es tan sensible al SO₂ que una pequeña cantidad la inactivará, mientras que la lacasa es más activa, fácilmente soluble y resistente a SO₂, y puede estar presente en el vino final (Boulton et al., 2001). Sin embargo, la concentración y la actividad de PPO disminuye gradualmente durante la oxidación (Li, 2000), y con el desarrollo de la fermentación y las operaciones tales como la clarificación, el tratamiento con SO₂ y la producción de etanol, no existirá PPO en el vino (Cheynier et al., 1989). En la actualidad, el conocimiento sobre el pardeamiento enzimático es tan profundo que las gestiones de control desarrolladas en la elaboración del vino han sido capaces de eliminar por completo el deterioro oxidativo y se presta mucha más atención al pardeamiento no enzimático que ocurre en los vinos, especialmente en vinos blancos (Labrousche et al., 2005).

2.1.2.2. Pardeamiento no enzimático:

Los o-difenoles, incluyendo principalmente el ácido cafeico y sus ésteres, catequina, epicatequina, antocianinas y sus derivados, y ácido gálico, se considera que son los más susceptibles a la oxidación en el proceso de pardeamiento no enzimático, y los niveles de flavan-3-oles se correlacionan más significativamente con el grado de pardeamiento de la mayoría de los vinos blancos (López-Toledano et al., 2002).

El pardeamiento no enzimático en el vino puede surgir a través de varias vías relacionadas con fenoles, y una de ellas es la oxidación de fenoles y la posterior polimerización de los productos oxidados, el primer proceso es catalizado por cobre y hierro. Otras rutas implican reacciones de polimerización entre fenoles y otros compuestos presentes en el vino, incluyendo la condensación con acetaldehído o ácido glioxílico (derivado de la oxidación del ácido tartárico). Algunos investigadores afirman que la condensación con acetaldehído es una reacción única, generalmente presentes en los vinos de jerez, para la que la concentración total de acetaldehído producido por las levaduras flor puede alcanzar 300 mg/L durante el envejecimiento biológico (Mérida et al., 2005). Sin embargo, la oxidación del etanol catalizada por metales de transición o por medio de la oxidación acoplada de fenoles también puede producir algo de acetaldehído en el vino (Sullivan, 2002).

2.1.2.2.1. La oxidación de los fenoles del vino:

Durante el proceso de oxidación no enzimática de vino, o-difenoles se oxidan a o-quinonas y pueden ser producidos radicales libres semi-quinona, mientras que el

oxígeno se reduce a H_2O_2 (Danilewicz, 2003), como se ejemplifica en la **Fig. 2**. Las quinonas formadas durante el proceso, como productos primarios, son inestables y pueden someterse a reacciones adicionales. Estas reacciones, que pueden causar la formación de pigmentos, son similares a las que tienen lugar en el pardeamiento enzimático (Robards et al., 1999). Por ejemplo, las reacciones de condensación para formar productos coloreados con alto peso molecular, o las reacciones de reducción para generar fenoles originales a través de la captura de átomos de hidrógeno de otros compuestos (**Fig. 2a**).

Las quinonas pueden combinarse de forma espontánea con compuestos nucleofílicos (incluyendo algunos fenoles, compuestos de sulfhidrilo y aminas) debido a su alta afinidad electrónica, y en el proceso, los dímeros o polímeros producidos pueden reordenar su estructura a través de una reacción de conversión tipo-enol para formar nuevos difenoles (Zhai et al., 2001). Por ejemplo, un dímero de quinona-fenol se puede convertir en un nuevo dímero difenol (Figura 2a). Además, los dímeros o polímeros producidos en la oxidación acoplada tienen potenciales redox más bajos que sus fenoles iniciales y son mucho más fáciles de oxidar (Li et al., 2005). Estos o-difenoles regenerados volverán a ser oxidados, acelerando finalmente las reacciones de polimerización de fenoles (Zhai et al., 2001). Mientras tanto, se produce más H_2O_2 y se oxida más etanol a acetaldehído en presencia de metales de transición, y algunos fenoles que no son fáciles de ser oxidados en un principio, parecen susceptibles a la oxidación a través de la estructura de reordenamiento anterior (Zhai et al., 2001).

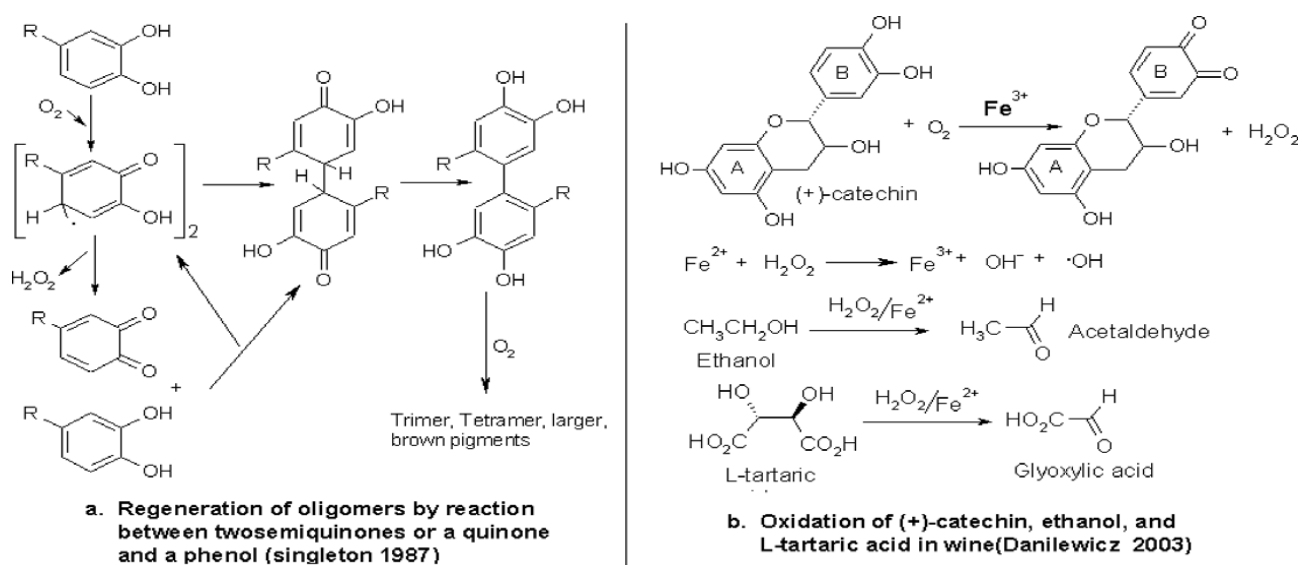


Figura 2: Reacciones de oxidación no enzimáticas en el vino (Li et al., 2005).

Sin embargo, Oszmianski et al. (1996) consideraron que el reordenamiento del ácido catequínico podría ser impedido por algunos aditivos, tales como sílice, ácido bórico, tricloruro de aluminio, y acetato de zinc (II), y esto no podría ocurrir a valores de pH por debajo de 8. La oxidación no enzimática de los fenoles se produce muy rápida bajo condiciones alcalinas, pero también tiene lugar lentamente en medios

ácidos como el vino a la presión y temperatura habituales, especialmente si están presentes iones metálicos (Boulton et al., 2001).

Como se indicó anteriormente, puede formarse H_2O_2 durante la oxidación de los fenoles del vino, lo cual ha sido ampliamente aceptado. Algunos autores también afirman que la principal función antioxidante de SO_2 en el vino es para reaccionar con el H_2O_2 , limitando de este modo la oxidación de etanol y otros compuestos hidroxil saturados (Danilewicz, 2007). Esto debe tenerse en cuenta, porque el H_2O_2 en asociación con el ion ferroso (Fe^{2+}) tiende a generar especies reactivas de oxígeno tales como el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), lo que se conoce como la reacción de Fenton (Waterhouse & Laurie, 2006). El proceso de la reacción de Fenton se muestra en la **Fig. 3**. En la actualidad, a pesar de que la reacción de Fenton se ha estudiado bien en la cerveza, su importancia en el vino es considerada sólo en los últimos años (Laurie & Waterhouse, 2006; Waterhouse & Laurie, 2006).

El radical hidroxilo, es un producto reducido de oxígeno con corta vida de alrededor a 10^{-6} s en el agua, es actualmente el oxidante más poderoso de especies reactivas de oxígeno y capaz de oxidar rápidamente la mayoría de las sustancias orgánicas (Choe et al., 2005). Algunos autores sugieren que $\cdot\text{OH}$ es capaz de oxidar casi cualquier componente presente en el vino, casi en la misma proporción a sus concentraciones (Laurie & Waterhouse, 2006).

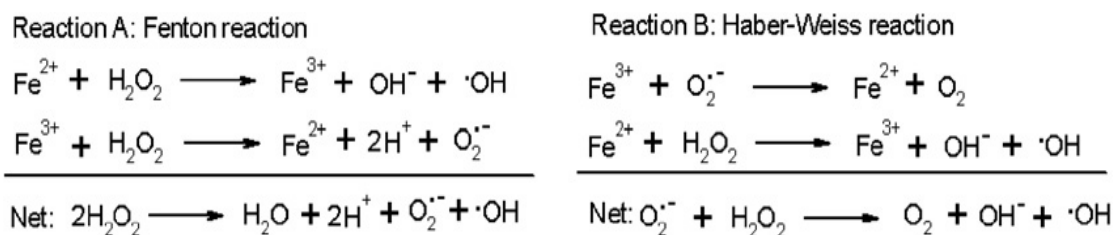


Figura 3: Reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Li et al., 2005).

Sin embargo, el radical $\cdot\text{OH}$ no es selectivo y sólo reacciona con las moléculas adyacentes a causa de su pequeño radio de acción (Waterhouse & Laurie, 2006). Por lo tanto, el etanol y ácido tartárico probablemente se oxidan por el $\cdot\text{OH}$ para formar acetaldehído y ácido glioxílico, respectivamente, y otros componentes abundantes de vino tales como glicerol, azúcares y ácidos orgánicos, probablemente, experimenten el mismo tipo de reacciones de oxidación para producir los productos correspondientes (Waterhouse & Laurie, 2006). Estos productos de oxidación esperados, principalmente aldehídos y cetonas, son buenos nucleófilos, que pueden ser importantes para el desarrollo del color y otros cambios en la estructura de los taninos (Waterhouse & Laurie, 2006).

2.1.2.2. Las vías de pardeamiento que involucran acetaldehído y ácido glioxílico.

2.1.2.2.1. El acetaldehído.

Actualmente, los cambios cromáticos durante el pardeamiento del vino están bien documentados, aunque el deterioro aromático parece ocurrir antes del cambio de color (Escudero et al., 2002). Al mismo tiempo, la degradación del sabor durante el pardeamiento de los vinos ha recibido poca atención, y menos la relación entre los cambios de sabor y color en el vino (Silva Ferreira et al., 2003).

Tradicionalmente, el acetaldehído se considera un compuesto que posee un olor y sabor desagradable, que da amargor y sabor oxidado al vino, y si su nivel es superior a 50 mg/L en un vino de mesa, significa que el vino se ha oxidado (Zhai et al., 2001). Sin embargo, el acetaldehído parece ser una de las sustancias típicas con sabor a nueces maduras en algunos vinos secos de Jerez sometidos a envejecimiento biológico (Ferreira et al., 1997). Timberlake y Bridle (1976) propusieron por primera vez uno de los mecanismos por el cual el acetaldehído podría contribuir a la formación de dímeros y trímeros entre flavanoles (taninos), y más tarde fue confirmado por otros investigadores (Es-Safi et al., 1999).

Como resultado de este fenómeno se observa un aumento del color en la región espectral amarilla y del grado de condensación (López-Toledano et al., 2004). Como se ha mencionado anteriormente, el acetaldehído presente en el vino deriva del (i) metabolismo de la levadura durante la fermentación o el envejecimiento biológico eventual y (ii) por la oxidación del etanol catalizada por metales de transición o por medio de la oxidación de fenoles acoplados. La primera ruta en la que se produce acetaldehído tiene lugar principalmente en ciertos vinos como vinos de Jerez, y la segunda ruta es la más importante en la mayoría de los vinos. Wildenradt y Singleton (1974) mostraron la oxidación acoplada de etanol a acetaldehído a una velocidad apreciable durante el proceso de oxidación de fenoles (**Fig. 2b**).

Se cree que la reacción entre el acetaldehído y los fenoles comienza con la protonación del acetaldehído a un carbocatión en condiciones ácidas, seguido por la adición nucleófila del flavanol (a través del C-6 o C-8 del anillo A) al carbocatión (**Fig. 4**). Después de perder una molécula de agua, el aducto de etanol forma un nuevo carbocatión intermedio que es atacado por una segunda unidad de flavanol nucleófila, probablemente en su posición C-8 para producir un flavanol dímero etil-ligado (**Fig. 4**). La reacción comienza de nuevo a partir de los dímeros de nueva formación, dando lugar a polímeros en el final. Con acetaldehído, los vínculos etil generados en los polímeros de flavanoles policondensados no son estables y escinden en oligómeros vinilflavanol (**Fig. 4 (1)**) (Fulcrand et al., 2006). Sin embargo, no se han detectado pigmentos xantilium cuando el acetaldehído se hace reaccionar con los flavanoles, pero la coloración naranja de la solución inicial es característica del cromóforo xantilium (Fulcrand et al., 2006.).

Como se ha demostrado en sistemas modelo y en vinos tintos, se lograría la condensación directa entre antocianos y taninos o catequinas para formar aductos antocianin-taninos y tanin-antocianina, pero la reacción es muy lenta, y los productos eventuales son sales xantilium amarillas, que siempre cambian el color del vino tinto a naranja (Dueñas et al., 2006). En comparación con la condensación directa entre antocianos y taninos o catequinas, la polimerización rápida entre ellos mediada por acetaldehído se produce con un aumento de la intensidad del color del vino y de su estabilidad. Sin embargo, la polimerización adicional con flavanoles da lugar a fenómenos de inestabilidad, precipitación y disminución de color (Es-Safi et al., 2002, 2003b). Además, el acetaldehído podría formar nuevos tipos de pigmentos tales como vitisina B y otras proantocianidinas que son más estables a la decoloración del SO₂ (Morata et al., 2007).

2.1.2.2.2.2. Ácido glioxílico.

En 1996, Oszmianski et al. encontraron que en un vino modelo, los productos de la oxidación de la (+) - catequina por el hierro eran incoloros o amarillo. Estos compuestos de color amarillo presentaban un máximo de absorbancia a 440-460 nm. Fulcrand et al. (1997) analizaron posteriormente y verificaron las características estructurales de estos importantes compuestos incoloros y amarillos, y propusieron una segunda vía de pardeamiento. En presencia de hierro, la oxidación de la catequina no sucedió directamente, pero si en el ácido tartárico para dar ácido glioxílico. Una vez que se formó el ácido glioxílico, este reaccionaría con dos unidades de flavanoles para formar un dímero incoloro unido a través de un puente carboximetin, por un mecanismo de reacción similar al de la condensación inducida del acetaldehído (**Fig. 4**).

Posteriormente, el dímero incoloro formaría pigmentos amarillos por una deshidratación seguida de un proceso de oxidación (**Fig. 4 (2)**). Nuevos estudios confirmaron esta nueva vía de pardeamiento (Es-Safi et al., 2000a). En presencia de cobre, se observaron los mismos fenómenos en los vinos modelo (Es-Safi et al., 2003a).

Teniendo en cuenta los contenidos de hierro y cobre y de ácido tartárico en el vino, la vía de pardeamiento puede ser importante durante el envejecimiento del vino (Fulcrand et al., 1997), pero hasta ahora, las funciones específicas de los iones metálicos en la formación de cationes xantilium no están claras. Clark et al. (2003) investigaron el efecto del cobre en la reacción entre la (+) - catequina y del ácido glioxílico en un vino blanco modelo. Propusieron que el cobre aumentaba los niveles totales de unión del dímero de catequina a través del puente carboximetin y del pigmento catiónico xantilium, lo que aceleraba el puente de las dos unidades de catequina por el ácido glioxílico. Un estudio más reciente en un vino modelo sugiere que (+) - epicatequina es ligeramente más reactiva con ácido glioxílico que (+) - catequina, sin embargo, los cationes xantilium generados a partir de (-) - epicatequina absorben el doble de fuerte a 440 nm que los derivados de (+) - catequina (Labrouche et al., 2005).

2.1.2.2.3. Otros posibles mecanismos de pardeamiento no enzimático.

Además de los principales pardeamientos no enzimáticos que involucran fenoles en el vino, los siguientes mecanismos químicos también pueden ocurrir en la elaboración del vino. Las principales reacciones de oxidación no enzimática que ocurren durante el calentamiento del mosto o el almacenamiento son la caramelización y la reacción de Maillard, afectando en esto la temperatura (Buglione et al., 2002). La caramelización puede ocurrir con los hidratos de carbono, pero requiere temperaturas superiores que los productos normalmente sometidos durante la distribución y almacenamiento (Steele, 2004). En el vino, la caramelización se produce durante la producción de jerez horneado y durante la pasteurización excesiva de vinos dulces; de manera similar, tonos fuertes de pardeamiento derivados de la caramelización pueden estar presentes en los vinos tintos y blancos vinificados de bayas pasificadas (Zoecklein et al., 1995).

La reacción de Maillard, es una reacción que implica la condensación de azúcares reductores con aminoácidos y proteínas, se produce en los alimentos durante el procesamiento y la cocción, incluso durante el almacenamiento. Aunque la reacción de Maillard se ha encontrado en la cerveza y otros alimentos, hay poca evidencia de su ocurrencia en el pardeamiento del vino (Zoecklein et al., 1995). Sin embargo, debido a que el vino contiene los sustratos de la reacción de Maillard tales como aminoácidos, proteínas y azúcares reductores, su posible aparición no debe pasarse por alto (Zoecklein et al., 1995). Por otra parte, ciertas condiciones pueden promover la reacción de Maillard, cuando los vinos se hacen usando tecnologías tales como termovinificación (calentamiento de las uvas) y el embotellado a alta temperatura (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

Muchos estudios indican que un gran número de compuestos volátiles responsables del aroma típico o aromas de envejecimiento de algunos vinos dulces naturales parece estar vinculado con reacciones químicas como la de Maillard entre azúcares y aminoácidos (Marchand et al., 2002). Por otro lado, los lípidos insaturados o lípidos complejos naturalmente presentes en el vino contienen ácidos grasos insaturados (Lauretta, 1993), que son susceptibles a la oxidación por el oxígeno molecular. Vivas et al. (1995) informaron de que la auto-oxidación de estos ácidos grasos insaturados en el vino puede conducir a la formación de peróxidos que se transforma en compuestos que causan malos sabores.

Como se indicó anteriormente, los fenómenos de pardeamiento oxidativo que ocurren en la elaboración del vino se pueden clasificar en pardeamiento enzimático y el pardeamiento no enzimático, y la mayor diferencia entre ellos reside en la tasa de producción de la quinona o en la velocidad de reacción de pardeamiento que tiene lugar. El pardeamiento enzimático es mucho más rápido, en el que la enzima PPO es el iniciador de estas reacciones de oxidación enzimáticas (Toit et al., 2006.). Las siguientes reacciones de polimerización causadas por quinonas conducen al oscurecimiento de pigmentos con mayor peso molecular (Fulcrand et al., 1997). Sin embargo, durante el proceso de pardeamiento no enzimático, las reacciones de

oxidación de fenoles a quinonas son muy lentas debido al bajo valor de pH de los vinos, siempre dependientes de la presencia de hierro y cobre, a pesar de que son rápidos en medio alcalino (Lasanta et al., 2005).

Un estudio previo demostró que, cuando se elimina hierro y cobre del vino con el uso de ferricianuro potásico, el vino casi no absorbe oxígeno, o lo hizo muy lentamente; si se renueva el cobre y el hierro en el vino tratado, el consumo específico de oxígeno se incrementó notablemente (Zhu, et al., 1983). Numerosos estudios publicados recientemente han confirmado la conclusión de que algunos metales de transición, especialmente el cobre y el hierro, que catalizan la oxidación son de gran importancia durante el proceso de pardeamiento no enzimático (Danilewicz, 2003); sin el cobre y el hierro, el oxígeno molecular no es suficientemente activo para oxidar los fenoles directamente en el vino (Danilewicz, 2003). La "auto-oxidación" del vino parece ser catalizada por metales de transición.

2.1.3. Papeles centrales de metales en oxidación no enzimática de vino.

2.1.3.1. La activación del oxígeno en el vino.

Una reacción redox es un proceso que implica la transferencia de electrones de las especies reductoras a las oxidantes, y si la reacción redox puede suceder, o llevarse a cabo por completo, depende tanto de la dificultad de la transferencia de electrones como de los potenciales (E_H) de ellos. E_H es considerada como un criterio importante para evaluar la ocurrencia de una reacción redox, la sucesión de la reacción y el nivel de rendimiento (Pi, 1987). Según la ecuación de Nernst, el potencial no sólo depende de la proporción de especies oxidantes y reductoras en una solución, sino también del pH, así como la influencia de la temperatura y la concentración iónica (Li et al., 2005). En el vino, hay una gran cantidad de pares de electrones de oxidación-reducción, tales como quinonas-fenoles, $O_2-H_2O_2$, O_2-H_2O , sulfito-sulfato, acetaldehído-etanol, acetato-acetaldehído, piruvato-lactato, fumarato-succinato, malato-oxalacetato, $Cu^{2+}-Cu^+$, $Fe^{3+}-Fe^{2+}$, y el pH puede afectar a los valores E_H de algunos pares y cambiar su estabilidad (Del Álamo et al., 2006).

El proceso de oxidación del catecol a quinona, junto con el del oxígeno reducido a H_2O_2 y otras especies reactivas de oxígeno, se muestra en la **Fig. 5**. Esto indica que el H_2O_2 no puede oxidar directamente al catecol en condiciones ácidas, si bien puede ser el precursor para la generación del radical $\cdot OH$, fuerte iniciador de la oxidación del vino. Numerosos informes bibliográficos también indican que los fenoles en el vino no pueden reaccionar con el oxígeno directamente, y la presencia de hierro y el cobre es necesario (Waterhouse & Laurie, 2006).

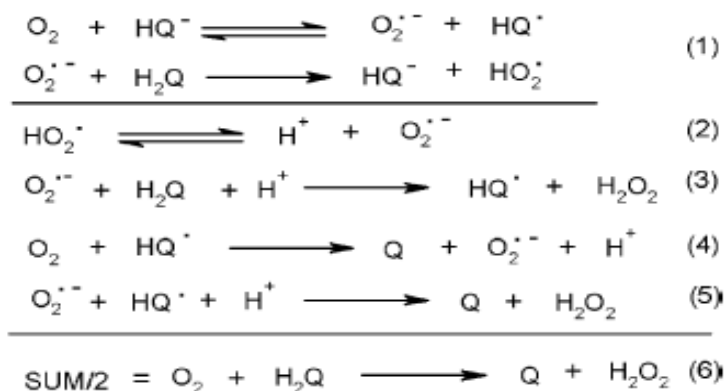


Figura 5: Autooxidación de catecoles del vino (H2Q) (Main, 1992).

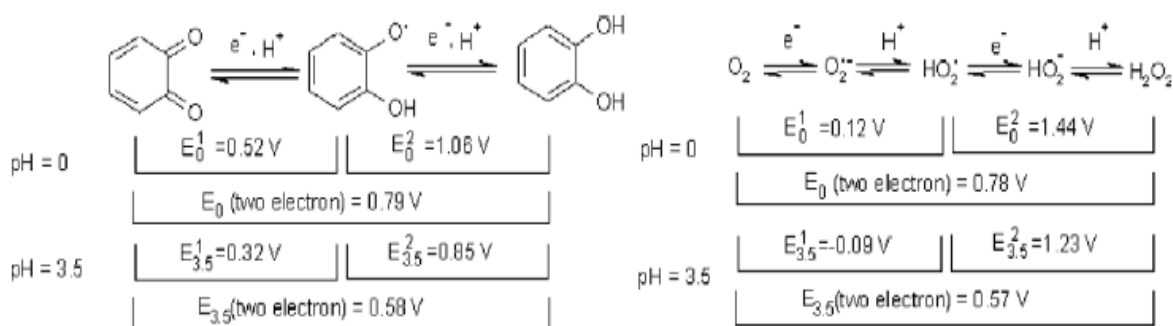


Figura 6: Primero, segundo y potenciales de reducción de dos electrones del sistema de 1,2-benzoquinona/catecol y el sistema de peróxido de oxígeno/hidrógeno (Danilewicz, 2003).

Esa reacción directa entre el oxígeno y los fenoles no pueden ocurrir o será extremadamente lenta en medio ácido, mientras que algunos metales de transición, especialmente hierro y cobre, pueden cambiar las rutas de reacción, disminuyendo la energía libre necesaria para la reacción, y así aumentar la velocidad de reacción (Dong et al., 2001), y estos pueden jugar un gran papel en llevar a cabo la iniciación de la primera reacción (Fig. 5 (1)) (Danilewicz, 2003).

2.1.3.2. Los iones hierro y cobre en el vino.

En el vino, los iones de metales de transición tales como el hierro y el cobre están ampliamente presentes, cuya contaminación es predominantemente relacionada con los equipos de trabajo del suelo y de la vinificación (Lasanta et al, 2005). Con el creciente uso de equipos de acero inoxidable, los niveles de metales de transición en el vino se han reducido en gran medida, y los vinos típicos contienen niveles promedio de hierro de alrededor de 0-5 mg/L, y en cobre aproximadamente 0,1-0,3 mg/L (Li et al., 2005). Sin embargo, pueden causar deterioro oxidativo a esta baja concentración (Lasanta et al, 2005). Aparte de sus concentraciones, las formas presentes y la

especificación del cobre y hierro en el vino son los factores más probables que conducen al pardeamiento del vino (Scollary, 2002).

El ion férrico (Fe^{3+}) presente en el vino no está en forma libre, pero si en forma de complejo con otros compuestos, y el ion ferroso (Fe^{2+}) también puede formar un complejo en el vino, pero el complejo es fácilmente ionizable (Zhu et al., 1983). Que la mayoría del hierro esté presente en forma de complejo en el vino es importante en la comprensión de la química del pardeamiento del vino.

La formación de complejos reduce el sistema pH debido a la liberación de iones hidrógeno (H^+), y con el aumento de pH, este se promueve y el potencial de reducción del par Fe^{3+} - Fe^{2+} se reduce (Yang et al., 2003). Aunque la solubilidad del complejo compuesto de polifenoles asociados con iones metálicos disminuye con el grado de sustitución y puede precipitar, el pH inicial al cual se observa la precipitación del complejo varía con los iones metálicos (Yang et al., 2003). Bajo condiciones básicas, por una parte, los fenoles son inestables y más fáciles de ser oxidados a quinonas con la pérdida del ligando hidroxibenceno, y por otra, los iones de hierro forman en gran medida hidróxido férrico para precipitar a través de reacciones de hidrólisis en las que se rompe su vinculación (Yang et al., 2003).

En las soluciones acuosas ácidas, aunque la mayoría de Fe^{3+} y Fe^{2+} están presentes en forma de complejo con seis moléculas de agua (es decir, $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ y $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, respectivamente), $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ sólo reacciona con el oxígeno a una velocidad baja, debido a la imposibilidad termodinámica (Danilewicz, 2003). Sin embargo, las moléculas de agua son fáciles de ser reemplazadas por otros ligandos fuertes tales como algunos fenoles que llevan catecol, galoil o grupos 3-hidroxil-4-carbonilo (tales como el ácido clorogénico, ácido cafeico, galato y ácido protocatéquico), que pueden unir hierro, las cantidades y la ubicación de los grupos hidroxilo en ellos también afectan a la formación de complejos. Como algunos fenoles quelato con Fe^{3+} , las reacciones de oxidación-reducción también se producen: los fenoles se oxidan a sus correspondientes quinonas, y Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} . Cuanto menores son los valores de pH de los medios, más fuerte es el poder reductor de los fenoles (Danilewicz, 2003). Por lo tanto, la formación de complejos reduce el potencial de Fe^{3+} - Fe^{2+} , en cierta medida, estabiliza el estado de oxidación de Fe^{3+} y aumenta el poder reductor del Fe^{2+} , lo que indica que los ligandos orgánicos presentes en el vino garantizan la rápida oxidación de Fe^{2+} . Como resultado, en presencia de oxígeno, el oxígeno se reduce a H_2O_2 , y Fe^{2+} se vuelve a oxidar de nuevo a Fe^{3+} , lo que mejora los ciclos de oxidación-reducción de Fe^{3+} - Fe^{2+} o la movilidad de hierro en el proceso de oxidación (Danilewicz, 2003).

Además, cuando el ion hierro, así como sus compuestos complejos están presentes en una solución de H_2O_2 , la reacción de Fenton tiene lugar y se produce el potente oxidante $\cdot\text{OH}$. En medio ácido, la producción del radical $\cdot\text{OH}$ llega a ser fácil, pero debido a la limitación de las condiciones reactivas, el hierro (IV) se puede formar en medio neutro (Danilewicz, 2003). Diferentes concentraciones de iones de hierro y H_2O_2 producirán diferentes radicales; cuando existen agentes quelantes, las reacciones anteriores cambiarán: algunos agentes aceleran la reacción de Fenton, pero otros pueden hacer lo contrario (Zhao, 1999). Por otra parte, el cobre puede

también reaccionar con H_2O_2 para producir $\cdot OH$, que parece mucho más fuerte que el hierro en la reacción; Además de la producción del radical $\cdot OH$, algunos otros oxidantes pueden estar implicados (Hawkins & Davies, 1997). Trazas de cobre podrían promover la capacidad como catalizador del hierro en el vino (Peynaud, 1992).

La investigación avanzada sobre el pardeamiento oxidativo del vino revela que la capacidad regenerativa de los fenoles (especialmente difenoles vicinales) en la oxidación junto con otros compuestos y sus reacciones de pardeamiento no oxidantes constituyen la principal razón para pardear el vino. El pardeamiento enzimático se produce casi en su totalidad en el mosto de uva y se puede controlar en la actualidad; el pardeamiento no enzimático prevalece en un vino fermentado, esencialmente en función de la presencia de hierro y cobre. Esto indica que el hierro y el cobre pueden desempeñar un papel central en la iniciación del pardeamiento no enzimático, y posiblemente, un mejor control del pardeamiento del vino depende principalmente de estos iones metálicos. Aunque esta hipótesis no está confirmada y tiene que ser confirmada por una mayor investigación, estos iones metálicos presentan importantes implicaciones enológicas, especialmente en el estudio de un antioxidante sustituto del SO_2 en el vino. Además, el $\cdot OH$ y otras especies reactivas de oxígeno pueden ser fundamentales para comprender plenamente la química oxidativa de los compuestos fenólicos del vino, lo cual necesita de más investigación y debates.

2.2. Principales antioxidantes en enología.

2.2.1. El dióxido de azufre:

A menudo abreviado como sulfito o SO_2 , es la sustancia química más importante y ampliamente utilizada para prevenir el pardeamiento del vino. Además de las actividades antioxidantes, el SO_2 también tiene propiedades antimicrobianas y otras funciones importantes, que se ha utilizado con éxito durante años. Sin embargo, la adición de SO_2 para vinos plantea objeciones relacionadas con la salud debido a las reacciones alérgicas graves sufridas por los individuos sulfito-sensibles, y la preocupación por los sulfitos han dado lugar a restricciones regulatorias establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Por otra parte, los productores también están preocupados por la adición de SO_2 al mosto y al vino por razones de calidad: su uso excesivo puede comprometer drásticamente la calidad del vino y cantidades excesivas de SO_2 en realidad puede dar al vino sabores y aromas desagradables o puede favorecer el enturbiamiento del vino durante su conservación (Li et al., 2005). Por lo tanto, una creciente conciencia sobre el uso de SO_2 en el vino ha creado la necesidad de su reducción o sustitución en los últimos años (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Hasta la fecha, no se ha encontrado un producto de reemplazo para realizar las mismas funciones sin las desventajas de SO_2 , a pesar de la gran cantidad de trabajo que se ha hecho (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Sin embargo, es perfectamente operable el estudiar la sustitución parcial por un compuesto con propiedades antioxidantes iguales o mejores que las del SO_2 en la vinificación.

El SO_2 reacciona con el O_2 de manera extremadamente lenta (el tiempo medio de reacción entre un mol de SO_3^{-2} y un mol de O_2 es de treinta días, y más bien su acción antioxidante es la de "enmascarar" los efectos de la oxidación, al combinar al acetaldehído (principal producto de oxidación, vía la Reacción de Fenton, del etanol) y otros compuestos carbonilos del vino (Boulton et al., 1996). Danilewicz (2007) no solo reconfirmó esto último sino que fue más allá, postulando un verdadero efecto antioxidante del SO_2 a partir de su reacción directa con el H_2O_2 , como lo muestra la Fig. 7.

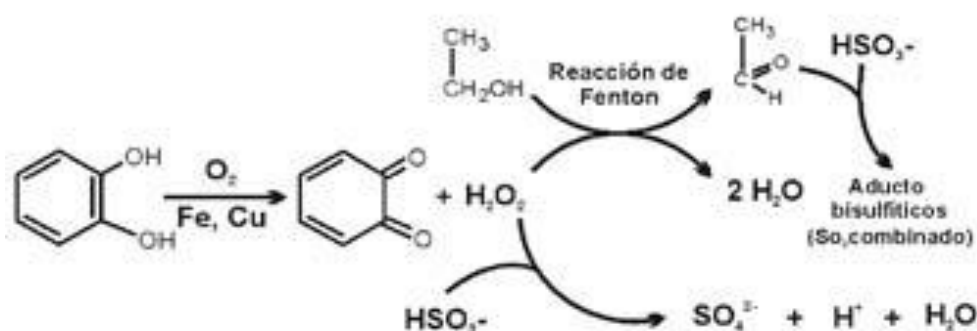


Figura 7: Reacción del anhídrido sulfuroso sobre el agua oxigenada formada vía oxidación de un grupo catecol, previniendo la oxidación del etanol vía Reacción de Fenton (Danilewicz, 2007).

Desde esta perspectiva, los polifenoles pueden ser considerados como oxidantes, ya que llevan a la formación de H_2O_2 , formación que indefectiblemente va a derivar en una reducción de los niveles de SO_2 libre. De hecho, el SO_2 aisladamente también puede ser considerado un oxidante, ya que en presencia de oxígeno y metales de transición también promueve la oxidación, pero esta queda inhibida por efecto de los polifenoles (Danilewicz et al., 2008). Es justamente esta interacción la que en parte impide que el SO_2 reaccione directamente con el O_2 en presencia de polifenoles. Los conceptos anteriores quedan claramente evidenciados en la Fig. 8. Concluyendo, el SO_2 es siempre requerido para reaccionar con el H_2O_2 y los fenoles son requeridos para bloquear la interacción entre el SO_2 y el O_2 , y es solo en presencia de ambos cuando su acción antioxidante se presenta completamente.

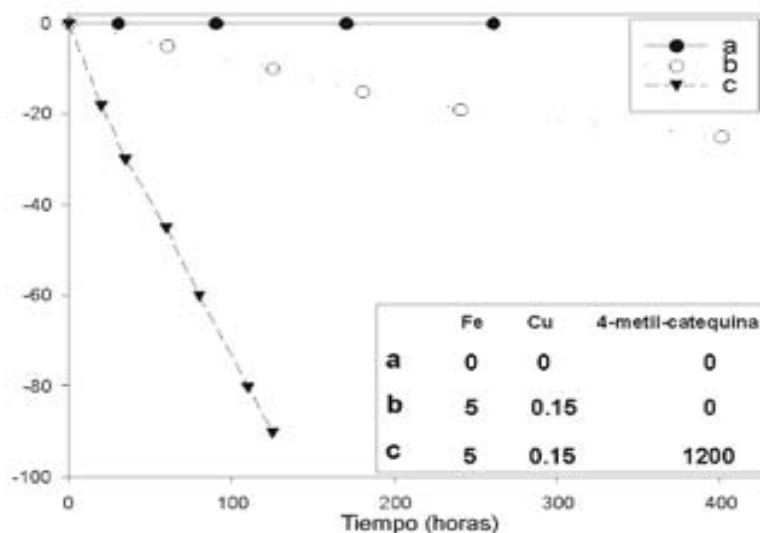


Figura 8: Efecto del hierro, cobre y un fenol (4-metil-catequina) en la tasa de reducción de SO₂ libre en una solución modelo de vino (Danilewicz, 2007).

Se ha indicado que el Cu y Fe actúan como poderosos catalizadores de reacciones de autooxidación del SO₂ libre. Se ha determinado que los dos metales actuando sinérgicamente son más efectivos en reducir la concentración de SO₂ libre que la suma de sus tasas individuales de reducción cuando fueron probados aislados el uno del otro. Este sinergismo es además muy evidente incluso bajo muy bajas concentraciones de Cu, como las que resultan en el mosto después de tratamientos tardíos a base de caldo bordelés o bien de prácticas enológicas como la adicción de SO₄Cu para corregir defectos de reducción. Ya que el Fe va a estar invariablemente presente en el mosto, la tasa de oxidación del SO₂ resulta especialmente sensible a pequeñas concentraciones de Cu. Como se expuso previamente esta puede ser la explicación química del porqué los vinos elaborados en tanques de hierro u hormigón armado mal epoxipados y con grifería de bronce se picaban con mayor facilidad, al tener menores dosis de SO₂ libre a causa del efecto combinado del Fe y Cu.

2.2.2. El ácido ascórbico:

El ácido ascórbico (vitamina C) y su isómero óptico, el ácido eritórbico, probablemente son una alternativa a los sulfitos, y han sido ampliamente utilizados como antioxidantes en la elaboración del vino, especialmente en la producción del vino blanco, principalmente debido a sus propiedades químicas (incluyendo su carácter reductor y su capacidad para disminuir el oxígeno) y su aprobación para el uso en vino (Bradshaw et al., 2001). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el ácido ascórbico puede tener un papel pro-oxidante en lugar de antioxidante en función de sus niveles en el vino bajo algunas condiciones (Bradshaw et al., 2003). Muchos de los resultados de investigaciones recientes en sistemas modelo y en vinos blancos indican que si el ácido ascórbico se utiliza en combinación con SO₂ pueden causar un consumo acelerado de SO₂ y acelerar la producción de pigmentos de color amarillo

(Bradshaw et al., 2004). En la actualidad, el uso de ácido ascórbico no está muy extendido en la elaboración del vino aunque sí está aprobado por la OIV.

2.2.3. El glutatión:

El glutatión es un componente natural de muchas frutas, clásicamente descrito como inhibidor de oxidaciones enzimáticas y no enzimáticas en jugos de frutas y otros alimentos (Roussis et al., 2007) y cuyo término es usado indistintamente para referirse a sus formas reducidas y diméricas, ambas presentes en el mosto/vino. El glutatión monomérico es conocido como glutatión reducido (**Fig. 9**) y su dímero como glutatión oxidado o disulfídico (**Fig. 10**).

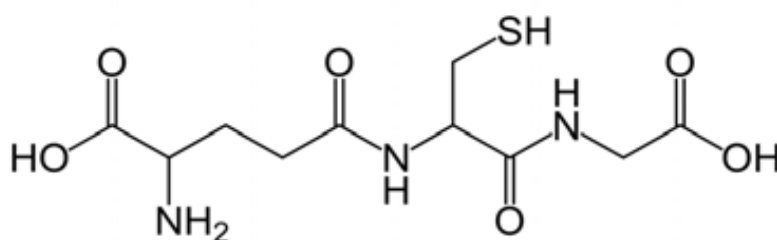


Figura 9: Estructura molecular del glutatión (Anderson, 1998).

Es una molécula relativamente grande comparada con otros iones del vino y su característica principal es la presencia de un grupo sulfhidrilo (SH), un fuerte donador de electrones, que le otorga sus propiedades antioxidantes y la capacidad de mantener en forma reducida muchas otras moléculas en la matriz del mosto/vino. Desde el punto de vista estrictamente químico es un tripéptido, siendo sus aminoácidos estructurales la cisteína, el ácido glutámico y la glicina.

El glutatión es un poderoso antioxidante natural de las uvas, con contenidos que pueden variar desde unos pocos miligramos hasta 30 mg/L dependiendo de la variedad, condiciones y zona de cultivo. Algunas de las generalizaciones sobre la evolución de su concentración en el curso de la maduración de la uva han sido brevemente reseñadas por Zoecklein (2007). Entre las más importantes, por ejemplo, está el hecho de que el glutatión aumenta de manera más o menos constante durante la maduración de la uva (Adams & Liyanage, 1993); que su concentración se encuentra positivamente correlacionada con los niveles de nitrógeno potencialmente asimilables; y que su concentración parece estar de alguna manera vinculada positivamente con los niveles de radiación ultravioleta (UV). En efecto, la radiación UV es superior en el hemisferio Sur, hecho que podría explicar porqué ciertos Sauvignon Blanc de la región de Marlborough (Nueva Zelanda), presentan concentraciones sorprendentemente altas de aromas tio-derivados, muy sensibles a la oxidación.

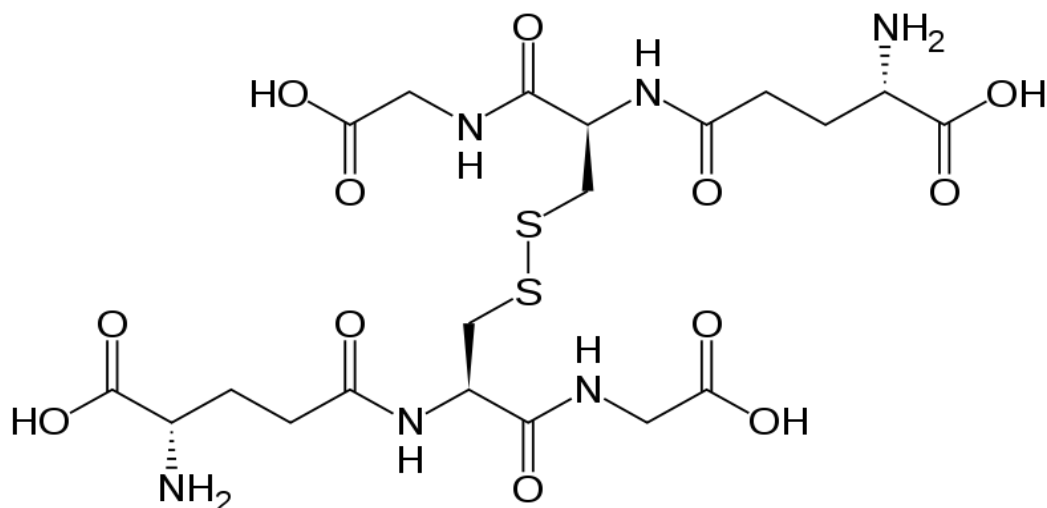


Figura 10: Estructura molecular de glutatión disulfuro (Anderson, 1998).

El glutatión es muy fácilmente degradado en el mosto bajo niveles muy bajos de oxígeno, aún en presencia de dosis de SO₂ de 60 ppm (Du Toit et al., 2007), por lo que además es un marcador de oxidación en mostos/vinos de variedades sensibles como el Sauvignon Blanc.

Son deseables altos niveles de glutatión en las uvas para formar el llamado Grape Reaction Product (GRP), ó producto de reacción de la uva, que se refiere al producto de reacción resultante entre el glutatión y las quinonas de ciertos fenoles del mosto, especialmente el ácido caftárico (**Fig. 11**). El GRP es el producto final de esta cadena de oxidación, y por lo tanto limita el progreso de la misma, ya que el mismo no puede ser subsecuentemente oxidado. Pero además el GRP es un poderoso antioxidante por sí mismo: mientras que un mol de un fenol simple puede consumir 3,4 átomos de O₂, el mismo fenol combinado con el glutatión bajo la forma de GRP puede consumir hasta 8,5 moles de O₂ (Du Toit et al., 2007). De hecho, ésta interacción entre la quinona del ácido caftárico y el tripéptido tiolado glutatión es un ejemplo clásico de interacción de las quinonas con compuestos tio-derivados.

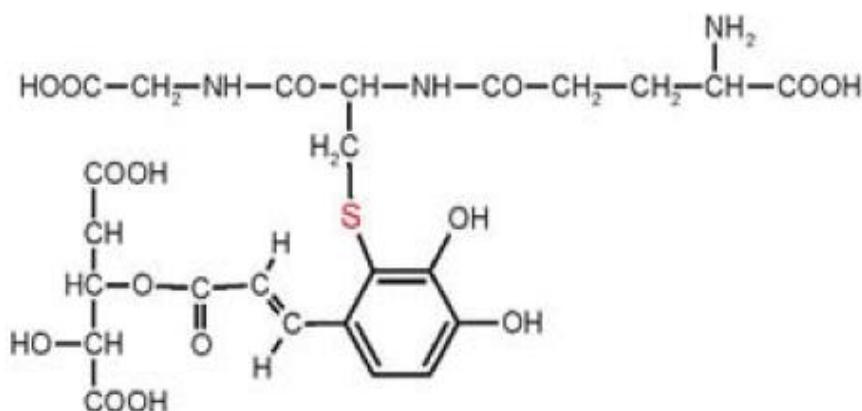


Figura 11: Fórmula desarrollada del ácido s-glutationil-2-cafeoil tartárico, conocido como producto reacción de la uva o GRP (Du Toit et al., 2007).

A nivel de la célula de *Saccharomyces cerevisiae* se ha comprobado que el glutatión tiene acción detoxificante (función que también cumple en el metabolismo hepático humano, entre otras), por lo que puede actuar como activador de la fermentación alcohólica. Algunas levaduras comerciales presentan altas concentraciones celulares de glutatión y ejercen cierto efecto complementario de protección contra la oxidación en el momento de su autólisis, al liberar parte del mismo (a condición de que los niveles de nitrógeno fácilmente asimilables iniciales sean adecuados) (Laffort, 2008).

Adicionalmente, las lías gruesas y ciertos suplementos comerciales fermentativos también pueden aportar glutatión soluble al mosto/vino. Finalmente, el manejo del glutatión durante la vinificación puede tener mucha influencia sobre la posterior longevidad de los vinos durante la etapa de embotellado, ya que se ha encontrado una relación directa entre los contenidos iniciales de este compuesto en mosto y los contenidos presentes en los vinos correspondientes después de un mes terminada la fermentación alcohólica (Dubourdiou & Lavigne-Cruege, 2004).

En el caso específico de vinos Sauvignon Blanc en la etapa de botella, el glutatión parece ejercer protección sobre los tioles volátiles 4-metil-4-mercaptopentanona y 3-mercaptohexanol (Dubourdiou & Lavigne-Cruege, 2004) y en el caso de variedades aromáticas, limitar la disminución de ésteres volátiles (acetato de isoamilo) y terpenos (linalool) durante el envejecimiento (Roussis et al., 2007). Se estima que concentraciones de entre 10 y 20 ppm de glutatión en el momento del embotellado son óptimas con vistas al control de la degradación oxidativa de ciertos aromas muy volátiles (Roussis et al., 2007). Por otro lado, algunos metabolitos derivados directamente del glutatión podrían estar implicados en la revelación de aromas de tipo mercaptohexanol (Peyrot et al., 2002) y mercaptopentanona, en vinos Sauvignon Blanc (Fedrizzi et al., 2009). Esta es otra faceta del glutatión: la de un posible precursor de aromas varietales.

El cobre (Cu), bajo cualquiera de sus estados, es el principal enemigo del glutatión, ya que se ha comprobado una relación inversa entre glutatión y Cu tanto en mostos como en vinos. El uso de pulverizaciones a base de Cu en momentos próximos a cosecha provoca la precipitación de moléculas tioladas como el glutatión y catalizan procesos oxidativos a través de la activación de la reacción de Fenton (**Fig. 12**).



Figura 12: Reacción de Fenton (1898).

El radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) es una de las especies oxidativas más potentes, que en el mosto/vino, literalmente, oxida a la primera molécula que se encuentre a su paso (Waterhouse & Laurie, 2006). Esto último representa un problema desde el punto de vista de la concentración de glutatión y también en el caso de vinos con bajas concentraciones de antioxidantes.

2.3. Levaduras secas inactivas.

Es generalmente reconocido que algunas técnicas enológicas basadas en el envejecimiento de los vinos con las lías puede mejorar la calidad y las propiedades organolépticas de los mismos (estabilidad del color, protección contra la degradación de aromas) (Serradilla. & Luque de Castro, 2008). Los principales responsables de esta mejora son los compuestos liberados durante la autólisis de las levaduras, principalmente péptidos, aminoácidos, esteroides y polisacáridos (manoproteínas). Sin embargo, este método de elaboración de los vinos es considerablemente lento y, por tanto, no está exento de riesgo microbiológico lo que puede perjudicar las características organolépticas y la calidad de los vinos. Por ello, en los últimos años está ganando interés el uso de preparaciones comerciales que incluyan en su composición productos procedentes de las levaduras. Este tipo de preparaciones se obtienen a partir de la levadura enológica *Saccharomyces cerevisiae* tras su inactivación térmica o enzimática, una vez que se ha crecido en medios concentrados y ricos en azúcares. Dependiendo del método de obtención, las preparaciones pueden clasificarse en cuatro tipos principales: a) levaduras inactivas, se obtienen por inactivación térmica y posterior secado; b) autolisados de levaduras, en los que además de la inactivación térmica hay un paso de incubación en el que se permite a los enzimas de la levadura ser liberados de las vacuolas y degradar parte del contenido intracelular; c) paredes o cortezas de levaduras, son insolubles y están formados exclusivamente por las paredes de levadura sin contenido citoplasmático, y d) extractos de levadura, que es el extracto soluble que se obtiene tras la degradación total del contenido citoplasmático (Pozo-Bayón et al., 2009a).

De entre todas estas preparaciones, las manoproteínas, que son el principal constituyente de la pared de *Saccharomyces cerevisiae* (25-50% de peso seco) han sido extensivamente estudiadas para mejorar los procesos tecnológicos y las características sensoriales de los vinos. Su uso como aditivo enológico durante la vinificación ha sido aprobado en la Unión Europea (EU Regulation 2165/2005 20 diciembre de 2005). Sin embargo la heterogeneidad de este grupo de compuestos en cuanto a su estructura y composición, y las diferencias en los procesos empleados para su obtención, hacen que muchas de las preparaciones comerciales a base de manoproteínas difieran considerablemente en peso molecular y en su composición química (porcentaje de azúcar, proteína, aminoácidos, etc). Esto puede dar lugar a efectos muy diferentes en el vino dependiendo del tipo de preparado comercial empleado.

Además de las manoproteínas, también está autorizado el empleo de preparaciones celulares de levaduras, también conocidas como «paredes o cortezas de levaduras» (Reglamento CE n.º 479/2008), y en la actualidad diversos productos están accesibles comercialmente bajo esta clasificación. Otro tipo de preparados a base levaduras inactivas que se comercializan actualmente son preparaciones de composición muy variable, que suelen incorporar levaduras inactivas y metabolitos procedentes de la autólisis (proteína, péptidos aminoácidos nucleótidos, ácidos grasos) cuya concentración puede variar en función de las condiciones de cultivo (Guilloux-Benatier & Chassagne, 2003); además suelen contener paredes de

levaduras, vitaminas y minerales. Todos estos productos a los que, a lo largo de esta revisión, nos referiremos como preparados de levaduras secas inactivas (LSI), son actualmente suministrados por numerosas compañías biotecnológicas y/o enológicas, bajo diferentes marcas comerciales, para un amplio espectro de aplicaciones enológicas con el objetivo de mejorar la calidad de los vinos. Sin embargo, la información actual de que se dispone sobre este tipo de productos y sus mecanismos de acción durante la vinificación y en las sucesivas etapas de acabado de los vinos es muy escasa. Esto puede generar cierta confusión en los elaboradores sobre el tipo de preparación más adecuada para solventar un problema específico, o sobre los mecanismos implicados en la mejora de las características organolépticas del vino.

A continuación se revisan las principales aplicaciones de estas preparaciones durante la vinificación y las evidencias científicas actuales sobre su modo de acción.

2.3.1. Principales aplicaciones de los preparados de LSI durante la vinificación.

2.3.1.1. Efecto en la fermentación.

La mejora de los procesos fermentativos mediante el empleo de LSI se basa en una acción indirecta gracias a su efecto protector durante la hidratación de las levaduras secas activas, o bien en un efecto directo de estimulación de la fermentación alcohólica y maloláctica.

Durante el proceso de hidratación de las levaduras secas activas, las células pueden experimentar modificaciones bioquímicas y cambios estructurales (Beker et al., 1984) que pueden dañar las membranas celulares. Se ha demostrado, que la rehidratación de las levaduras secas activas en presencia de una cantidad relativamente grande de LSI (100-200 g/L) aumenta la velocidad de fermentación y disminuye su duración (Dulau et al., 2002). La liberación de fragmentos insolubles de las paredes de la levadura puede formar agrupaciones de esteroides en forma de micelas que se podrían incorporar en las membranas de las levaduras secas activas reparando sus posibles daños. En medios de fermentación sintéticos, se ha comprobado que la adición de 150 g/L de LSI añadidos durante la rehidratación sería equivalente a la adición de 40 μ L/L de ergosterol en el medio de fermentación (Soubeyrand et al., 2005). Por otro lado, se ha sugerido que los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) procedentes de las LSI podrían actuar como agentes protectores reduciendo el choque osmótico de las levaduras secas activas debido al elevado contenido de azúcares en el medio y favoreciendo la adaptación metabólica de las células a las nuevas condiciones (Caridi, 2002).

Se ha sugerido que la consecuencia de este papel protector podría ser la reducción de la acidez volátil del vino y la formación de algunos aromas desagradables (SH_2). También se ha sugerido que los AGP liberados de las LSI podrían actuar como reservorios de micronutrientes que podrían ser transferidos a las nuevas generaciones de levaduras incrementando su resistencia y viabilidad. El empleo de preparados de

LSI como activadores de las fermentaciones alcohólica y maloláctica es posiblemente la aplicación más común de este tipo de productos. Tanto las levaduras como las bacterias implicadas en la vinificación tienen requerimientos nitrogenados básicos. *Saccharomyces cerevisiae* puede utilizar como fuentes de nitrógeno en primer lugar el amonio (NH_4^+) y una vez consumidas las reservas de éste, también pueden utilizar aminoácidos de manera muy eficiente. Un bajo nivel de compuestos nitrogenados asimilables por las levaduras ha sido asociado con una disminución en la velocidad de fermentación y un detrimento en su eficacia, que son las principales causas de las paradas de fermentación (Kunkee, 1991). También el etanol y otros productos del metabolismo de las levaduras durante la fermentación, como los ácidos grasos de cadena corta y media, pueden contribuir a este fenómeno.

Para solventar estos problemas, se han venido utilizando diferentes tipos de fuentes de nitrógeno inorgánico, como las sales de amonio y la tiamina (Feuillat, 2001). Sin embargo, más recientemente se ha sugerido que el uso de preparados basados en LSI permite subsanar las carencias nutricionales y por tanto mejorar la fermentación. La diferente composición de este tipo de preparados comerciales, induce sin embargo diferentes efectos en la fermentación. La mayor parte de estas preparaciones pueden incluir una parte soluble, que incluye la mayoría de los metabolitos citoplasmáticos de la levadura (péptidos, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, etc.), una parte insoluble, formada por las paredes de la levadura y soportes inertes de tipo celulosa, además de otros compuestos como vitaminas, y minerales. Aunque se ha comprobado que la adición de activadores de la fermentación en medios sintéticos mejora el desarrollo de la fermentación alcohólica (mayor velocidad de fermentación, mayor número de células viables), el mecanismo de acción es muy diferente dependiendo de la composición del preparado. Por ejemplo, se ha comprobado que la adición de la fracción soluble de un preparado de LSI a un medio rico en nitrógeno asimilable (300 mg/L) no mejora la fermentación alcohólica (Feuillat & Guerreau, 1996), mientras que si la promueve en medios deficientes en nitrógeno (100 mg/L). Sin embargo, la adición de la fracción insoluble puede mejorar la eficiencia de la fermentación en medios ricos en nitrógeno debido al efecto detoxificante de las paredes de levadura, ya que son capaces de adsorber metabolitos tóxicos como los ácidos grasos de cadena corta (Lafon-Lafourcade et al., 1984).

Otra de las razones que se han indicado para explicar el aumento en la eficacia de la fermentación tras la adición de preparados de LSI a los vinos, se debe al elevado contenido de esteroides presentes en las mismas. Larue et al. (1998) demostraron que el aumento del contenido de esteroides en las levaduras da lugar a una mayor eficiencia en la fermentación. Según los autores, esto produce una mayor permeabilidad en la membrana, lo que permite un mejor intercambio de sustancias entre la célula y el medio. El esteroide acumulado en las membranas puede actuar además como un factor de supervivencia ya que podría ser utilizado por la levadura en la fase de declive. González-Marco et al. (2006) han comprobado en mostos Chardonnay suplementados con un autolisado de levadura, que el consumo de nitrógeno amínico aumenta durante la segunda mitad de la fermentación alcohólica comparado con el mosto control (sin adición del autolisado). Estos autores sugieren que los autolisados suplementan a los mostos con ácidos grasos de cadena larga (C16, C18) minimizando el daño en la

membrana de la levadura y mejorando el transporte de membrana que de otra forma quedaría comprometido por el elevado contenido de etanol en el medio.

En los últimos años se está aumentando el empleo de preparados de LSI como activadores de la fermentación maloláctica. En este caso, los preparados se emplean, generalmente, una vez que la alcohólica ha sido completada. Al contrario que la fermentación alcohólica, la fermentación maloláctica suele ser un proceso más lento y en algunos casos se requieren incluso meses para completarla. Sin embargo, hasta que este proceso no se ha completado, no se pueden comenzar el resto de operaciones implicadas en la vinificación, lo que supone un riesgo de contaminación microbiana del vino, y la aparición de alteraciones organolépticas como el conocido «picado acético», la producción de fenoles volátiles (Chatonnet et al., 1995) o la formación de heterociclos nitrogenados volátiles (Costello & Henschke, 2002), entre otras. La repercusión de estas alteraciones en la calidad del vino es una de las principales razones del uso de preparados de LSI. Los primeros estudios sobre el tema indicaron que la adición de paredes de levaduras (0,2 g/L) a los vinos estimulaba el crecimiento de las bacterias lácticas durante la fermentación maloláctica, además de ejercer un efecto de detoxificación debido a su capacidad para la adsorción de sustancias tóxicas para la bacteria (Edwards & Beelman, 1987). La estimulación de la fermentación maloláctica por la adición de preparados de LSI, puede ser debida a la liberación de compuestos nitrogenados de la levadura (sobre todo aminoácidos y péptidos), y polisacáridos y proteínas de la pared de la levadura (Guilloux-Benatier et al., 1995). Algunos autores (Remize et al., 2005) han comprobado, sin embargo, que sólo ciertas fuentes nitrogenadas estimulan la actividad proteásica de *Oenococcus oeni*. Por ejemplo, los péptidos de mayor tamaño (0,5-10 kDa) son más favorables para el crecimiento de bacterias del vino que los de menor tamaño (< 0,5 kDa). Además, esta capacidad es dependiente de la cepa bacteriana y de las condiciones de vinificación (pH, nivel de etanol, temperatura).

Además otros componentes de las levaduras, que se pueden encontrar en las preparaciones de LSI, como los lípidos, minerales, vitaminas, nucleótidos, etc., pueden tener también un importante papel en la estimulación de la fermentación maloláctica (Alexandre et al., 2004).

Por otro lado, la adición de preparados de LSI como activadores de fermentación alcohólica y maloláctica, podría inducir la aparición de cambios imprevisibles y negativos en la calidad del vino. Por ejemplo, se ha demostrado que los mostos suplementados con un autolisado de levadura tienen una mayor concentración de algunas aminas biógenas (tiramina y cadaverina) que proceden de los aminoácidos precursores tirosina y lisina, originalmente presentes en el autolisado de levadura.

2.3.1.2. Efecto en la composición y en las características organolépticas de los vinos

A continuación se revisarán los principales efectos de estas preparaciones en las propiedades sensoriales de los vinos y las evidencias científicas que lo apoyan.

2.3.1.2.1. Efecto de los polisacáridos en el color y en la astringencia de los vinos tintos

La estabilidad del color en los vinos tintos envejecidos, depende al menos en parte, de la formación de pigmentos de tipo tanino-antocianina o antocianina-antocianina (Lavigne-Cruege et al., 2003). Se ha comprobado, que la estabilidad del color en estos vinos puede mejorarse con el enriquecimiento del medio en polisacáridos. Estos compuestos podrían actuar como coloides protectores e interactuar con los taninos y antocianinas previniendo así su agregación y precipitación y, por tanto, incrementando la estabilidad del color (Doco et al., 2003). En medios vínicos sintéticos, las manoproteínas de la levadura pueden evitar la agregación de taninos (Riou et al., 2002). Esta es la principal razón por la que se ha sugerido que el empleo de preparaciones de LSI puede estabilizar el color de los vinos tintos (Francois et al., 2007). Sin embargo, y al igual que ocurre con otras aplicaciones de este tipo de preparaciones, los trabajos encaminados a probar científicamente estos efectos son muy escasos. No obstante, recientemente, Guadalupe et al. (2007) comprobaron que la adición de un preparado de LSI rico en manoproteínas a mostos de la variedad Tempranillo (13,5 g/100 L) no provocaba ningún efecto en la estabilidad del color del vino, es decir, no inducía un estado coloidal de los polifenoles del vino. Estos autores, comprobaron además que estos vinos presentaban igual color o incluso menor que los vinos control (sin la adición de la preparación), lo que puede ser debido a la formación de un mayor número de complejos de tipo manoproteína-polifenol, provocando la precipitación de estos últimos. Estos estudios sugieren por tanto, la necesidad de profundizar en los mecanismos de actuación de estas preparaciones en los vinos y su relación con el color de los mismos.

Por otro lado, y relacionado con el empleo de preparaciones de LSI ricas en polisacáridos, una de las aplicaciones a las que más frecuentemente se hace referencia por parte de las compañías que comercializan estos productos, es su empleo para modular la astringencia de algunos vinos tintos así como para mejorar el cuerpo y la untuosidad del vino en boca. La astringencia de un vino, se debe a la capacidad de las procianidinas (o taninos condensados) de interactuar con las proteínas de la saliva, lo que conduce a la formación de agregados que precipitan, disminuyendo o reduciendo la lubricación en la boca, y que son responsables de la sensación de sequedad en boca tras el consumo de algunos vinos ricos en taninos.

La capacidad de los polisacáridos de la levadura (manoproteínas) de interactuar con las procianidinas del vino podría reducir su astringencia debido a la disminución de la cantidad de procianidinas libres capaces de interactuar con las proteínas de la saliva (Smith & Noble, 1998). Por otro lado, el aumento en viscosidad

debido a la presencia de polisacáridos de la levadura podría compensar la pérdida de lubricación producida por las procianidinas. Sin embargo, se ha comprobado que dependiendo de la composición de los polisacáridos, el efecto en la untuosidad es diferente (Vidal et al., 2004).

A pesar de que, como se ha comentado, se ha relacionado a los polisacáridos de las levaduras con una reducción en la astringencia, así como con el aumento del cuerpo y untuosidad de los vinos, existen pocos trabajos científicos que corroboren estas diferencias. Guadalupe et al. (2007) han comprobado que efectivamente la adición de un preparado de LSI rico en manoproteínas afectaba la estructura del vino, incrementando la sensación de dulzor y redondez y reduciendo su astringencia.

La adición simultánea de preparaciones de LSI junto con enzimas del tipo β -glucanasa, se ha propuesto también como procedimiento para aumentar el color del vino y la liberación de polisacáridos al mismo, y por tanto para disminuir su astringencia (Francois et al., 2007). Aunque tampoco en este caso hay suficientes evidencias científicas que puedan corroborar este efecto. Guadalupe et al. (2007) han comprobado que la adición al vino de una preparación a base de enzimas de maceración (poligalacturonidasas, pectinasas, etc.) aunque favorecía la extracción del color, aumentaba la astringencia y el contenido tánico del mismo. Estos resultados indican la necesidad de investigaciones adicionales para confirmar estos resultados.

2.3.1.2.2. Otros efectos del empleo de preparaciones de LSI en las características organolépticas de los vinos

Las levaduras, y concretamente la pared celular tiene una gran capacidad de adsorber compuestos químicos del medio (Caridi, 2007). Es importante tener en cuenta esta propiedad, ya que la adición de preparaciones de LSI (que contienen en su composición paredes de levadura), pueden provocar cambios sensoriales imprevistos en los vinos. Por ejemplo, se ha demostrado la capacidad de las paredes de las levaduras de adsorber compuestos de tipo antocianina (Morata et al., 2005) y, por tanto, de modificar el color de los vinos tintos. También se ha comprobado su capacidad de adsorber otro tipo de compuestos fenólicos responsables del color y del pardeamiento de vinos blancos (Razmkhab et al., 2002). Por otro lado, la capacidad de adsorción de algunos compuestos volátiles como los ácidos grasos de cadena corta por las paredes de levadura fue descrito por primera vez por Lafon-Lafourcade et al. en el año 1984 para la eliminación o reducción de este tipo de compuestos tóxicos para las levaduras (Lafon-Lafourcade et al., 1984). Desde entonces, la capacidad de adsorción de otros compuestos volátiles relevantes para el aroma de los vinos ha sido demostrada (Lubbers et al., 1994a, b), y se ha comprobado la naturaleza hidrofóbica de estas interacciones y su dependencia de las características fisicoquímicas del compuesto. Chalier et al. (2007) han comprobado que las manoproteínas de levadura son capaces de retener compuestos del aroma, estando implicadas ambas partes de la molécula (glicosídica y péptidica) en la interacción. Además, encontraron diferencias importantes en la capacidad de retención de compuestos del aroma dependiendo de la cepa de levadura empleada.

También se ha comprobado la capacidad de las paredes de levadura de interaccionar con terpenos glicosilados (Moio et al., 2004), lo que puede tener consecuencias importantes para el aroma varietal de los vinos. Debido a la capacidad de las paredes de levadura de adsorber compuestos volátiles responsables de defectos aromáticos en el vino (fenoles volátiles), se ha propuesto también, la utilización de las paredes de levadura como método para eliminar o reducir la presencia de estos compuestos indeseables en el vino (Chassagne et al., 2005).

Los efectos de la adición de preparados de LSI y sus consecuencias para el aroma del vino han sido también estudiados por Comuzzo et al. (2006). Estos autores comprobaron la aparición en el vino de cambios sensoriales, positivos o negativos, dependiendo del tipo de vino y de sus características aromáticas iniciales. Además del efecto de estas preparaciones en la reducción en volatilidad de los compuestos del aroma, se ha comprobado la capacidad de algunos compuestos volátiles presentes en estas preparaciones y originados durante su procesamiento (pirazinas) de ser liberados a los vinos, lo que podría implicar importantes cambios en el aroma del vino (Pozo-Bayón et al., 2009a).

2.3.1.3. Efecto en la seguridad del vino

Los vinos, como otros muchos alimentos, pueden estar contaminados con ocratoxina A (OTA). Esta toxina es un potente neurotóxico y cancerígeno producida principalmente por hongos de las especies *Aspegillus* y *Penicillium*. El contenido de OTA en los vinos ha sido regulado en la Unión Europea a 2 µg OTA/L (EU Regulation 1881/2006, 19 de diciembre 2006). La búsqueda de metodologías que permitan la eliminación o la reducción del contenido de OTA en el vino es una línea de interés en la investigación actual en enología. Una de las estrategias más interesantes que actualmente se están evaluando para reducir el contenido de OTA, es el empleo de preparados de LSI. Por ejemplo, García-Moruno et al. (2005) han comprobado que la adición de 20 g/L de lías de levaduras (formadas principalmente por paredes de levadura) al vino, es capaz de reducir hasta un 70% el contenido de OTA después de 7 días. La competencia que existe entre polifenoles y OTA por los sitios de unión a las paredes de la levadura es la principal responsable de que esta estrategia sea más activa para reducir el contenido de OTA en vinos blancos que en vinos tintos (Bornet et al., 2008). Las manoproteínas de la pared de las levaduras son las principales responsables de la unión de la OTA (Ringot et al., 2005). Las diferencias en el contenido de manosilfosfato de las manoproteínas junto con otras características intrínsecas a la célula de levadura, como la velocidad de sedimentación, dimensión, capacidad de floculación, etc., pueden influir en la capacidad de adsorción de las manoproteínas (Caridi, 2007). Además, otros parámetros de la vinificación, como la temperatura, pH, cantidad de etanol, así como la especie de levadura, pueden también modificar la capacidad de adsorción de la pared.

Otras sustancias tóxicas como ciertos metales pesados (plomo, cadmio), también pueden estar presentes como contaminantes en los vinos. Debido a sus efectos nocivos para la salud, el contenido de estos compuestos en el vino ha sido

regulado por la OIV. Otros metales, como el hierro cuando su cantidad es excesiva (10-20 mg/L), puede disminuir la estabilidad del vino ya que en su forma reducida puede estar implicado en fenómenos de precipitación de pigmentos. El empleo de preparados de LSI podría ser una buena herramienta para la eliminación de metales pesados del vino. De hecho, Bornet y Teissedre (2008) han comprobado que la adición a los vinos de quitina de origen fúngico, puede reducir el contenido de plomo y cadmio en el vino.

La capacidad de adsorción de compuestos químicos por las levaduras, puede extenderse a otras aplicaciones en los vinos para mejorar la seguridad de los mismos, como por ejemplo, su empleo para reducir el contenido de aminas biógenas, pesticidas y agentes antiespumantes (Pozo-Bayón et al., 2009b) Aunque todas estas estrategias prometen resultados esperanzadores, sería necesario explorar el efecto de la adición de estas preparaciones teniendo en cuenta el efecto de todos los parámetros que participan en la vinificación (pH, SO₂, etanol, etc.).

2.3.1.4. Levaduras secas inactivas ricas en glutatión.

El uso de preparaciones de levadura seca inactiva (LSI) está ganando interés en la elaboración de vino debido a su amplia gama de aplicaciones reivindicadas. Se fabrican a partir de la inactivación térmica de levadura *S. cerevisiae* producida en un medio con alta concentración de azúcar y bajo condiciones aeróbicas (Pozo-Bayón et al., 2009a).

Pozo-Bayón et al. (2009a) clasifica las preparaciones LSI en cuatro categorías:

- Levadura inactiva (obtenida por inactivación térmica antes del secado).
- Autolisados de levadura (el contenido intracelular es parcialmente degradado por una etapa de incubación liberando enzimas vacuolares antes de la inactivación térmica).
- Cortezas de levadura o paredes (el componente insoluble de las paredes de la levadura excluyendo el contenido citoplasmático).
- Extractos de levadura (extracto soluble después de la degradación total del contenido citoplasmático).

Se han hecho estudios para determinar el tior natural contenido en levaduras secas inactivas enológicas en términos de GSH, cisteína libre y proteica (Tirelli et al., 2010). Se informó de niveles de GSH que van desde 0,39 a 0,92 mmol/100g. El contenido en tior de diferentes muestras comerciales de manoproteínas de levadura, cortezas, lisados y extractos también se analizaron. A diferencia de lo que se esperaba, los extractos de levadura no contenían GSH, a pesar de que es un extracto soluble del contenido citoplasmático de la levadura, y el GSH es un componente citoplasmático. De hecho, fueron los productos lisados los que contenían el mayor contenido de GSH (hasta 4,6 mmol/100g) (Tirelli et al., 2010).

Tradicionalmente, las preparaciones LSI se han utilizado principalmente para mejorar la fermentación alcohólica y maloláctica, pero su uso para mejorar las características sensoriales del vino han recibido recientemente mucha atención (Pozo-Bayón et al., 2009a). Varios productos comerciales LSI están disponibles actualmente en el mercado, los cuales pretenden preservar el aroma del vino, extender la vida útil de los vinos embotellados y retrasar el desarrollo de notas oxidadas y el pardeamiento del vino blanco. El efecto de estos productos se atribuye al alto contenido de GSH con propiedades reductoras. Las preparaciones de levadura secas inactivas enriquecidas ricas en glutatión (LSI-GSH), pretenden incrementar el contenido de GSH en el vino tanto por la liberación del GSH en el vino, como permitiendo a la levadura asimilar precursores del GSH durante la fermentación alcohólica y de este modo aumentar la producción de GSH. Sin embargo, la dosis óptima requerida, el momento óptimo de adición durante la fermentación y los efectos de otros parámetros de la vinificación como temperatura, SO_2 y pH en su eficacia siguen siendo desconocidos.

Andujar-Ortíz et al. (2011) midieron la cantidad de GSH total y reducido aportado a vinos sintéticos por LSI-GSH comerciales. Además, la evolución de estos compuestos fueron también controlados durante un periodo de 9 meses en vino rosado Garnacha suplementado con una preparación de LSI-GSH. Se observaron cantidades muy similares de GSH total y reducido en el vino adicionado con las diferentes LSI-GSH. Cuando las preparaciones fueron añadidas en una dosis de 0,3 g/L, entre 1 y 2 mg/L de GSH reducido fueron liberados en el vino sintético después de 30 min. Después de 9 días de la adición, sólo una ligera reducción en la concentración de GSH reducido se observó para todas las LSI-GSH.

En el caso de las vinificaciones, el contenido total de GSH fue máximo después de la fermentación alcohólica tanto para el vino control como para el suplementado con LSI-GSH, correspondiendo con 8 y 16 mg/L respectivamente. Además, la diferencia en el contenido total de GSH entre el vino control y el suplementado fue mayor de la esperada, teniendo en cuenta la cantidad de GSH liberado por la preparación específica de LSI-GSH que fue determinada en el experimento con el vino sintético. Los análisis de la composición de nitrógeno de los vinos revelaron un mayor contenido de aminoácidos y péptidos en el vino LSI-GSH comparado con el control. Esto condujo a la hipótesis de que el mayor contenido en nitrógeno en el vino LSI-GSH estimuló la producción de GSH reducido por parte de la cepa de *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticas en el contenido de GSH reducido entre el vino control y el vino LSI-GSH después de la fermentación alcohólica. Los autores explicaron este fenómeno por la oxidación del GSH reducido liberado por el LSI-GSH durante la fermentación alcohólica. Sin embargo, el contenido de GSH reducido de vino control aumentó de 0,7 mg/L en el mosto a 6 mg/L después de la fermentación alcohólica, lo que sugiere que la levadura es una fuente potencial de GSH. Una disminución drástica en la concentración de GSH durante la fermentación alcohólica debido a la oxidación es poco probable, debido al ambiente reductor durante este proceso y claramente este aspecto necesita más investigación.

Kritzinger et al. (2013) evaluaron los niveles de glutatión en una solución de un vino modelo suplementado con las preparaciones de LSI-GSH utilizando un nuevo método UPLC-MS/MS. El método ha sido desarrollado para la cuantificación simultánea de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en mosto, vino y vino modelo. La preparación de la muestra es mínima y no requiere derivatización. El método tiene un rendimiento muy bueno en términos de sensibilidad y selectividad. El límite de detección fue de 0,002 y 0,001 mg/l de GSH y GSSG, respectivamente. Se evaluó la cantidad de GSH y GSSG liberado por las preparaciones comerciales de LSI-GSH en una solución de vino modelo. Se observaron diferencias significativas en la cantidad de GSH y/o GSSG liberado por las diferentes LSI-GSH. Además, se comprobó que las LSI-GSH puede llevar a elevados niveles de GSH en el vino, siempre que la suplementación se realice temprano durante la fermentación alcohólica.

En el trabajo realizado en 2013 en la bodega experimental de la ETSIAA de Palencia (Universidad de Valladolid) la adición de estos derivados de levadura ricos en glutatión sobre vinos blancos promovió una velocidad de inicio de fermentación mayor aunque no acortó la duración de la misma, no modificó notablemente valores de pH, acidez volátil y total y azúcares reductores aunque si se obtuvieron vinos con mayor graduación alcohólica.

Por otro lado algunas de las preparaciones de LSI-GSH redujeron el contenido en polifenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles.

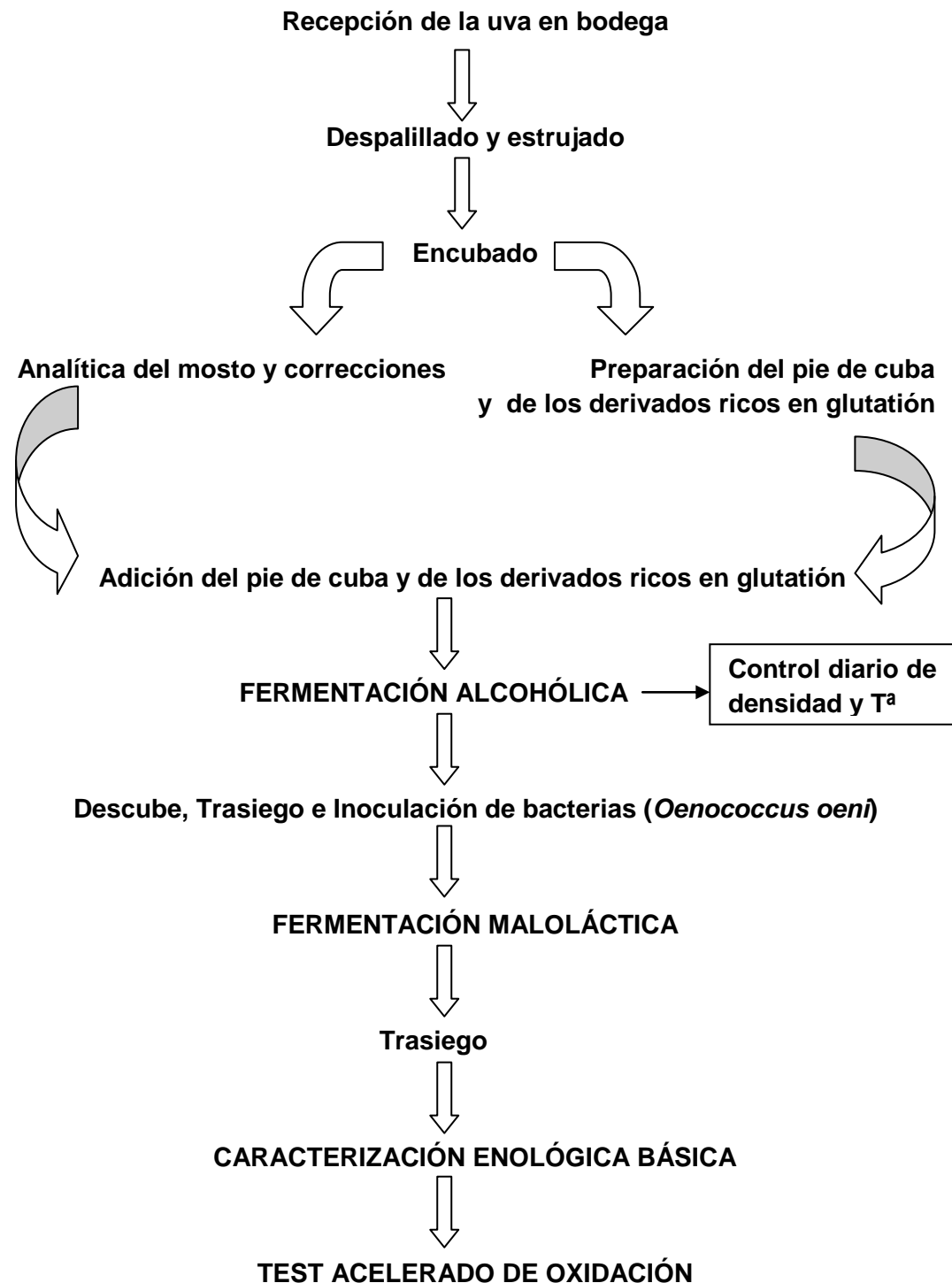
En cuanto a las características cromáticas y el pardeamiento de estos vinos, se observó que los parámetros de color no fueron modificados de manera notable y que algunas preparaciones sí provocaron un descenso en el pardeamiento de los vinos.

Por último se concluyó exponiendo la existencia de indicios de que efectivamente las LSI-GSH dificultan la oxidación del vino, al observarse entre otros indicadores un porcentaje de disminución menor de los polifenoles totales en los vinos tratados (Mazuelas, 2013).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Desarrollo de la vinificación:

A continuación se muestra el esquema seguido para la realización de la vinificación.



- **RECEPCIÓN DE LA UVA EN BODEGA:**

La uva de la variedad “Cabernet Sauvignon” procedente de la vendimia de 2013, de los viñedos situados en la finca Zamadueñas (ITACyL, Valladolid), llegó en cajas de material de uso alimentario a la bodega experimental de la ETSIIAA de Palencia (Universidad de Valladolid), tras esto se procede a su vinificación siguiendo un esquema clásico de vinificación en tinto.

- **DESPALILLADO Y ESTRUJADO:**

La uva se despallilla y estruja para repartirla en catorce depósitos de acero inoxidable de 20 litros. Se realizan siete vinificaciones por duplicado, dos para los vinos controles y cinco más, una por cada tipo de derivado de levadura, procurando mantener las mismas condiciones para cada depósito (**tabla 1**).



Figura 13: Depósitos identificados con el nombre de los vinos objeto de estudio en la bodega de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia.

- **ANÁLISIS Y ACONDICIONAMIENTO DEL MOSTO, Y PREPARACIÓN DEL PIE DE CUBA Y LEVADURAS SECAS INACTIVAS RICAS EN GSH:**

Se realizó la analítica del mosto, cuyos resultados fueron:

- Densidad (1099 g/cm^3).
- Acidez total (4,26 g/L ácido tartárico).
- pH (3,62).
- Grado alcohólico probable (13,45%).
- Nitrógeno fácilmente asimilable (313,6 mg/L).

Se añadió metabisulfito potásico para llegar a valores de sulfuroso total de 15 mg/L.

Como se ha comentado anteriormente, los ensayos de fermentación con las distintas levaduras secas inactivas ricas en glutatión (LSI-GSH) se realizaron, por duplicado, en recipientes de acero inoxidable de 20 litros. Se adicionaron levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (RVA, Viniferm®, Agrovin, España) a la dosis media recomendada por el fabricante de 30 g/hl. Para la preparación de los derivados de levadura ricas en glutatión, se diluyeron previamente cada uno en una pequeña cantidad de mosto teniendo en cuenta la dosis recomendada por cada fabricante (300 mg/L) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Codificación de los vinos y tipo de derivado añadido.

CÓDIGO	TIPO DE LEVADURA SECA INACTIVA RICA EN GLUTATIÓN	DOSIS
VSO1	Ninguno. Con doble dosis de SO ₂ total.	
VSO2	Ninguno	
VDL1	Mannoblanc (Agrovin)	300 mg/L
VDL2	ActimaxGSH (Agrovin)	300 mg/L
VDL3	Opti-white (Lallemand)	300 mg/L
VDL4	Optimum-white (Lallemand)	300 mg/L
VDL5	Bioarom (Laffort)	300 mg/L

Los vinos VSO1 y VSO2 se tomaron como vinos control, por lo que no se les añadió ningún derivado de levadura rico en glutatión. Ahora bien, previamente a la fermentación, el mosto de la muestra VSO1 fue llevado a 30 mg/L de SO₂ total, mientras que a todos los demás se les añadió una cantidad menor de metabisulfito potásico, hasta llegar a 15 mg/L de SO₂ total.

- **FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA:**

Para llevar a cabo el control de la fermentación se realizó diariamente medidas de la densidad y temperatura del mosto-vino.

- **FERMENTACIÓN MALOLÁTICA:**

A los 2 días acabada la fermentación alcohólica, inoculamos al vino con bacterias lácticas *Oenococcus Oeni* a la dosis de 0,01 g/l (ALPHA, Uvaferm, Lallemand.S.A.) para comenzar la fermentación maloláctica. Para realizar el seguimiento de la fermentación maloláctica se determinó el contenido de ácido málico por la técnica de cromatografía de papel cada 2 días. Esta técnica permite la separación de una mezcla en sus componentes individuales los cuales pueden ser identificados cualitativamente relacionándolos con unos patrones. Por tanto a través de la cromatografía podemos detectar la ausencia o presencia de ácido málico y saber cuándo termina la fermentación maloláctica. Consideramos que el vino está terminado

cuando la mancha de ácido málico es indetectable a simple vista en la cromatografía de papel, menor a 0,5 g/l.

- **CARACTERIZACIÓN ENOLÓGICA DE LOS VINOS**

Una vez finalizadas las fermentaciones alcohólica y maloláctica se sulfitaron los vinos a la dosis requerida para llegar a 30 mg/L de SO₂ libre en el caso del vino VSO1, y de 15 mg/L de SO₂ libre en los demás vinos y se embotellaron. Se realizó una caracterización enológica de los mismos analizando los siguientes parámetros: pH, acidez total y volátil, grado alcohólico, azúcares reductores, polifenoles totales, antocianos totales, taninos totales, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, y características cromáticas. Los análisis se realizaron por duplicado. Las muestras se centrifugarán a 4000 rpm durante 10 minutos antes de analizarlas.

- **TEST ACELERADO DE OXIDACIÓN**

Los vinos tintos son sometidos a un test acelerado de oxidación, calentando los vinos a 45°C durante 15 días en un recipiente cerrado con una cámara de aire, con el objeto de favorecer su oxidación. Se tomarán muestras a los 0, 1, 2, 4 y 7 días, y se evaluaron el contenido en polifenoles, antocianos, taninos totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles y sus características cromáticas. Las muestras se centrifugarán a 4000 rpm durante 10 minutos antes de analizarlas.

3.2 Control analítico

- **TEMPERATURA**

La temperatura del mosto es importante, pues de ella, en parte, depende el arranque de la fermentación del mosto. Cuando la temperatura es baja es necesario aportar calor al depósito para favorecer la fermentación; por el contrario si la temperatura es muy alta, es aconsejable bajarla un poco para favorecer las características del futuro vino.

Durante la fermentación, el desprendimiento de calor puede conducir a dificultades, tales como inactivación y pérdida de viabilidad de las levaduras, disminución de aromas y calidad del vino. Además, el aroma secundario producido por las levaduras a temperaturas elevadas es menos agradable. El método para controlar la temperatura es directo mediante termómetro.

- **DENSIDAD**

Fundamento:

La areometría se basa en el principio de Arquímedes para la determinación de la masa volúmica de líquidos en función de la flotabilidad que presenta en ellos un cuerpo de peso constante.

La determinación se realiza a partir de la lectura de los denominados areómetros, graduados en unidades de masa volúmica a 20°C (*densímetro*) que se introducen en el vino (García et al., 2005).

Material:

- Aerómetro específico (densímetro).
- Termómetro contrastado.
- Probeta 250 mL.

Procedimiento:

Llenar la probeta con aproximadamente 200 mL de mosto o mosto-vino a analizar exento de anhídrido carbónico en una probeta de 250 mL. Introducir el densímetro, cuando está bien estabilizado en el líquido se lee sobre la varilla graduada el valor de la masa volúmica aparente a t °C, la lectura debe realizarse en lo alto del menisco. Tras determinar la densidad se introduce el termómetro para obtener la temperatura de la muestra y realizar la corrección de la masa volúmica aparente.

Cálculos:

Calcular la densidad a 20°C.

- **GRADO ALCOHÓLICO PROBABLE EN MOSTO (Medida con refractómetro)**

Fundamento:

La refractometría es un método indirecto que determina la concentración de azúcar de un mosto mediante la medida del índice de refracción. La refracción se basa

en la modificación de la trayectoria de un rayo luminoso al atravesar una superficie que limita dos medios diferentes (García et al., 2005).

El funcionamiento del refractómetro se basa en las variaciones que experimenta la refracción de un líquido al modificarse su contenido en sustancias disueltas. Antes de emplear el refractómetro conviene calibrarlo adecuadamente según nos indican las instrucciones del fabricante

Material:

- Refractómetro (**Fig. 14**) provisto de una escala que indique el porcentaje en masa de sacarosa (°Brix).
- Pipeta pasteur.



Figura 14: Refractómetro de mano.

Procedimiento:

Colocar, empleando una pipeta, unas gotas de la muestra en el prisma inferior del refractómetro, procurando que los prismas queden en estrecho contacto con la superficie de vidrio que debe quedar cubierta uniformemente (**Fig. 15**). Después de cada lectura hay que aclarar la parte óptica con agua y secar bien con un papel absorbente. Conviene realizar al menos dos determinaciones.

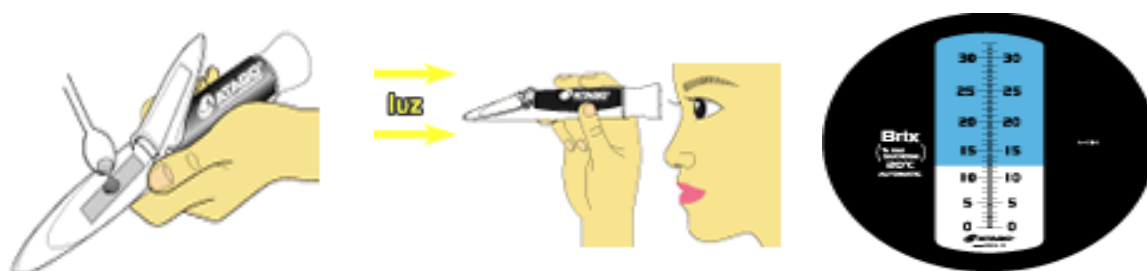


Figura 15: Descripción del proceso de medida.

Cálculos:

Para conocer el grado alcohólico probable del mosto analizado es necesario interpolar el resultado de la lectura del °Brix en la siguiente fórmula (válida en el intervalo de 15-25 °Brix):

$$\% \text{ vol.} = (0,6757 \times \text{°Brix}) - 2,0839$$

En caso de que la temperatura en la medida fuera diferente a 20°C será necesario corregir (**Tabla 2**) el valor de los °Brix aparente (°Brix_t) del refractómetro según la fórmula siguiente: °Brix_{20°C} = °Brix_t + c

Tabla 2. Factores de corrección del °Brix en función de la temperatura.

Temperatura (°C)	c	Temperatura (°C)	c
15	-0,3	21	+0,1
16	-0,3	22	+0,1
17	-0,2	23	+0,2
18	-0,1	24	+0,3
19	-0,1	25	+0,3

- **pH**

Fundamento:

El pH indica la fuerza de los ácidos del vino. Se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno.

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

Es adimensional y en el vino suele oscilar entre 2,8 y 3,8. Un pH bajo corresponde a una fuerte acidez y un pH elevado, a una acidez débil (Delanöe y col., 2003).

Material:

- pH-metro.
- Vaso de precipitados (50 mL).
- Pipeta (25 mL).

Procedimiento:

Se toma una muestra (25 mL) en el vaso de precipitados y se introduce el electrodo del pH-metro. Cuando se estabiliza la medida leer el valor del pH.

Se debe calibrar el pH-metro siguiendo las instrucciones, con las soluciones tampón de pH 4,01 y 7,00 a 20°C.

- **ACIDEZ TOTAL EN VINOS (Método Potenciométrico)**

Fundamento:

La acidez total está constituida como la suma de los ácidos valorables de un vino, cuando se neutraliza por adición de una disolución alcalina valorada. El ácido carbónico, el anhídrido sulfuroso libre y el combinado no se incluyen (García et al., 2005).

La acidez total está constituida por la acidez fija, formada por varios ácidos como los ácidos tartárico, málico, cítrico, láctico succínico y la acidez volátil, debida ésta casi exclusivamente al ácido acético.

Material y reactivos:

- pH-metro.
- Bureta (50 mL).
- Vaso de precipitados (100 mL).
- Pipeta (20 mL).
- Solución 0,1N de hidróxido sódico (NaOH).

Procedimiento:

Para ello se toma una muestra de 20 mL de vino desprovisto de CO₂ en un vaso de precipitados. Se introduce en él, el electrodo del pH-metro, y utilizando el modo medida en continuo, se espera a que se estabilice la medida. Valorar lentamente con la solución alcalina de factor conocido, hasta que marque pH 7. Se deberá agitar permanentemente la solución para que sea homogénea.

Finalmente se anota el volumen en mL de sosa (V_{NaOH}) gastado hasta pH 7 y se realizan los cálculos incluyendo el factor de corrección (F) de la sosa.

Cálculos:

Acidez total en g/L expresado en ácido tartárico = $V_{\text{NaOH}} \times 0,375 \times F$

- **ACIDEZ VOLÁTIL (Método García-Tena)**

Fundamento:

La acidez volátil es el conjunto de ácidos grasos de la serie acética que se hallan en el vino, libres o combinados, formando sales. El más importante es el ácido acético.

El método se basa en una destilación fraccionada del vino y valoración de una de las fracciones recogidas. El primer volumen se recoge en una probeta de 5,1 mL y el segundo en probeta de 3,2 mL. Este ácido no puede recogerse en una sola destilación por ser menos volátil que el agua (punto de ebullición del ácido acético = 118,1°C). Se emplea una placa de calefacción eléctrica y destilación directa. El calefactor está previsto para la destilación de pequeños volúmenes (García, 1990).

Material y reactivos:

- Aparato de destilación (**Fig. 16**), matraz de destilación de 60 mL, placa eléctrica y refrigerante.
- Pipetas de 1 y 10 mL.
- Probetas de 5,1 mL y 3,2 mL.
- NaOH 0,01N.
- Bureta (25 mL).
- Vaso de precipitados (100 mL).
- Fenolftaleína.
- Pipeta pasteur.



Figura 16: Volatímetro eléctrico

Procedimiento:

Poner 11 mL de vino en un matraz de 60 mL de capacidad y destilar calentando directamente en el aparato de destilación.

El destilado se recoge en dos probetas diferentes:

- En la primera se recogen 5,1 mL de destilado. El método considera que en esta primera fracción han pasado los ácidos más volátiles que el acético: SO₂, CO₂. Se desecha.
- En la segunda probeta se recogen 3,2 mL de destilado, estimándose que en dicho volumen ha pasado 1/3 del ácido acético del vino.

El líquido de la probeta se vierte en un vaso y se valora con la solución de hidróxido sódico 0,01N de factor (F) conocido, en presencia de unas gotas de fenolftaleína hasta obtener un color rosado. Finalmente, se anota el volumen en mL de sosa 0,01N (V_{NaOH}) gastados en la valoración.

Cálculos:

$$\text{Acidez volátil en g/L} = 3 \times V_{\text{NaOH}} \times F \times 0,06$$

- **SULFUROSO LIBRE Y TOTAL (Método Ripper Sencillo)**

Fundamento:

Según el método Ripper sencillo vamos a determinar la cantidad de SO₂ libre y total que tiene el vino. La determinación del dióxido de azufre libre se realiza por valoración yodométrica directa. La determinación del dióxido de azufre total también se realiza por valoración yodométrica tras hidrólisis alcalina. La suma del dióxido de azufre libre y o total permite obtener el dióxido de azufre total (Reglamento CEE N°2 676/90, 1990).

Material y reactivos:

- Erlenmeyer de 100 mL.
- Pipetas de 10 mL, 5 mL y 2 mL.
- NaOH 1N.
- H₂SO₄ 16%.
- I₂ 0,02N.
- Almidón al 1%.

✓ **SULFUROSO LIBRE****Procedimiento:**

Poner 10 mL de vino en un matraz Erlenmeyer de 100 mL, añadir 5 mL de H₂SO₄ 16% y 2 mL de almidón. A continuación valorar con I₂ 0,02N hasta la aparición de un color azul y se anota el volumen en mL de yodo gastado V (I₂).

Cálculos:

$$\text{SO}_2 \text{ libre (mg/L)} = V (\text{I}_2) \times 64$$

✓ **SULFUROSO TOTAL****Procedimiento:**

Poner en un matraz Erlenmeyer de 100 mL: 10 mL de vino y 10 mL de NaOH 1N, tapar y dejar reposar 15 minutos. Añadir 5 mL de H₂SO₄ 16% (para poner en

medio ácido) y 2 mL de almidón (indicador). Valorar con I_2 0,02N y apuntar el volumen en mL de yodo [V (I_2)] empleado en la valoración.

Cálculos:

$$SO_2 \text{ Total (mg/L)} = V (I_2) \times 64$$

- **GRADO ALCOHÓLICO (Método ebulométrico)**

Fundamento:

El método ebuloscópico se basa en la variación del punto de ebullición que experimentan los líquidos hidroalcohólicos según su proporción de alcohol.

En condiciones normales (760 mm Hg/cm² \equiv 1013 hPa) el punto de ebullición del agua es 100°C y el del alcohol 78,5°C. Una mezcla de alcohol y agua que se mantenga constante mediante un refrigerante a reflujo, hervirá a una temperatura tanto más próxima a la del agua cuanto menos alcohol contenga y viceversa (García y col., 2005).

Materiales:

- Ebulómetro.
- Refrigerante vertical.
- Termómetro.
- Indicador de temperatura del refrigerante.
- Regla de cálculo.

Procedimiento:

Se llena con agua la caldera hasta la marca y se ajusta el termómetro, se acopla el refrigerante, llenándose de agua y se enciende el equipo. La temperatura de ebullición del agua se leerá cuando la medida del termómetro se estabilice.

Se vacía la caldera y se enfría con agua corriente, enjuagándola con vino. A continuación se llena la caldera con vino. Se ajusta el termómetro y se acopla el refrigerante, llenándose de agua y se enciende equipo. Cuando la medida en el termómetro se estabilice se anotará la temperatura de ebullición del vino.

Cálculos:

Por medio de una regla de cálculo y empleando las temperaturas de ebullición del agua y del vino se calcula directamente el grado alcohólico volumétrico. El grado alcohólico volumétrico (GAV) a 20°C se expresa con dos decimales y en % vol.

- **NITRÓGENO FÁCILMENTE ASIMILABLE:**

Fundamento:

Se empleó el método de Sørensen basado en la valoración de la acidez de los compuestos formados por la reacción del formaldehído con los aminoácidos (Hidalgo, 2003).

Material y reactivos:

- pH metro (Crison EC-Meter BASII 30+).
- Solución de aldehído fórmico al 37/38.
- NaOH 0,1 N y 1,0 N

Procedimiento:

Colocamos en un vaso de precipitado 25 mL de mosto o vino y lo llevamos hasta pH 8 con la adición de NaOH 1,0 N. Esperamos quince minutos, transcurridos éstos completamos el volumen hasta 50 mL con agua destilada en un matraz aforado; a continuación agitamos y filtramos. Del volumen filtrado tomaremos 25 mL y estos serán llevados de nuevo a pH 8 con NaOH 0.1N. Añadimos 6,25 mL de aldehído fórmico al 37/38% y lo agitamos, esperaremos otros quince minutos y por último pasaremos a valorar con NaOH hasta pH 8.

Cálculos:

Nitrógeno total asimilable (mg/L) = $112 \times V$ (mL de NaOH 0,1 N gastados).

- **AZÚCARES REDUCTORES (Método Rebelein)**

Fundamento:

Se basa en las propiedades reductoras de la glucosa y la fructosa sobre las sales cúpricas. Estos azúcares son oxidados a la temperatura de ebullición por un

exceso de solución alcalina de Cu^{+2} que contiene tartrato para mantener el metal en solución. El Cu^{+2} es reducido a Cu^{+} y el Cu^{+2} en exceso se puede determinar por yodometría después de adicionar exceso de KI y acidular (García et al., 2005).

Material y reactivos:

- Bureta 50 mL.
- Placa calefactora.
- Pipetas de 2 mL, 10 mL y 5 mL.
- Erlenmeyer de 250 mL.
- Vidrios de reloj y bolitas de vidrio.
- Yoduro potásico (KI) (300 g de KI más 100 mL de NaOH 1N y enrasar a 1 L con agua destilada).
- Sal de Seignette (Disolver 250 g de tartrato sódico y potásico en 400 mL de agua; por otro lado disolver 80 g de NaOH en 400 mL de agua. A temperatura ambiente verter las dos disoluciones en un matraz aforado de un litro y enrasar con agua destilada).
- Carbón activo.
- Disolución cúprica. (Disolver 41,92 g de sulfato de cobre pentahidratado en agua destilada, añadir 10 mL de ácido sulfúrico 1N y enrasar a 1 litro con agua destilada).
- Tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1N. (Disolver 13,78 g de tiosulfato sódico pentahidratado en agua destilada, añadir 50 mL de NaOH 1N y enrasar a 1 litro con agua destilada).
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 16%.
- Almidón al 1%. (Disolver 1 g de almidón en 100 mL de agua destilada hirviendo).

Procedimiento:

Se prepara una muestra de un blanco: se realiza de forma paralela al vino pero sustituyendo el mosto-vino por agua destilada. La preparación del mosto-vino comprende los siguientes pasos:

Como se trata de vinos tintos se deben decolorar previamente con carbón activo (añadir en un vaso de precipitados con aproximadamente 20 mL de vino a decolorar una cucharada de carbón activo y tapar con parafilm). Una vez decolorado

se filtra y se centrifuga. Del sobrenadante se recogen 2 mL del vino y se lleva a un erlenmeyer de 250 mL.

Añadir al erlenmeyer de 250 mL con los 2 mL de vino: 10 mL de solución cúprica, 5 mL de sal de Seignette y 3 bolitas de vidrio. Calentar en la placa calefactora (tapando con un vidrio de reloj). Contar dos minutos desde que empiece la ebullición, retirar y enfriar a chorro de agua del grifo agitando. Después añadir agitando continuamente, 10 mL de KI, 10 mL de ácido sulfúrico al 16% y 10 mL de almidón al 1%. Valorar con tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) hasta viraje a un color blanco marfil.

Cálculos:

La diferencia entre los mL gastados por el blanco y los de la muestra nos da directamente los g/L de azúcares reductores que hay en el mosto-vino.

V_1 = volumen de tiosulfato del vino a analizar.

V_2 = volumen de tiosulfato en blanco.

$V_2 - V_1$ = g/L de azúcares reductores en el mosto-vino.

- **ÁCIDO MÁLICO (Método cromatográfico)**

Fundamento:

El método de la cromatografía de papel es un método cualitativo simple que permite hacer un seguimiento a la fermentación maloláctica y determinar si el vino tiene o no ácido málico.

Este método consiste en colocar una pequeña cantidad de vino en el extremo de un papel de filtro; este se introduce en una solución de desarrollo que consiste en algún disolvente orgánico saturado con una solución acuosa.

La porción acuosa del sistema disolvente forma una fase inmóvil a medida que es absorbida por el papel, la parte orgánica sirve para extraer el ácido de la fase acuosa.

Para evitar que los disolventes se evaporen, lo que significaría un mal desarrollo del cromatograma, las tiras de papel deben estar en un recipiente cerrado saturado con el vapor del disolvente.

Cuando los disolventes han ascendido una cierta distancia sobre el papel, se deseca este y se trata con el reactivo adecuado (revelado) para localizar los solutos.

Se estima el contenido de ácido málico por comparación visual de los tamaños de las manchas con una escala patrón con estándares.

Aunque este método es muy utilizado ya que nos permite de forma económica saber si ha empezado o no la fermentación maloláctica, sólo es capaz de detectar hasta aproximadamente concentraciones de 100-150 mg/L de ácido málico. Sin embargo para garantizar el cumplimiento de la fermentación maloláctica estos niveles son muy elevados por lo que se aconseja seguir con un monitoreo enzimático que puede detectar niveles inferiores y cuantificar el málico (García, 1990).

Material y reactivos:

- Azul de bromofenol.
- n-butanol.
- Ácido acético.
- Ácido málico.
- Papel Watman nº 1.
- Cubeta cromatográfica.
- El eluyente es una mezcla de las disoluciones nº1 y nº2 en la proporción de 50ml y 20 ml.
 - Solución nº 1: revelador (1g de azul de bromofenol en 1 litro de n-butanol).
 - Solución nº 2: ácido acético al 50 % (500 ml de agua destilada + 500 ml de acético puro).
- Disoluciones patrón de ácido málico con un contenido de 0,5, 1 y 2 g/l utilizando de disolvente una mezcla hidroalcohólica al 12 %.

Procedimiento:

Se preparan las disoluciones patrón de 0,5, 1 y 2 g/l de ácido málico.

Se corta un trozo de papel adecuado y a unos 2 cm del borde inferior, se traza una recta dividiéndola en segmentos. Se depositan 2 µl de vino en el papel mediante un capilar y de la misma forma los patrones.

Para desarrollar el cromatograma se lleva el papel a la cubeta que contiene el eluyente y está saturada con sus vapores; se sumerge el papel 1 cm y se deja que ascienda (unas 3 horas).

Por último se saca el cromatograma y se deja secar en un ambiente exento de vapores ácidos.

En el cromatograma (fondo azul y machas amarillas) observaremos primero las tres manchas de los patrones, situadas a la misma altura, pero de distinto diámetro.

En la vertical correspondiente al vino, encontraremos según contenga o no ácido málico 3 manchas de color amarillo a distintas alturas que corresponden a:

- Mancha superior: ácidos láctico y succínico solapados.
- Mancha central: ácido málico.
- Mancha inferior: ácido tartárico.

Comparando el diámetro de la mancha del málico con las de los patrones se conocerá aproximadamente la cantidad de ácido málico (g/L) que contiene el vino.

En la **Fig. 17** se muestra un ejemplo de una cromatografía simple de papel de los ácidos orgánicos de un vino. Como podemos comprobar este vino si ha empezado la fermentación maloláctica. Comparando la mancha de ácido málico que deja el vino con las manchas de los patrones, podemos concluir que esta se encuentra entre 1 y 2 g/L, diríamos que aproximadamente tiene 1,5 g/L de ácido málico.

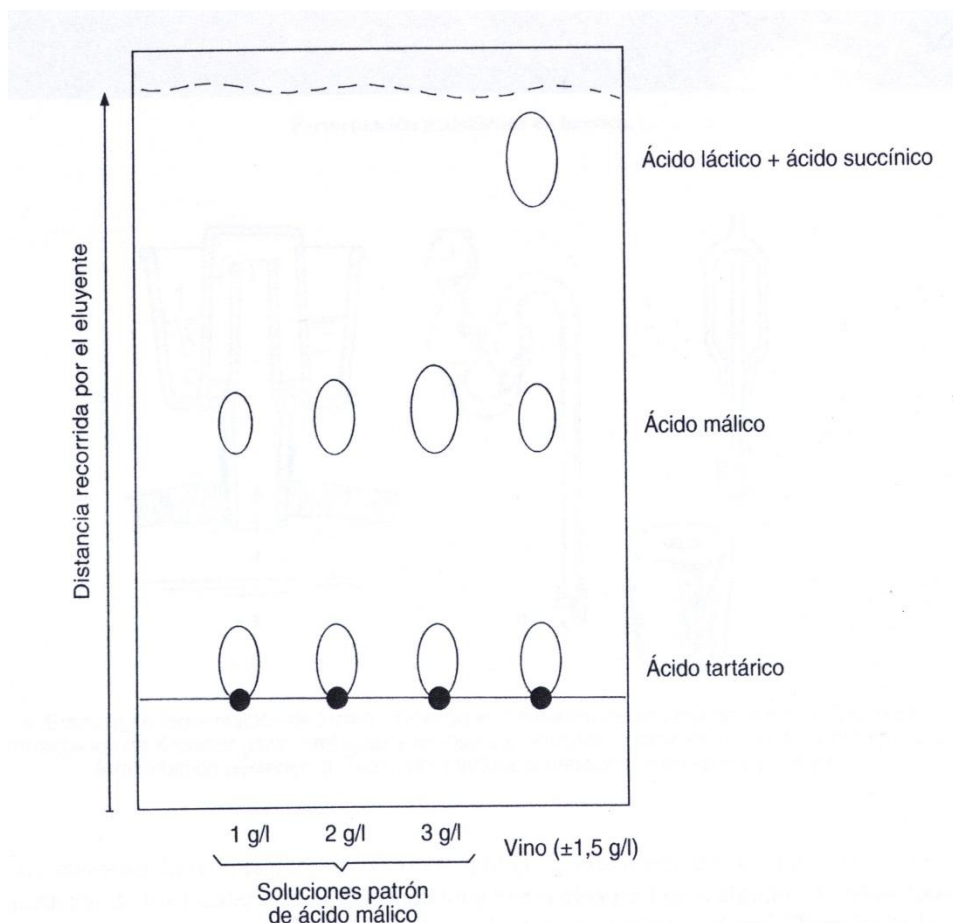


Figura 17: Separación de ácidos orgánicos por cromatografía de papel. Análisis semicuantitativo del ácido málico (Hidalgo, 2002).

- **INDICE DE FOLIN-CIOCALTEU (IFC)**

Fundamento:

El conjunto de los compuestos polifenólicos del vino se oxida por el reactivo Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico), dando una coloración azul directamente proporcional al contenido de polifenoles y medible a 750 nm.

Material y reactivos:

- Espectrofotómetro (Lan Optios Serie 2000 UV)
- Cubeta de vidrio de 1 cm.
- Pipetas de 1, 5, 20 y 50 mL.
- Matraz aforado de 100 mL.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Solución al 20 % (p/v) de carbonato de sodio.

Procedimiento:

En un matraz aforado de 100 mL, se introducen respetando el orden, 1 mL de vino, 50 mL de agua destilada, 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 20 mL de la solución de carbonato de sodio y se enrasa a 100 mL con agua destilada. Se agita el matraz para homogeneizar, se espera 30 min para estabilizar la reacción y se mide la absorbancia a 750 nm con una cubeta de 1 cm frente a un blanco preparado con agua destilada.

Cálculos:

El valor de absorbancia obtenido se multiplica por 20.

$$\text{IFC} = A_{750} \times 20$$

- **INDICE DE POLIFENOLES TOTALES (IPT)**

Fundamento:

Los compuestos fenólicos presentan un espectro de absorción característico en la región UV entre 200 y 350 nm, con dos máximos típicos a 215 nm y 280 nm y un mínimo a 245 nm, de los cuales sólo el máximo a 280 nm es constante en cualquier tipo de vino y para cualquier compuesto fenólico. En este método no influye el pH de la solución (MAPA, 1993).

Material y reactivos:

- Espectrofotómetro (Lan Optios Serie 2000 UV)
- Cubeta de cuarzo de 1 cm.
- Pipeta de 1 mL.
- Matraces aforados de 20 y 100 mL.

Procedimiento:

Previamente se centrifuga la muestra aproximadamente 15 minutos a 2500 rpm. Así eliminamos las partículas en suspensión que podrían interferir en las medidas espectrofotométricas.

Se diluye la muestra de vino tinto a 1:100 (pues la lectura es elevada y se sale de la escala del espectofotómetro). A continuación se mide la absorbancia a 280 nm en cubetas de cuarzo de 1 cm frente a agua destilada.

Cálculos:

El valor de absorbancia obtenido es corregido por el factor de dilución.

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

• ANTOCIANINOS TOTALES:**Fundamento:**

El método empleado para la determinación de antocianos totales presentes en un vino, es el de decoloración mediante bisulfito de sodio (Ribéreau-Gayon, 1980), donde la decoloración es proporcional a la concentración de antocianos libres. Los resultados que proporcionan son ligeramente altos, pues el bisulfito se puede combinar con otros compuestos que poseen insaturaciones, pero aun así este método es más fiable que otro método alternativo como el de diferencia de pH (Paronetto, 1977), ya que la variación de la intensidad de color con el pH del medio está parcialmente afectada por la concentración de SO₂ en el medio.

Materiales y reactivos:

- Etanol y agua destilada.
- HCl al 2%.
- HNaSO₃ al 16%.
- Cubeta de cuarzo de 1 cm.

Procedimiento:

En un vaso se preparan 1 mL de muestra, 1 mL de etanol y 20 mL de HCl al 2%. A partir de esta disolución se preparan dos tubos de ensayo, tubo A y tubo B. En el tubo A se introducen 5 mL de la disolución inicial y 2 mL de agua destilada y en el tubo B se introducen 5 mL de la disolución inicial y 2 mL de HNaSO₃ al 16%. Se esperan 15 minutos y se mide la absorbancia a 520 nm en cubeta de cuarzo de 1 cm.

Cálculos:

$$C \text{ (mg/L)} = 875 \times (A1-A2)$$

- **TANINOS CONDENSADOS:**

Fundamento:

Este método se basa en la propiedad que presentan los taninos condensados de liberar en medio ácido y caliente, por rotura de los enlaces intermonoméricos, un carbocatión muy reactivo, que puede, por oxidación, dar lugar a una antocianidina, principalmente la cianidina. Por esta razón la reacción de determinación se lleva a cabo a 90°C y en contacto con el aire (MAPA, 1993).

Procedimiento:

Previamente preparar en un matraz aforado de 10 mL una dilución a 1:10 de la muestra de vino tinto. Se preparan 2 tubos:

Tubo A:

- 1 mL de muestra diluida 1:10.
- 0,5 mL de agua destilada.
- 3 mL de HCl al 37%.

Se tapa, se protege de la luz y se calienta a 90°C durante 30 minutos en un baño de agua. Se deja enfriar en la oscuridad y se añade 0,5 ml de etanol de 99°.

Tubo B:

- 1 mL de muestra diluida 1:10.
- 0,5 mL de agua destilada.
- 3 mL de HCl al 37%.

Se tapa y se deja a temperatura ambiente protegido de la luz y se añade 0,5 ml de etanol de 99°.

Se mide la absorbancia de ambos tubos en cubeta de cuarzo 1 cm a 550 nm.

Cálculos:

$$C \text{ (mg/L)} = [19,33 \times (A_{\text{tubo1}} - A_{\text{tubo2}})] / 5$$

- **ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS**

Fundamento:

Los ácidos hidroxicinámicos se detectan en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 320 nm (Andrés-Lacueva et al., 1997, Betés-Saura et al., 1996).

Material:

- Espectrofotómetro (Lan Optios Serie 2000 UV)
- Cubeta de vidrio de 1 cm.

Procedimiento:

Para el vino tinto se diluye previamente por un factor de 50 con agua destilada. A continuación se mide la absorbancia a 320 nm en cubeta de vidrio de 1 cm, frente a agua destilada.

Cálculos:

El valor de la absorbancia obtenido es corregido por el factor de dilución

$AHC = A_{320} \times 50$ (expresado en mg/L de ácido cafeico).

- **FLAVONOLES**

Fundamento:

Los flavonoles se detectan en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 365 nm (Andrés-Lacueva et al., 1997, Betés-Saura et al., 1996).

Material:

- Espectrofotómetro (Lan Optios Serie 2000 UV)
- Cubeta de vidrio de 1 cm.

Procedimiento:

Para el vino blanco se diluye previamente por un factor de 50 con agua destilada. A continuación se mide la absorbancia a 365 nm en cubeta de vidrio de 1 cm, frente a agua destilada.

Cálculos:

El valor de la absorbancia obtenido es corregido por el factor de dilución.

Flavonoles = $A_{365} \times 50$.

- **DETERMINACIÓN DEL COLOR**

Fundamento:

Las características cromáticas de un vino, se deducen de su espectro de absorción que presenta un mínimo a 420 nm y un máximo a 520 nm, estas medidas permiten definir su intensidad colorante y su tonalidad.

Material:

- Espectrofotómetro (Lan Optios Serie 2000 UV)
- Cubeta de vidrio de 1 cm.

Procedimiento:

De acuerdo a los parámetros cromáticos de Glories, previamente se centrifuga la muestra aproximadamente 15 minutos a 2500 rpm. Así se eliminan las partículas en suspensión que podrían interferir en las medidas espectrofotométricas (Glories, 1994).

Posteriormente se toma el vino tinto y se introduce en una cubeta de vidrio de 1 mm de camino óptico, se realiza el espectro del vino introducido y se mide la absorbancia a las longitudes de onda de 420 nm, 520 nm y 620 nm frente a agua destilada. La absorbancia medida se expresa referida a 1 cm, para ello multiplicamos los resultados por 10. Esto se hace así y no midiendo directamente con cubetas de 1 cm de longitud de camino óptico porque la lectura del espectrofotómetro se saldría de la escala. Además debido al estado coloidal de la materia colorante, no existe proporcionalidad entre la absorción y la dilución, por lo tanto las medidas espectrofotométricas deben hacerse sobre el vino mismo, no diluido.

Cálculos:

Antes de realizar estos cálculos hay que corregir las medidas de absorbancia y referirlas a la cubeta de 1 cm de espesor, multiplicándolas por 10.

Absorbancia (1cm) = 1 / b x Absorbancia medida en cubeta de 1 mm.

- b = espesor de la cubeta (0,01cm).

Tabla 3. Cálculos para la determinación de los parámetros de color.

PARÁMETRO CROMÁTICO	FÓRMULAS
Intensidad Colorante	$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$
Tonalidad	$T = A_{420} / A_{520}$
% Amarillo	$\%A_{420} = (A_{420} / IC) \times 100$
% Rojo	$\%A_{520} = (A_{520} / IC) \times 100$
% Azul	$\%A_{620} = (A_{620} / IC) \times 100$

3.3 Tratamiento estadístico de los resultados

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVI.1 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, USA), realizando un análisis de varianza (ANOVA) (valor de α de 0,05) y un análisis por componentes principales.

4. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

4.1. Objetivo.

Aunque el SO₂ es muy eficaz en la protección del vino contra la oxidación, ciertos consumidores son sensibles a este antioxidante. Por ello, actualmente se está estudiando la posibilidad de reducir el uso del SO₂ durante la vinificación. El GSH puede ayudar al SO₂ en su papel como antioxidante, permitiendo el uso de menores niveles de SO₂ y superar posibles resistencias de los consumidores.

Actualmente la adición de GSH en el mosto o vino no está permitido por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). Una alternativa podría ser el uso de levaduras secas inactivas ricas en glutatión (LSI-GSH).

En este sentido, el objetivo principal de este estudio es:

- Estudiar el efecto de la adición de LSI-GSH sobre la calidad del vino tinto "Cabernet Sauvignon".

4.2. Plan de trabajo.

Para realizar este trabajo se han llevado a cabo las siguientes fases:

- **Revisión bibliográfica:**

Se ha realizado la búsqueda de información, principalmente proveniente de publicaciones científicas, con el fin de conocer los trabajos que se han realizado anteriormente sobre el papel del glutatión y el uso de LSI-GSH en vinificación y las conclusiones a las que han llegado estos autores.

- **Vinificación con los LSI-GSH.**

- Se procedió a la recepción, despalillado y estrujado de la uva. Tras esto se realizó el encubado del mosto y una analítica básica del mismo.
- Se corrigió el mosto y se sulfitó.
- Se estableció la codificación de las muestras y se prepararon los depósitos.
- Se adicionó la levadura y las LSI-GSH.
- Se realizó una vinificación siguiendo un esquema clásico de elaboración en tinto.
- El seguimiento de la fermentación alcohólica se realizó con un control diario de temperatura y densidad.
- El seguimiento de la fermentación maloláctica se realizó determinando el contenido de ácido málico por la técnica de cromatografía de papel cada 2 días.
- Acabadas las fermentaciones, se sulfitaron y embotellaron los vinos.
- Se realizó un test acelerado de oxidación de los vinos.

- ***Analítica***

Se realizaron las siguientes analíticas del vino después de la fermentación alcohólica y maloláctica: pH, acidez total, acidez volátil, azúcares reductores, grado alcohólico, sulfuroso libre y total, polifenoles totales, antocianos totales, taninos totales, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y parámetros de color. Después del test acelerado de oxidación se realizaron las analíticas siguientes: polifenoles totales, antocianos totales, taninos totales, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y parámetros de color.

- ***Estudio y discusión de los resultados obtenidos***

Se aplicaron herramientas estadísticas univariantes y multivariantes mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.1 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, USA), con el fin de estudiar las diferencias en la capacidad antioxidante de cada derivado de levadura rico en GSH.

- ***Elaboración de un documento con formato de estudio científico***

Se redactó el presente trabajo con el objetivo de reunir toda la información obtenida, los resultados y su discusión y las conclusiones a las que se ha llegado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En vista de proporcionar más consistencia a nuestros resultados se realizan ensayos con varias preparaciones comerciales de LSI-GSH, por ello se seleccionaron cinco preparaciones comerciales de LSI-GSH de tres casas comerciales, además de incluir dos vinos control. Un vino (VSO1) elaborado con una dosis de SO_2 habitual y un segundo vino control con una dosis baja de SO_2 (VSO2). A continuación se muestran los resultados obtenidos. Es preciso comentar que el efecto de estos preparados comerciales sobre la calidad de los vinos se debe a la propia presencia de las LSI y/o al GSH.

5.1. Efecto de los derivados de levadura ricos en glutatión en la cinética de fermentación.

En la gráfica de tiempo-densidad (**Fig. 18**) se muestra de manera comparativa la cinética de fermentación de los distintos mostos. Durante la fermentación alcohólica se pueden distinguir claramente tres fases. Una primera fase de latencia hasta el día 1, en el que las levaduras comienzan a reproducirse y consumir azúcares, iniciándose la fermentación; una segunda fase de desarrollo celular, del día 1 al día 7, en la que la fermentación avanza manteniendo una velocidad relativa constante. En esta fase tiene lugar un gran consumo de los azúcares fermentables por las levaduras. Finalmente, una tercera fase del día 7 hasta el día 9, en el que las densidades de los diferentes mostos se mantienen constantes, debido al descenso de la población de levaduras, ocasionada por la falta de nutrientes y el exceso de productos metabólicos tóxicos producidos por su propio metabolismo, dándose por terminada la fermentación.

Analizando la evolución de la densidad, se aprecia que todos los vinos inician la fermentación al mismo ritmo. Esta igualdad se rompe a partir del día 2 cuando los vinos suplementados con LSI-GSH adquieren una mayor velocidad de fermentación, llegando a valores más bajos de densidad al final de la misma.

Como se observó en otros trabajos (Mazuelas, 2013; Del Olmo, 2014) parece claro que de manera general la adición de LSI-GSH favorece el desarrollo de cinéticas más rápidas.

La mejora de los procesos fermentativos mediante el empleo de LSI se basa en una acción indirecta gracias a su efecto protector durante la hidratación de las levaduras secas activas, o bien en un efecto directo de estimulación de la fermentación alcohólica (Pozo-Bayón et al., 2009a).

El empleo de preparados de LSI como activadores de la fermentación alcohólica y maloláctica es posiblemente la aplicación más común de este tipo de productos. Tanto las levaduras como las bacterias implicadas en la vinificación tienen requerimientos nitrogenados básicos. *Saccharomyces cerevisiae* puede utilizar como fuentes de nitrógeno en primer lugar el amonio (NH_4^+) y una vez consumidas las reservas de éste, también pueden utilizar aminoácidos de manera muy eficiente. Un bajo nivel de compuestos nitrogenados asimilables por las levaduras ha sido asociado con una disminución en la velocidad de fermentación y un detrimento en su eficacia, que son las principales causas de las paradas de fermentación. También el etanol y otros productos del metabolismo de las levaduras durante la fermentación, como los ácidos grasos de cadena corta y media, pueden contribuir a este fenómeno.

Por otro lado, los vinos suplementados con LSI-GSH presentan cinéticas de fermentación ligeramente diferentes entre sí. Es probable que el diferente efecto de los preparados de LSI-GSH en la velocidad de fermentación sea causado por su distinta composición. La mayor parte de estas preparaciones pueden incluir la parte soluble citoplasmática de las levaduras rica en nitrógeno que favorece el desarrollo de las levaduras. Sin embargo, este efecto no se ha observado en mostos con un alto contenido en nitrógeno asimilable (300 mg/L). Por otro lado, la adición de la fracción insoluble de las levaduras puede mejorar la eficiencia de la fermentación en medios ricos en nitrógeno debido al efecto detoxificante de las paredes de levadura, ya que son capaces de adsorber metabolitos tóxicos como los ácidos grasos de cadena corta (Pozo-Bayón et al., 2009a). Además se ha descrito un mayor contenido en esteroides en estas preparaciones, lo que permitirá aumentar la permeabilidad de las membranas dando lugar a una mayor eficiencia en la fermentación (Larue et al., 1998).

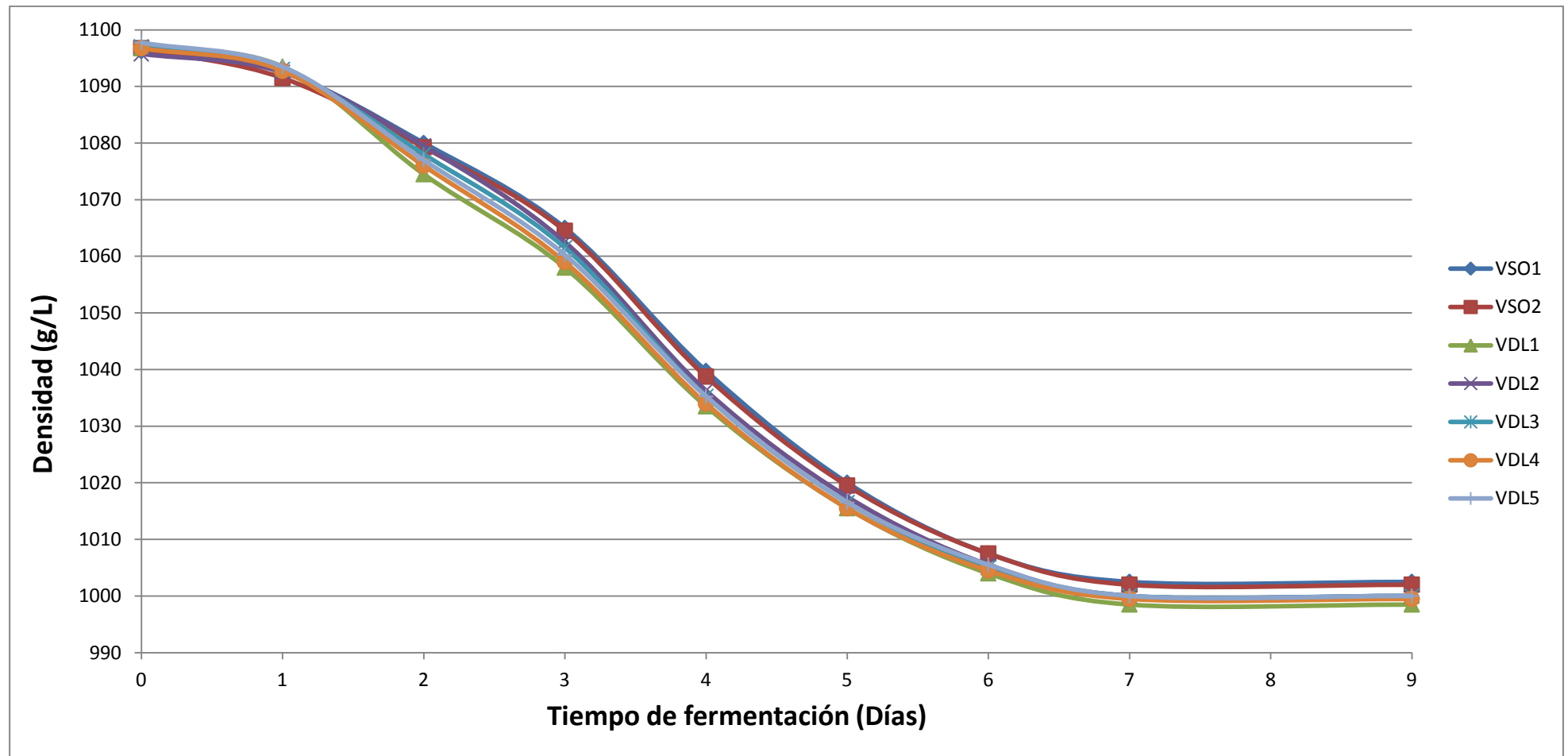


Figura 18: Cinética de fermentación de los diferentes vinos. VSO1 (Vino control elaborado con dosis habitual de SO_2); VSO2 (Vino control elaborado con baja dosis de SO_2); VDL (Vinos elaborados con distintos derivados de levadura inactivos ricos en glutatión).

5.2. Efecto de los derivados de levadura ricos en glutatión sobre los parámetros enológicos del vino fermentado.

5.2.1. Parámetros básicos.

A continuación se valorará el efecto de la reducción del nivel de SO_2 durante la vinificación y la adición de LSI-GSH sobre el valor del pH, acidez total y volátil, grado alcohólico y azúcares reductores de los vinos una vez acaba la fermentación alcohólica. En las **Fig. 19, 20, 21, 22 y 23** se muestran las medias observadas para estos parámetros, respectivamente.

El análisis de varianza de los datos analíticos mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los distintos vinos solamente para el parámetro azúcares reductores. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el pH, acidez total y volátil, y grado alcohólico.

Como puede observarse en la **Fig. 19**, ni la reducción de la dosis de SO_2 ni la adición de derivados de levadura ricos en glutatión, modificaron el pH final analizado en el vino.

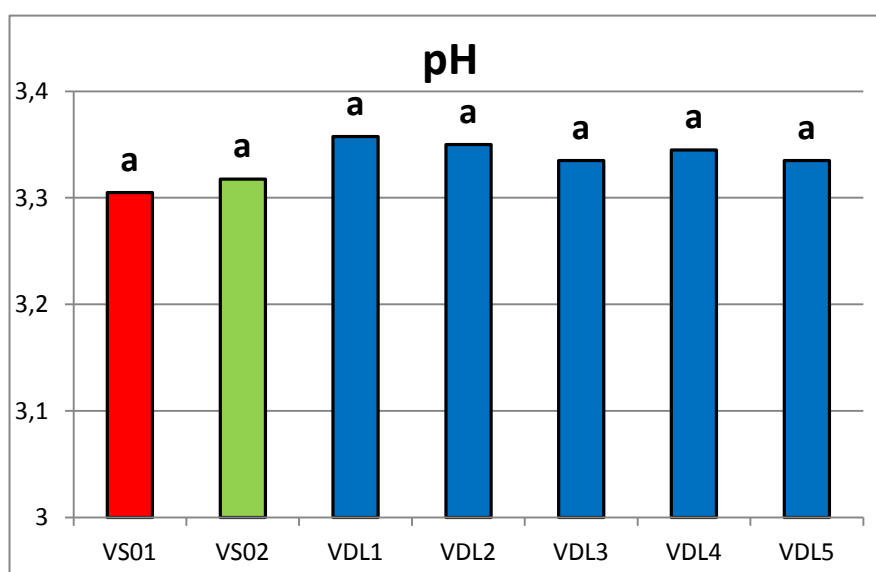


Figura 19: pH de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p > 0,05$).

Como se comentó anteriormente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las medias de acidez total y volátil (**Fig. 20 y 21**), por lo que podemos afirmar que ni la disminución de la dosis de SO_2 , ni la adición de derivados de levadura ricos en glutatión afectaron a estos parámetros.

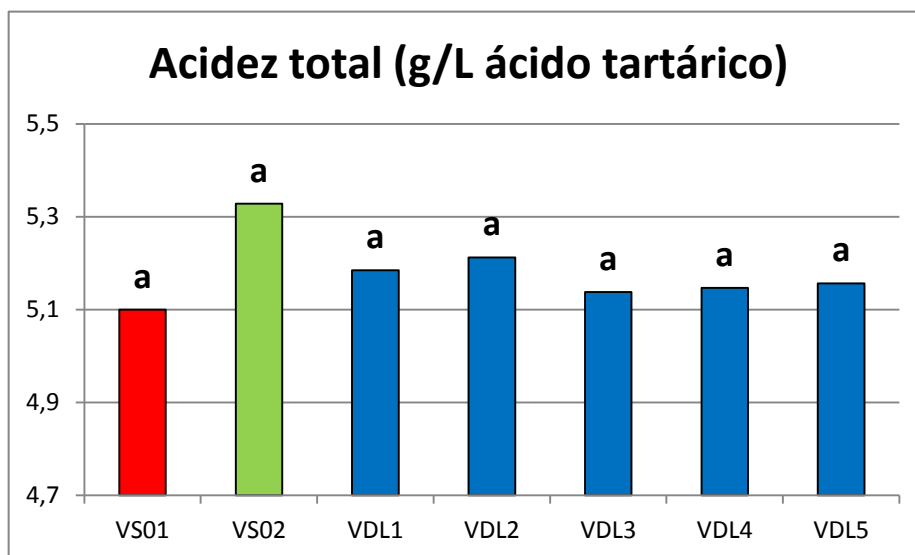


Figura 20: Acidez total de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p>0,05$).

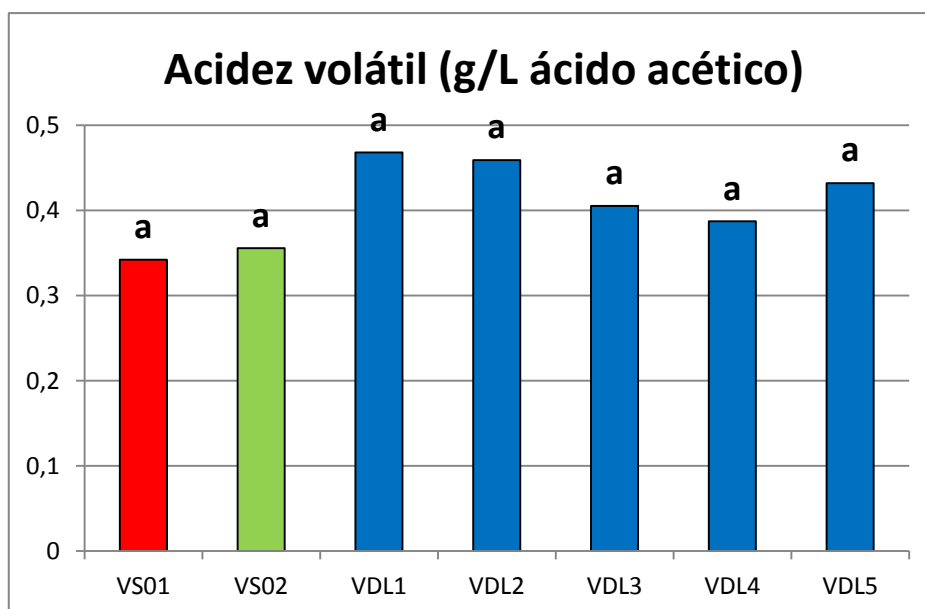


Figura 21: Acidez volátil de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p>0,05$).

Como se observa en la **Fig. 22**, todos los vinos acabaron la fermentación alcohólica con valores en azúcares reductores menores de 1,2 g/L. La disminución de la dosis de SO₂ no modificó la capacidad fermentativa de las levaduras, sí lo hizo la adición de LSI-GSH, aunque la disminución en azúcares reductores es de en torno a 0,15 g/L, cantidad que no despierta interés a nivel tecnológico.

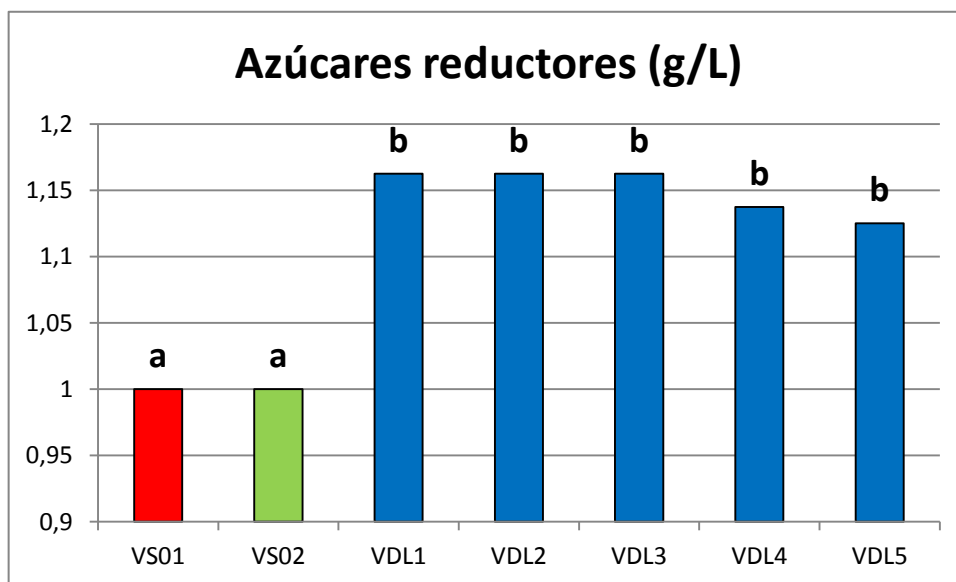


Figura 22: Azúcares reductores de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p > 0,05$).

Finalmente, ni la reducción en el nivel de SO₂, ni la adición de LSI-GSH afectó al grado alcohólico en los vinos (**Fig. 23**). A priori, se podría pensar que el mayor contenido en azúcares reductores observado en los vinos con LSI-GSH es debido a que no finalizaron sus fermentaciones alcohólicas quedando azúcares residuales sin fermentar, y resultando vinos con menor contenido alcohólico, algo que no sucedió.

Existe muy poca información sobre el efecto de la adición de LSI-GSH durante la vinificación. Recientemente, Andújar-Ortiz et al., (2012) evaluaron el papel de un preparado de LSI-GSH sobre la calidad de un vino rosado de Garnacha. Estos autores no encontraron diferencias notables entre los valores de pH, acidez total y volátil y grado alcohólico para el vino control y el vino con LSI-GSH. Otros autores han abordado el estudio de diversas preparaciones comerciales de LSI durante la vinificación de vinos tintos y blancos, y han observado que los parámetros enológicos básicos (pH, acidez total y volátil y grado alcohólico) no se veían modificados por la adición de las LSI (Barrio-Galán et al., 2012; Guadalupe et al., 2007, 2010).

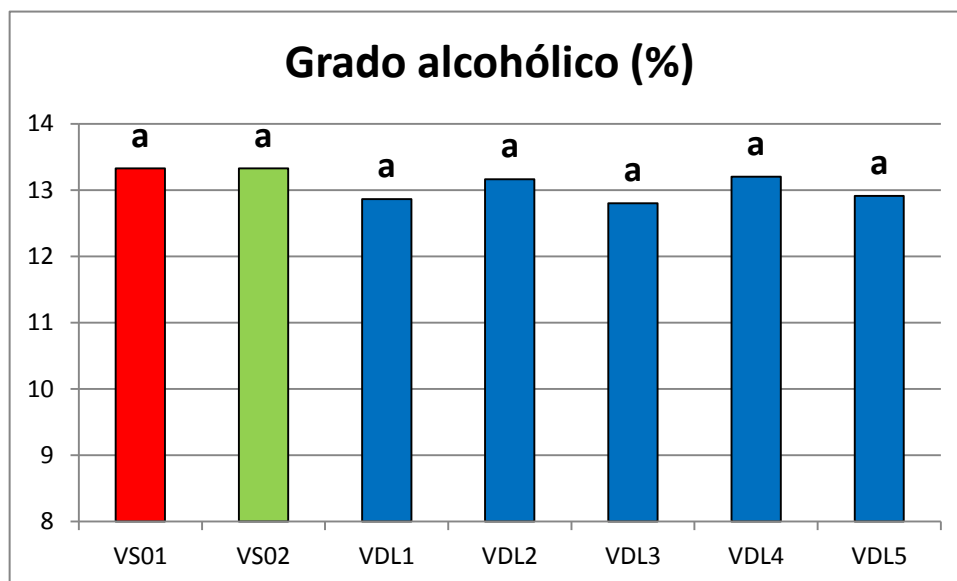


Figura 23: Grado alcohólico de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p>0,05$).

5.2.2. Compuestos fenólicos.

En la **Fig. 24** se muestra el Índice de Folín-Ciocalteu (IFC), parámetro que nos indica el contenido en polifenoles totales que presenta un vino. En este caso podemos observar diferencias estadísticamente significativas entre las medias del IFC para los distintos vinos. Por otro lado la reducción de la dosis de SO_2 empleada durante la vinificación no afectó al contenido final en polifenoles totales.

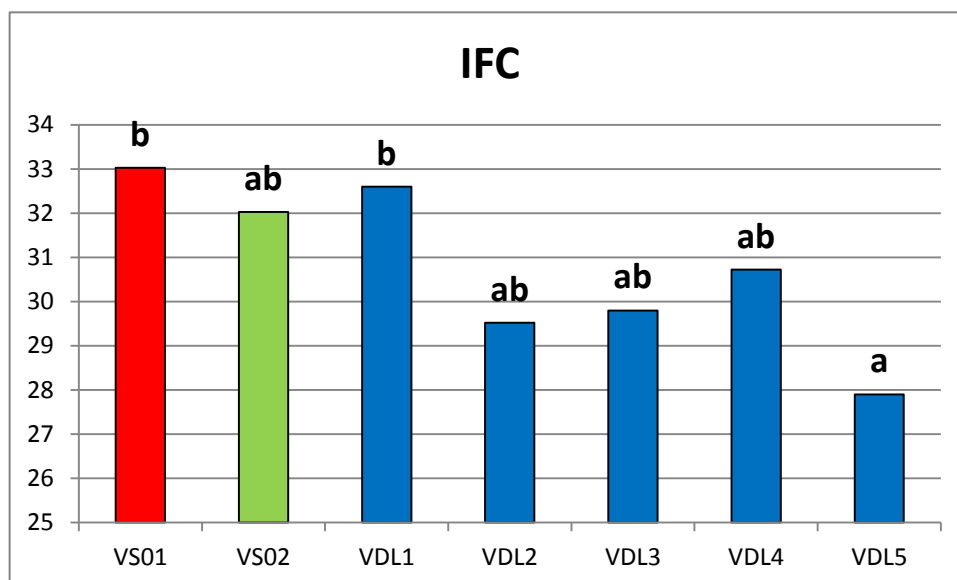


Figura 24: Índice de Folín-Ciocalteu de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p>0,05$).

A la vista de las **Fig. 24 y 25** se puede afirmar que el contenido en polifenoles descendió ligeramente en todos los vinos con LSI-GSH salvo para el VDL1, siendo este descenso más notable para el vino VDL5. Se ha observado que las LSI tienen capacidad de adsorber en su superficie polifenoles y generar complejos insolubles entre los polisacáridos de su pared celular y los polifenoles del vino (Guadalupe et al., 2007, 2008, 2010; Pozo-Bayón et al., 2009b; Barrio-Galán et al., 2011), provocando un descenso en el nivel de polifenoles totales en el vino. Por otro lado, esta disminución no podría atribuirse a un proceso de oxidación de los polifenoles ya que estos vinos (VDL2-5), además de contener los mismos niveles de SO₂ que su vino control VSO2, se les ha añadido LSI-GSH, compuesto con conocido poder antioxidante (Kritzinger et al., 2013).

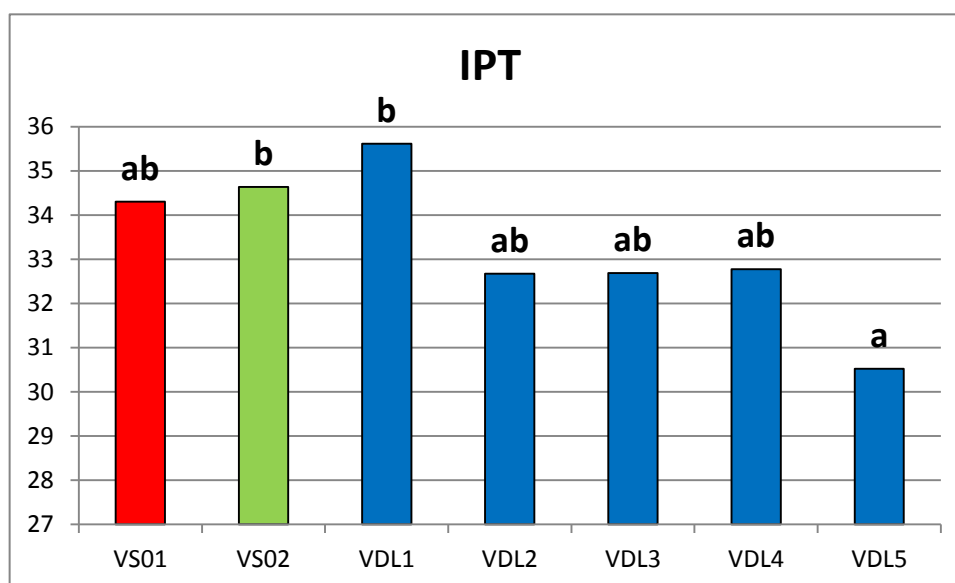


Figura 25: Índice de Polifenoles Totales de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p > 0,05$).

Se ha descrito que el uso de preparaciones de LSI-GSH modifica la composición polifenólica en vinos rosados (Andújar-Ortiz et al., 2012). Estos autores observaron un descenso en el contenido en antocianos al adicionar LSI-GSH al mosto y atribuyeron este comportamiento a los polisacáridos presentes en las LSI, los cuales podrían formar complejos insolubles entre los polisacáridos y los antocianos. Por otro lado, se ha observado que la reducción en el contenido en polifenoles totales en vinos blancos tratados con LSI después de la fermentación alcohólica dependía de la composición del preparado comercial, y en especial, del peso molecular de los polisacáridos contenidos. En concreto, únicamente se observó una reducción en el nivel de polifenoles cuando se usaban preparados de LSI con una gran riqueza en polisacáridos de alto peso molecular (47,3-404 KDa) (Barrio-Galán et al., 2012).

En cuanto a los flavonoles, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los distintos vinos (**Fig. 27**). Para ácidos hidroxicinámicos tampoco, salvo entre dos de los vinos adicionados con LSI-GSH, como son el VDL1 y VDL5 (**Fig. 26**). De modo general, el comportamiento de los ácidos hidroxicinámicos (**Fig. 25**) fue similar al presentado por el IFC e IPT. Como se comentó anteriormente para el IFC, la reducción de la dosis de SO_2 no modificó ni el nivel de los ácidos hidroxicinámicos ni el de los flavonoles. Por otro lado, el vino que presentó el menor nivel en ácidos hidroxicinámicos fue el vino VDL5, elaborado con LSI-GSH. Finalmente, el menor contenido en flavonoles se observó para el vino VDL2, aunque esta diferencia no fué estadísticamente significativa. Tal y cómo se apuntó previamente, la capacidad que presentan las paredes de las levaduras de adsorber compuestos fenólicos podría explicar el comportamiento observado para los ácidos hidroxicinámicos y flavonoles.

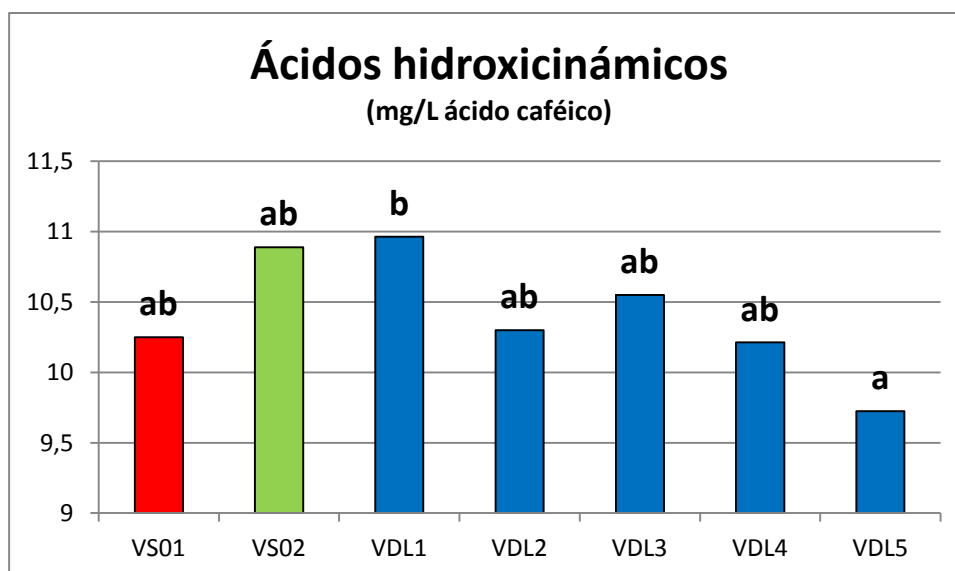


Figura 26: Ácidos hidroxicinámicos de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p > 0,05$).

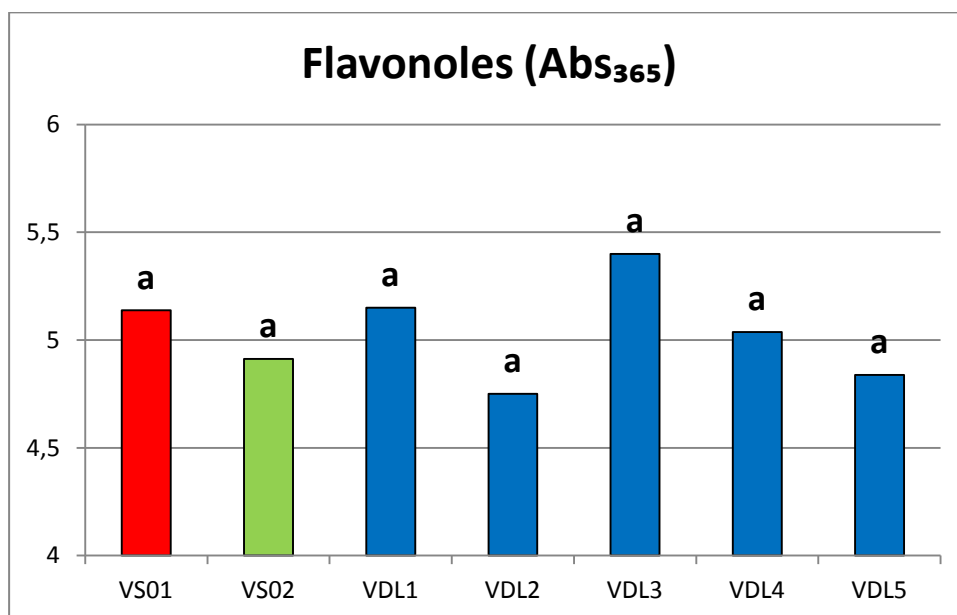


Figura 27: Flavonoles de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p > 0,05$).

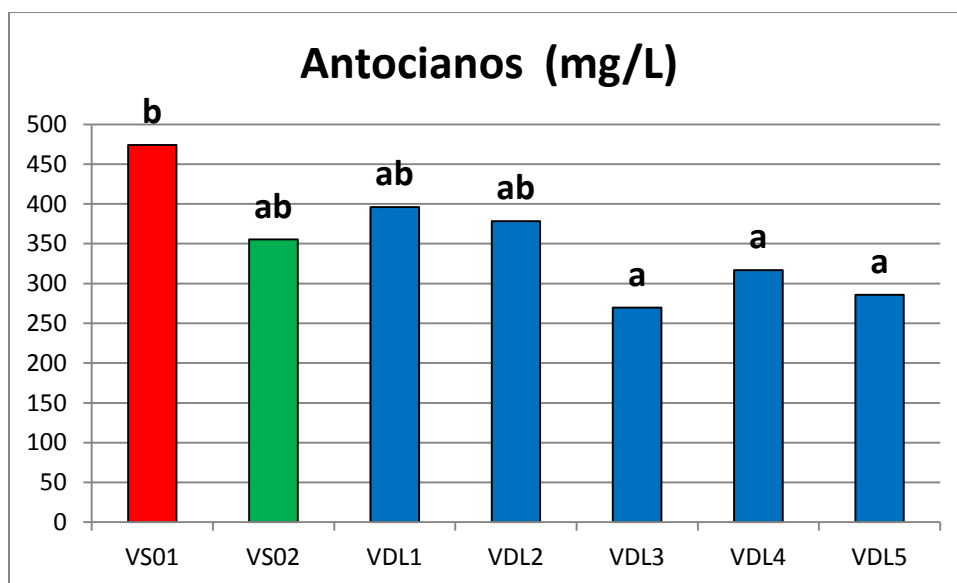


Figura 28: Antocianos de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p > 0,05$).

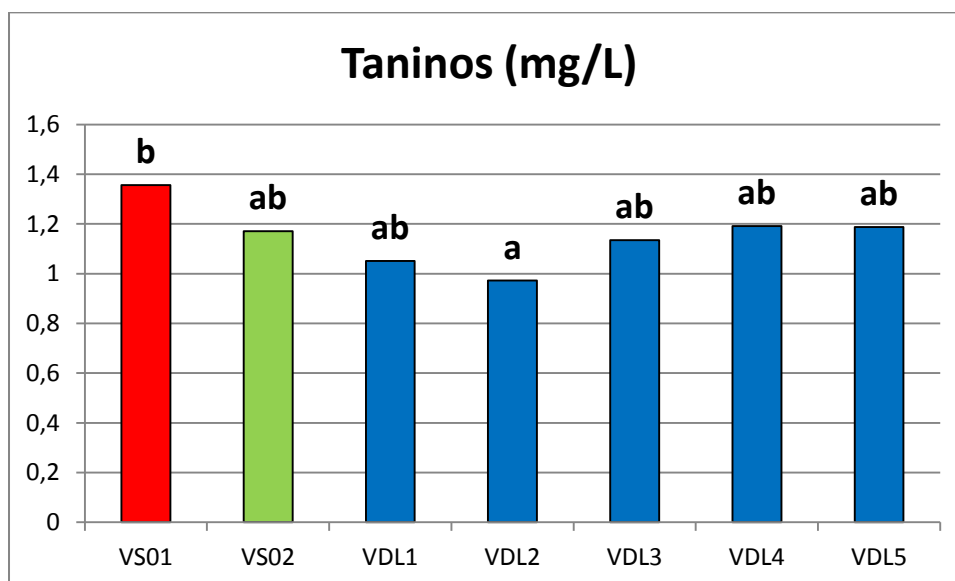


Figura 29: Taninos de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p>0,05$).

Atendiendo al nivel de antocianos y taninos presentes en los vinos (**Fig. 28 y 29**, respectivamente), la disminución del nivel de sulfuroso en los vinos control no modificó estos parámetros. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el vino VS01 y los vinos VDL3, 4 y 5 en cuanto al nivel de antocianos, y con respecto al vino VDL2 en el nivel de taninos. Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el vino control VS02, con dosis baja de sulfuroso, y los vinos con LSI-GSH para antocianos y taninos. A priori, se podría pensar que estos preparados no tienen un efecto protector frente a la oxidación de estos compuestos, pero como se comentó el poder antioxidante del GSH está más que probado (Kritzinger et al., 2013).

Cabe destacar como una explicación a este fenómeno a los polisacáridos de la pared celular presente en los preparados de LSI-GSH, estos pueden formar compuestos insolubles que reducen los niveles de antocianos y taninos (Guadalupe et al., 2007, 2010; Pozo-Bayón et al., 2009b; Barrio-Galán et al., 2012; Andújar-Ortiz et al., 2012). De esta forma, es probable, que la acción antioxidante de las LSI-GSH (que implicaría un mayor nivel de antocianos y taninos que su vino control) se encuentre compensada por la formación de compuestos insolubles con los polisacáridos.

5.2.3 Características del color.

En cuanto a los parámetros de color, tanto la intensidad colorante como el porcentaje de amarillo, rojo y azul presentan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras (**Fig. 30, 31, 32 y 33**, respectivamente). En los vinos control la reducción de la dosis de SO_2 , sí que modificó el parámetro de intensidad colorante pero no los otros tres. Así vemos como la reducción del nivel de sulfuroso incrementó

el valor IC. Es conocido el papel decolorante del sulfuroso al combinarse este con los antocianos (Ribéreau-Gayon, 2006a,b). Por otro lado, la adición de LSI-GSH tiene influencia en el color del vino. Si comparamos los vinos con derivados con el vino control VSO2, el vino VDL3 presentó altos valores para la intensidad de color y % de rojo, y bajos valores para % de amarillo y % de azul, siendo estas diferencias en algún caso estadísticamente significativas.

Del Olmo (2014), en su estudio sobre la adición de LSI-GSH en vino rosado, encontró también diferencias estadísticamente significativas para % de rojo y % de amarillo entre los vinos adicionados con LSI-GSH, y entre estos y el vino control con dosis normal de SO₂.

Se puede destacar que el vino VSO1 con dosis doble de sulfuroso tiene peores características de color tras la fermentación, al presentar una menor intensidad de color, mayor % de amarillo y menor % de rojo que el vino control con dosis reducida de SO₂ y que los vinos con LSI-GSH.

Aun así, salvo para el vino VDL3, los resultados están en consonancia con los encontrados por Andújar-Ortiz et al. (2012) que no encontraron claras diferencias entre los vinos rosado control y con LSI-GSH para los parámetros de color después de la fermentación alcohólica. En este artículo sus autores destacan la escasa relación que guardan los parámetros de color de los vinos respecto a su concentración fenólica, algo que en nuestro caso se vuelve a poner de manifiesto.

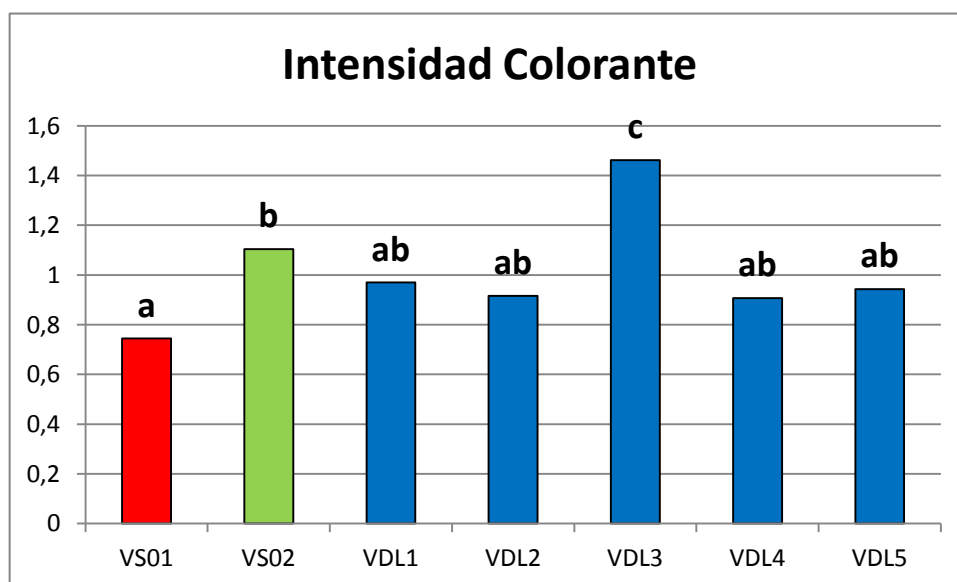


Figura 30: Intensidad Colorante de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p > 0,05$).

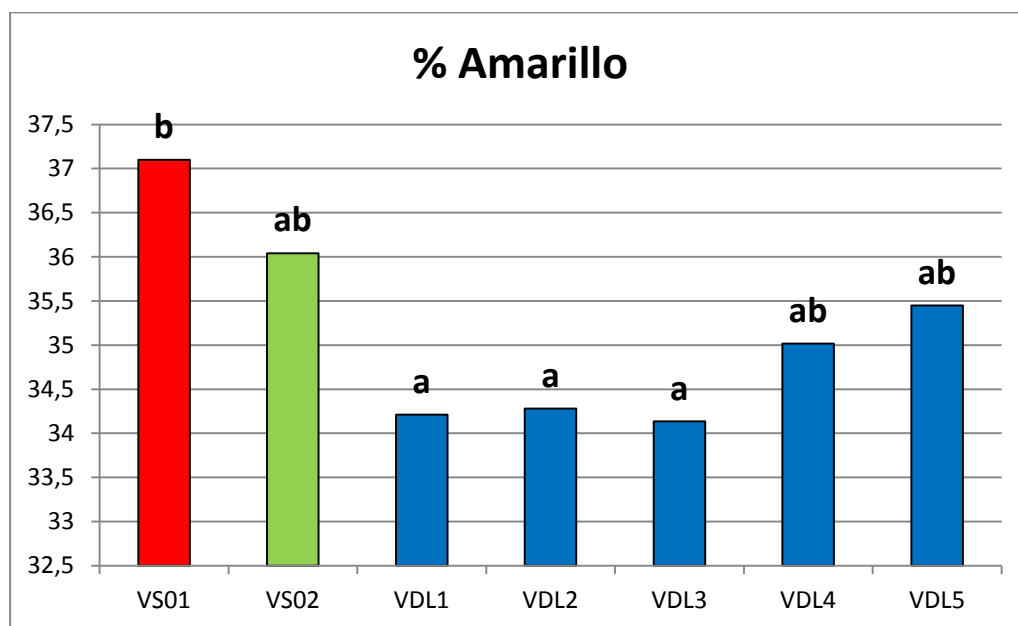


Figura 31: % Amarillo de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p > 0,05$).

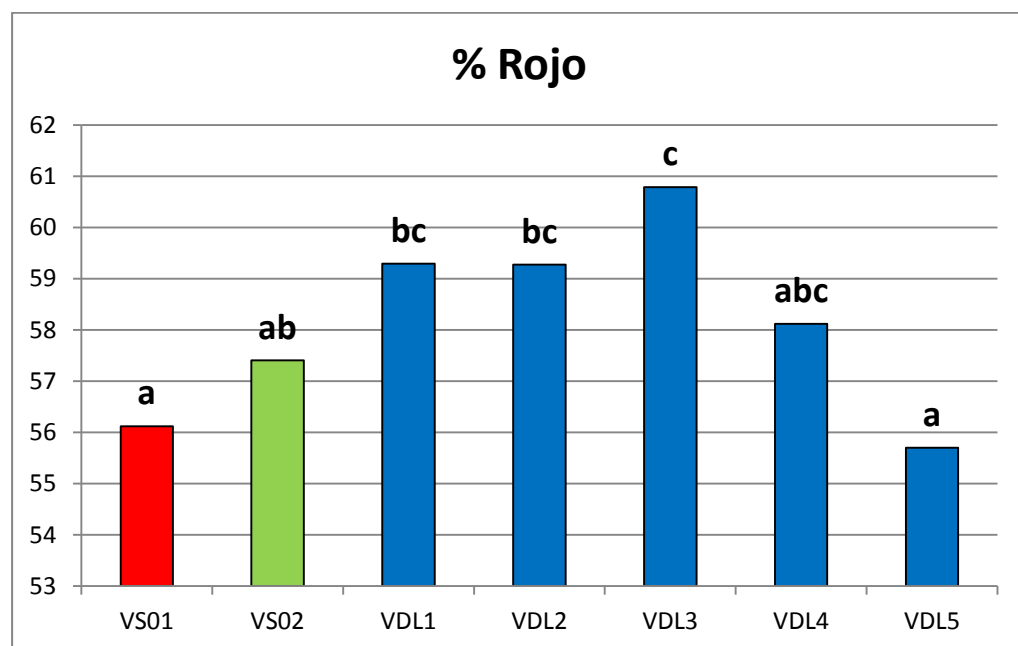


Figura 32: % Rojo de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p > 0,05$).

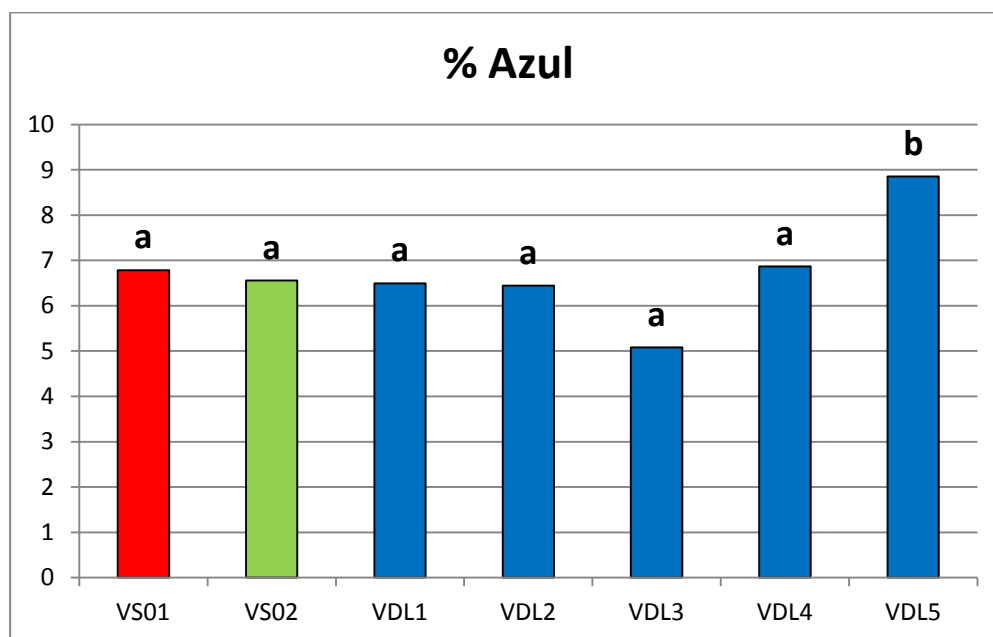


Figura 33: % Azul de los diferentes vinos después de la fermentación alcohólica. Diferentes letras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($p > 0,05$).

5.3. Estudio multivariante de la influencia de las LSI ricas en glutatión.

Con la intención de poder determinar las asociaciones entre las variables de estudio y las muestras de vinos se realizó un análisis por componentes principales (ACP). Su propósito es obtener un pequeño número de combinaciones lineales de las variables que expliquen la mayoría de la variabilidad de los datos. Para este análisis multivariante, únicamente se han empleado las variables relativas a compuestos fenólicos y color que presentaron diferencias estadísticamente significativas tras el análisis ANOVA. Se extrajeron las componentes principales cuyo autovalor fue mayor o igual a 1,0. En este caso, como se puede observar en la **Tabla 4**, se extraen 3 componentes que juntas explican el 93,2% de la variabilidad de los datos.

Tabla 4. Tabla de autovalores y porcentaje de varianza explicado de las componentes principales.

Componente (Número)	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	3,89081	43,231	43,231
2	3,46643	38,516	81,747
3	1,03394	11,488	93,235
4	0,424185	4,713	97,948
5	0,142647	1,585	99,533

Tabla 4 (Cont.). Tabla de autovalores y porcentaje de varianza explicado de las componentes principales.

6	0,041995	0,467	100,000
7	2,79134E-16	0,000	100,000
8	1,03084E-16	0,000	100,000
9	0,0	0,000	100,000

La CP1 explica el 43,2% de la varianza; su parte positiva está influenciada por valores altos de las variables: % rojo, intensidad colorante, ácidos hidroxicinámicos e índice de polifenoles totales (enumeradas de mayor a menor influencia), mientras que su parte negativa se encuentra marcada por valores altos de % amarillo, % azul, taninos, antocianos, e índice de Folin-Ciocalteu (**Tabla 5**). La CP2 explica el 38,5% de la varianza y se encuentra influenciada en su parte positiva por valores elevados de índice de Folin-Ciocalteu, índice de polifenoles totales, antocianos, ácidos hidroxicinámicos, % amarillo, taninos y % rojo, mientras que su parte negativa lo está por valores altos de % azul, e intensidad de color.

Tabla 5. Componentes principales significativas y sus pesos (coeficientes que expresan la contribución de las variables originales a las componentes principales).

Variables¹	Componente 1	Componente 2	Componente 3
TANINOS	-0,362289	0,117102	0,620939
ANTOCIANOS	-0,201673	0,427181	-0,316468
IFC	-0,0341532	0,529369	0,0608042
IPT	0,109082	0,514162	-0,0805999
AHC	0,306415	0,387544	0,0218012
IC	0,388208	-0,1284	0,547579
% AMAR.	-0,425705	0,191847	0,342342
% ROJO	0,490599	0,0263668	-0,0292238
% AZUL	-0,385358	-0,234589	-0,292778

IFC: índice de Folin- Ciocalteu; IPT: índice de polifenoles totales; AHC: ácidos hidroxicinámicos; ANTOCIANOS: antocianos; IC: intensidad colorante; % AMAR.: porcentaje de amarillo; % ROJO: porcentaje de rojo; % AZUL: porcentaje de azul.

En la **Fig. 34** se muestra el diagrama de dispersión de las muestras de vino y de las variables en función de la CP1 y CP2.

En esta podemos distinguir tres grupos, el primero formado por los dos vinos testigo, con CP2 positiva y que aunque en la gráfica se encuentren en cuadrantes diferentes en función de la CP1, se debe a la única variable que presenta una diferencia estadísticamente entre ellos, la IC, que arrastra al vino con dosis baja de SO₂ a valores positivos de la CP1. Estos vinos se caracterizan por valores altos de % amarillo, antocianos, taninos e IFC.

El segundo grupo formado por los vinos VDL1, VDL2 y VDL3, con CP1 positiva para todos ellos, se caracteriza por valores altos de % de rojo, IC y AHC.

Por último el grupo formado por los vinos VDL4 y 5, con CP1 y CP2 negativas y altos valores para % de azul.

Se observa un mejor comportamiento en cuanto a color en algunos vinos con derivados de levaduras (VDL1, 2 y 3), con valores altos de % de rojo e IC, respecto a los vinos testigos, con valores altos de % de amarillo. Esto puede deberse a la doble acción realizada por los preparados comerciales de levaduras secas inactivas ricas en glutatión, absorbiendo pigmentos oxidados por un lado y por otro, actuando como antioxidante. Este comportamiento va en consonancia con los resultados encontrados por Ortega (2015) en un estudio llevado a cabo en vino rosado donde en general los vinos adicionados con derivados de levaduras ricas en glutatión presentaron mayores valores para el % de rojo e IC.

Del Olmo (2014) también encontró que los vinos control presentan en general mayores valores de antocianos, taninos y % de Amarillo que los vinos adicionados con derivados, mientras que estos tuvieron mayor % de Rojo e IC.

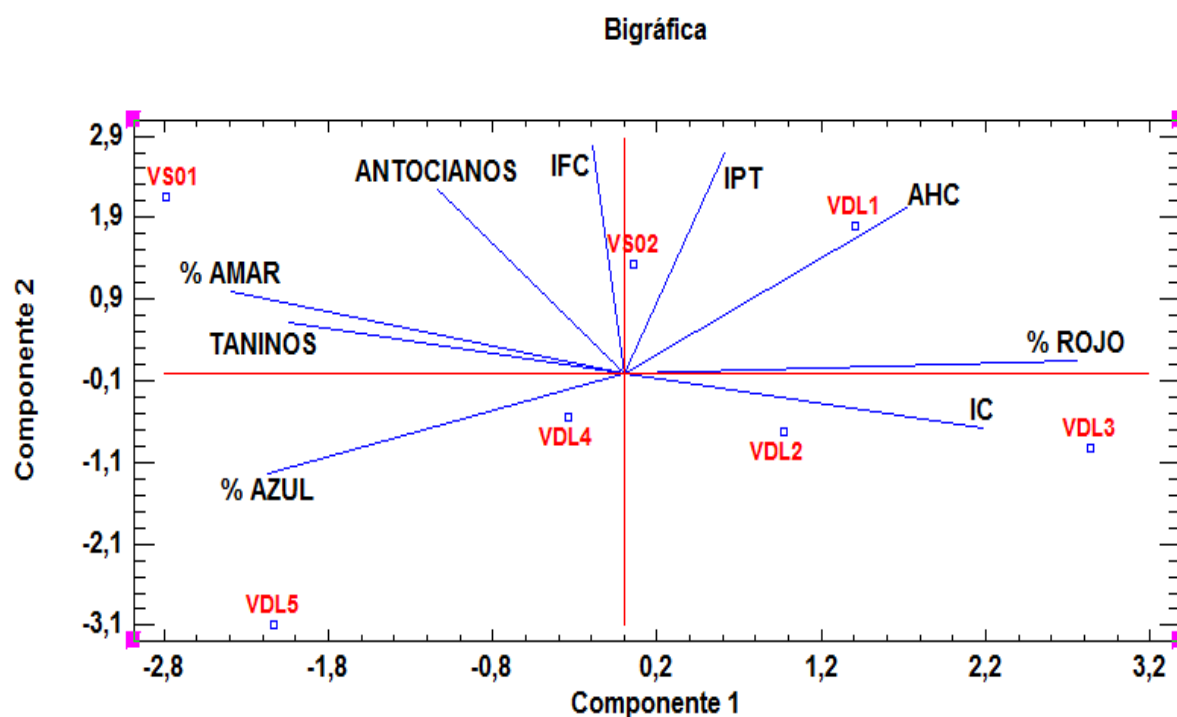


Figura 34: Diagrama de dispersión de componentes principales en función de las componentes principales 1 y 2. ACIDEZ VOL.: acidez volátil; REDUCTORES: azúcares reductores; IFC: índice de Folin-Ciocalteu; IPT: índice de polifenoles totales; AHC: ácidos hidroxicinámicos; ANTOCIANOS: antocianos; IC: intensidad colorante; % AMAR.: porcentaje de amarillo; % ROJO: porcentaje de rojo; % AZUL: porcentaje de azul.

5.4. Efecto de los derivados de levadura ricos en glutatión sobre el envejecimiento de los vinos (Test acelerado de oxidación).

Para evaluar la tendencia a la oxidación de los distintos vinos elaborados con y sin LSI-GSH se realizó un test de oxidación acelerado propuesto por Singleton y Kramling (1976). A continuación se muestran los resultados obtenidos en los análisis realizados durante los días 0, 1, 2, 4 y 7 de oxidación para antocianos, taninos, IPT, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, % amarillo, rojo y azul, respectivamente, tras el test de oxidación. Los resultados están expresados en % relativos, suponiendo el 100% el valor para después de la fermentación alcohólica (día 0).

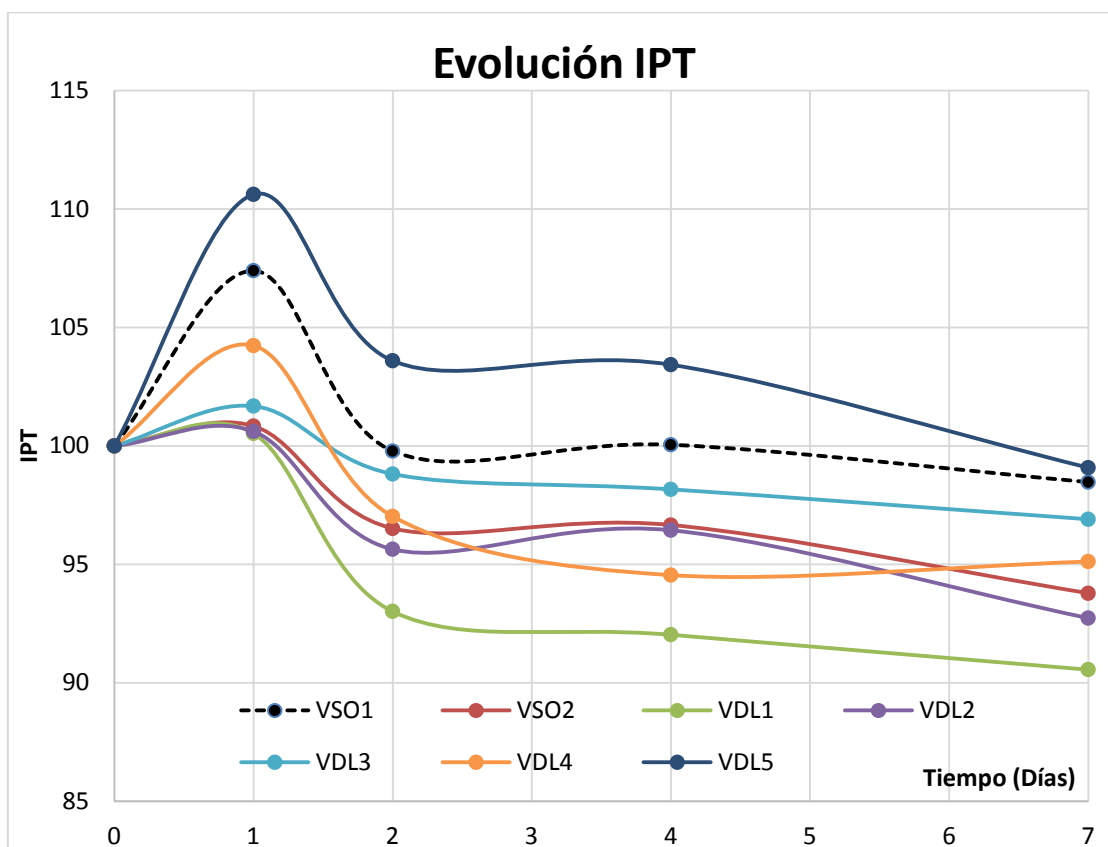


Figura 35: Evolución relativa (en %) del índice de polifenoles totales durante el test de oxidación.

Si bien es cierto que todos los vinos experimentan un aumento para el IPT en el día 1, al finalizar el test acelerado de oxidación todos presentan un descenso medio en el nivel de polifenoles totales (Fig. 35). Este fenómeno tiene explicación debido a la acción de las temperaturas elevadas que favorecen la oxidación de los vinos, conduciendo a una pérdida de compuestos polifenólicos. Fernando-Zurbano et al., (1998) contemplaron un fenómeno similar al someter un vino blanco a una temperatura de 55°C durante 8 días.

Del análisis de varianza realizado con los datos del 4º y 7º día del test de oxidación (**Tablas 6 y 7**) se determinó que no había diferencias estadísticamente significativas entre el IPT de los vinos en ninguno de los dos días.

Este fenómeno puede deberse a la adsorción de los polifenoles por las paredes de levadura, (Guadalupe et al., 2007, 2010; Pozo-Bayón et al., 2009a; Barrio-Galán et al., 2011) protegiéndolos de la oxidación y/o por la acción antioxidante del propio glutatión presente en los preparados de LSI-GSH (Kritzinger et al., 2012).

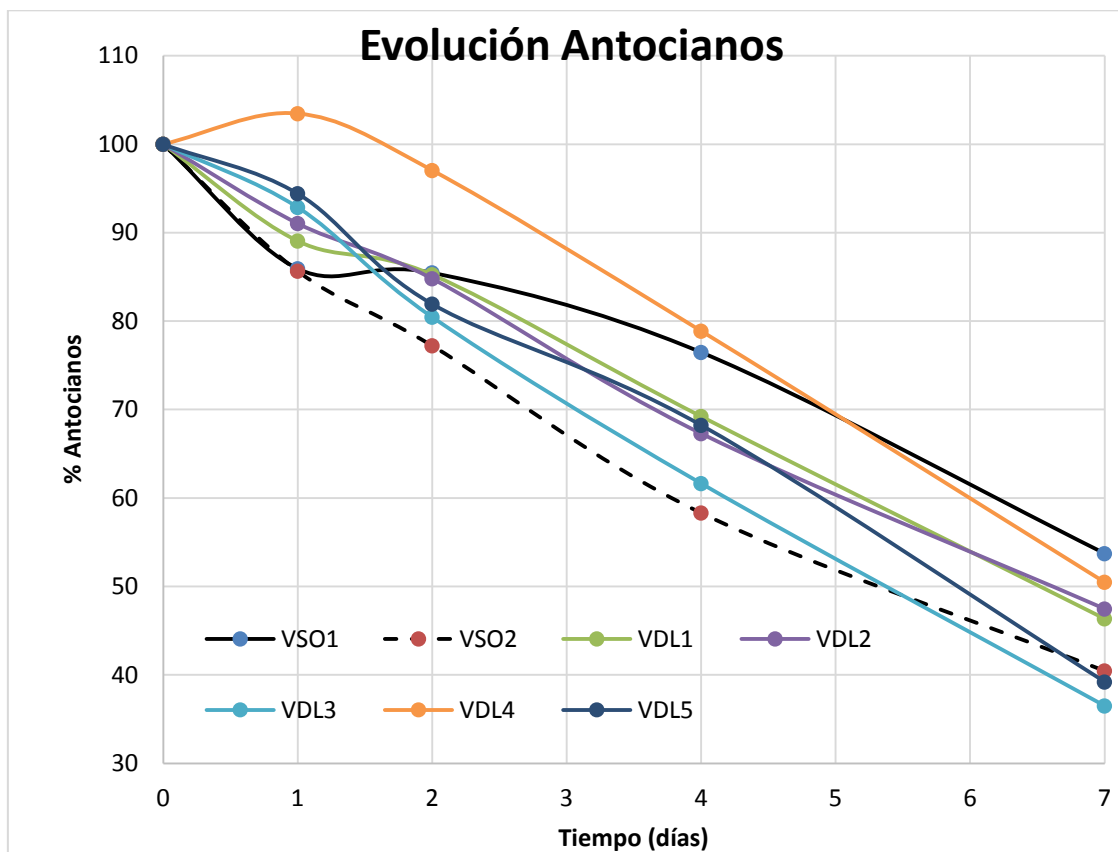


Figura 36: Evolución relativa (en %) de antocianos durante el test de oxidación.

Como se muestra en la **Fig. 36** hubo un descenso acusado para el nivel de antocianos en todos los vinos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre estos.

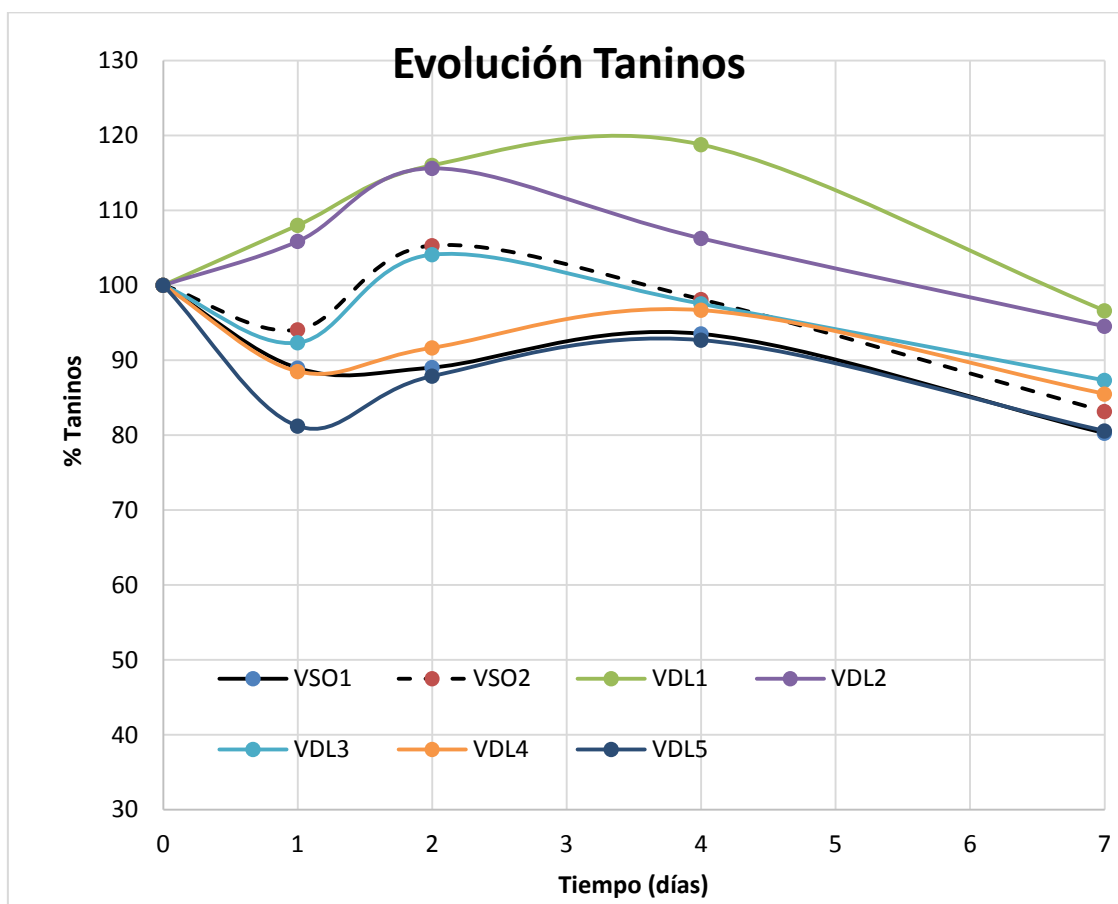


Figura 37: Evolución relativa (en %) de taninos durante el test de oxidación.

En cuanto al porcentaje del nivel de taninos también se aprecia un descenso generalizado al final del test de oxidación aunque menos acusado. En las **Tablas 6** y **7** podemos ver como el vino VDL1 presenta diferencias estadísticamente significativas frente al vino VDL5, entre los adicionados con algún tipo de derivado de levadura, y frente al vino control VSO1, tanto para el día 4 como para el 7 del test de oxidación.

Como se comentó anteriormente el tratamiento de oxidación provocó un descenso en el nivel de polifenoles totales de todos los vinos.

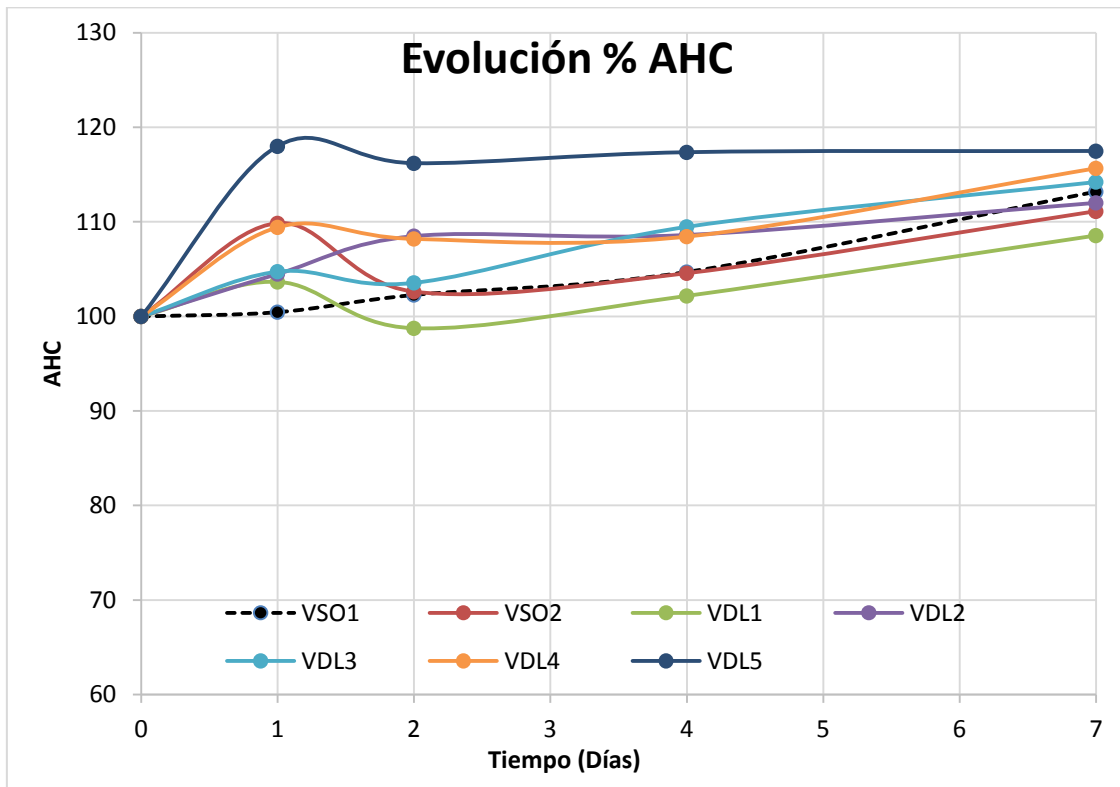


Figura 38: Evolución relativa (en %) de ácidos hidroxicinámicos durante el test de oxidación.

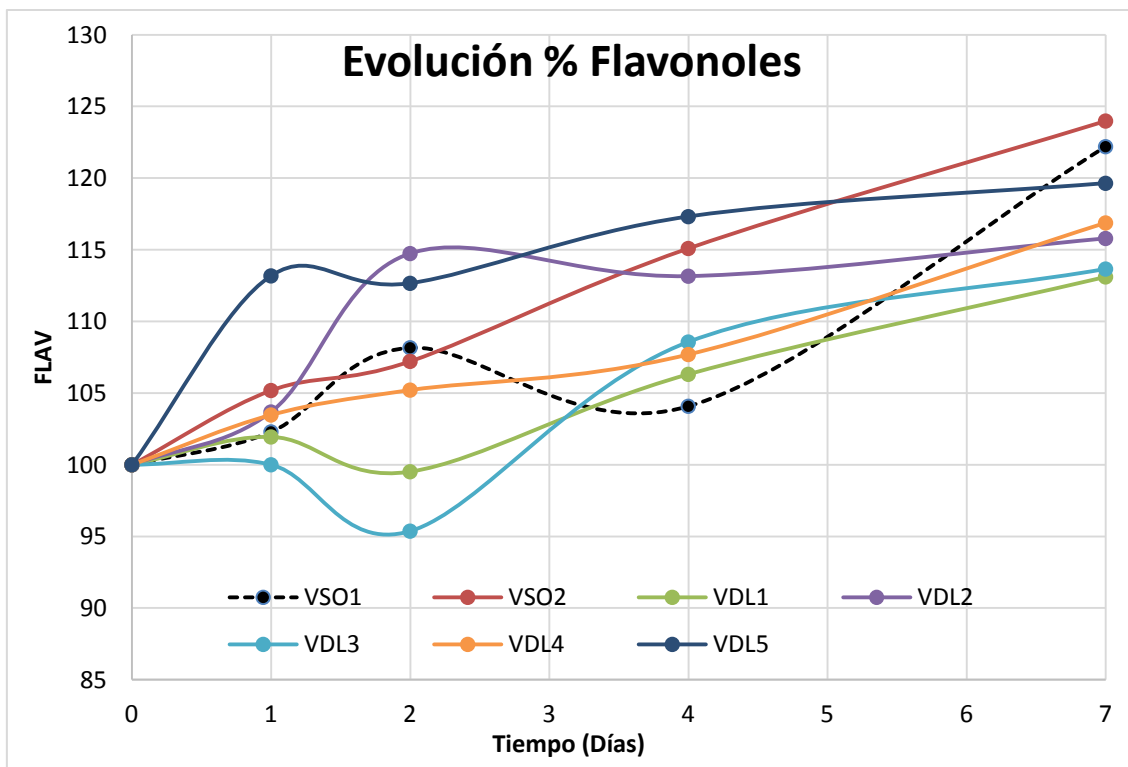


Figura 39: Evolución relativa (en %) de flavonoles durante el test de oxidación.

En todos los vinos, tanto ácidos hidroxicinámicos como flavonoles (**Fig. 38** y **39**, respectivamente), experimentaron un aumento en su porcentaje de evolución durante el test acelerado de oxidación. Probablemente, este comportamiento sea debido a la formación de compuestos oxidados con absorbancia a 320 y 365 nm.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas para el contenido en AHC el día 4 del test entre el vino control VSO1 y el vino VDL5, no las hubo entre los vinos con LSI-GSH, ni entre los vinos control. Para el día 7 no hubo diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

En cuanto al comportamiento del contenido relativo en flavonoles durante el test, el día 4 como puede observarse en la **tabla 6** no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ningún vino. El día 7 (**tabla 7**) no las hubo entre los vinos adicionados con LSI-GSH, ni entre los vinos control. Si se observan diferencias estadísticamente significativas entre los vinos control y los vinos VDL1 y VDL3.

Destacar que los vinos control son los que presentan mayor porcentaje del contenido en flavonoles el último día del test.

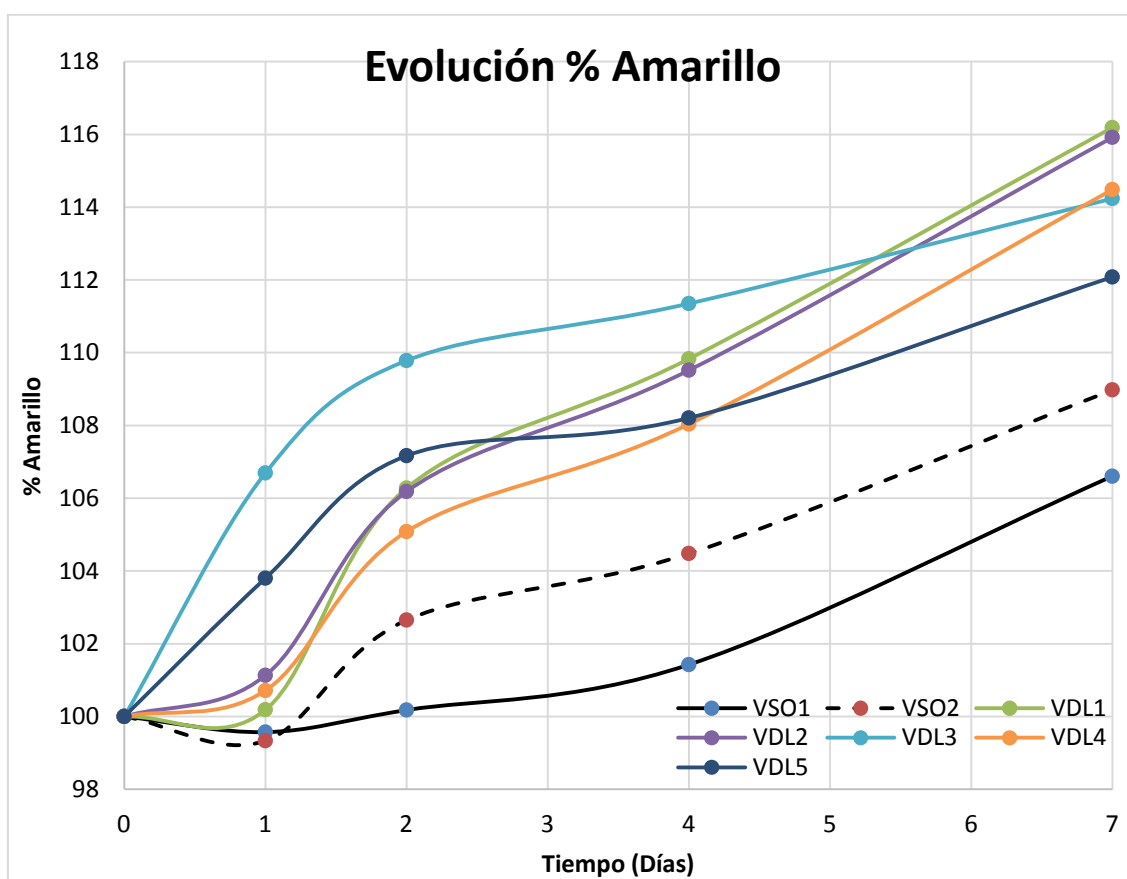


Figura 40: Evolución relativa (en %) de amarillo durante el test de oxidación.

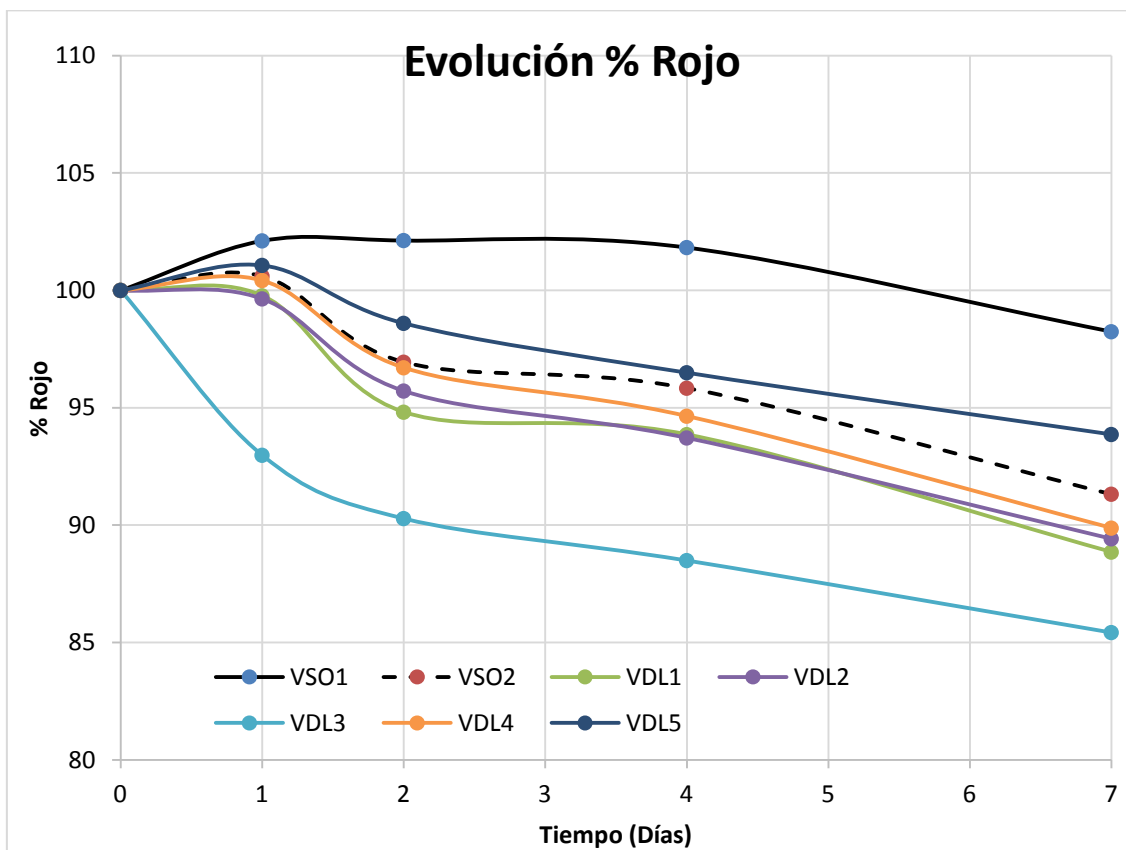


Figura 41: Evolución relativa (en %) de rojo durante el test de oxidación.

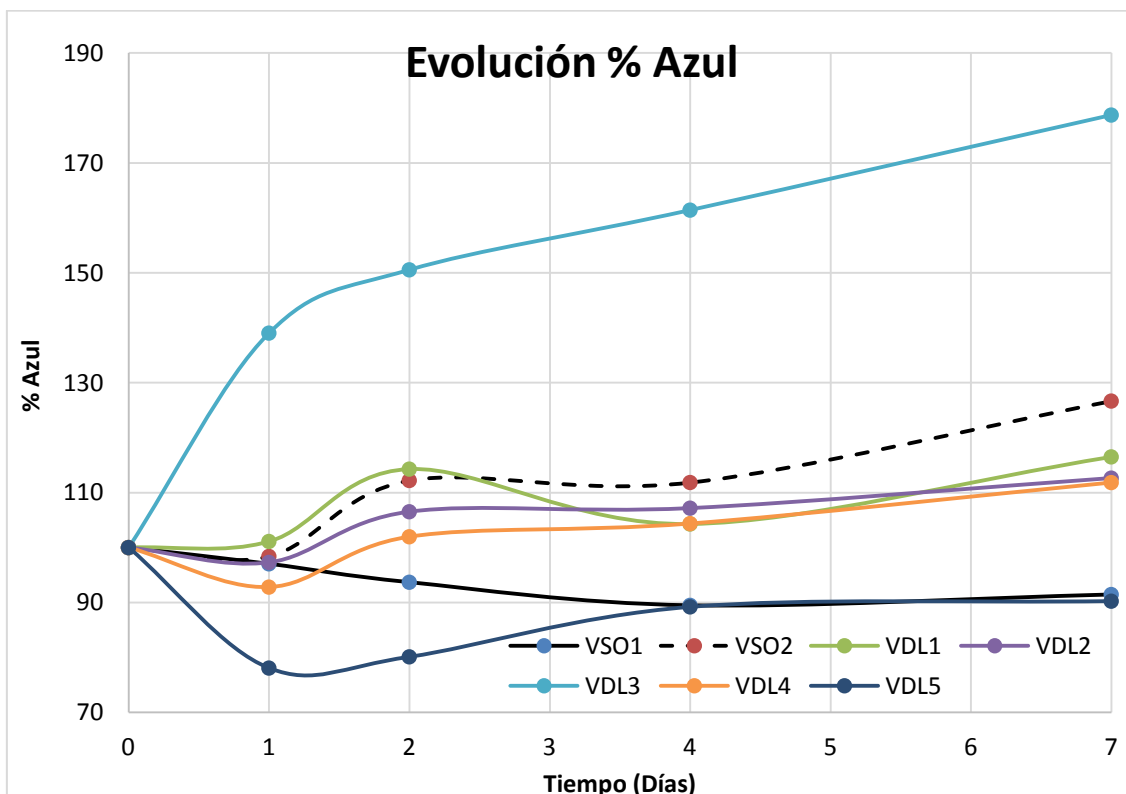


Figura 42: Evolución relativa (en %) de azul durante el test de oxidación.

En cuanto al color de los vinos, todos los vinos experimentaron un aumento del porcentaje de amarillo al final del test y un descenso del porcentaje de rojo. Este fenómeno es normal debido a que la exposición prolongada de un vino a un tratamiento térmico en presencia de oxígeno, produce que los compuestos fenólicos se oxiden a coloraciones amarillas, pudiendo polimerizarse y precipitar disminuyendo su contenido total (Schneider, 1998).

El porcentaje de azul aumentó para todos salvo para el vino control VSO1 y el vino con el derivado VDL5, para los que descendió.

Así cabe destacar que el vino VDL3 ha sido el que en general presentó peores parámetros de color, al tener los valores más altos para amarillo y azul, y más bajos para rojo. Los vinos que mejor se comportaron fueron el control VSO1 y el adicionado con el derivado de levadura VDL5.

En el día 4 del test no existen diferencias estadísticamente significativas para la variable % de rojo entre los vinos VDL y su vino control VSO2, excepto para el vino VDL3. Si hay diferencias estadísticamente significativas en el día 4 entre los dos vinos control para las tres variables de %, comportándose el vino VSO1 mejor en todos los casos. Para el último día del test de oxidación, en la **tabla 7**, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los vinos control y los adicionados con LSI-GSH para el % de amarillo y % rojo, presentando los primeros una mejor conservación del color.

Tabla 6. Características fenólicas y cromáticas de los vinos sometidos al tratamiento térmico durante 4 días.

VINO	% ANTOCIANOS		% TANINOS		% IPT		% AHC		% FLAV		% AMARILLO		% ROJO		% AZUL	
VSO1	76,4652	a	93,5139	a	93,025	a	97,4	a	104,075	a	101,35	a	101,875	c	89,225	a
VSO2	58,3128	a	98,1007	ab	96,625	a	104,575	ab	115,1	a	104,6	b	95,85	b	111,075	b
VDL1	69,2265	a	118,767	b	92,05	a	102,15	ab	106,325	a	109,875	cd	93,85	b	104,175	ab
VDL2	67,2832	a	106,262	ab	96,45	a	108,65	ab	113,15	a	109,45	cd	93,675	b	107,95	ab
VDL3	61,6383	a	97,5298	ab	98,175	a	109,475	ab	108,575	a	111,5	d	88,475	a	160,775	c
VDL4	78,8674	a	96,6748	ab	94,525	a	108,425	ab	107,675	a	108,075	c	94,675	b	103,875	ab
VDL5	68,2236	a	92,677	a	103,425	a	117,375	b	117,325	a	108,325	c	96,5	b	88,725	a

Tabla 7. Características fenólicas y cromáticas de los vinos sometidos al tratamiento térmico durante 7 días.

VINO	% ANTOCIANOS		% TANINOS		% IPT		% AHC		% FLAV		% AMARILLO		% ROJO		% AZUL	
VSO1	53,7148	a	80,2566	a	98,45	a	113,175	a	122,2	bc	106,5	a	98,275	e	91,225	a
VSO2	40,4557	a	83,1544	ab	93,775	a	111,125	a	124,0	c	109,075	a	91,325	c	125,8	b
VDL1	46,3536	a	96,5961	b	90,55	a	108,55	a	113,1	a	116,25	c	88,825	b	116,4	b
VDL2	47,4566	a	94,5328	ab	92,725	a	112,025	a	115,8	ab	115,85	c	89,375	b	113,475	b
VDL3	36,4964	a	87,3083	ab	96,925	a	114,2	a	113,675	a	114,35	bc	85,375	a	178,025	c
VDL4	50,4834	a	85,4826	ab	95,125	a	115,65	a	116,875	abc	114,525	bc	89,9	b	111,3	b
VDL5	39,2037	a	80,5533	a	99,075	a	117,475	a	119,625	abc	112,225	b	93,85	d	89,775	a

5.5. Estudio multivariante de la influencia del tipo de derivado de levadura rico en glutatión sobre el envejecimiento de los vinos.

Con la intención de poder comparar las distintas concentraciones de las variables básicas en los distintos vinos, y una mejor comprensión de los resultados al 4º día del test acelerado de oxidación, realizamos este análisis de componentes principales (CP) cuyo propósito es obtener un pequeño número de combinaciones lineales de las variables que explican la mayoría de la variabilidad de los datos y ver las relaciones existentes entre las muestras y las variables. Para este estudio únicamente se han empleado las variables que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias tras el análisis de varianza.

Se extrajeron las componentes principales cuyo autovalor fue mayor o igual a 1,0. En este caso, como se puede observar en la **Tabla 8**, se extraen 2 componentes que juntas explican el 83,1% de la variabilidad de los datos. La CP1 recoge el 57,49% de la variabilidad de los datos, mientras que la CP2 el 25,59%.

Tabla 8. Tabla de autovalores y porcentaje de varianza explicado de las componentes principales.

Componente Número	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	2,87465	57,493	57,493
2	1,27938	25,588	83,081
3	0,80597	16,119	99,200
4	0,0298354	0,597	99,797
5	0,0101661	0,203	100,000

Tabla 9. Componentes principales significativas y sus pesos (coeficientes que expresan la contribución de las variables originales a las componentes principales).

Variables¹	Componente 1	Componente 2
TANINOS (%)	0,193534	0,762704
AHC (%)	0,311102	-0,644211
% AMAR	0,561546	0,0313092
% ROJO	-0,582007	-0,041164
% AZUL	0,460102	0,0244876

TANINOS (%): porcentaje de taninos; AHC (%): porcentaje de ácidos hidroxicinámicos; % AMAR.: porcentaje de amarillo; % ROJO: porcentaje de rojo; % AZUL: porcentaje de azul.

En la **Fig. 43** se pueden diferenciar dos grupos en función de la componente principal 1. Con valores negativos de esta tenemos los vinos control y el vino VDL5, con valores positivos todos los demás. Los vinos control y el vino VDL5 presentarían un mayor porcentaje de color rojo y menores de azul y amarillo, características que hacen que sean vinos con mejor comportamiento a la oxidación en cuanto a su color. Frente a esto los demás, que a pesar de presentar peor características de color, presentan mejores valores para el porcentaje de taninos y de ácidos hidroxicinámicos.

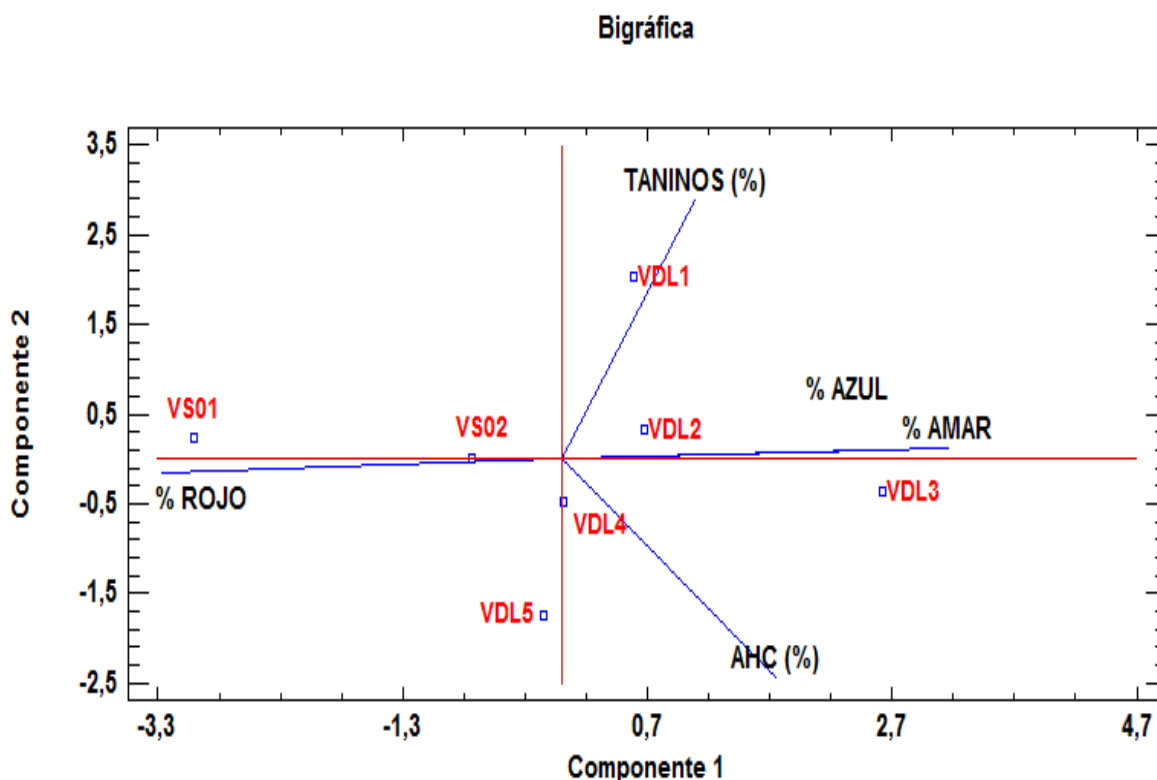


Figura 43: Diagrama de dispersión de componentes principales en función de las componentes principales 1 y 2. TANINOS (%): porcentaje de taninos; AHC (%): porcentaje de ácidos hidroxicinámicos; % AMAR.: porcentaje de amarillo; % ROJO: porcentaje de rojo; % AZUL: porcentaje de azul.

Tras realizar el test de oxidación, trabajar con los datos y analizarlos, se observan que los vinos control presentan un mejor comportamiento durante el test de oxidación. Estos vinos conservan mejores cualidades de color aunque una peor evolución para el porcentaje de taninos y ácidos hidroxicinámicos.

Al contrario de lo observado por Del Olmo (2014) en vinos rosados, en este estudio con vinos tintos las diferencias estadísticamente significativas sí se dan en los parámetros de color. No obstante, nuestro estudio presenta resultados coincidentes con los encontrados por este autor, donde los vinos con LSI-GSH presentan valores más altos para los % relativos de taninos y ácidos hidroxicinámicos. Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en vinos blancos (Mazuelas, 2013), los vinos suplementados con LSI-GSH presentaron un mejor comportamiento durante el test de oxidación, ya que presentaron un menor nivel de pardeamiento.

Cabe destacar que los resultados tras el test acelerado de oxidación van en consonancia con los encontrados recientemente por Ortega (2015) en vinos rosados. En su caso los vinos con derivados de levadura también presentan en general mejores parámetros de color tras la fermentación que los vinos testigo, pero peores tras el test acelerado de oxidación, con altos % de azul y amarillo. Esto puede ser debido a que en primera instancia los derivados de levaduras inactivas ricas en glutatión, actúen como se indicó anteriormente, como antioxidante y a su vez reteniendo en su

superficie los pigmentos oxidados que se pudieran formar antes del embotellado. Pero una vez que el vino es sometido a un tratamiento agresivo para evaluar su comportamiento a la oxidación, estos derivados pierdan su función adsorbente al degradarse por el tratamiento térmico, liberando los compuestos oxidados que retenían en su superficie, con lo que se incremente su % de amarillo y la coloración del vino resulte peor que en los vinos testigo.

Como consecuencia de estos resultados, creo conveniente llevar a cabo más trabajos de investigación en posteriores vendimias para poder concretar y tratar de esclarecer el efecto de los LSI-GSH en la vinificación y posterior envejecimiento de vinos tintos.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos del uso de las levaduras secas inactivas ricas en glutatión (LSI-GSH) en la vinificación de vinos tintos podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Sobre la cinética de fermentación:

- Parece claro que la adición de LSI-GSH favorece el desarrollo de cinéticas más rápidas.

2. Sobre los parámetros enológicos del vino fermentado, se pueden destacar los siguientes aspectos:

En cuanto a los parámetros generales:

- La reducción del nivel de SO₂ no modificó la composición básica de los vinos.
- La adición de LSI-GSH no modificó notablemente los valores de pH, acidez total y volátil, grado alcohólico y azúcares reductores.

En cuanto a los compuestos fenólicos:

- La reducción de la dosis de SO₂ empleada durante la vinificación no afectó al contenido final en polifenoles totales.
- Se puede afirmar que el contenido en polifenoles descendió en todos los vinos con LSI-GSH salvo para el VDL1, siendo más notable este descenso para el vino VDL5.
- En cuanto al nivel de antocianos y taninos, el vino control VSO1 presentó los mayores niveles en estos parámetros. Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el vino control VSO2 y los vinos con LSI-GSH.

En cuanto a las características cromáticas:

- Se puede destacar que el vino VSO1 tiene las peores características de color tras la fermentación, al presentar una baja intensidad de color, mayor % de amarillo y menor % de rojo que el vino control con dosis reducida de SO₂ y que los vinos con LSI-GSH.
- La adición de LSI-GSH tiene influencia en el color del vino, obteniéndose en general vinos con mejores características cromáticas. El vino VDL3 presentó los mayores valores para la intensidad de color y % de rojo, y los menores valores para % de amarillo y % de azul, siendo estas diferencias en algún caso estadísticamente significativas.

3. Sobre el envejecimiento del vino se pueden destacar los siguientes aspectos:

- El tratamiento de oxidación provocó un descenso en el nivel de los compuestos fenólicos, a excepción de los compuestos con absorbancia a 320 y 365 nm.
- En cuanto al color de los vinos, todos los vinos experimentaron un aumento del porcentaje de amarillo al final del test y un descenso del porcentaje de rojo.
- Cabe destacar que el vino VDL3 ha sido el que presentó de manera general peores parámetros en cuanto a color, al tener los valores más altos para amarillo y azul, y más bajos para rojo. Los vinos que mejor se comportaron fueron el control VSO1 y el adicionado con el derivado de levadura codificado como VDL5.
- A diferencia de lo observado en los vinos tras el embotellado, los vinos control presentan en general una mejor conservación del color tras el test acelerado de oxidación.

Como conclusión general, no existen suficientes evidencias que nos permitan afirmar que la adición de LSI-GSH puede disminuir la evolución oxidativa de los vinos tintos durante su almacenamiento, si bien parece que ayudan a conservar el color tras la fermentación del vino. No sabemos qué ocurriría en condiciones normales de oxidación en bodega, por lo que son necesarias más investigaciones para poder corroborar estos resultados, y ver su efecto sobre la calidad del vino durante su envejecimiento en botella.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.O. & Liyanage, C. (1993). **Glutathione increases in grape berries at the onset of ripening**. American Journal of Enology & Viticulture, 44 (3): 333-338.
- Alexandre, H., Costello, P. J., Remize F., Guzzo, J., & Guilloux-Benatier, M. (2004). **Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni interactions in wine: current knowledge and perspectives**. International Journal of Food Microbiology, 26: 235 - 240.
- Anderson, M. E., (1998). **Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation**. Chemico-Biological Interactions. 112, 1-14.
- Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Ramentos, R.M., Buxaderas, S. y de la Torre-Boronat, M.C. (1997). **Influence of Variety and Aging on Foaming Properties of Cava (Sparkling Wine)**. 2. Journal Agricultural and Food Chemistry, 45, 2520-2525.
- Andújar-Ortiz, I. Pozo-Bayón, M. A., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J. & Rodríguez-Bencomo, J. J., (2011). **Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography–Fluorescence detection for the analysis of glutathione and its precursor γ -glutamyl cysteine in wines and model wines supplemented with oenological inactive dry yeast preparations**. Food Analysis Methods, 5, I 154-161.
- Andújar-Ortiz, I. Pozo-Bayón, M. A., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J. & Garrido, I., (2012). **Effect of using glutathione-enriched inactive dry yeast preparations on the phenolic composition of rosé Grenache wines during winemaking**. Journal Science de la Vigne et du Vin, 46, 241-251.
- Barrio-Galán, R., Perez-Magarino, S., Ortega-Heras, M. (2012). **Polysaccharide characterization of commercial dry yeast preparations and their effect on white and red wine composition**. Food Science and Technology, 48, 2, 215-223.
- Beker, M. J., Blumbergs, E.J., Ventina, E. J., & Rapoport A. I. (1984). **Characteristics of cellular membranes at rehydrated of rehydration of dehydrated yeast Saccharomyces cerevisiae**. Applied Microbiology and Biotechnology, 19: 347 - 352.
- Betés-Saura, C., Andrés-Lacueva, C. y Lamuela-Raventós, R.M. (1996). **Phenolic in white free run juice and wines from Penedès by high-performance liquid chromatography: changes during vinification**. Journal Agricultural and Food Chemistry, 44, 3040-3046.
- Bornet A., Teissedre & P. L. (2008). **Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines**. European Food Research & Technology, 226: 681 - 689.
- Boulton, R. B.; Singleton, V. L.; Bisson, L. F.; Kunkee, R. E. (1996). **Principles and Practices of Winemaking**. Boulton, R. B., Ed.; Chapman and Hall: New York.

- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (2001). **Principles and Practices of Winemaking (Chinese trans.)**. Beijing: China Light Industry Press.
- Bradshaw, M. P., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2001). **Ascorbic acid induced browning of (+)-catechin in a model wine system**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(2), 934–939.
- Bradshaw, M. P., Cheynier, V., Scollary, G. R., & Prenzler, P. D. (2003). **Defining the ascorbic acid crossover from anti-oxidant to pro-oxidant in a model wine matrix containing (+)-catechin**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(14), 4126–4132.
- Bradshaw, M. P., Scollary, G. R., & Prenzler, P. D. (2004). **Examination of the sulfur dioxide-ascorbic acid anti-oxidant system in a model white wine matrix**. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84(4), 318–324.
- Buglione, M., & Lozano, J. (2002). **Nonenzymatic browning and chemical changes during grape juice storage**. Journal of Food Science, 67(4), 1538–1543.
- Caridi, A. (2002). **Protective agents used to reverse the metabolic changes induced in wines yeasts by concomitant osmotic and thermal stress**. Letters in Applied Microbiology, 35, 98 - 1001.
- Caridi, A. (2007). **New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity**. International Journal of Food Microbiology, 120: 167 - 172.
- Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T., & Gunata, Z. (2007). **Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains**. Food Chemistry, 100: 22 - 30.
- Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., & Voilley, A. (2005). **Sorption of wine volatile phenols by yeast lees**. Food Chemistry, 91: 39 - 44.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., & Boidron, J.N. (1995). **The influence of *Brettanomyces / Dekkera* sp yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines**. American Journal of Enology and Viticulture, 46: 463 - 468.
- Cheynier, V., Basire, N., & Rigaud, J. (1989). **Mechanism of transcaffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37(4), 1069–1071.
- Cheynier, V., Fulcrand, H., Guyot, S., Oszmianski, J., & Moutounet, M. (1995). **Reactions of enzymically generated quinones in relation to browning in grape musts and wines**. C. Y. Lee & J. R. Whitaker (Eds.). Enzymatic browning and its prevention. ACS Symposium Series, 600, 130–143.

- Cheynier, V., Fulcrand, H., & Moutounet, M. (2000). **Ossidazione dei polifenoli nei mosti d'uva (Oxidation of polyphenols in wine musts)**. Vignevini, Italie, 27(11), 52–56.
- Choe, E., & Min, D. B. (2005). **Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods**. Journal of Food Science, 70(9), R142–R159.
- Clark, A. C., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2003). **The role of copper (II) in the bridging reactions of (+)-catechin by glyoxylic acid in a model white wine**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(21), 6204–6210.
- Comuzzo, P., Tat, L., Tonizzo, A., & Battistutta, F. (2006). **Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility**. Food Chemistry, 99: 217 - 230.
- Costello, P.J., & Henschke, P.A. (2002). **Mousy off-flavor of wine: Precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2 -ethyltetrahydropyridine, 2 -acetyltetrahydropyridine, and 2 - acetyl- 1 -pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 7079 - 7087.
- Danilewicz, J. C. (2003). **Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper**. American Journal of Enology and Viticulture, 54(2), 73-85.
- Danilewicz, J. C. (2007). **Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper**. American Journal of Enology and Viticulture, 58(1), 53-60.
- Danilewicz, J.C., Secombe, J.T., Whelan, J. (2008). **Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfur Dioxide in Model Wine and Wine**. American Journal of Enology & Viticulture, 59 (2): 128-136.
- Del Álamo, M., Nevares, I., & Cárcel, L. M. (2006). **Redox potential evolution during red wine aging in alternative systems**. Analytica Chimica Acta, 563(1-2), 223-228.
- Del Olmo, A. (2014). **Efecto de la adición de levaduras inactivas ricas en glutatión sobre la calidad de vinos rosados**. Proyecto fin de carrera. Universidad de Valladolid.
- Doco, T., Patrick, V., Cheyner, V. & Moutonnet, M. (2003) **Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees**. American Journal of Enology and Viticulture 54: 150 - 157.
- Dong, Y., Li, B., & Lu, F. (2001). **Physical Chemistry**. Beijing: Scientific Publishing Company.

- Dubourdieu, D. & Lavigne, V., (2004). **The role of glutathione on the aromatic evolution of dry white wine.** *Vinidea Net*, 2, 1–9.
- Dueñas, M., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2006). **Formation of anthocyanin–flavanol adducts in model solutions.** *Analytica Chimica Acta*, 563(1), 15–25.
- Dulau, L. A., Ortiz-Julien, A. & Trioli, G. (2002). **Method for dry yeast rehydration and rehydration medium.** International patent. PCT/FR02/01949.
- Du Toit, W. J., Lisjak, K., Stander, M. & Prevoo, D., (2007). **Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2765-2769.
- Edwards, C.G., & Beelman, R.B. (1987). **Inhibition of the malolactic bacterium, *Leuconostoc oenos* (PSU-1), by decanoic acid and subsequent removal of the inhibition by yeast ghost.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 38: 239 - 242.
- Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J., & Ferreira, V. (2002). **Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants.** *Food Chemistry*, 77(3), 325-331.
- Es-Safi, N. E., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). **Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerization of flavanols.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 2088-2095.
- Es-Safi, N. E., Le Guerneve, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000a). **New phenolic compounds formed by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic solution and their implication in color changes of grape-derived foods.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4233–4240.
- Es-Safi, N. E., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000b). **Study of the reactions between (+)-catechin and furfural derivatives in the presence or absence of anthocyanins and their implication in food color change.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 5946–5954.
- Es-Safi, N. E., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). **Role of aldehydic derivatives in the condensation of phenolic compounds with emphasis on the sensorial properties of fruit-derived foods.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5571-5585.
- Es-Safi, N. E., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2003a). **Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system.** *International Journal of Food Science and Technology*, 38(2), 153-163.

- Es-Safi, N. E., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2003b). **Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties.** *Journal of Food Composition and Analysis*, 16 (5), 535–553.
- Fedrizzi, B.; Pardon, K.H.; Sefton, M.A.; Elsey, G.M.; Effery, D.W. (2009). **First identification of 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon blanc juice.** *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, In Press.
- Ferreira, V., Escudreo, A., Fernández, P., & Cacho, J. F. (1997). **Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process.** *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A/Food Research and Technology*, 205(5), 392-396.
- Feuillat, M & Guerreau, J. (1996). **Les nouveaux activateurs de la fermentation alcoolique.** *Bulletin de l'OIV* 789 - 790: 987 - 998.
- Feuillat, M. (2001). **Nouveaux adjuvants oenologiques possibles d'origine levurienne.** *Bulletin de l'OIV* 849 - 850: 753 - 771.
- Francois, J. M., Alexandre H., Granes, D. & Feuillat, M. (2007). **Versune meilleure connaissance des produits dérivés de levures.** *Revue des OEnologues* 122: 9 - 12.
- Fulcrand, H., Cheynier, V., Oszmianski, J., & Moutounet, M. (1997). **An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation.** *Phytochemistry*, 46(2), 223–227.
- Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., & Cheynier, V. (2006). **Phenolic reactions during winemaking and aging.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 289–297.
- García, J., (1990). **Técnicas analíticas para vinos.** GAB, Barcelona, España.
- García, J., Xirau, M., Azorín, R., (2005). **Técnicas usuales de análisis en enología.** Panreac Química, Barcelona, España.
- García-Moruno, E., Sanlorenzo, C., Boccaccino, B., & Di Stefano, R. (2005). **Treatment with yeasts to reduce the concentration of ochratoxin A in red wines.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 56: 73 - 76.
- González-Marco, A., Jiménez-Moreno, N. & Ancín-Azpilicueta, C. (2006). **Influence of addition of yeast autolysate on the formation of amines in wine.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 2221 - 2227.
- Glories, Y. (1984). *La couleur des vins rouges. II: mesure, origine et interpretation.* *Conn. Vigne Vin*, 18 (4). 253-271.

- Guadalupe, Z., Palacios, A. & Ayestarán, B. (2007). **Maceration enzymes and mannoproteins: a possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 4854 - 4862.
- Guadalupe, Z., Martinez, L. & Ayestarán, B. (2010). **Yeast Mannoproteins in Red Winemaking: Effect on Polysaccharide, Polyphenolic, and Color Composition.** American Journal of Enology and Viticulture, 61: 191-200.
- Guilloux-Benatier, M., Guerreau, J., & Feuillat, M. (1995). **Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms.** American Journal of Enology and Viticulture, 46: 486 - 492.
- Guilloux-Benatier, M., & Chassagne, D. (2003). **Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 746 - 751.
- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (1997). **Oxidative damage to collagen and related substrates by metal ion/hydrogen peroxide systems: Random attack or site-specific damage.** Biochimica et Biophysica Acta, 1360(1), 84-96.
- Hidalgo, J. (2003). **Tratado de Enología**, Tomo II. Mundi Prensa
- Kritzinger, E.C., Bauer, F.F. & du Toit, W.J. (2012). **Role of glutathione in winemaking: a review.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 16, 269-277.
- Kritzinger, E. C., Stander, M. A. & Du Toit, W. J., (2013). **Assessment of glutathione levels in model solution and grape ferments supplemented with glutathione-enriched inactive dry yeast preparations using a novel UPLC-MS/MS method.** Food Additives, Contam, Part A Chem, Anal, Control Expo, Risk Assess 30, 1, 80-92.
- Kunkee, R.E. (1991). **Relations hip between nitrogen content of must and sluggish fermentation.** In: Proceeding of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine, 148 - 155.
- Labrouche, F., Clark, A. C., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2005). **Isomeric influence on the oxidative coloration of phenolic compounds in a model white wine: Comparison of (+)-catechin and (-)-epicatechin.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(26), 9993-9998.
- Laffort Inc. (2008). Laffort. Bioarom. **Natural aroma protection, natural reductive power.**

- Lafon-Lafourcade S., Geneix C., & Ribéreau- Gayon P. (1984). **Ways of initiating the action of yeast ghosts during winemaking.** *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18: 111 - 125.
- Larue F., Lafon-Lafourcade, S. & Ribéreau-Gayon P. (1998). **Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentative activity in grape must.** *Applied and Environmental Microbiology* 39: 808 - 811.
- Lasanta, C., Caro, I., & Perez, L. (2005). **Theoretical model for ion exchange of iron (III) in chelating resins: Application to metal ion removal from wine.** *Chemical Engineering Science*, 60(13), 3477–3486.
- Lauretta, G. (1993). **Comparison of instrumental and classical methods of wine analysis.** *Vignevini*, 20(7-8), 51-54.
- Laurie, V. F., & Waterhouse, A. L. (2006). **Oxidation of glycerol in the presence of hydrogen peroxide and iron in model solutions and wine: Potential effects on wine color.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4668–4673.
- Lavigne-Cruege, V., Pons, A., Chone, X. & Dubourdieu, D. (2003) **In: Oenologie.** Lonvaud-Funel A., de Revel., G., Darriet Ph (Eds.), Editions Tec & Doc, Paris, 385 - 387.
- Li, H. (2000). **Modern enology.** Xi'an: People's Press of Shaanxi.
- Li, H., Wang, H., Yuan, C., & Wang, S. (2005). **Wine chemistry.** Beijing: Scientific Publishing Company.
- Lonvaud-Funel, A., Desens, C., & Joyeux, A. (1985). **Stimulation de la fermentation malolactique par l'addition au vin d'enveloppes cellulaires de levure et differents adjuvants de nature polysaccharidique et azotee.** *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 19: 229 - 240.
- Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (2002). **Yeast induced inhibition of (+)-catechin and (-)-epicatechin degradation in model solutions.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1631 - 1635.
- Lopez-Toledano, A., Villano-Valencia, D., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (2004). **Interaction of yeasts with the products resulting from the condensation reaction between (+)-catechin and acetaldehyde.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), 2376–2381.
- Lubbers, S., Charpentier, C., Feuillat, M., & Voilley, A. (1994a). **Influence of yeast walls on the behaviour of aroma compounds in a model wine.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 29 - 33.

- Lubbers, S., Voilley, A., Feuillat, M., & Charpentier, C. (1994b). **Influence of mannoproteins from yeast on the aroma intensity of a model wine.** Food Science and Technology-Lebens mittel-Wissens chaft & Technologie, 27: 108 - 114.
- Main, G. L. (1992). **Juice fining treatments to reduce browning and use of sulfur dioxide in white wine production.** Ph.D. Thesis, University of Arkansas, AR, United States.
- Marchand, S., De Revel, G., & Alain Bertrand, J. V. (2002). **Possible mechanism for involvement of cysteine in aroma production in wine.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(21), 6160–6164.
- Mazuelas, B. (2013). **Estudio de derivados de levadura ricos en glutatión sobre la calidad de vinos blancos.** Proyecto fin de carrera. Universidad de Valladolid.
- Merida, J., Lopez-Toledano, A., Marquez, T., Millan, C., Ortega, J. M., & Medina, M. (2005). **Retention of browning compounds by yeasts involved in the winemaking of sherry type wines.** Biotechnology Letters, 27(20), 1565–1570.
- Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación. Secretaría General de Alimentación. Dirección General de Política Alimentaria (1993). **Métodos oficiales de análisis.** Tomo II.
- Moio, L., Ugliano, M., Gambuti, A., Genovese, A., & Piombino, P. (2004). **Influence of clarification treatment on concentrations of selected free varietal aroma compounds and glycoconjugates in Falanghina (*Vitis vinifera* L.) must and wine.** American Journal of Enology and Viticulture, 55: 7 - 12.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J.A. (2005). **Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes.** European Food Research & Technology, 220: 341 - 346.
- Morata, A., Calderón, F., González, M. C., Gómez-Cordovés, M. C., & Suárez, J. A. (2007). **Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde.** Food Chemistry, 100(3), 1144-1152.
- Ortega, M. (2015). **Estudio de los efectos de la calidad de vinos rosados con derivados de levadura ricos en glutatión.** Proyecto fin de carrera. Universidad de Valladolid.
- Oszmianski, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). **Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(7), 1712-1715.

- Peynaud, E. (1992). **Knowing and making wine (Chinese trans.)**. Beijing: China Light Industry Press.
- Peyrot Des Gachons, C.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. (2002). **Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: Identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from Vitis Vinifera L. cv. Sauvignon Blanc**. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 50, 4076-4079.
- Pi, Y. (1987). **Redox titration and potentiometric analysis**. Beijing: Higher Education Press.
- Pozo-Bayón, M. A., Monagas, M., Bartolomé, B. & Moreno-Arribas, M.V. (2008). **Wine features related to safety and consumer health: an integrated perspective**. Crítica Revista Food Science and Nutrition (En prensa).
- Pozo-Bayón, M. A., Andújar-Ortiz, I. & Moreno-Arribas, M.V. (2009a). **Scientific evidences beyond the application of specific inactive dry yeast preparations in winemaking**. Food Research International, 42: 754 - 757.
- Pozo-Bayón, M. A., Andujar-Ortiz, I., & Moreno-Arribas., M.V. (2009b). **Volatile profile and potential of inactive dry yeast based winemaking additives to modify the volatile composition of wines**. Journal of the Science of Food and Agriculture (En prensa).
- Razmkhab S., López-Toledano, A., Ortega, J.M., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (2002). **Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 7432 - 7437.
- Remize, F., Augagneur, Y., Guilloux-Benatier, M. & Guzzo, J. (2005). **Effect of nitrogen limitation and nature of the feed upon *Oenococcus oeni* metabolism and extracellular protein production**. Journal of Applied Microbiology, 98: 652 - 661.
- Ribéreu-Gayon, P., Peynaud, E., & Sudraud, P. (1980). **Ciencias y Técnicas del vino. Tomo I: Análisis y Control de los vinos**. Editorial Hemisferio Sur.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006a). **Handbook of enology (2nd ed.). The microbiology of wine and vinifications (Vol. 1)**. Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006b). **Handbook of enology (2nd ed.). The chemistry of wine stabilization and treatments (Vol. 2)**. Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd.
- Rigaud, J., Cheynier, V., Souquet, J. M., & Moutounet, M. (1991). **Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics**. Journal of the Science of Food and Agriculture, 57(1), 55–63.

- Ringot, D., Lerzy, B., Bonhoure, J.P., Auclair, E., Oriol, E. & Larondelle, Y. (2005). **Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives.** *Process Biochemistry*, 40: 3008 - 3016.
- Riou V., Vernhet, A., Doco, T. & Moutonet, M. (2002). **Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polysaccharides.** *Food Hydrocolloids*, 16: 17 - 23.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). **Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits.** *Food Chemistry*, 66(4), 401-436.
- Roussis, I.G.; Lambropoulos, I.; Tzimas, P. (2007). **Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 58 (2): 274 - 278.
- Schneider, V. (1998). **Must hyperoxidation: a review.** *American Journal of Enology and Viticulture*. 49, 65-73.
- Scollary, G. R. (2002). **Factors determining wine oxidation: The critical role of ascorbic acid.** National Wine & Grape Industry Centre. Final report to Grape and Wine Research & Development Corporation.
- Serradilla, J .A. & Luque de Castro, M .D. (2008). **Role of lees in wine production: A review.** *Food Chemistry*, 111: 447 - 456.
- Silva Ferreira, A. C., Oliveira, C., Hogg, T., & Guedes de Pinho, P. (2003). **Relationship between potentiometric measurements, sensorial analysis, and some substances responsible for aroma degradation of white wines.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4668–4672.
- Singleton, V. L. (1987). **Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical implications.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 69–77.
- Sioumis, N., Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2005). **Browning development in white wines: Dependence on compositional parameters and impact on antioxidant characteristics.** *European Food Research and Technology*, 220(3–4), 326–330.
- Smith, A .K. & Noble, A.C. (1998). **Effects of increased viscosity on the sourness and astringency of aluminium sulphate and citric acid.** *Food Quality and Preference*, 9: 139 - 144.

- Soubeyrand, V., Luparia V., Williams, P., Doco, T., Vernhet, A., Ortiz-Julien, A., & Salmon, J. M. (2005). **Formation of micelle containing solubilized sterols during rehydration of active dry yeasts improves their fermentation capacity.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 8025 - 8032.
- Steele, R. (2004). **Understanding and measuring the shelf-life of food.** Abington: Woodhead Publishing.
- Sullivan, P. J. (2002). **The effects of microoxygenation on red wines.** M.S. Thesis, California State University, Fresno, CA, United States.
- Timberlake, C. F., & Bridle, P. (1976). **Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines.** American Journal of Enology and Viticulture, 27(3), 97-105.
- Tirelli, A., Fracassetti, D., & De Noni, I., (2010). **Determination of reduced cysteine in oenological cell wall fractions of *Saccharomyces cerevisiae*.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 4565–4570.
- Toit, W. J. D., Marais, J., Pretorius, I. S., & Toit, M. D. (2006). **Oxygen in must and wine – A review.** South African Journal of Enology and Viticulture, 27(1), 76–94.
- Vidal S., Francis L., Williams, P., Kwiatkowskia, M., Gawela, R., Cheynier, V. & Waters E. (2004). **The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium.** Food Chemistry, 85: 519 - 525.
- Vivas, N., Bourgeois, G., Glories, Y., & Vitry, C. (1995). **Identification by mass spectrometry of the linoleic acid autoxidation products in hydroalcoholic solutions.** Sciences des Aliments, 15(1), 49–58.
- Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., & Nonier, M. F. (2001). **Scavenging and antioxidant properties of different soluble compounds in hydroalcoholic media. Comparison with SO₂ efficiency.** Bulletin de L'O.I.V., 74(843/844), 331–346.
- Wang, Z. (1990). **Food enzymology.** Beijing: China Light Industry Press.
- Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). **Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses.** American Journal of Enology and Viticulture, 57(3), 306–313.
- Wildenradt, H. L., & Singleton, V. L. (1974). **The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging.** American Journal of Enology and Viticulture, 25(2), 119-126.
- Yang, X., Wang, Y., & Chen, L. (2003). **Chemistry of tea polyphenols.** Shanghai: Science and Technology Press of Shanghai.

- Zhai, H., Du, J., Guan, X., Qiao, X., & Pan, Z. (2001). **Cultivating and processing technologies for wine grapes**. Beijing: China Agricultural Press.
- Zhao, B. (1999). **Oxygen free radicals and natural antioxidants**. Beijing: Press of Science.
- Zhu, M., Li, W., & Guo, Q. (1983). **Wine enology (revised ed.)**. Beijing: Light Industry Press.
- Zoecklein, B. C., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1995). **Wine analysis and production**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Zoecklein, B. (2007). **Glutathione and Wine Longevity**. *Enology Notes*, 129.
- Zoecklein, B. (2008). **Copper, Glutathione, and Wine Longevity**. *Enology Notes*, 144.