



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Graduado en Enología

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE LEVADURAS
INACTIVAS RICAS EN GLUTATIÓN SOBRE
LA CALIDAD DE LOS VINOS ROSADOS**

Alumno: ALBERTO DEL OLMO CAMARGO

Tutor: JOSÉ MANUEL RODRÍGUEZ NOGALES

**Cotutores: ENCARNACIÓN FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
JOSEFINA VILA CRESPO**

Septiembre 2014

	Página
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. EL GLUTATIÓN.....	1
1.2. MECANISMO ANTIOXIDANTE DEL GSH EN MOSTOS Y VINOS.....	2
1.3. INFLUENCIA DEL GSH SOBRE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS.....	3
1.4. LEVADURAS SECAS INACTIVAS RICAS EN GLUTATION.....	4
2. JUSTIFICACIÓN.....	5
3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
4.1. TRATAMIENTO Y DESARROLLO DE LA VINIFICACIÓN.....	6
4.2. CONTROL ANALÍTICO.....	8
4.1.1. Temperatura	
4.1.2. Densidad	
4.1.3. Grado alcohólico probable en mosto	
4.1.4. pH	
4.1.5. Acidez total	
4.1.6. Acidez volátil	
4.1.7. NFA	
4.1.8. SO ₂ libre y total	
4.1.9. Grado alcohólico volumétrico	
4.1.10. Azúcares reductores	
4.1.11. Antocianos totales	
4.1.12. Taninos condensados	
4.1.13. Compuestos polifenólicos	
4.1.14. Color	
4.3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	10
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
5.1. SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	12
5.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	12
5.2.1. Efecto de la adición de LSI-GSH sobre los parámetros básicos del vino.....	12
5.2.2. Efecto de la adición de LSI-GSH sobre los compuestos fenólicos y el color vino.....	12
5.2.3. Análisis multivariante de fin de fermentación.....	17
5.3. TEST ACELERADO DE OXIDACIÓN.....	18
6. CONCLUSIONES.....	25
7. BIBLIOGRAFÍA.....	25

1. ANTECEDENTES:

1.1. EL GLUTATIÓN:

El glutatión (GSH) se define como un tripéptido compuesto por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. Se puede encontrar reducido (GSH), o en su forma oxidada como glutatión disulfuro (GSSG), así como disulfuros mixtos, GS-S-Cys y GS-S-CoA (Fahey et al., 2001). Es un componente natural de muchas frutas, cuyo papel principal es actuar como inhibidor de oxidaciones enzimáticas y no enzimáticas.

También se considera el tiol no proteico intracelular más abundante presente en numerosos organismos procariontas. En los tejidos vivos, el GSH desempeña un papel fundamental en la protección contra el estrés oxidativo y en la desintoxicación de metabolitos tóxicos, en la actividad enzimática, evitando posibles oxidaciones de carácter enzimático, y en el metabolismo del azufre y el nitrógeno (Penninckx, 2002). El GSH se utiliza ampliamente como compuesto farmacéutico y tiene potencia para ser usado como aditivo alimentario, cosmético y en nutrición deportiva (SIES, 1999,).

Su acción antioxidante se debe al grupo tiol libre de la cisteína (-SH), un fuerte donador de electrones, que le otorga la capacidad de mantener en forma reducida muchas otras moléculas en la matriz del mosto/vino, evitando la oxidación de estos compuestos (Penninckx, 2000).

Se cuantificó por primera vez el GSH en uvas en 1989 (Cheynier et al., 1989). En los mostos se encuentra de forma natural en contenidos variables desde 0,001 hasta 100 mg/L, (Penninckx, 2000). Se han encontrado grandes diferencias entre variedades, sin embargo, estas diferencias no eran sólo estrictamente dependientes de la variedad. La vendimia, la localización y las prácticas tecnológicas pueden influir en el contenido de GSH. El GSH se sintetiza en el citosol y los cloroplastos de las células vegetales (Leustek et al., 2000). En algunos estudios se ha observado un aumento del GSH en el inicio de la maduración del fruto de la *Vitis vinífera*. La fuerte correlación entre el GSH acumulado y los sólidos solubles persiste hasta que los frutos alcanzan los 16°Brix, donde después el contenido de GSH se mantiene estable (Adams y Liyanage, 1993).

Liyanage y Adams (1993) observaron que el incremento del contenido de GSH en la uva va acompañado de un descenso del mismo en la hoja, esto indica un movimiento del compuesto a través del floema. El contenido de GSH en la uva está estrechamente relacionado con el grado de nitrógeno en la vid calculado como contenido de nitrógeno asimilable por la levadura en el mosto. Una fertilización tardía con nitrógeno del suelo de la vid provoca un mosto con seis veces mayor contenido de nitrógeno fácilmente asimilable comparado con el control.

Hay otros factores que también pueden influir en la concentración de GSH en el mosto, por ejemplo, la exposición al oxígeno, la actividad de la tirosinasa, la maceración de la piel de la uva durante el periodo de prefermentación y prensado (Du Toit et al., 2007).

Durante la vendimia a máquina, el consumo de O₂ es inevitable, lo que se traduce en una disminución del contenido de GSH en el mosto. La oxidación del GSH reduce su contenido en los mostos. El mosto procedente de la fase de escurrido, se

caracteriza por una mayor concentración de GSH, en comparación con las fracciones prensadas más fuertemente (Maggu et al., 2007; Patel et al., 2010).

En cuanto a la evolución de la cantidad de GSH durante la fermentación alcohólica del mosto encontramos opiniones muy diversas de unos autores a otros. Mientras que Andujar-Ortíz et al. (2011) y Fracassetti et al. (2011) observaron un incremento de la concentración de GSH, otros como Du Toit et al. (2007), Lavigne et al., (2007) y Patel et al. (2010) muestran un descenso en su concentración motivado por una combinación con las orto-quinonas oxidables del mosto. Otros estudios interesantes acerca de la evolución del GSH durante la fermentación del mosto de Park et al. (2000a,b) reportan un aumento de la concentración de GSH hacia el final de la fermentación de ocho mostos de diferentes variedades. Este aumento se atribuye a la formación de GSH por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con la consecuente liberación en el mosto en fermentación.

Lavigne et al. (2007) sugieren que la cepa de levadura vínica específica puede influir en los niveles de GSH presentes tras la fermentación alcohólica. En cambio otros autores como Fracassetti et al. (2011) consideran que la influencia de la cepa de levadura es insignificante. El GSH puede ser asimilado al igual que otros compuestos por la levadura, lo que reduciría sus niveles en el vino. Según la cepa de levadura empleada en la fermentación alcohólica, el contenido de GSH en el vino será diferente, ya que no todas tienen los mismos requerimientos de este compuesto. En cuanto a la relación de las levaduras y el GSH durante la crianza, Lavigne et al. (2007) evaluaron el efecto que tiene la crianza sobre lías en el contenido de GSH en el vino. Por otro lado, Penna et al. (2001) y Ugliano et al. (2011) estudiaron el contenido de GSH durante la crianza en ambiente reductor o botella. Ambos trabajos demuestran que los niveles de GSH tienden, por regla general, a disminuir durante el envejecimiento en botella, y que los vinos con crianza sobre lías parecen proteger los niveles de GSH en cierta forma. Este último fenómeno podría deberse a la autólisis de las levaduras que libera el GSH contenido por las mismas al medio. Park et al. (2000a) encontraron que los niveles de GSH en el vino estaban directamente correlacionados tanto con el nivel nitrógeno total como con el contenido de aminoácidos asimilables del mosto, de modo que un aumento del nitrógeno disponible en el medio conlleva a un aumento del contenido de GSH en ese mosto o vino.

1.2. MECANISMO ANTIOXIDANTE DEL GSH EN MOSTOS Y VINOS:

La tirosinasa es una enzima, cuya especificidad comprende la oxidación de todos los orto-difenoles como la catequina o el ácido caftárico. En cambio los meta y para-difenoles no son substratos para esta enzima. El SO₂ posee una eficaz acción antioxidásica para la tirosina, reduciéndose su actividad incluso a pequeñas dosis y llegando incluso a destruirla. Pero además del SO₂, su acción puede ser inhibida por la presencia de otros compuestos naturales o añadidos, tales como el GSH (Hidalgo, 2010).

El GSH puede ser utilizado para prevenir las oxidaciones de los mostos y vinos, pues reacciona con las orto-quinonas oxidables que contiene la vendimia, formando la sustancia agregada 2-S-glutathionil-cafeoiltartárico, también conocido como GRP, que limita las oxidaciones de otros componentes (Fig. 1). Este GRP no es sustrato para la oxidación enzimática adicional de la polifenoloxidasas que contienen las uvas. De esta manera, el glutatión atrapa orto-quinonas en una forma incolora y la formación de polímeros marrones está limitada (Singleton et al., 1985). Mientras exista GSH en el medio las oxidaciones son muy limitadas, pero en el momento en que éste se agota,

las moléculas incoloras de GRP pueden ser de nuevo oxidadas por nuevas orto-quinonas y entonces se producen las oxidaciones. Razón por la cual es importante añadir una dosis suficiente de GSH, además de mantener un cierto nivel de SO₂ en el mosto o vino.

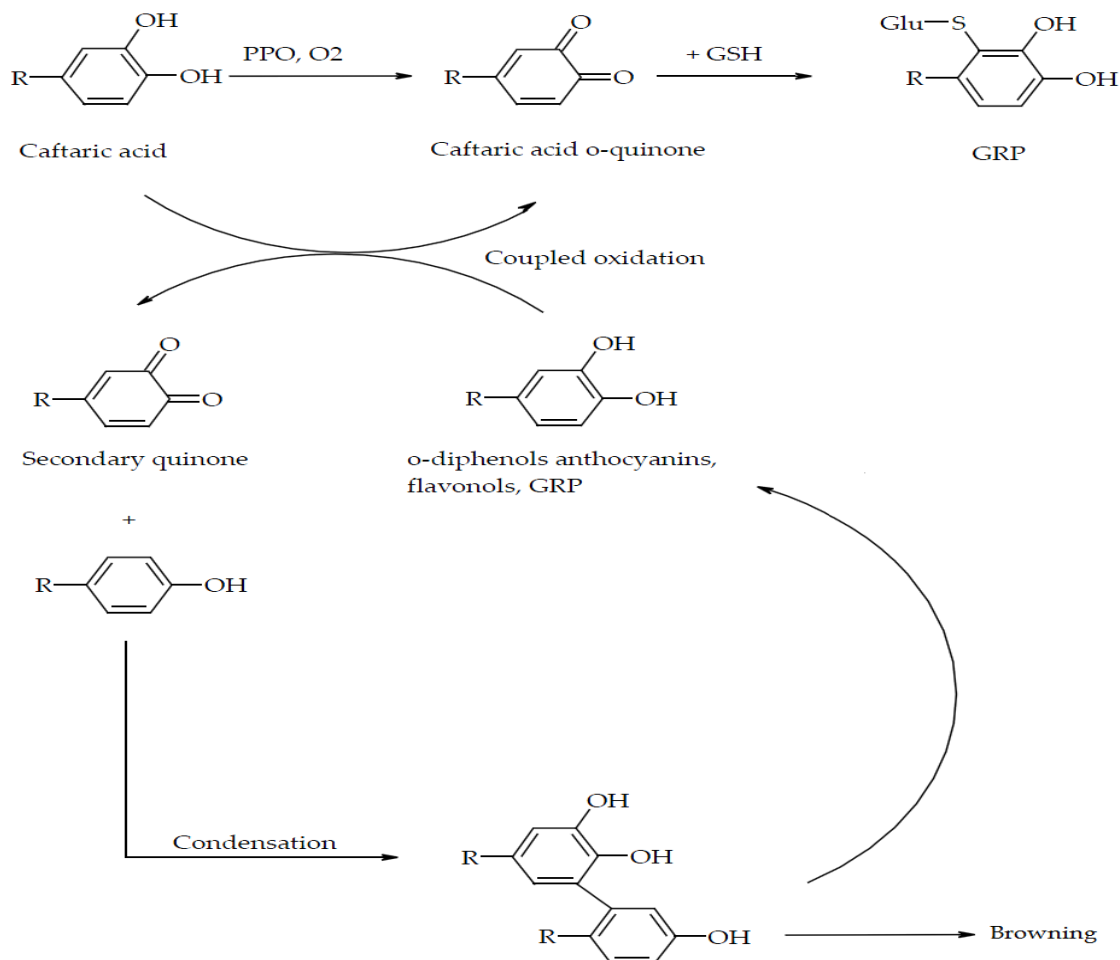


Fig. 1. Mecanismo de oxidación enzimática (Fracassetti et al., 2011).

1.3. INFLUENCIA DEL GSH SOBRE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS:

Aparte de limitar la coloración oxidativa en el mosto y el vino, el GSH ejerce un efecto protector sobre diversos compuestos aromáticos durante el envejecimiento del vino, tales como los tioles volátiles, ésteres y terpenos (Papadopoulo y Roussis, 2008). La pérdida de estos compuestos volátiles puede ser atribuida a la oxidación y otras reacciones químicas que tienen lugar. También se ha demostrado que el desarrollo de caracteres de sabor atípico durante el envejecimiento de algunos vinos, incluyendo sotolón y 2-aminoacetofenona, es obstaculizado por la presencia de GSH (Dubordieu y Lavigne, 2004).

Los tioles volátiles son particularmente susceptibles a la oxidación durante el almacenamiento y se ha observado que el GSH desempeña un papel importante en la protección de estos compuestos durante la crianza en botella (Lavigne-Cruege y Dubourdieu, 2002; Dubourdieu y Lavigne, 2004).

Esta afirmación concuerda con los hallazgos de Ugliano et al. (2011) que informan de que la adición de 20 mg/L de GSH antes de ser embotellado en general da lugar a vinos con niveles más altos del tiol 3-mercaptohexanol después de 6 meses de crianza en botella. Los ácidos hidroxicinámicos en el vino pueden ser oxidados a ortoquinonas en presencia de oxígeno y estas ortoquinonas pueden fácilmente reaccionar con tioles a través de la reacción de adición de Michael, perdiendo sus propiedades (Cheynier et al., 1986). Además, las ortoquinonas pueden también generar peróxidos a través de una serie de reacciones acopladas que son conocidos por sus propiedades oxidativas de los tioles (Wilderandt y Singleton, 1974). El mecanismo propuesto por el cual el GSH ejerce un efecto protector sobre tioles varietales se denomina competencia (Fracassetti et al., 2011). La acción del GSH siendo también un tiol, es posiblemente la de competir con el resto de tioles varietales que se unen a las ortoquinonas, formando compuestos primero con ellas y consiguiendo así limitar la pérdida de aromas varietales (Tirelli et al., 2010).

Los ésteres de alcoholes superiores y etílicos contribuyen positivamente a la calidad del vino rosado porque proporcionan aromas a fruta. Los terpenos son un grupo aromático muy importante en la mayoría de variedades de uva, aportando propiedades sensoriales óptimas a los correspondientes vinos. Terpenos como el linalol, α -terpineol, nerol, geraniol y hotrienol imparten notas florales y frutales al vino. El papel del GSH sobre estos compuestos es importante dado que inhibe la disminución de varios compuestos volátiles tales como acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo en el vino (Papadopoulou y Roussis, 2001). Un estudio de Roussis (2007) concluye que el vino con bajo contenido de SO_2 libre (35 mg/L) y suplementado con 20 mg/L de GSH, fue más eficaz en la protección de varios ésteres comparado con un vino con 50 mg/L de SO_2 libre.

1.4. LEVADURAS SECAS INACTIVAS RICAS EN GLUTATIÓN:

El GSH juega un papel esencial en la viabilidad de las levaduras fermentativas, sobre todo para su crecimiento y esporulación, así como para mantener la integridad de las mitocondrias, también en la detoxificación de metabolitos nocivos, y ser fuente de suministro de azufre y nitrógeno cuando existen carencias de estos elementos en el medio. La alta concentración de GSH en las células de levadura (hasta 10 mM), su bajo potencial redox para el intercambio del grupo tiol, así como el hecho que el GSH se mantiene en su estado reducido por el NADPH dependiente de la enzima GSH disulfuro reductasa, hacen de este tripéptido un tampón redox celular (Meyster y Anderson, 1983), protegiendo a la levadura del estrés oxidativo (Togores, 2010). Dependiendo de las condiciones de crecimiento, el GSH puede ser del 0,5 al 1% del peso seco celular (Pennickx, 2000).

Debido a que la OIV no permite una suplementación directa de GSH al mosto durante la vinificación, las empresas biotecnológicas del sector están desarrollando preparados comerciales de levaduras secas inactivas ricas en GSH (LSI-GSH). Estas preparaciones se obtienen a partir del cultivo intensivo de levaduras seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* con alta capacidad para acumular GSH en sus células (Pennickx, 2002). Después, las levaduras son autolisadas, secadas y liofilizadas (Pozo-Bayón et al., 2009).

El uso de preparaciones de LSI-GSH, pretende incrementar el contenido de GSH en el mosto-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 su liberación.

Andujar-Ortíz et al. (2011), evaluaron el nivel de GSH total y reducido en unos vinos sintéticos y vinos rosados de Garnacha suplementados con LSI-GSH comerciales. Se observaron cantidades muy similares de GSH total y reducido en estos vinos. A la dosis de LSI-GSH de 0,3 g/L, entre 1 y 2 mg/L de GSH reducido se detectó en el vino sintético después de 30 min, observándose una ligera reducción después de 9 días. En los vinos rosados de Garnacha se encontraron los máximos niveles de GSH total después de la fermentación alcohólica, tanto para el vino control como para el suplementado con LSI-GSH (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, lo que sugiere que la levadura es una fuente potencial de GSH.

Únicamente se ha encontrado un estudio que aborde el efecto que presenta las LSI-GSH en la calidad de vinos rosados. Andujar-Ortíz et al. (2002) observaron un mayor descenso en el nivel de antocianos y una menor evolución del color del vino rosado de Garnacha suplementado con un preparado de LSI-GSH, respecto al vino testigo. Sin embargo, este trabajo se realizó únicamente con un preparado de LSI-GSH, por lo que con el objetivo de dar más robustez a estos resultados, nos planteamos en este trabajo ensayar cinco preparaciones comerciales de LSI-GSH de tres casas comerciales.

2. JUSTIFICACIÓN:

La competencia entre los países productores de vino cada día es mayor y además se intensifica gracias a la disminución del consumo de vino, en general, y al aumento de las producciones. Ahora se busca mayor calidad por parte de los consumidores que compran vino embotellado, es decir vino bien elaborado, a partir de una uva de calidad y sin presentar defecto alguno a la hora de ser consumido.

La oxidación del vino rosado tiene consecuencias perjudiciales sobre su calidad final. Como resultado de este proceso se observa una pérdida de la calidad de su aroma y una disminución de su frescura, desarrollando a cambio un sabor atípico y una evolución del color hacia tonalidades marrones. Por ello, esta oxidación de los vinos rosados, con la consecuente pérdida de color y aromas, constituye en la actualidad un serio problema en vinificaciones que buscan obtener un producto final de calidad. Los productores que consigan unas estrategias dirigidas a preservar la calidad del vino tendrán una ventaja importante sobre sus competidores directos. Por ello el aumento del contenido de glutatión (GSH) en el vino, podría mejorar su calidad gracias a las propiedades antioxidantes que este compuesto natural aporta al vino.

Si se consigue un elevado nivel de antioxidantes naturales en un vino, se podría en teoría también reducir la dosis de dióxido de azufre (SO₂). Este compuesto está causando actualmente grandes debates sobre si su utilización conlleva o no problemas para la seguridad de sus consumidores. El uso de GSH está en discusión por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), pero hasta la fecha no

está permitida su adición directa (Roland et al., 2011; Ugliano et al., 2011). Una alternativa sería el uso de levaduras secas inactivas ricas en glutatión durante la vinificación. En el mercado actual encontramos productos de levaduras secas inactivas ricas en GSH (LSI-GSH) que podrían ser empleados para este fin.

3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO:

El objetivo principal de este estudio es:

- Comprobar el efecto de la acción antioxidante de diversos preparados de levaduras secas inactivas ricas en glutatión sobre la calidad de vinos rosados.

Para conseguir este objetivo se procede a la elaboración de dos vinos rosados con distintas dosis de sulfuroso, de la variedad Cabernet sauvignon, siguiendo el método tradicional de vinificación en rosado que servirá de vinos control (VSO1 y VSO2). Además se elaborarán otros cinco vinos (VDL1-VDL5), a los cuales se le adicionarán distintos preparados comerciales de LSI-GSH. Se lleva a cabo una analítica completa y un test de oxidación de los vinos. Finalmente, se llevó a cabo un estudio estadístico de los datos obtenidos en los análisis de los vinos de los distintos tratamientos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1. TRATAMIENTOS Y DESARROLLO DE LA VINIFICACIÓN:

Una vez recibida la uva de la variedad Cabernet sauvignon procedente de la vendimia del 2013, de los viñedos situados en la Finca Zamadueñas (ITACyL, Valladolid), se procedió a su vinificación en la bodega experimental de la ETSIAA de Palencia (Universidad de Valladolid), siguiendo un-diagrama de flujo de vinificación de rosado con maceración (Fig. 2.)

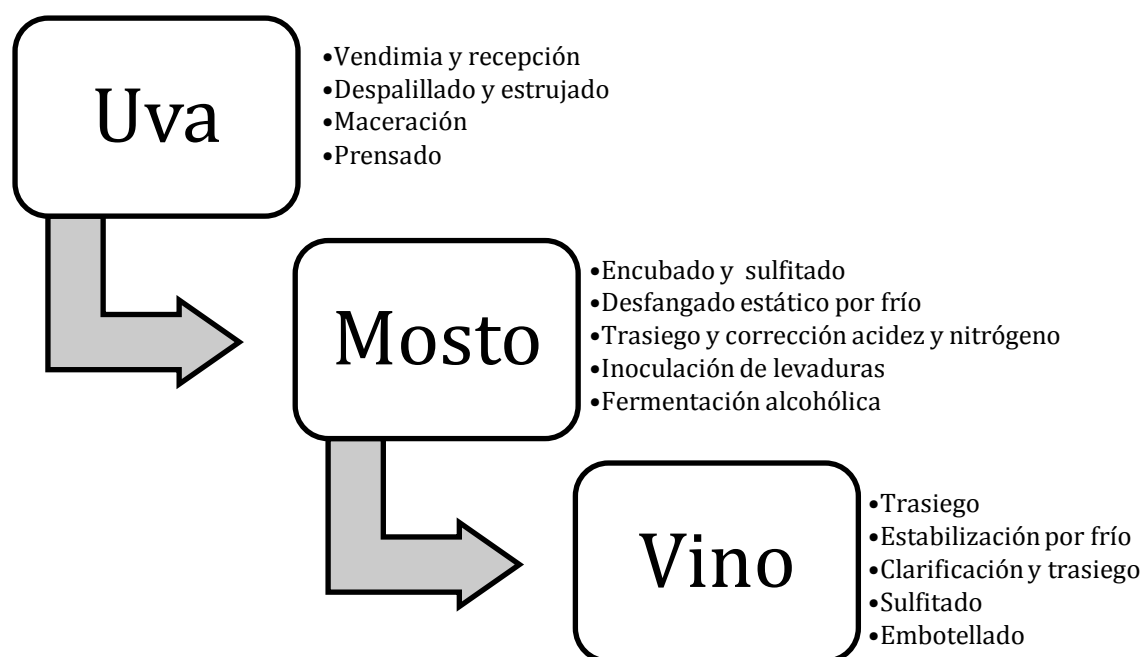


Fig.2. Diagrama de flujo del proceso de vinificación realizado

El despalillado y estrujado de la vendimia se realizó en una despalilladora-estrujadora de acero inoxidable y se sulfitó a 15 mg/L de sulfuroso total. A continuación, se maceró el mosto junto al hollejo durante 24 horas a una temperatura de 6°C. Posteriormente se procedió al prensado de la uva, utilizando para ello una prensa horizontal de membrana axial durante dos ciclos. Una vez obtenido el mosto se dejó durante 24 horas desfogado a una temperatura de 6°C. Al día siguiente se realizó un trasiego, eliminando las heces y se tomó una muestra para analizar pH, acidez total, densidad, °Brix, NFA, sulfuroso libre y total, IPT y color; obteniendo los siguientes resultados:

- pH = 3,54
- T^a = 11,4°C
- Densidad = 1100 g/L
- °Brix = 23 (13,45% grado alcohólico probable)
- Acidez total = 4,5 g/L
- SO₂ libre = 5 mg/L
- SO₂ total = 15 mg/L
- NFA = 290 mg/L
- IPT = 14,25

A continuación una vez obtenidos los datos de la analítica se procedió a la corrección de la acidez, utilizando para ello ácido tartárico a una dosis de 0,75 g/L. El nitrógeno no se corrigió dado que para un grado probable de 13,5%, el contenido de nitrógeno del mosto era suficiente.

Después de realizar un nuevo trasiego para eliminar los fangos se inoculó el mosto con levaduras neutras comerciales de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, a razón de 25 g/hL siguiendo el protocolo del fabricante.

Una vez inoculado el mosto se divide el volumen total en 14 depósitos de vidrio de 3 litros (7 vinificaciones por duplicado), procurando que el mosto sea lo más homogéneo posible. Se codificaron los depósitos y se añadieron los aditivos (tabla 1).

Código	Adición de compuestos antioxidantes en mosto	Adición de compuestos antioxidantes en el embotellado
VSO1	30 mg/L SO ₂ total	Llevar a 30 mg/L SO ₂ libre
VSO2	15 mg/L SO ₂ total	Llevar a 15 mg/L SO ₂ libre
VDL1	15 mg/L SO ₂ total + 300 mg/L LSI-GSH 1	Llevar a 15 mg/L SO ₂ libre
VDL2	15 mg/L SO ₂ total + 300 mg/L LSI-GSH 2	Llevar a 15 mg/L SO ₂ libre
VDL3	15 mg/L SO ₂ total + 300 mg/L LSI-GSH 3	Llevar a 15 mg/L SO ₂ libre
VDL4	15 mg/L SO ₂ total + 300 mg/L LSI-GSH 4	Llevar a 15 mg/L SO ₂ libre
VDL5	15 mg/L SO ₂ total + 300 mg/L LSI-GSH 5	Llevar a 15 mg/L SO ₂ libre

Los vinos VSO1 y VSO2 se tomaron como vinos control, por lo que no se les añadió ningún derivado de LSI-GSH. Antes de dar comienzo la fermentación alcohólica, el mosto de la muestra VSO1 fue llevado a 30 mg/L de SO₂ total.

El seguimiento de la fermentación alcohólica se realizó diariamente midiendo densidad y temperatura de cada depósito. Una vez finalizada la fermentación alcohólica se sulfitaron los vinos hasta conseguir la dosis de 30 mg/L de SO₂ libre en

el caso del vino VSO1, y de 15 mg/L de SO₂ libre en los demás vinos. Una vez corregido el sulfuroso, se guardaron los vinos en una cámara a una temperatura de 6°C durante 7 días para conseguir una correcta estabilización por frío. Se realizó una analítica final de todos los vinos midiendo los siguientes parámetros: pH, acidez total y volátil, grado alcohólico, azúcares reductores, polifenoles totales, antocianos totales, taninos totales, ácidos hidroxycinámicos, flavonoles y parámetros de color. Todas las analíticas se realizaron por duplicado para cada vino.

Los vinos fueron sometidos a un test acelerado de oxidación, calentando los vinos a 45°C durante 7 días 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 evaluarán los siguientes parámetros por duplicado: IPT, antocianos totales, taninos totales, ácidos hidroxycinámicos, flavonoles y parámetros de color.

Las muestras se centrifugarán a 4000 rpm durante 10 minutos antes de analizarlas.

4.2. CONTROL ANALÍTICO:

- **TEMPERATURA**

El control de temperatura de los mostos y vinos es realizado directamente mediante termómetros.

- **DENSIDAD:**

La densidad se mide mediante el método aerométrico (OIV-MA-AS2-01B:R2009).

- **GRADO ALCOHÓLICO PROBABLE EN MOSTO:**

La medida del grado alcohólico probable en el mosto se lleva a cabo mediante un refractómetro y siguiendo el método descrito por la OIV (OIV-MA-AS2-02:R2012).

- **pH:**

El pH de los mostos y de los vinos se mide de forma directa utilizando un pHmetro.

- **ACIDEZ TOTAL:**

Nos basaremos en la valoración potenciométrica a pH 7 como indicador del punto final de la valoración ácido-base (OIV-MA-AS313-01).

- **ACIDEZ VOLÁTIL:**

Para analizar la acidez volátil, vamos a utilizar el método García-Tena (OIV-MA-AS313-02).

- **NITRÓGENO FACILMENTE ASIMILABLE:**

Se llevará a cabo su determinación mediante el método Aerny (1996). Mediante este método se valora la acidez de los compuestos formados por la reacción del formaldehído con los aminoácidos (MAPA, 1993).

- **SO₂ LIBRE Y TOTAL:**

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

- **GRADO ALCOHÓLICO:**

Se ha seguido para calcular el grado alcohólico el método ebulloscópico que se basa en la variación del punto de ebullición que experimentan los líquidos hidroalcohólicos según su proporción de alcohol (García et al., 2000).

- **AZÚCARES REDUCTORES:**

El cálculo de los azúcares reductores de todos los vinos se ha realizado siguiendo el método de Rebelein (OIV-MA-AS311-01C).

- **ANTOCIANOS TOTALES:**

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.

- **TANINOS CONDENSADOS:**

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 (MAPA, 1993).

- **COMPUESTOS POLIFENÓLICOS:**

- ✓ **Índice de polifenoles totales (IPT)**

La medida de los IPT de todos los vinos se ha realizado mediante espectroscopia, El resultado de la absorbancia a 280 nm se multiplica por el factor de dilución (f: 50) (Zamora, 2003)

- ✓ **Ácidos hidroxicinámicos**

La medida de los ácidos hidroxicinámicos de todos los vinos se ha realizado mediante espectroscopia. El resultado de la absorbancia a 320 nm se multiplica por el

factor de dilución (f: 50) y se expresa en mg/L de ácido Cafeico. (Andrés-Lacueva et al., 1997).

✓ Flavonoles

La medida de los flavonoles de todos los vinos se ha realizado mediante espectroscopia. El resultado de la absorbancia a 365 nm se multiplica por el factor de dilución (f: 50) (Andrés-Lacueva et al., 1997).

- **COLOR:**

Para la medida del color y obtención de los porcentajes de amarillo, rojo y azul, se ha seguido el método de Glories (Glories, 1994).

4.3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO:

Con toda la información obtenida gracias a las analíticas realizadas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con la intención de comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los parámetros físico-químicos ($p < 0,05$), comprobando así el efecto de los preparados de LSI-GSH añadidos. Posteriormente con el test de Tukey se realizaron los diferentes subconjuntos homogéneos definidos con letras. Además, se incluyó un análisis por componentes principales. Dichos análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

5.1. SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA:

Para el correcto seguimiento y control de la fermentación alcohólica se midió de forma diaria la temperatura y densidad de todos los vinos. Cuando la densidad se estabilizó sobre 992 g/L se procedió a realizar un análisis de los azúcares reductores, con el fin de asegurar que la fermentación alcohólica había terminado.

En la gráfica de tiempo-densidad (Fig. 3.) se muestra de forma comparativa, la cinética de fermentación de todos los vinos. Durante el desarrollo de la fermentación alcohólica se distinguen tres fases, claramente diferenciadas en la gráfica: (i) primera fase de latencia, las levaduras se reproducen y comienzan a transformar los azúcares en etanol, (ii) segunda fase de desarrollo celular, momento en que las levaduras tienen una actividad de transformación máxima y (iii) tercera fase de declive en el que las densidades comienzan a estabilizarse y las levaduras mueren debido a la falta de nutrientes y a la elevada toxicidad del medio.

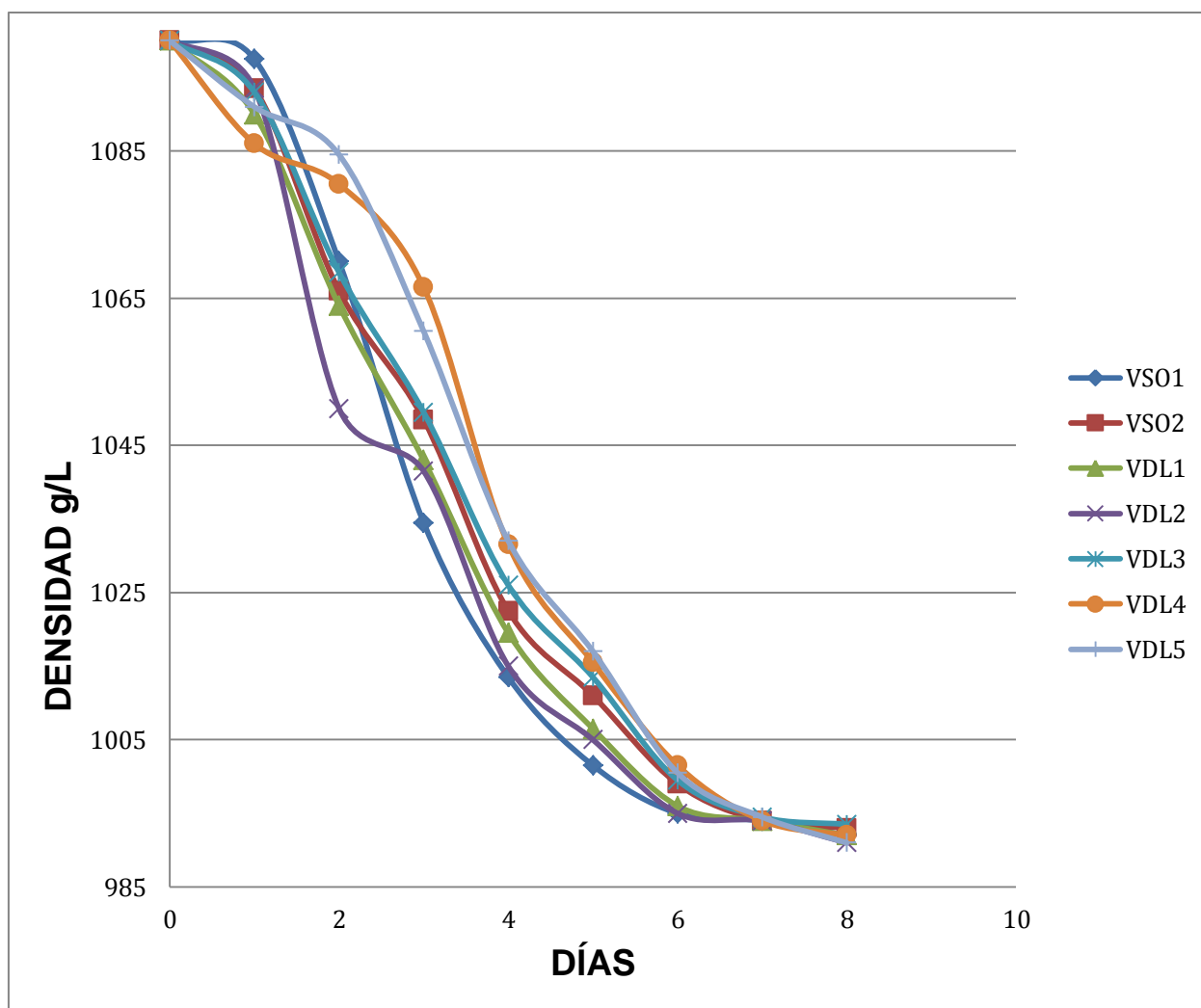


Fig. 3. Cinética de fermentación de los vinos rosados: VSO1 (Vino control 1); VSO2 (Vino control 2); VDL (Vinos que contienen derivados de LSI-GSH).

Si observamos las cinéticas de fermentación de los vinos control (VSO1 y VSO2), existe un ligero retraso en el inicio de fermentación del vino con la mayor concentración de SO_2 (VSO1), sin embargo, rápidamente se observa un incremento en la velocidad de su fermentación, superando al vino VSO2. Este fenómeno se debe a un efecto de activación que tiene el SO_2 en dosis normales de vinificación. La destrucción de sustancias tóxicas, la elevación de la actividad proteásica de la levadura que incrementa los niveles de nitrógeno orgánico asimilable y el mantenimiento en el medio de una mayor cantidad de oxígeno disuelto que favorece la multiplicación de las levaduras son algunas de las posibles causas que pueden explicar la acción estimulante del SO_2 (Hidalgo, 2011).

Por otro lado, los vinos VDL1 y VDL2 presentan unas cinéticas de fermentación más rápidas que su vino control (VSO2) y el resto de los vinos suplementados con LSI-GSH, finalizando su fermentación un día antes. 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., 2009). Por otro lado, 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).

5.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS:

5.2.1. Efecto de la adición de LSI-GSH sobre los parámetros básicos del vino:

A continuación se va a valorar si la adición de LSI-GSH sobre los vinos rosados, unido a una reducción del nivel de SO₂, tiene efectos sobre los diferentes parámetros evaluados. En la tabla 2, se muestra, tras realizar el análisis de varianza, que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias para todos los parámetros básicos de los vinos, por lo que la adición de LSI-GSH en los vinos si ha tenido un efecto marcado sobre estos parámetros. Todos los vinos acabaron la fermentación con valores de azúcares reductores menores a 3 g/L.

Para los parámetros pH, acidez total, grado alcohólico y acidez volátil no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos vinos control (VSO1 y VSO2), por lo que la reducción del nivel de SO₂ no afectó a estos parámetros. Si comparamos el vino control (VSO2) con los vinos con LSI-GSH, no se observan marcadas diferencias entre los vinos, a excepción de las encontradas para los vinos VDL2 y VDL3. En el vino VDL2 se observó la mayor acidez volátil (0,29 mg/L), no observándose diferencias estadísticamente significativas entre el control y el resto de vinos con LSI-GSH. Por otro lado, el vino VDL3 además de tener un bajo valor de pH (3,09), presentó la acidez total más elevada, característica importante en un vino rosado, y un menor grado alcohólico (9,9%).

Existen pocos estudios que nos aporten información acerca del efecto de la adición de LSI-GSH durante la vinificación. Recientemente, Andújar-Ortiz et al. (2012) analizaron el efecto que tenía el empleo de un preparado de LSI-GSH sobre la calidad de un vino rosado de Garnacha. Sus resultados no concluyeron que existieran diferencias importantes entre los valores de los parámetros básicos del vino (pH, acidez total y volátil y grado alcohólico). Por otro lado, en un estudio realizado en vino Verdejo, la adición de LSI-GSH no modificó notablemente los valores de pH, acidez total y volátil y azúcares reductores, sin embargo, se obtuvieron vinos con un ligero incremento en su graduación alcohólica (Mazuelas, 2013). 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 (Del Barrio-Galán et al., 2012; Guadalupe et al., 2007, 2010)

5.2.2. Efecto de la adición de LSI-GSH sobre los compuestos fenólicos y el color del vino:

En este estudio, el índice de polifenoles totales (IPT) (Fig. 4) no presenta diferencias estadísticamente significativas, al igual que los flavonoles (Fig. 6) y los ácidos hidroxicinámicos (Fig. 5) entre los vinos. En cambio en cuanto al nivel de antocianos y taninos (Fig. 7 y 8, respectivamente), el vino control VSO1 presentó los

mayores niveles en estos parámetros. Probablemente el uso de una mayor dosis de SO_2 disminuyó la oxidación de estos compuestos. Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el vino control VSO2 y los vinos con LSI-GSH para los antocianos y taninos. A priori, se podría pensar que estos preparados no tienen un efecto protector frente a la oxidación de estos compuestos, sin embargo es conocido el poder antioxidante del GSH (Kritzinger et al., 2012). Por otro lado, los polisacáridos de la pared celular presente en los preparados de LSI-GSH pueden formar compuestos insolubles que reducen los niveles de antocianos y taninos (Guadalupe et al., 2007, 2008, 2010; Pozo-Bayón et al., 2009b; Barrio-Galán et al., 2011, 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.

En cuanto a los parámetros de color, tanto el % de amarillo como el % de rojo sí presentan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras (Fig. 9 y 10, respectivamente), en cambio el % de azules no (Fig. 11). En los vinos control la reducción de la dosis de SO_2 , no modificó los parámetros de color. Por otro lado, la adición de LSI-GSH no tiene una clara influencia en el color del vino. El vino VDL2 presentó los menores valores para el % de amarillo y los mayores para el % de rojo, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Estos 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.

Mazuelas (2013), analizó el efecto de los derivados de los LSI-GSH levaduras ricas en glutatión sobre la calidad de los vinos blancos, obteniendo como resultado que los vinos adicionados con LSI-GSH comenzaron antes la fermentación alcohólica, al igual que ocurre en algunos casos (VDL4) de este estudio, y algunos vinos limitaron su pardeamiento gracias a la acción de estos productos. Los parámetros básicos de los vinos no se vieron modificados en ningún caso.

Tabla 2. Parámetros básicos de los vinos rosados.

Vino	VSO1	VSO2	VDL1	VDL2	VDL3	VDL4	VDL5	Significación ¹
pH	3,15 ^c ±0,02	3,14 ^{bc} ±0	3,09 ^a ±0,01	3,11 ^{ab} ±0,01	3,09 ^a ±0	3,10 ^a ±0,01	3,08 ^a ±0	SI
Acidez total (g/L)	6,50 ^a ±0,08	6,60 ^a ±0	6,80 ^{ab} ±0,29	6,60 ^a ±0,09	7 ^b ±0,081	6,50 ^a ±0,2	6,50 ^a ±0,09	SI
Grado alcohólico (%)	10,7 ^b ±0,2	11 ^b ±0,2	10,5 ^{ab} ±0,1	10,5 ^b ±0,4	9,9 ^a ±0,1	10,5 ^b ±0,4	10,7 ^b ±0,2	SI
Acidez volátil (g/L)	0,24 ^a ±0,01	0,25 ^a ±0,03	0,23 ^a ±0,01	0,29 ^b ±0,16	0,27 ^{ab} ±0,01	0,26 ^{ab} ±0,01	0,29 ^{ab} ±0,02	SI

¹SI: p-valor < 0,05, significativo al 95%; NO: p-valor ≥ 0,05, no significativo.

IPT

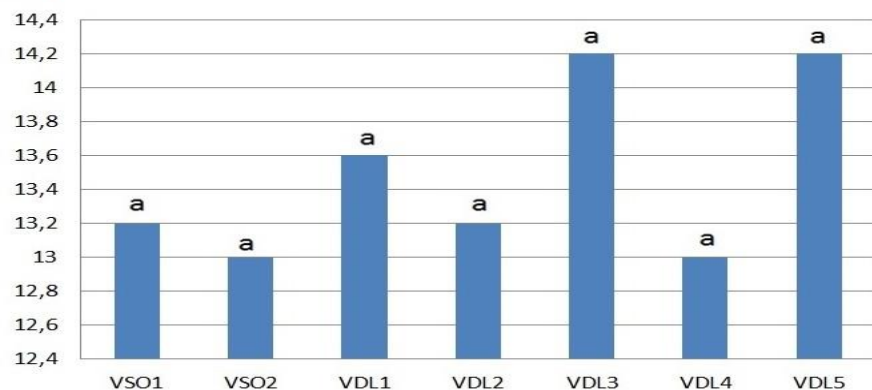


Fig. 4. IPT de los vinos rosados terminados

Ác. Hidroxicinámicos

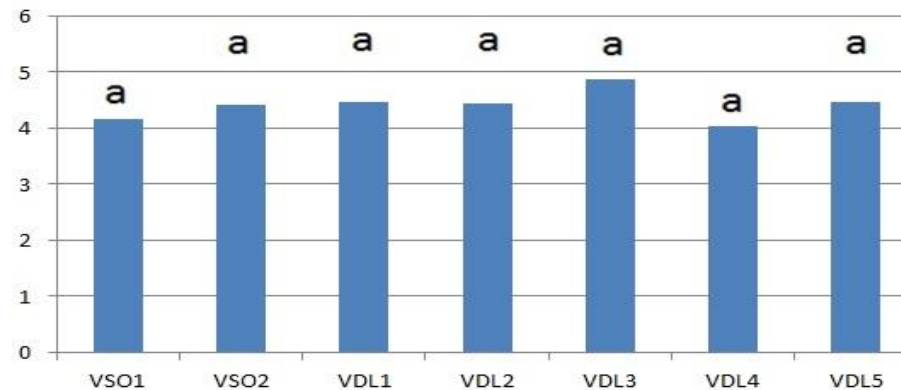


Fig. 5. Ácidos hidroxicinámicos (mg/L ác. cafeico) de los vinos rosados terminados.

Flavonoles

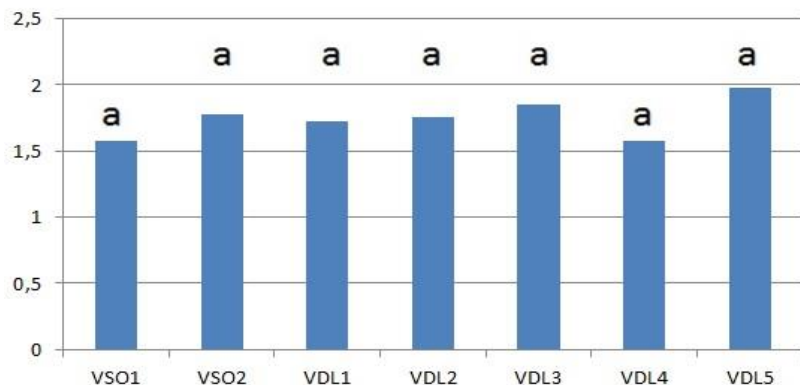


Fig. 6. Flavonoles (Abs 365) de los vinos rosados terminados.

Antocianos



Fig. 7. Antocianos (mg/L) de los vinos rosados terminados.

Taninos

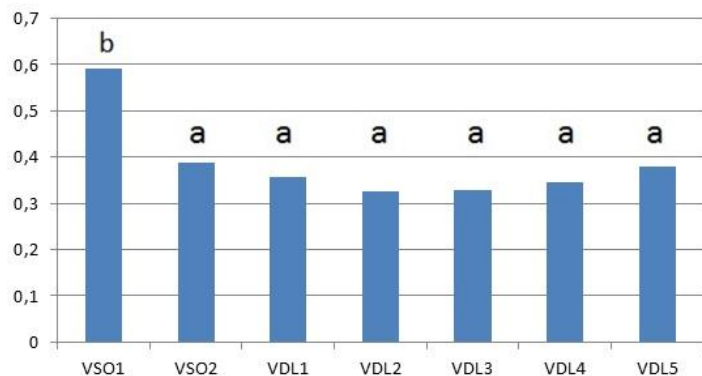


Fig.8. Taninos (g/L) de los vinos rosados terminados.

% Amarillo

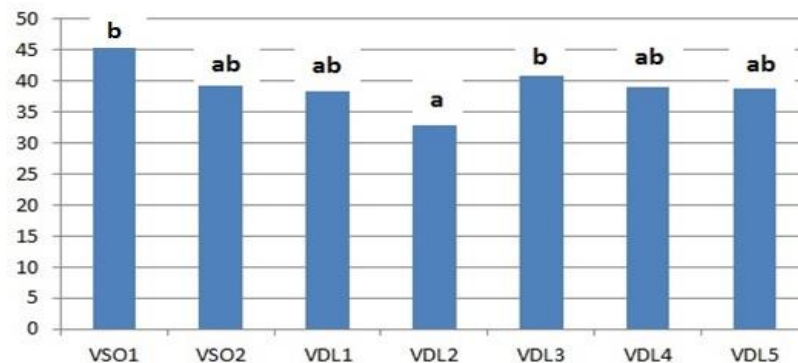


Fig. 9. % Amarillo de los vinos rosados terminados.

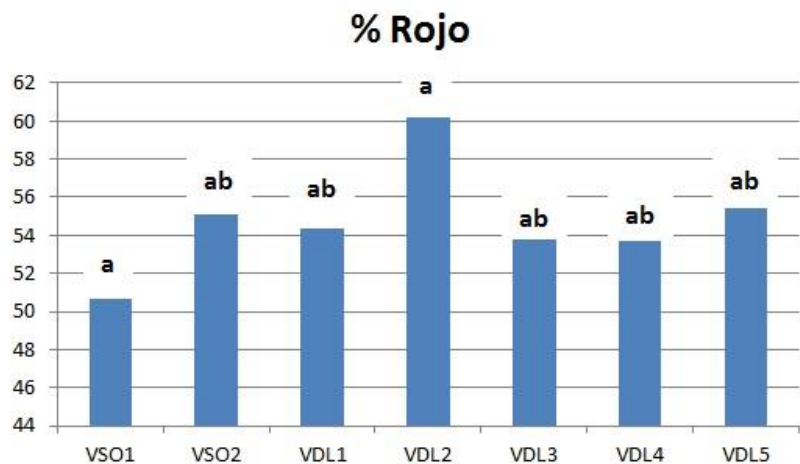


Fig. 10. % Rojo de los vinos rosados terminados.

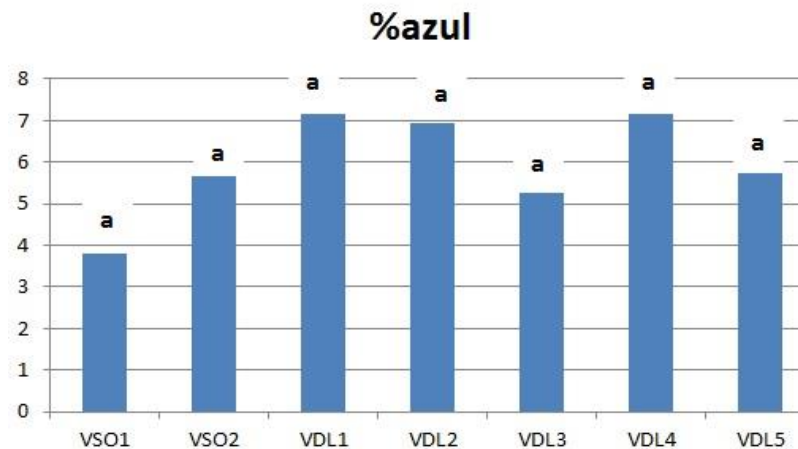


Fig. 11. % Azul de los vinos rosados terminados.

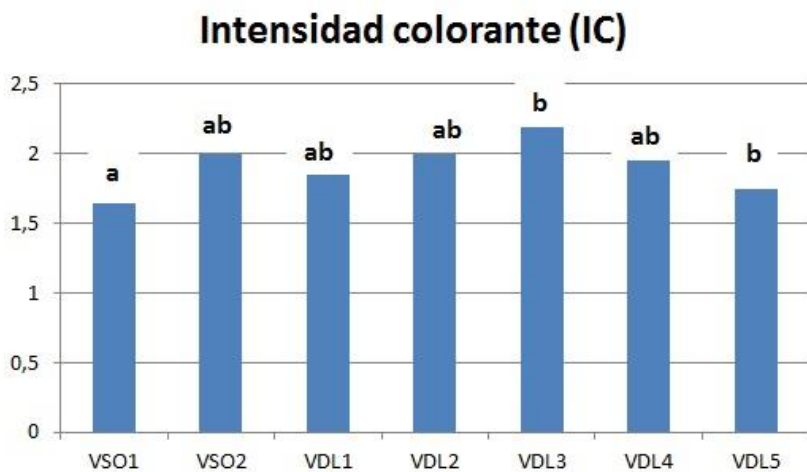


Fig. 12. Intensidad colorante de los vinos rosados terminados.

5.2.3. Análisis multivariante de fin de fermentación:

Se realizó un análisis por componentes principales de las muestras de vinos para comparar el efecto que produce en los parámetros físico-químicos la utilización de diferentes preparados de LSI-GSH. Debido al elevado número de variables estudiadas, es necesario realizar una compresión de los datos, reduciendo el número de variables a unas pocas denominadas componentes principales (CP) pero manteniendo la máxima información. De este modo, en este análisis se emplearon 13 variables que fueron reducidas a cuatro CP con autovalores mayores o iguales a 1,0. Estas cuatro CP juntas consiguieron explicar el 92,6% de la variabilidad de los datos originales. La CP1 explicó el 46,8% de la varianza; por otro lado, la CP2 explicó el 24,8% de la varianza.

En el bigráfico de la Fig.18, se muestra el diagrama de dispersión de las muestras de vino y de las variables en función de las CP1 y CP2. Puede observarse que hay cuatro vinos agrupados de dos en dos (VDL4 y VSO2) (VDL1 y VDL5), el resto de vinos aparecen separados a lo largo de todo el bigráfico. Dependiendo de la cercanía de las muestras a unos parámetros u otros, su concentración será mayor o menor.

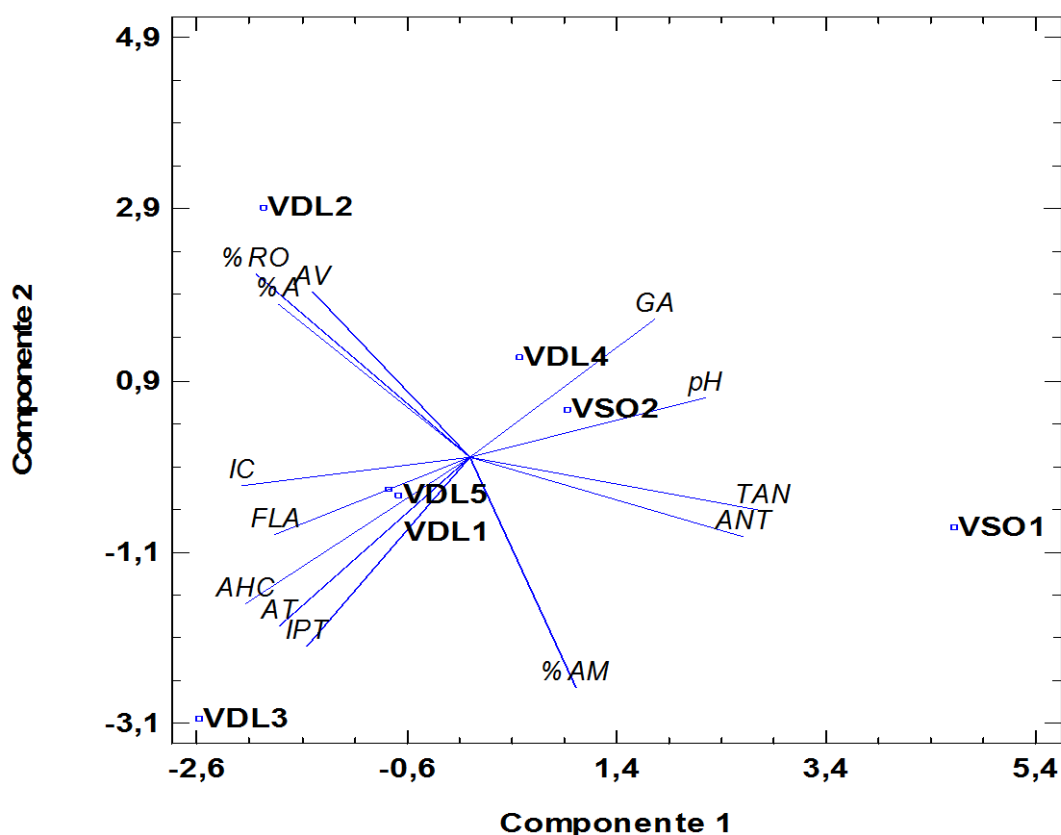


Fig. 13. Diagrama de dispersión de las muestras de vino y de las variables en función de las CP1 y CP2.

El vino VSO1, se encuentra separado del resto con valores positivos elevados de CP1 y valores algo negativos de CP2, por lo tanto este vino se caracteriza por altos valores de taninos, antocianos, pH y % amarillo. Los vinos VSO2 y VDL4 presentan características similares al estar agrupados en el cuadrante positivo de la CP1 y de la CP2, caracterizándose por tener la mayor graduación alcohólica y el mayor pH, a la vez que presentan la menor acidez total y el menor nivel de IPT. El vino VDL2 se encuentra en el cuadrante muy positivo de la CP2 y negativo de la CP1, presentando altos valores de % rojo, % azul y acidez volátil. Los vinos VDL1 y VDL5 se encuentran agrupados en una región intermedia, presentando valores bajos para todos los parámetros. Por último el vino VDL3 se encuentra en el cuadrante negativo tanto de CP1 como de CP2, presentando los mayores niveles de IPT, AT, AH y flavonoles; este vino además presenta la graduación y el pH más bajos.

5.3. TEST ACELERADO DE OXIDACIÓN:

Con el objetivo de comprobar el efecto que tiene la adición de preparados de LSI-GSH sobre la oxidación de los vinos rosados, se llevó a cabo una oxidación acelerada siguiendo el procedimiento 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 los compuestos fenólicos y el color. Los resultados están expresados en % relativos, suponiendo el 100% el valor para después de la fermentación alcohólica (día 0).

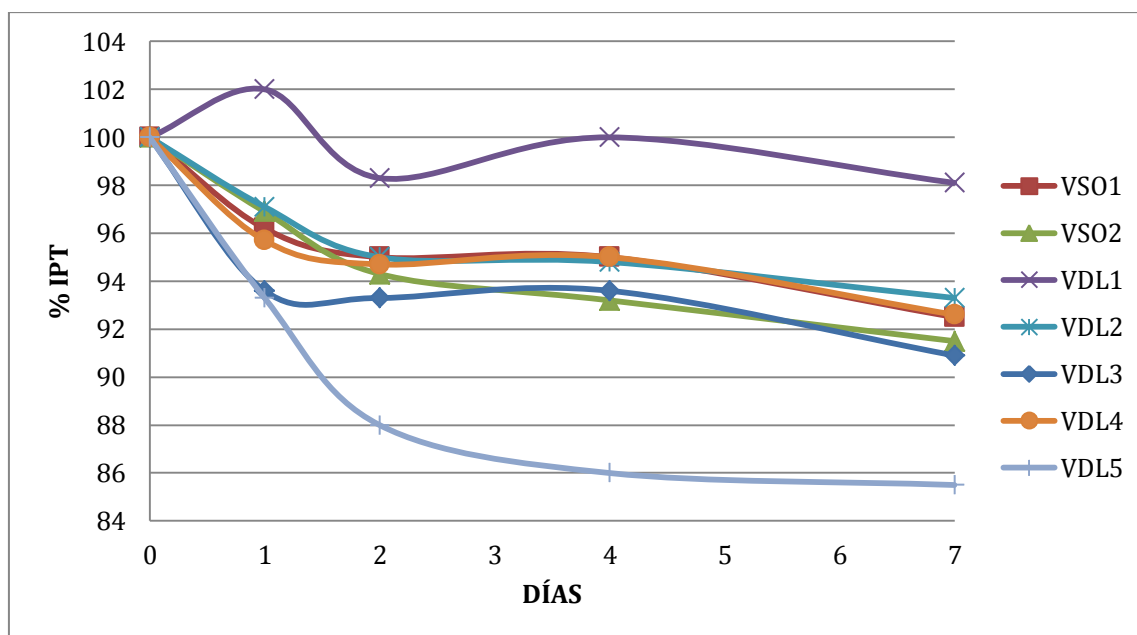


Fig. 14. Evolución relativa (en %) del IPT durante el test de oxidación

IPT



Fig. 15. IPT al 4º día de oxidación.

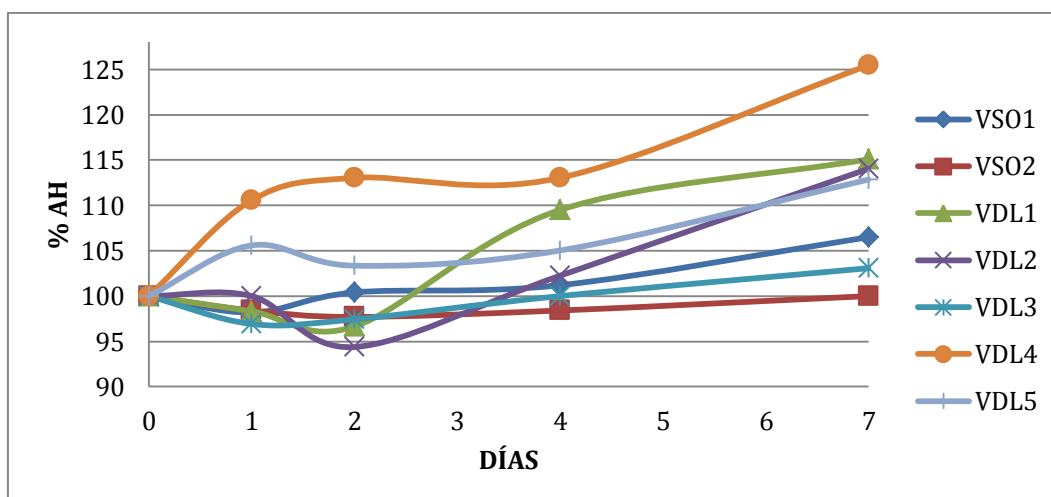


Fig. 16. Evolución relativa (en %) de ácidos hidroxicinámicos durante el test de oxidación

ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS



Fig. 17. Ácidos hidroxicinámicos al día 4 de oxidación.

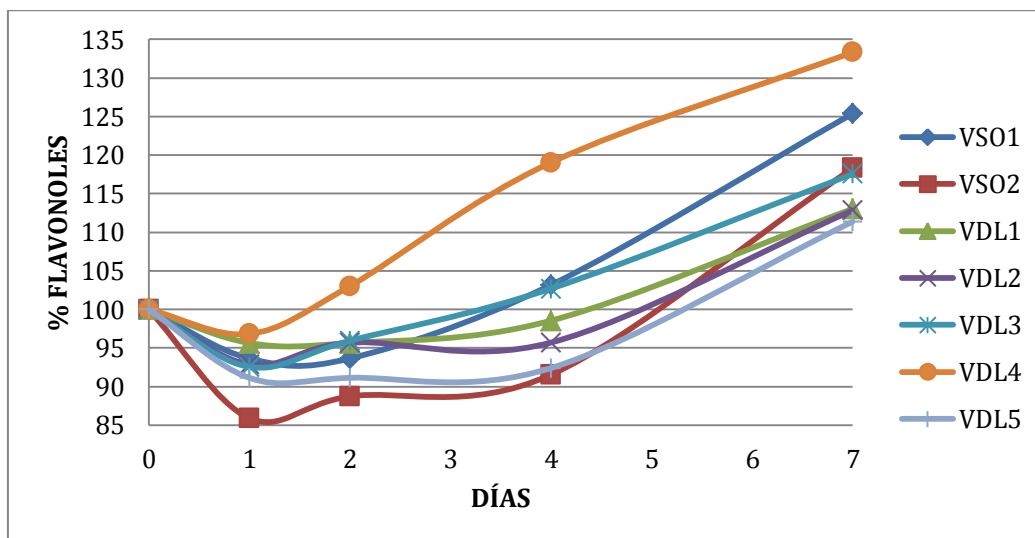


Fig. 18. Evolución relativa (en %) de flavonoles durante el test de oxidación

FLAVONOLES



Fig. 19. Flavonoles al día 4 del test oxidación.

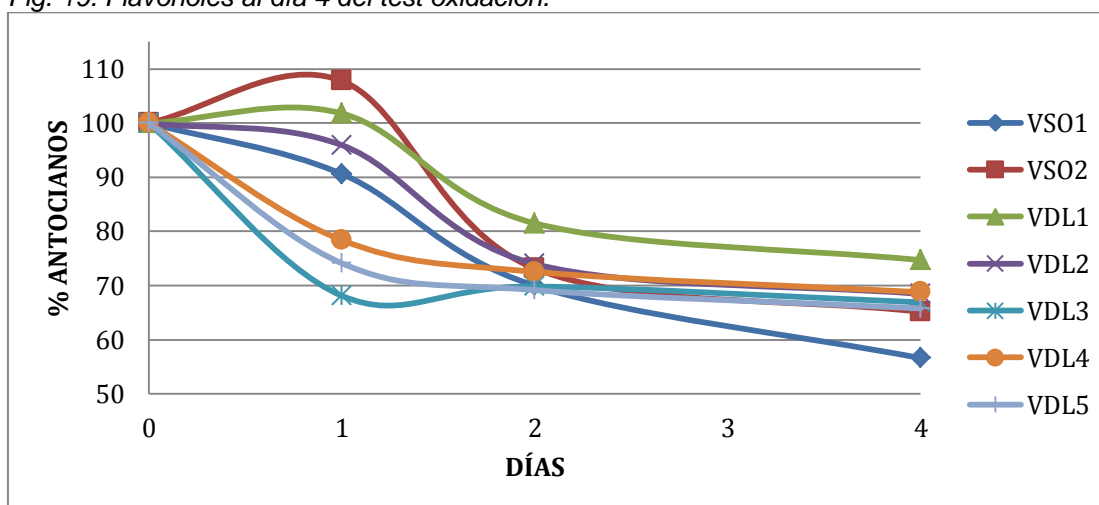


Fig. 20. Evolución relativa (en %) de antocianos durante el test de oxidación

ANTOCIANOS

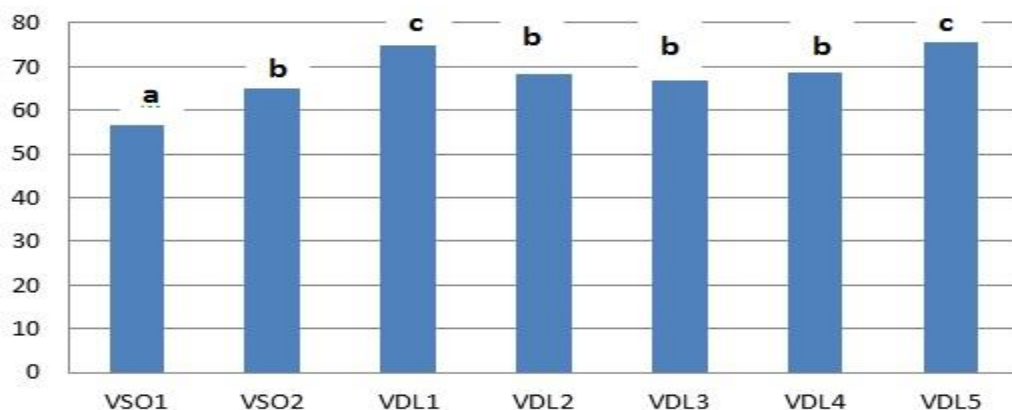


Fig. 21. Antocianos al día 4 de oxidación.

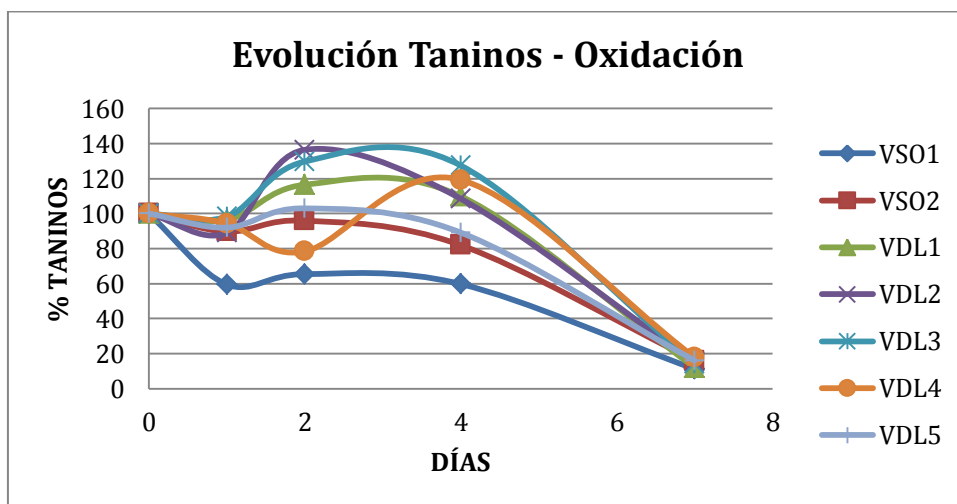


Fig. 22. Evolución relativa (en %) de taninos durante el test de oxidación.

TANINOS

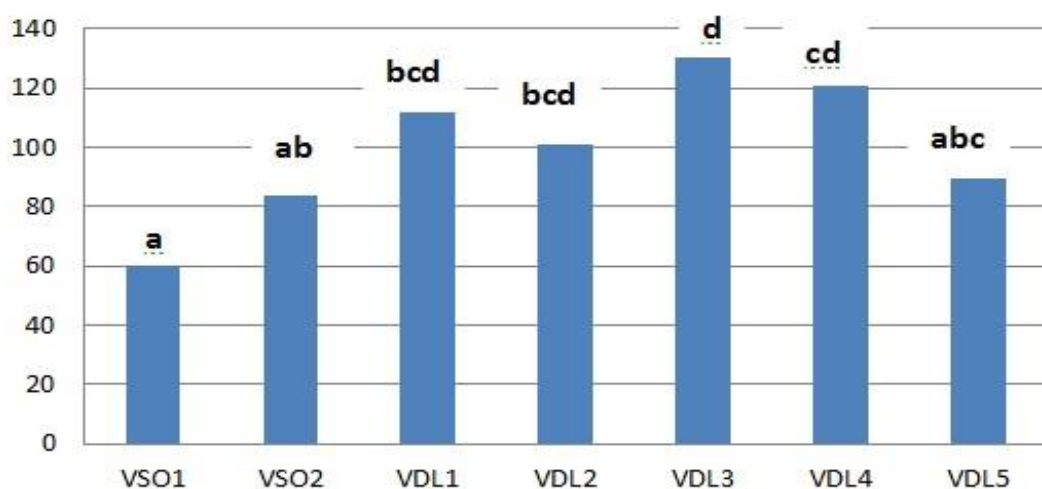


Fig. 23. taninos al día 4 de oxidación.

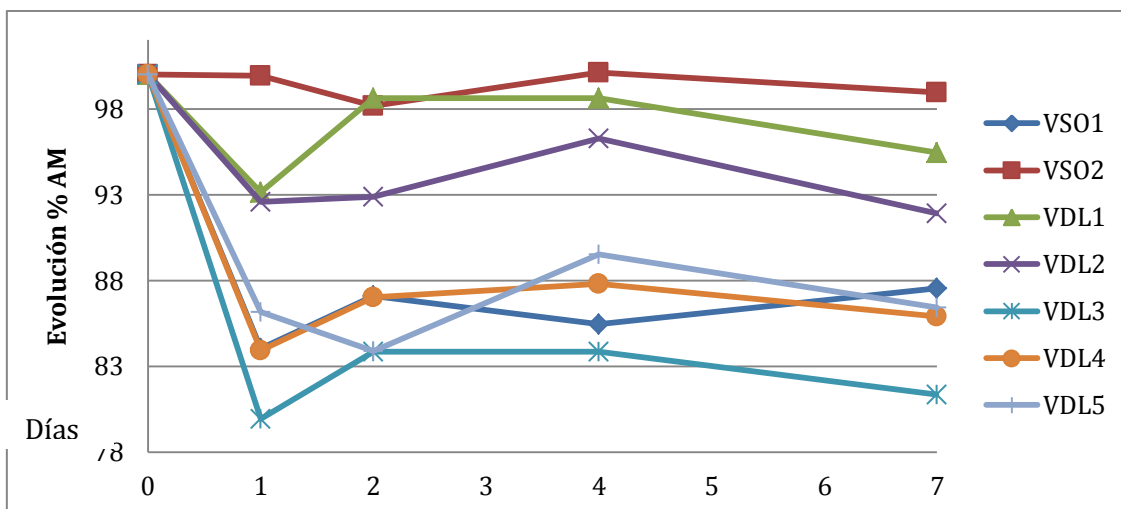


Fig. 24. Evolución relativa (en %) de amarillo durante el test de oxidación.

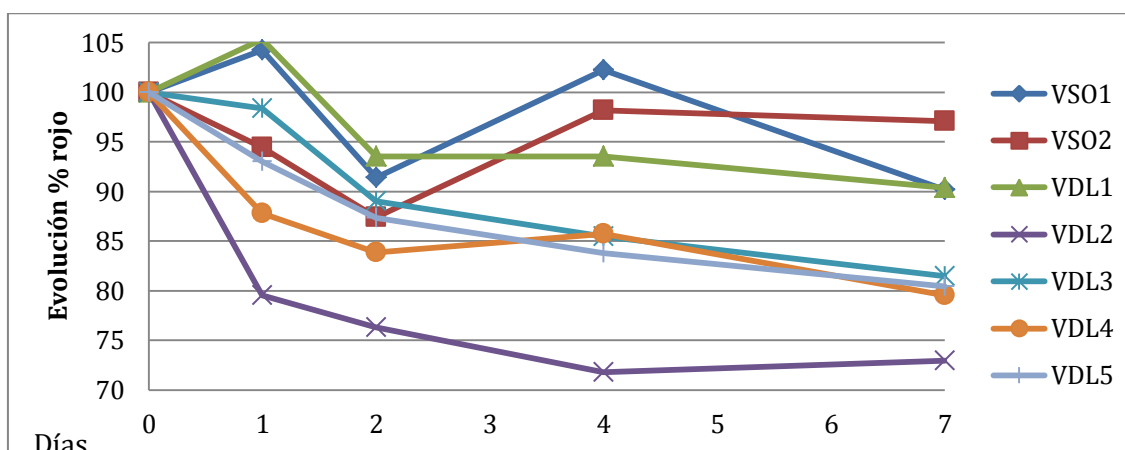


Fig. 25. Evolución relativa (en %) de rojo durante el test de oxidación.

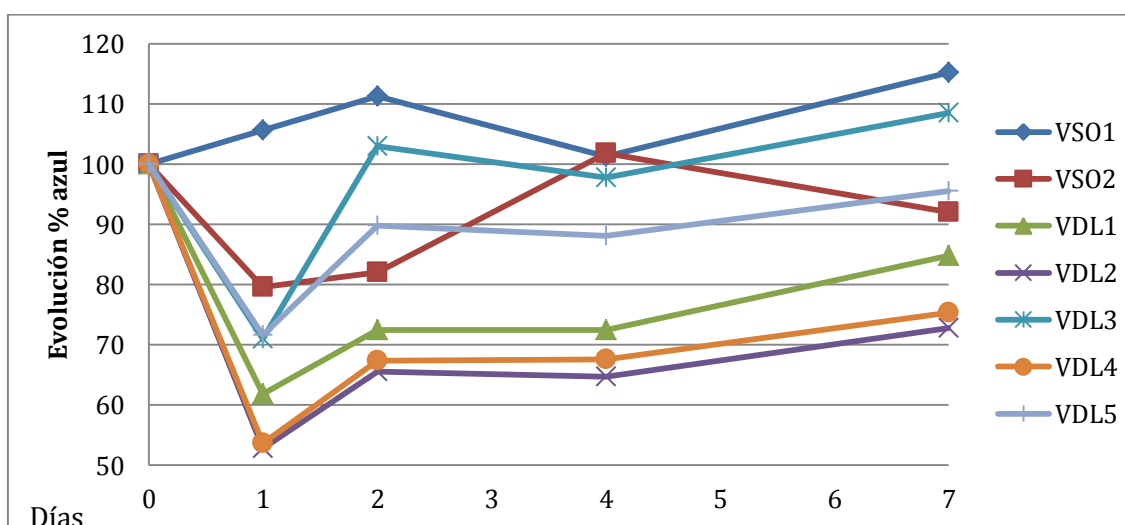


Fig. 26. Evolución relativa (en %) de azul durante el test de oxidación.

Durante el test acelerado de oxidación todos los vinos experimentaron un descenso medio en el nivel de polifenoles totales (Fig. 14), que fue más acusado para el vino VDL5. Por otro lado el vino VDL1 experimentó el menor descenso de todos. 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 día de oxidación (Fig. 15) se determinó que no había diferencias estadísticamente significativas entre los dos vinos control. Por otro lado, el menor y mayor descenso en el % relativo de IPT se observó en los vinos VDL1 y VDL5, respectivamente. Finalmente, el resto de vinos suplementados con LSI-GSH no mostraron diferencias estadísticamente significativas con los vinos control.

Tanto los ácidos hidroxicinámicos como los flavonoles (Fig. 16 y 18, respectivamente), experimentaron un cierto aumento en el porcentaje de evolución, para todos los vinos durante el test acelerado de oxidación. Probablemente, este comportamiento sea debido a la formación de compuestos oxidados con absorbancia a 320 y 365 nm. El estudio estadístico al 4º día de oxidación reveló que los vinos VDL1 y VDL4 son los que mostraron mayor absorbancia a 320 nm, mientras que el VDL4 mayor absorbancia a 365 nm. Además, no se observaron diferencias para ambos parámetros entre los vinos control.

El porcentaje de disminución del nivel de antocianos totales fue muy similar para todos los vinos a lo largo de todo el test de oxidación. Los vinos VDL1 y VDL5 sufrieron un menor descenso en el nivel de antocianos (respecto a su vino control VSO2), no observándose diferencias estadísticamente significativas entre el resto de vinos suplementados con LSI-GSH. Al igual que los antocianos, los taninos también sufrieron un proceso de oxidación durante el test con calor, observándose un descenso de sus niveles con el tiempo. A los cuatro días de oxidación, los vinos VDL3 y VDL4 son los que mantuvieron los mayores niveles de taninos (en comparación con el vino control VSO2), mientras que no se observaron diferencias para el resto de vinos con LSI-GSH.

En cuanto al color de los vinos, no aparecieron diferencias estadísticamente significativas para ningún vino analizado al 4º día de oxidación. De forma general, todos experimentaron al inicio un descenso de su % de amarillos y % de azules, excepto VSO1 que aumentó su % azul los dos primeros días. Posteriormente se da un aumento de ambos porcentajes de colores para todos los vinos el segundo día del test; mientras que la coloración azul seguirá en ligero aumento hasta el final del test, la coloración de amarillo disminuirá a partir del cuarto día de oxidación. En cambio el % de rojo sufrió una disminución los primeros días, a excepción de los vinos VDL1 y VSO1 que por el contrario aumentan su porcentaje; el segundo día del test de oxidación supone un punto de inflexión importante ya que todos los vinos adicionados con LSI-GSH disminuyen su coloración roja de forma constante hasta el último día. 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).

Finalmente, para una mejor comprensión de los resultados al 4º día de oxidación se realizó un análisis por componentes principales con las variables significativas. La CP1 recoge el 45,7% de la variabilidad de los datos, mientras que la CP2 el 28,8%. En la Fig. 27 se observa que las muestras se agrupan en varios subgrupos. Cabe destacar el grupo formado por los vinos VDL1 y VDL4 que presentan los mayores niveles para los % relativos para todos los parámetros analizados, lo que nos puede indicar que los vinos suplementados con los derivados de LSI-GSH1 y LSI-GSH4 sufrieron un menor grado de oxidación, si bien, es preciso comentar que no se observaron diferencias estadísticas para los parámetros de color.

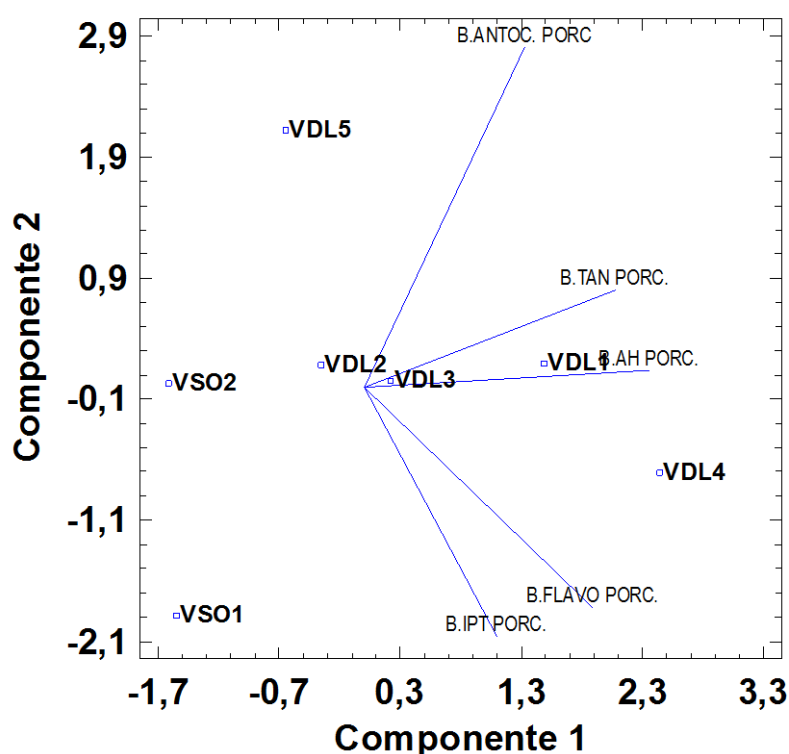


Fig. 27. Diagrama de dispersión de las muestras de vino y de las variables al 4º día de oxidación en función de las CP1 y CP2.

6. CONCLUSIONES:

Se extraen las siguientes conclusiones tras analizar los resultados obtenidos en las diferentes analíticas realizadas tras la fermentación alcohólica y tras el test acelerado de oxidación:

- El preparado LSI-GSH VDL4 promueve un comienzo más rápido de fermentación, aunque no acorta la duración total de la misma.
- La reducción en el nivel de sulfuroso no promueve notables cambios en los parámetros básicos ni en el color de los vinos, lo que nos lleva a la conclusión que la adición de LSI-GSH ha aportado el mismo efecto que el sulfuroso durante la fermentación en condiciones normales.
- Atendiendo a los distintos compuestos fenólicos analizados, hay indicios que los vinos suplementados con las LSI-GSH1 y LSI-GSH2 sufrieron menos grado de oxidación durante el test de oxidación. Si bien, este comportamiento no se puede corroborar con los parámetros de color.

La conclusión final de este estudio es que el empleo de levaduras inactivas ricas en glutatión sí tiene consecuencias sobre la oxidación de los vinos rosados, limitando las pérdidas de color. Sin embargo no se puede corroborar esta afirmación con absoluta certeza, para ello sería necesario desarrollar estudios complementarios que aporten nuevos datos con los que poder comparar los resultados obtenidos.

7. BIBLIOGRAFÍA:

- Adams, D. O. & Liyanage, C., 1993. *Glutathione increases in grape berries at the onset of ripening. Am. J. Enol. Vitic.* 44, 333-338.
- Anderson, M. E., 1998. *Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chemico-Biolog. Interactions.* 112, 1-14.
- 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 Anal. Methods,* 5, 1 154-161.
- Andújar-Ortiz, I. Pozo-Bayón, M. A., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J. & Garrido, I., 2011. *Effect of using glutathione-enriched inactive dry yeast preparations on the phenolic composition of rosé Grenache wines during winemaking. J. Int. Sci. Vigne Vin.* 46, 241-251.
- Barrio-Galán, R., Pérez-Magarino, S., Ortega-Heras, M., Willians, P., & Doco, T., 2012. *Polysaccharide characterization of commercial dry yeast preparations and their effect on white and red wine composition. Food Science Tech.* 48, 215-223.

- *Beutler, E., 1989. Nutrition and metabolic aspects of glutathione. Annu. Rev. Nutr. 9, 287-302.*
- *Cheynier, V. F., Trousdale, E. K., Singleton, V. L., Salgues, M. J. & Wylde, R., 1986. Characterization of 2-S-glutathioylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. J. Agric. Food Chem. 34, 217–221.*
- *Cheynier, V., Souquet, J. M. & Moutounet, M., 1989. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. Am. J. Enol. Vitic. 40, 320-324.*
- *COMPENDIUM OF INTERNATIONAL METHODS OF WINE AND MUST ANALYSIS (OIV). Edition 2014. Volumen 1, 2.*
- *Dr. Cazorla García Juan, Dra. Xirau Vayreda María, Azorín Romero, Roberto (2000). Técnicas usuales de análisis en enología. Ed. Panreac Química S.A.*
- *Dubourdieu, D. & Lavigne, V., 2004. The role of glutathione on the aromatic evolution of dry white wine. Vinidea. Net. 2, 1–9*
- *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. J. Agric. Food Chem. 55, 2765-2769.*
- *Fahey, R.C., 2001. Novel thiols of prokaryotes. Annu. Rev. Microbiol. 55, 533-556.*
-
- *Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Escudero, A., & Cacho, J., 1998. Role of Hydroxycinnamic Acids and Flavanols in the Oxidation and Browning of White Wines. J. Agric. Food Chem. 46, 4937-4944.*
- *Fracassetti, D., Lawrence, N., Tredoux, A. G. J., Tirelli, A., Nieuwoudt, H. H. & Du Toit, W. J., 2011. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. Food Chem. 128, 1136–1142.*
- *García Barceló J. (1990). Técnicas analíticas para vinos. GAB.*
- *Guadalupe, Z., Palacios, A. & Ayestaran, B. 2007. Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. J. Agric. Food Chem. 55, 4854-4862*
- *Guadalupe, Z., Martínez, L. & Ayestaran, B. 2010. Yeast mannoproteins in red winemaking: effect on polysaccha*
- *Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges. 1re. Partie: les equilibres des anthocyanes et des tanins. Connaissance de la Vigne et du Vin 18(3): 195-217.*
- *Hidalgo, J., 2011. Tratado de enología. Tomo I y II. Mundi- Prensa, Madrid, España.*

- 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 Addit, Contam, Part A Chem, Anal, Control Expo, Risk Assess* 30, 1, 80-92.
- Larue, F., Lafon-Lafourcade, S. & Ribéreau-Gayon, P., 1980. Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentative activity in grape must. *Appl. Environment. Microbiol.* 39, 808-811.
- Lavigne, V., Pons, A. & Dubourdiou, D., 2007. Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection-Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. *J. Chrom. A.* 1139, 130-135.
- Lavigne-Cruège, V. & Dubourdiou, D., 2002. Role of glutathione on development of aroma defects in dry white wines. In: Trogus, H., Gafner, J. and Sutterlin, A. (eds). *13th International Enology Symposium, International Association of Enology: Montpellier, France*, 331-347.
- Leustek, T., Martin, M., Bick, J. & Davies, J., 2000. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 141-165.
- Maggu, M., Winz, R., Kilmartin, P. A., Trought, M. C. T. & Nicolau, L., 2007. Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10281-10288.
- Mazuelas, B. 2013. Estudio de derivados de levadura ricos en glutatión sobre la calidad de los vinos blancos. Proyecto fin de carrera. Universidad de Valladolid.
- Meister, A. & Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760.
- Papadopoulou, D. & Roussis, I. G., 2001. Inhibition of the decline of linalool and α -terpineol in muscat wines by glutathione and N-acetyl-cysteine. *It. J. Food Sci.* 13, 413-419.
- Papadopoulou, D. & Roussis, I. G., 2008. Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetyl-cysteine. *It. J. Food Sci. Technol.* 43, 1053-1057.
- Park, S. K., Boulton, R. B. & Noble, A. C., 2000a. Formation of hydrogen sulfide and glutathione during fermentation of white grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 91-97.
- Park, S. K., Boulton, R. B. & Noble, A. C., 2000b. Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection. *Food Chem.* 68, 475-480.
- Patel, P., Herbst-Johnstone, M., Lee, S. A., Gardner, R.C., Weaver, R., Nicolau, L. & Kilmartin, P. A., 2010. Influence of juice pressing conditions on

- *polyphenols, antioxidants and varietal aroma of Sauvignon blanc microferments. J. Agric. Food Chem. 58, 7280-7288.*
- *Penna, N. C., Daudt, C. E., Brendel, M. & Henriques, J. A. P., 2001. Evolución de los niveles de glutathion y ésteres hidroxicinámicos durante la vinificación de Sauvignon Blanc, Chenin Blanc, Niágara y Tannat. Alimentaria 326, 147-151.*
- *Penninckx, M. J. & Jaspers, C.J., 1982. On the role of glutathione in microorganisms. Bull. Inst. Pasteur 80, 291-301.*
- *Penninckx, M. J., 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. Enz. Microbial Techn. 26, 737-742.*
- *Penninckx, M. J., 2002. An overview on glutathione in Saccharomyces versus non-conventional yeasts. FEMS Yeast Res. 2, 295-305.*
- *Pozo-Bayón, M. A., Andújar-Ortiz, I. & Moreno-Arribas, M. V., 2009. Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. Food Res. Int. 42, 754-761.*
- *Ribéreau Gayon, J., Peynaud E., Sudraud P., y Ribereau Gayon P. ; 1980. Ciencias y Técnicas del vino, Tratado de enología.*
- *Roland, A., Schneider, R., Razungles, A. & Cavelier, F. 2011. Varietal thiols in wine: Discovery, analysis and applications. Chem. Rev. 111, 7355-7376.*
- *Roussis, I. G., Lambropoulos, I. & Tzimas P., 2007. Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. Am. J. Enol. Vitic. 58, 274-278.*
- *Roussis, I. G., Papadopoulou, D. & Sakarellos-Daitsiotis, M., 2009. Protective effect of thiols on wine aroma volatiles. Open Food Sci. J. 3, 98-102.*
- *Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic. Biol. Med. 27, 916-921.*
- *Singleton, V. L. & Kramling, T. E. 1976. Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. J. Enol. Vitic. 27, 157-160.*
- *Singleton, V. L., Salgues, J., Zaya, J. & Trousdale, E., 1985. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymatic oxidation in grape must and wine. Am. J. Enol. Vitic. 36, 50-56.*
- *Singleton, V. L., & Cilliers, J. J. L., 1995. Phenolic browning: a perspective from grape and wine. Research Enzymatic Browning and Its Prevention ACS Symposium Series. 600, 23-48.*
- *Tirelli, A., Fracassetti, D., & De Noni, I., 2010. Determination of reduced cysteine in oenological cell wall fractions of Saccharomyces cerevisiae. J Agric. Food Chem. 58, 4565-4570.*
- *Ugliano, M., Kwiatkowski, M. J., Vidal, S., Capone, D., Siebert, T., Dieval, J. B., Aagaard, O. & Waters, E. J., 2011. Evolution of 3-mercatohexanol, hydrogen*

- sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2564-2572.
- *Wilderandt, H. L. & Singleton, V. L., 1974. The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. Am. J. Enol. Vitic.* 25, 119-126.

