



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Título

Influencia de la adición de metionina y glutatión en mostos de uva sobre el aroma del  
vino obtenido.

Influence of methionine and glutathione addition to grape musts on the aroma  
formation of wine.

Autor/es

Mario Soler Bonet  
mariosolerbonet@gmail.com

Director/es

Purificación Hernández Orte y Yohanna Alegre Martínez

Facultad de Veterinaria

2017

---

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>8</b>
Mostos sintéticos.....	8
Análisis químicos del vino.....	10
Análisis sensorial .....	12
Tratamiento de datos.....	13
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>14</b>
Efecto de las adiciones de GSH y metionina sobre la velocidad de la fermentación alcohólica .....	15
Efecto de las adiciones de GSH y metionina sobre los parámetros clásicos de los vinos obtenidos .....	18
Efecto del glutatión y la metionina sobre el consumo de los precursores de mercaptanos polifuncionales.....	19
Efecto de las adiciones de GSH y metionina sobre la liberación de los mercaptanos polifuncionales.....	21
Efecto del GSH y la metionina sobre el aroma de los vinos finales .....	22
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>24</b>
<b>OPINIÓN PERSONAL Y APORTACIONES.....</b>	<b>26</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>27</b>

## RESUMEN

El aroma del vino es una de las características que más influye en la aceptabilidad o preferencia de los consumidores. Hay muchos compuestos volátiles en el vino que generan el aroma característico de cada variedad. Por lo tanto estudiar su origen y formación, puede ayudar a mejorar las cualidades organolépticas de los vinos y con ello, la calidad de los mismos.

Algunos aromas se generan durante la fermentación alcohólica de los vinos a partir de precursores inodoros. Este trabajo se centra en los precursores cisteínicos y de glutatión, que van a dar lugar a un tipo de aromas, denominados mercaptanos polifuncionales. Este grupo de compuestos se caracterizan por tener la presencia de un grupo tiol (-SH) en su estructura molecular y un perfil aromático con notas a frutas tropicales, boj o piel de pomelo. Estos compuestos son muy importantes debido a que se encuentran por encima de su umbral de olfacción, lo cual hace que sean percibidos con claridad.

El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de compuestos con grupo azufre (glutatión y metionina) sobre la liberación de los mercaptanos polifuncionales, así como sobre el consumo de sus precursores. Para ello, se preparan 5 fermentaciones de mosto sintético que contiene cantidades conocidas de precursores de mercaptanos polifuncionales, así como los elementos necesarios para el metabolismo de la levadura. Cada fermentación se prepara por triplicado. En unas muestras se adiciona metionina a dos concentraciones distintas, en otras se adiciona glutatión también a dos concentraciones distintas, y en la última muestra no se añade nada. Al final de la fermentación alcohólica se realizan los análisis clásicos de los vinos, se analizan los mercaptanos polifuncionales, así como sus precursores, y se lleva a cabo un análisis sensorial.

Los distintos análisis realizados en cada muestra han dado lugar a resultados muy variables con diferencias significativas, que de alguna manera ayudan a dar un paso más en este tema tan complejo.

## **ABSTRACT**

The aroma of wine is one of the features that influences the most with the highest influence on the acceptability or preference of the consumers. There are many volatile compounds in the wine that generate the typical aroma of each variety. Therefore to study the study of their origin and formation can help us to improve the organoleptic qualities of the wines and also the quality of themselves.

Some aromas are generated during alcoholic fermentation of wines from odorless precursors. This work is focused on the cysteinylated and glutathionylated precursors, which will result in a specific type of aromas, called polyfunctional mercaptans. This group of compounds is characterized by the presence of a thiol (-SH) group in its molecular structure and an aromatic profile with notes of tropical fruits, boxwood or grapefruit skin. These compounds are very important because they are found above their olfactory perception thresholds, which makes them been perceived clearly.

The aim of this work is to determine the effect of compounds with sulfur group (glutathione and methionine) on the release of polyfunctional mercaptans as well as on the consumption of their precursors. In order to do that, 5 fermentations of synthetic must that contain known amounts of polyfunctional mercaptan precursors as well as the necessary elements for the yeast metabolism are prepared. Each fermentation is prepared in triplicate. In some samples methionine is added at two different concentrations, in others glutathione is also added at two different concentrations, and in the last sample nothing is added. At the end of the alcoholic fermentation the traditional analyzes of the wines are done, the polyfunctional mercaptans, as well as their precursors are analyzed, and a sensorial analysis is also carried out.

The different analysis performed in each sample has result to variable results with significant differences, which in some way can help to take a step further in this complex subject.

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El motivo por el que he elegido este trabajo parte de mi interés por conocer un poco más el mundo de la enología. El vino es un producto muy interesante desde el punto de vista gustativo, y en un país como España donde hay una gran producción, apenas es consumido por sus habitantes. Por ello estudiar este tema relacionado con uno de los principales factores más apreciados del vino, me servirá para valorarlo aún más. Los objetivos que se han fijado son:

- Obtener vino a partir de la fermentación de mosto de uva sintético adicionado con precursores cisteínicos y glutatiónicos.
- Comprobar el efecto de la adición de metionina y glutatión en el aroma del vino tanto a nivel químico como sensorial.
- Caracterizar químicamente los vinos obtenidos.

## INTRODUCCIÓN

La uva es el fruto obtenido de la vid, *Vitis vinífera*, utilizada para la elaboración del vino a través de la fermentación. Las partes de las que se compone son el hollejo o piel, la pulpa, las semillas y el raspón. En la pulpa se encuentran la mayoría de los nutrientes de la uva. Los más importantes son los azúcares como glucosa y fructosa, que aumentan durante la maduración, así como, los ácidos orgánicos, destacando el ácido málico, cuya concentración va disminuyendo y el ácido tartárico, cuya concentración permanece más o menos constante (Conde et al., 2007). En el hollejo destacan los compuestos fenólicos solubles (flavonoides y no flavonoides) que van a contribuir al color. Los taninos (flavonoides) proporcionan la astringencia o sabor amargo a vinos jóvenes, pero aportan cuerpo y estructura a vinos envejecidos (crianza). Los antocianos son los responsables principales del color rojo. Las características finales del vino van a depender de muchos factores, sobre todo, del tipo y estado de la uva, de los tratamientos culturales realizados en los viñedos y del momento de la vendimia. Cuando aproximadamente la mitad de los granos han cambiado de color (envero) se realizan varios muestreos para seguir la maduración del grano, y decidir el momento de la vendimia. Se mide el azúcar, la acidez, los polifenoles, el estado sanitario, etc.

La fermentación es el proceso mediante el cual el azúcar del mosto es transformado por las levaduras en etanol, de forma que el grado alcohólico final del vino vendrá determinado por el contenido en azúcares de la uva. Asimismo, este proceso es clave en la generación de las diferentes propiedades organolépticas del vino final. La cantidad de azúcar que tenga el vino obtenido nos dirá si es un vino seco ( $<4$  g/L azúcar residual) o dulce (12-45 g/L azúcar). Los ácidos málico y tartárico, determinan la acidez del vino (Ruffner, 1982). Un pH bajo y una acidez moderada son características muy importantes en los vinos de calidad (Conde et al., 2007). Por otro lado, una de las características más importantes de los vinos, dado que es uno de los principales criterios de calidad de los mismos es el aroma. Por lo tanto, estudiar los factores que influyen en la composición aromática podría ayudar a mejorarla.

En el vino han sido identificados aproximadamente 800 compuestos volátiles, la mayoría de los cuales contribuyen al aroma (Bayonove C., Baumes R., Cruzet J., & Z., 2000), y cuyas concentraciones van desde varios mg/L hasta unos pocos ng/L e incluso menos.

Se distinguen tres tipos de aromas, según las fuentes de los diferentes compuestos que contribuyen (Schreier & Jennings, 1979): i) el aroma primario o varietal que lo componen los aromas propios de la uva, ii) aroma secundario o fermentativo que lo componen los aromas generados por las levaduras y bacterias durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica, y iii) aroma terciario o post-fermentativo que es el aroma adquirido por el vino durante el envejecimiento tanto en bodega como en botella.

Los metabolitos volátiles provienen del azúcar, de aminoácidos, compuestos azufrados, etc. Sin embargo, los compuestos derivados de las uvas son los que juegan un papel más decisivo en las notas aromáticas características de la variedad. En algunos casos, varios compuestos contribuyen a la percepción de un aroma en particular, como es el caso de los aromas afrutados (San-Juan, Ferreira, Cacho, & Escudero, 2011). En otros, un único compuesto es responsable del aroma propio de la variedad, como el linalol en los vinos Moscatel (Ribereau-Gayon, Boidron, & Terrier, 1975) o el 4-etilfenol en el carácter Brett del vino (Suárez, Suárez-Lepe, Morata, & Calderón, 2007).

En la uva los compuestos aromáticos pueden estar en forma libre o unidos a precursores. Los precursores son unos compuestos de la uva no volátiles e inodoros que

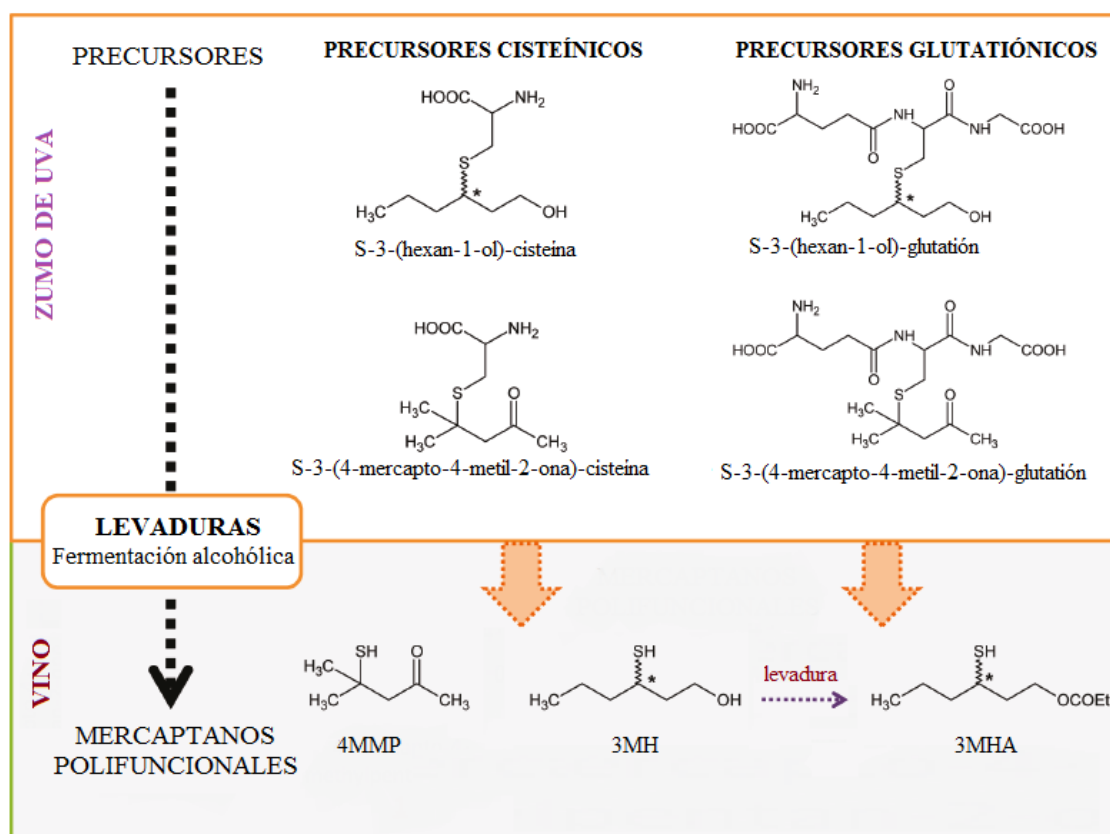
durante la vinificación van a dar lugar a sustancias aromáticas (Ugliano, 2009). Mientras que los compuestos libres son odoríferos inicialmente, los precursores dan lugar a compuestos aromáticos tras la acción del medio ácido, así como, enzimas y/o levaduras a través de reacciones bioquímicas complejas.

Algunos de estos precursores son los denominados precursores glicosídicos, un grupo diverso de compuestos inodoros inicialmente identificados en las uvas (Cordonni.R & Bayonove, 1974). Se caracterizan por contener azúcar, normalmente glucosa, unida a un compuesto volátil por enlace  $\beta$ -glicosídico (Martínez-Gil et al., 2013). Los compuestos volátiles son denominados agliconas, existiendo más de 100 agliconas que se agrupan dentro de las categorías de los shikimatos, terpenoides y norisoprenoides (Loscós, Hernandez-Orte, Cacho, & Ferreira, 2007). La liberación de estos compuestos volátiles es debida a la hidrólisis, tanto ácida como enzimática, de sus precursores, lo cual produce un incremento de las características aromáticas del vino (Ugliano, 2009).

Otros precursores son los S-conjugados que tienen una gran importancia para algunas variedades de uva como la Sauvignon blanc (SB). Estos precursores son inodoros pero durante la fermentación alcohólica (FA), las levaduras mediante la acción de la enzima  $\beta$ -liasa rompen el enlace carbono-azufre (C-S) que une el tiol con el resto del compuesto liberando los aromas (Tominaga, des Gachons, & Dubourdieu, 1998). Dentro de estos precursores hay dos tipos: i) los precursores S-cisteína conjugados, S-3-(hexan-1-ol)-cisteína (CYSMH) y S-3-(4-mercapto-4-metil-2-ona)-cisteína (CYSMP) (Tominaga, des Gachons, et al., 1998); y ii) los precursores S-glutación conjugados, S-3-(hexano-1-ol)-glutación (GLUMH) y S-3-(4-mercapto-4-metil-2-ona)-glutación (GLUMP) (des Gachons, Tominaga, & Dubourdieu, 2002; Fedrizzi, Pardon, Sefton, Elsey, & Jeffery, 2009). Además, el precursor CYSMH en parte se podría derivar del precursor GLUMH mediante la conversión enzimática (des Gachons et al., 2002).

Estos precursores dan lugar a un tipo de compuestos denominados mercaptanos polifuncionales, también conocidos como tioles volátiles (grupo -SH). Estos compuestos son responsables de las notas típicas de la variedad Sauvignon Blanc (SB) y contribuyen positivamente a las notas frutales de los vinos jóvenes. Los principales mercaptanos polifuncionales son la 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP) identificado como un olor agradable a boj y grosella negra, el 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) y el acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA) asociados a aromas a pomelo,

guayaba y fruta de la pasión (Lund et al., 2009). La 4MMP y el 3MH se liberan a partir tanto de sus precursores cisteínicos (CYSMH y CYSMP) como glutatiónicos (GLUMH y GLUMP). El acetato de 3-mercatohexilo se produce mediante la acetilación del 3-mercatohexanol por la acción de la alcohol acetil transferasa (AAT) de las levaduras (Swiegers & Pretorius, 2007). En la figura 1 se puede ver el proceso de formación de estos compuestos.



**Figura 1.** Liberación de los mercaptanos polifuncionales a partir de sus precursores cisteínicos y glutatiónicos. Modificada de (Roland, Schneider, Razungles, Le Guerneve, & Cavelier, 2010).

Los mercaptanos polifuncionales son clave en el vino debido a que se suelen encontrar por encima de su umbral de olfacción (tabla 1). Sin embargo, altas concentraciones de estos compuestos pueden conducir a aromas desagradables como sudor, cebolla u orina (Swiegers, Francis, Herderich, & Pretorius, 2006). En la uva y en el mosto los precursores se encuentran en concentraciones que pueden ser del orden de  $\mu\text{g/L}$ , mientras que los mercaptanos polifuncionales en el vino tienen concentraciones de  $\text{ng/L}$ , es decir, 1000 veces más bajas. Estudios previos han demostrado que una parte de los precursores está directamente relacionada con el aroma generado, pero solo una pequeña parte de estos liberan el tior aromático durante la fermentación, existiendo un factor de conversión de los precursores en los mercaptanos polifuncionales menor del 5



% (des Gachons, Tominaga, & Dubourdieu, 2000; Roland, Schneider, Le Guerneve, Razungles, & Cavelier, 2010; Roland, Schneider, Razungles, et al., 2010).

**Tabla 1.** Mercaptanos polifuncionales identificados en vinos de Sauvignon Blanc. Descripción de las notas aromáticas de cada compuesto, umbral de detección olfativa y rangos de concentración a los que se suelen encontrar en los vinos.

Compuesto	Umbral de olfacción (ng/L) <sup>a</sup>	Descripción aromática	Rangos encontrados en vinos (ng/L) <sup>b</sup>
<b>4MMP</b>	0,8	Boj, grosella negra	4-40
<b>3MH</b>	60,4	Piel de pomelo, guayaba, fruta de la pasión	26-18000
<b>3MHA</b>	4	Fruta de la pasión	0-2500

<sup>a</sup>(Tominaga, Murat, & Dubourdieu, 1998)

<sup>b</sup>(Lund et al., 2009; Mateo-Vivaracho, Zapata, Cacho, & Ferreira, 2010; Tominaga, Furrer, Henry, & Dubourdieu, 1998).

Hay otros mercaptanos polifuncionales, como el 2-furfuritiol (FFT), que imparte un olor a café tostado (Tominaga, Blanchard, Darriet, & Dubourdieu, 2000), el bencil mercaptano (BM) que aporta notas empireumáticas (Tominaga, Guimbertau, & Dubourdieu, 2003) y el 2-metil-3-furanthiol (2M3F) con aroma a maíz y carne asada (Withycombe & Mussinan, 1988). Al igual que los mercaptanos polifuncionales descritos anteriormente, estos compuestos tienen bajos umbrales, 0,4 ng/L, 0,3 ng/L y 1 ng/L, respectivamente (Tominaga et al., 2000; Tominaga et al., 2003; Withycombe & Mussinan, 1988). Los derivados del furantiol, como el FFT y 2M3F, son aromas que se forman principalmente durante el envejecimiento en barricas de roble (Blanchard, Tominaga, & Dubourdieu, 2001). Sin embargo, Schieberle encontró el FFT en vinos jóvenes, y lo definió como el producto de la reacción entre azúcares o derivados de azúcares y cisteína o sulfuro de hidrógeno (Schieberle, 1993). Por otro lado, la formación de BM nunca ha sido identificada.

Hay muchos factores que van a influir en la liberación de estos compuestos como las operaciones pre-fermentativas y las condiciones de vinificación (Masneuf-Pomarede, Mansour, Murat, Tominaga, & Dubourdieu, 2006). Hoy en día se sabe que la cantidad de precursores que pueda tener la uva está estrechamente relacionada con la cantidad de materia nitrogenada (Bell & Henschke, 2005; Subileau, Schneider, Salmon, & Degryse, 2008). El nitrógeno es un nutriente necesario para las levaduras, y se encuentra en forma de aminoácidos e iones de amonio. Cuando en el medio hay cantidades muy bajas del nitrógeno fácilmente asimilable (NFA, *yeast assimilable nitrogen* (YAN)), las levaduras

crecen lentamente, por lo tanto no fermentan adecuadamente y en consecuencia se generan menos aromas. El FAN tiene un efecto importante sobre el metabolismo de las levaduras, afectando a la formación de compuestos volátiles y no volátiles (Bell & Henschke, 2005). Normalmente en las bodegas, al inicio de la fermentación se suelen completar los mostos de uva con fosfato de diamonio para garantizar una población adecuada de levaduras.

Además de la cantidad de nitrógeno, también es importante el azufre. El azufre no se encuentra como tal en el mosto sino que forma parte de aminoácidos como la cisteína, la metionina y el péptido glutatión. El azufre, al igual que el nitrógeno, también lo utilizan las levaduras como otra fuente de nutrición.

Hasta ahora, no hay explicación del por qué se genera tan pocos mercaptanos polifuncionales en el vino, si en la uva la cantidad de precursores es mucho más alta. Por eso, en este trabajo se va a estudiar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de dos compuestos azufrados al mosto, el glutatión y la metionina, sobre la liberación de los mercaptanos polifuncionales, así como sobre el consumo de sus precursores. También, se estudiará de qué manera influye en los parámetros básicos del vino, así como en el aroma final del vino.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Mostos sintéticos**

#### Preparación de un mosto sintético

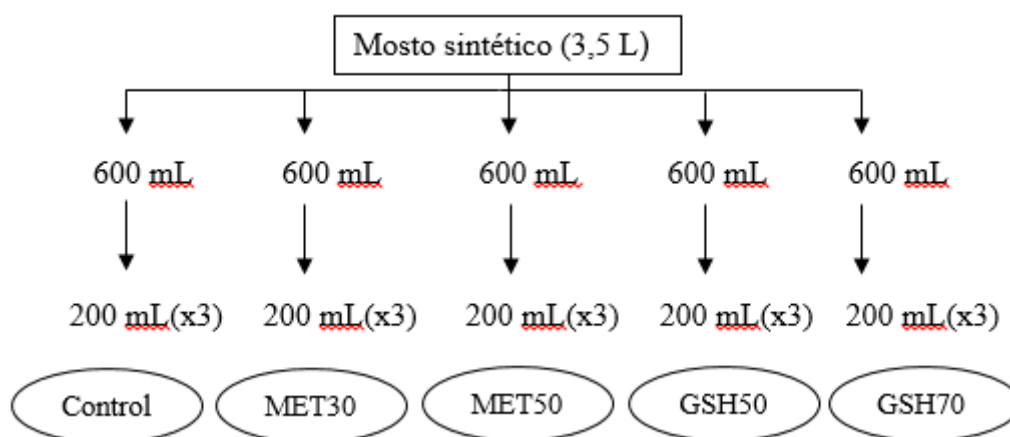
Se elabora un mosto a partir de distintas disoluciones ya preparadas (en stocks) y conservadas en el congelador. El mosto utilizado para este trabajo es adaptado de Bely et al., (Bely, Sablayrolles, & Barre, 1990). Este medio está formado por los siguientes componentes: glucosa (105 g/L), fructosa (105 g/L), ácido málico (0,3 g/L), ácido tartárico (5 g/L), ácido cítrico (0,3 g/L); oligoelementos expresados en mg/L: 4,7  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,49  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,19  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,54  $\text{CuCl}_2$ , 1,29  $\text{KIO}_3$ , 1  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2  $\text{Cl}_2\text{Zn}$ ; macroelementos expresados en g/L: 0,2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,155  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; vitaminas en mg/L: 1 piridoxinaClH, 1 ácido nicotínico, 1 pantotenato de calcio, 1 tiamina ClH, 1 ácido p-aminobenzoico, 0,2 rivo flavina, 0,2 ácido fólico, 0,04 biotina, myo-inositol (0,3 g/L); factores de crecimiento anaeróbico: ergosterol

(0,015 g/L), Tween 80 (0,05% v/v); nitrógeno: fosfato de diamonio  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (0,2199 g/L), aminoácidos que simulan el perfil encontrado en mostos de la variedad Chardonnay en mg/L: 49,19 ASP, 143,79 GLU, 105,95 GLN, 108,47 SER, 3,78 GLY, 49,73 HIS, 82,61 THR, 200,9 ARG, 528,11 PRO, 13,50 MET, 35,73 PHE, 12,27 LYS, 60,07 GABA, 60 ALA, 20 TYR, 20 VAL, 20 ILE, 20 LEU, 5 CYS; precursores de los mercaptanos polifuncionales en  $\mu\text{g/L}$ : 100 CYSMH, 50 CYSMP, 1000 GLUMH, 50 GLUMP.

El mosto se ajusta a pH 3,5. En una campana de extracción (flujo laminar) con aire en convección para impedir la entrada de contaminantes del exterior, se filtra el mosto sintético con un filtro amicróbico para retener los microorganismos (bacterias y levaduras). Seguidamente el mosto filtrado se recoge en recipientes previamente esterilizados en el autoclave a una temperatura de 140 °C durante 20 minutos.

#### Adición de glutatión y metionina

El mosto inicial (3,5 L) se reparte en 5 recipientes de 600 mL para cada uno de los compuestos a adicionar. Se realizan 5 experimentos: i) **Control**, mosto sintético sin adicionar; ii) **MET30**, mosto sintético con adición de 30 mg/L de metionina; iii) **MET50**, mosto sintético al que se añade 50 mg/L de metionina; iv) **GSH50**, adición de 50 mg/L de glutatión (GSH); v) **GSH70**, adición de 70 mg/L de glutatión. Cada uno de estos recipientes se divide en tres recipientes más pequeños de 200 mL, en los que posteriormente se lleva a cabo la fermentación (figura 2).



**Figura 2.** Esquema de la preparación de los mostos sintéticos por triplicado con las adiciones de metionina (30 mg/L y 50 mg/L) y glutatión (50 mg/L y 70 mg/L).

### Inoculación

Se preparan las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* Zymaflore X5, primero hidratándolas con agua a 37 °C durante 20 minutos y luego nutriéndolas con mosto sintético previamente filtrado a la misma temperatura durante 10 minutos. Esta levadura es elegida debido a que previos estudios mostraron su buena capacidad en la liberación de mercaptanos polifuncionales (Masneuf-Pomarede et al., 2006). Seguidamente se inoculan  $10^6$  cel/mL en cada uno de los fermentadores previamente mencionados.

### Fermentación

Las muestras de mosto ya inoculadas se pesan por separado antes de meterlas a incubar y seguidamente se ponen a fermentar a 21 °C.

Durante las 3-4 semanas siguientes, cada día se pesan todas las muestras. Se lleva a cabo un seguimiento de la fermentación mediante pesada. El peso es cada vez menor debido a la transformación por las levaduras del azúcar (glucosa, fructosa) en etanol y a su consecuente producción de CO<sub>2</sub> que al ser un gas se desprende.

A medida que las fermentaciones van acabando (el peso se mantiene constante durante 2-3 días), se centrifuga el vino a 4500 rpm durante 20 minutos. Las muestras ya centrifugadas se guardaran refrigeradas a 4 °C hasta la posterior realización de los análisis.

### **Análisis químicos del vino**

Se realizan análisis clásicos, análisis de precursores cys/glu y de mercaptanos polifuncionales para caracterizar los distintos vinos y comparar posibles diferencias entre ellos.

### Análisis clásicos

En los análisis clásicos se realizan las determinaciones de azúcares reductores, acidez volátil, acidez total, y pH. Estos métodos se realizan según la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). Además se determina el grado alcohólico mediante cromatografía de gases.

### *Azúcares reductores*

Todo vino contiene monosacáridos o azúcares reductores. Hay varios métodos para determinarlos, frecuentemente llevan como base la oxidación de los azúcares por cobre divalente, en medio alcalino y en caliente, a ebullición. Se evita la insolubilización del cobre en medio alcalino acomplejándolo. En un erlenmeyer de 100 mL se vierten 10 mL de una disolución de sulfato de cobre II ( $\text{CuSO}_4$ ) pentahidratado y se añaden 5 mL de disolución de Seignette (625 g/L de tartrato de sodio y potasio + 200 g/L de NaOH). A continuación se añade el vino, o en el caso del blanco, se añade agua. Se lleva a ebullición durante 2 minutos sobre una placa calefactora y se deja enfriar. Seguidamente se añaden: 10 mL de disolución de yoduro de potasio (KI) (150 g de KI/L + 50 mL/L de NaOH 1N), 10 mL de disolución de ácido sulfúrico al 16 % ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), y 10 mL de indicador de almidón (10 g/L). A continuación se valora con tiosulfato sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) (13,7 g de tiosulfato sódico pentahidratado/L + 50 mL de NaOH/L). La diferencia en mL entre el gasto de tiosulfato de la muestra de vino y del blanco representa el contenido en azúcares reductores expresado en g/L.

### *Acidez volátil*

La acidez volátil está constituida por los ácidos pertenecientes a la serie del ácido acético. La determinación se efectúa mediante la separación de los ácidos volátiles con arrastre de vapor de agua y rectificación de los vapores. Posteriormente estos ácidos se valoran con NaOH en presencia de fenoftaleína como indicador.

### *Acidez total y pH*

La acidez total es la suma de las acideces valorables cuando se lleva el vino a pH 7 por adición de una solución alcalina valorada. Así, el vino se valora con la solución de NaOH utilizando el pHmetro para localizar el punto final de la valoración a pH 7.

### *Grado alcohólico*

El grado alcohólico de las muestras se determina mediante cromatografía de gases con detector (FID) de llama ionizante. Para cada muestra se añaden en un matraz aforado 0,125 mL de vino, 4  $\mu\text{L}$  de patrón interno 2-butanol en una concentración de 323 mg/L y se enrasa con agua hasta los 10 mL. El análisis se realiza con un cromatógrafo GC 8000 de Fisons Instruments (Ipswich, Reino Unido) usando una columna capilar DB-

cera (30 m x 53 mm i.d. x 2  $\mu$ m) de J & W Scientific (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). El inyector se mantiene a 250 °C y la relación de división es de 1:4. Se utiliza hidrógeno como gas portador y la presión se mantiene a 27,5 kPa. La temperatura del FID es de 250 °C y los caudales de los gases del detector son 95 kPa para el gas de preparación, 35 kPa para el hidrógeno y 60 kPa para el aire. El programa de separación se realiza en modo isotérmico establecido a 70 °C. Se inyectan 0,5  $\mu$ L de muestra. La relación entre el área de los picos del etanol del vino y del estándar interno nos permite determinar el valor del grado alcohólico de las distintas muestras. El tiempo de adquisición es de 5 minutos. Para hallar el grado alcohólico exacto de cada vino se hace una recta de calibrado, a partir de patrones con distintas concentraciones de etanol conocidas y sus respectivas normalidades (la normalidad es la relación entre el área del etanol y el área del patrón interno). Con la ecuación de la recta se interpolan las normalidades de las diferentes muestras y así se obtienen los datos.

#### Precusores cisteínicos y de glutatión

Los precursores CYSMP, CYSMH, GLUMP y GLUMP se cuantifican en la Universidad de la Rioja. Para ello, se toma 1 ml de muestra, se centrifuga a 4500 rpm durante 20 minutos, se filtra con dos filtros en tándem de 0,45  $\mu$ m y 0,20  $\mu$ m y se inyecta en un cromatógrafo de líquidos UPLC acoplado a espectrometría de masas siguiendo el método validado por Concejero et al. (Concejero, Pena-Gallego, Fernandez-Zurbano, Hernandez-Orte, & Ferreira, 2014).

#### Mercaptanos polifuncionales

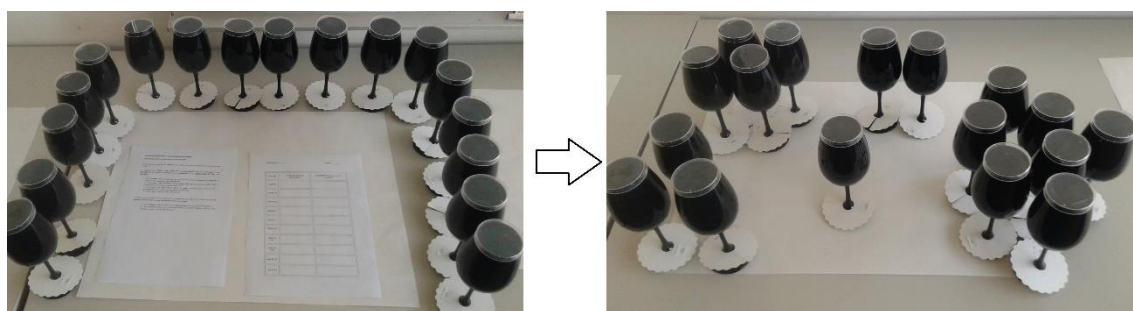
La cuantificación del 2M3F, FFT, 4MMP, 3MHA, 3MH y BM se lleva a cabo usando el método propuesto y validado por Mateo-Vivaracho et al., (Mateo-Vivaracho et al., 2010).

### **Análisis sensorial**

*Panel:* El análisis sensorial del vino se lleva a cabo por un panel de 17 catadores expertos del departamento de química analítica de la facultad de ciencias de la Universidad de Zaragoza.

*Procedimiento:* La prueba de agrupación o sorting task es un método de análisis sensorial que consiste en la agrupación de los distintos vinos de acuerdo a la similitud

del aroma entre ellos. En este estudio se les pide a los panelistas que agrupen los vinos sobre la mesa como se muestra en la figura 3. Pueden hacer tantos grupos como quieran y en cada grupo pueden meter el número de vinos que ellos crean conveniente. Una vez los grupos están hechos sobre la mesa, se les da un papel y un bolígrafo para que escriban sus respuestas. Seguidamente, se les pide que describan cada grupo de vinos con entre 1 y 3 atributos.



**Figura 3.** Preparación de los puestos de cata. Realización de los diferentes grupos en función de la semejanza del aroma.

*Muestras:* 17 muestras de vino son analizadas mediante sorting task: 15 muestras procedentes de las fermentaciones y 2 muestras replicadas como control de reproducibilidad del panel. Una hora antes de realizar este análisis las muestras se retiran del frigorífico y se sirven 10 mL de cada una en copas de vino oscuras (ISO 3591, 1977) etiquetadas con números de tres dígitos aleatorios y cubiertas por placas plásticas de Petri.

## **Tratamiento de datos**

Las copas se sirven en la misma sala, en puestos individuales, a la misma hora y en un orden aleatorio para cada catador. No se les informa a los panelistas sobre la naturaleza de los vinos a evaluar.

### Análisis estadístico

Con todos los datos se ha realizado un estudio ANOVA de un factor mediante el SPSS 19.0 system (SPSS Inc., Chicago. iL. USA) para determinar si existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos de los vinos obtenidos. El nivel de significatividad al que se trabaja es del 95 %.

### Tratamiento de los datos obtenidos con el sorting task

Los resultados se recopilan en una matriz de coocurrencia, que representa la cantidad de veces que cada par de vinos se han agrupado juntos. De forma que números mayores indican una mayor similitud entre las muestras. Esta matriz se somete a un análisis estadístico denominado escalado multidimensional (MDS). Se trata de una técnica de representación espacial, con la que se visualiza sobre un mapa de 2 o 3 dimensiones un conjunto de vinos.

Para la realización del clúster, las coordenadas obtenidas del MDS se someten a un análisis de agrupamiento jerárquico (HCA). Los análisis MDS y HCA se realizan utilizando el software XLSTAT (versión 2014.2.02). El HCA permite identificar los vinos que pertenecen al mismo clúster.

En el caso del tratamiento de los descriptores dados por los panelistas, se asume que todas las muestras pertenecientes a un mismo grupo están asociadas con los mismos atributos. De esta forma, se calcula la frecuencia de citación de cada descriptor y solo son considerados aquellos descriptores dichos, por al menos el 20 % del panel.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Con el fin de estudiar el efecto de las adiciones de glutatión y metionina sobre los diferentes parámetros clásicos de los vinos, así como sobre los mercaptanos polifuncionales, se realizan 5 fermentaciones (por triplicado) de mostos sintéticos a las que se han adicionado diferentes concentraciones de GSH y metionina. En esta parte del trabajo se muestran los distintos resultados que se obtienen de los análisis de los vinos. Primero se presenta el seguimiento de todas las fermentaciones, observando las diferencias entre ellas. Después se reflejan los resultados de los análisis clásicos, así como los análisis de los mercaptanos polifuncionales, y de sus precursores. Finalmente se explican los resultados obtenidos tras el análisis sensorial.

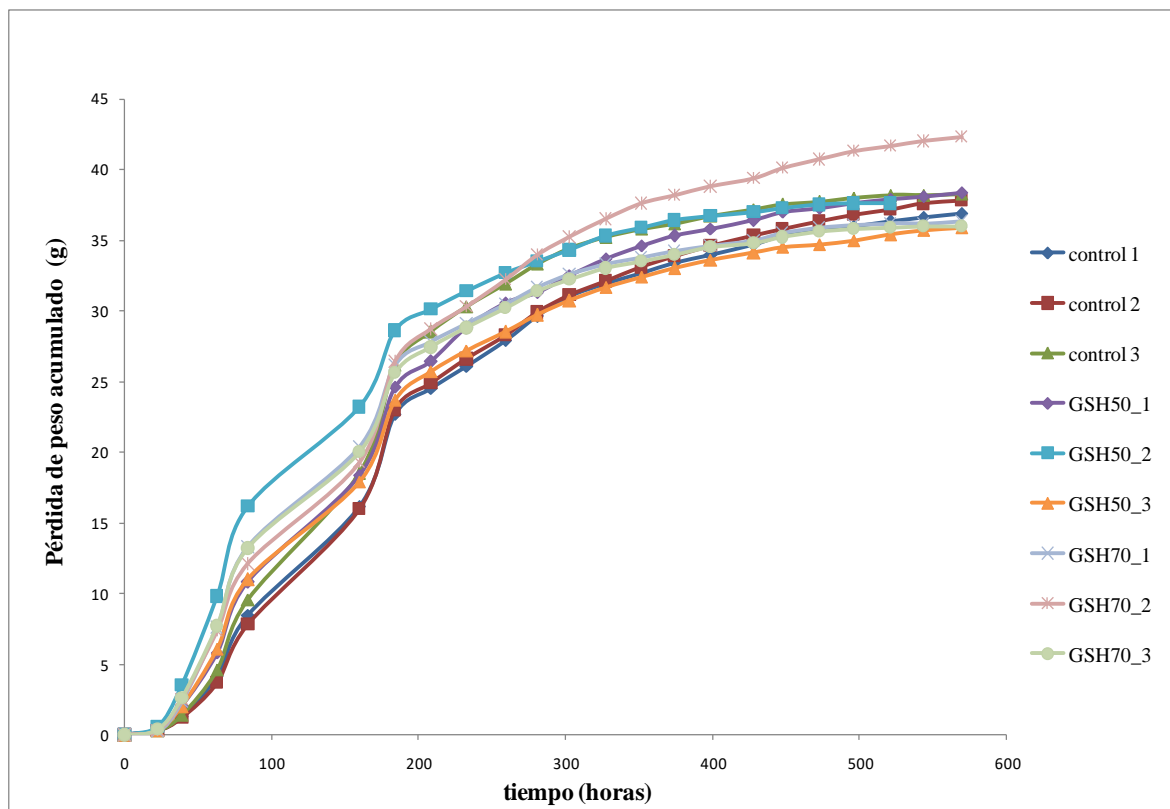


## **Efecto de las adiciones de GSH y metionina sobre la velocidad de la fermentación alcohólica**

### Efecto de la adición de GSH

En la figura 4 se representa la pérdida de peso acumulada frente al tiempo total de fermentación, de las muestras control y las muestras con adición de glutatión, con el fin de determinar si dichas adiciones provocan cambios en la evolución de la FA. La fermentación alcohólica se lleva a cabo por las levaduras, las cuales utilizan los azúcares del mosto convirtiéndolos en etanol y liberando CO<sub>2</sub> (que se libera a la atmósfera), por lo que el peso al final de la fermentación siempre será menor que al comienzo.

De manera general, se observa que todas siguen una trayectoria similar desde el comienzo hasta el final de la fermentación. Durante las primeras horas (0-30 h), apenas se modifica el peso inicial del mosto, puesto que las levaduras se encuentran en la fase de latencia. En esta fase se están adaptando a las condiciones del medio y tienen que preparar su metabolismo para comenzar a fermentar con mayor actividad. En las horas siguientes, se ve claramente una gran pérdida de peso, ya que las levaduras están en condiciones óptimas, crecen muy rápido y fermentan con mayor velocidad encontrándose en la fase exponencial. Alcanzadas las 200 horas de fermentación, la velocidad de fermentación cada vez es menor y la pérdida de peso va variando poco a poco hasta que permanece constante, indicando que se encuentran en la fase estacionaria de la FA.

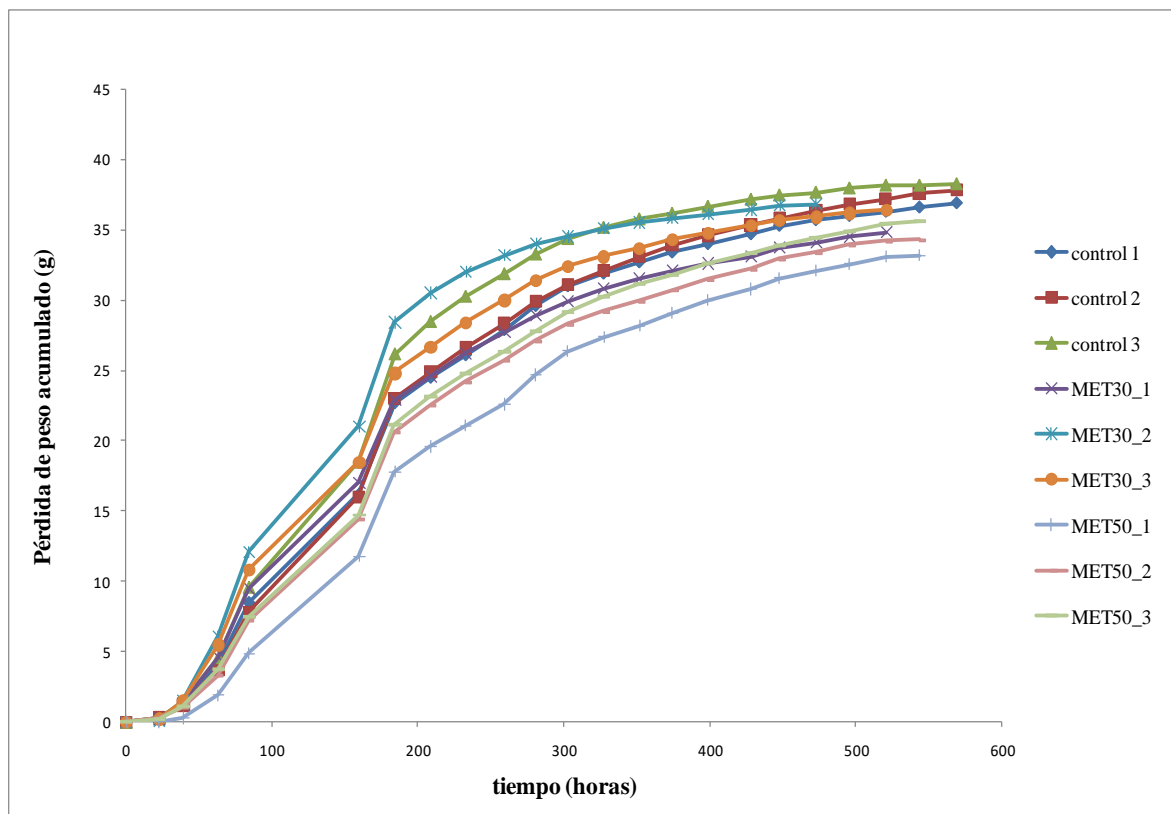


**Figura 4:** Pérdida de peso acumulada durante la fermentación alcohólica de las muestras control, y de las muestras con adición de glutatión (GSH 50 y GSH 70).

Centrándonos en los tipos de muestras, al principio de la fermentación las muestras con adición de glutatión pierden más peso que las muestras control, siendo la muestra GSH50\_2 la que pierde más peso durante la fase exponencial. Al final de la FA, el peso perdido total es similar para todas las muestras, salvo para la muestra GSH70\_2 que pierde más peso.

#### Efecto de la adición de metionina

Por otro lado en la figura 5 se representa la pérdida de peso acumulada frente al tiempo total de fermentación para las muestras control y las muestras con adición de metionina, con el fin de estudiar el efecto de la metionina sobre la velocidad de la FA. Se puede destacar que las muestras con MET han acabado la fermentación antes que las control.



**Figura 5:** Pérdida de peso acumulada durante la fermentación alcohólica de las muestras control, y de las muestras con adición de metionina (MET 30 y MET 50).

Al igual que se ve en la figura 4, en la figura 5 se observa que todas siguen una trayectoria similar. Asimismo, en la figura 5 se observa que la pérdida de peso al comienzo es mayor para las réplicas de MET30, y es menor para las muestras MET50, mientras que las muestras control van a una velocidad intermedia. Por otro lado, al finalizar la fermentación las muestras control han perdido más peso que las muestras MET30. Las muestras MET50 se han mantenido con una pérdida menor durante toda la fermentación en comparación con las muestras control y MET30. Además, curiosamente las muestras a las que se ha adicionado metionina (a ambas concentraciones) han acabado la fermentación antes que las muestras control.

La mayor pérdida de peso en las muestras con adición de GSH en comparación con las muestras control puede deberse a que las levaduras utilizan ese compuesto como un nutriente más y por tanto tienen una mayor actividad. En cambio, la adición de metionina provoca cambios en función de la concentración, observándose que en las muestras MET30 se favorece el metabolismo de las levaduras, y en las muestras MET50 se dificulta su actividad fermentativa. Esto podría deberse a que a

concentraciones bajas la metionina podría actuar como un nutriente de la levadura pero a concentraciones superiores podrían ejercer un efecto inhibitorio sobre ellas.

## Efecto de las adiciones de GSH y metionina sobre los parámetros clásicos de los vinos obtenidos

En la tabla 2 se muestran los resultados del análisis de los parámetros clásicos de los vinos obtenidos.

**Tabla 2.** Parámetros clásicos (media  $\pm$  s) de los vinos obtenidos tras la fermentación alcohólica de los mostos sintéticos con y sin adición de metionina y glutatión.

	Acidez volátil (g/L ácido acético)	Acidez total (g/L ácido tartárico)	pH (20°C)	Azúcares reductores (g/L)	Grado alcohólico (% etanol)
<b>Control</b>	1,10 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,11	5,17 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	3,54 $\pm$ 0,04	5,57 <sup>b</sup> $\pm$ 0,60	11,0 $\pm$ 1,90
<b>MET30</b>	1,01 <sup>b</sup> $\pm$ 0,03	4,88 <sup>b</sup> $\pm$ 0,13	3,52 $\pm$ 0,03	4,90 <sup>b</sup> $\pm$ 0,26	10,7 $\pm$ 0,63
<b>MET50</b>	1,17 <sup>a</sup> $\pm$ 0,04	4,93 <sup>b</sup> $\pm$ 0,04	3,57 $\pm$ 0,12	9,60 <sup>a</sup> $\pm$ 0,70	11,2 $\pm$ 0,94
<b>GSH50</b>	1,14 <sup>a</sup> $\pm$ 0,04	4,93 <sup>b</sup> $\pm$ 0,04	3,50 $\pm$ 0,05	3,70 <sup>c</sup> $\pm$ 0,17	10,3 $\pm$ 0,51
<b>GSH70</b>	1,17 <sup>a</sup> $\pm$ 0,06	5,03 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,15	3,53 $\pm$ 0,02	2,90 <sup>c</sup> $\pm$ 0,17	10,4 $\pm$ 0,30
p(<0,05)	0,056	<b>0,027</b>	0,708	<b>0,000</b>	0,798

<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas (nivel de significatividad del 95 %).

La acidez volátil la forman los ácidos pertenecientes a la serie del ácido acético. El rango de acidez normal de un vino comprende entre 0,2 - 1,2 g/L de ácido acético. Por lo que las muestras analizadas en este estudio mostraron una acidez volátil bastante alta (tabla 2). Según Moreno-Arribas et al., la acidez volátil alta es debida a un alto crecimiento de microorganismos por un nivel de oxígeno alto, las altas concentraciones de azúcar hacen que las levaduras generen más ácido acético o simplemente debido a su conservación en bodega o botella (Moreno-Arribas & Polo, 2008). Todos los vinos analizados en este estudio muestran valores altos de acidez volátil, que podría ser debido a que son vinos obtenidos a partir de mostos sintéticos, a la cantidad de azúcar o bien a las condiciones de anaerobiosis. Asimismo, todas las muestras muestran valores similares (sin diferencias significativas al 95 %), por lo que la adición de metionina y glutatión no influye este parámetro.

La acidez total de un vino se suele encontrar entre 4 y 7 g/L de ácido tartárico (Zoecklein, Fugelsang, Gump, & Nury, 1995), por lo que estos vinos presentan una acidez total normal. Sin embargo, las adiciones de glutatión y metionina producen una

disminución significativa de la acidez total con respecto al control, aunque siguen siendo unos valores que se encuentran dentro del rango. Por lo tanto, los vinos adicionados con MET o GSH tienen menor acidez total.

El pH observado en los vinos analizados muestra unos valores normales para un vino (3,5-3,7). No se observan diferencias significativas en las muestras adicionadas con respecto al control.

En cuanto a los azúcares reductores, si un vino tiene menos de 5 g/L de azúcares reductores será un vino seco, mientras que valores superiores indican que los vinos son semisecos, semidulces o dulces. Los vinos analizados en este trabajo muestran que la adición de GSH a ambas concentraciones produce una disminución significativa del azúcar residual (obteniendo vinos secos) con respecto al control. Por el contrario, en el caso de la adición de metionina, la adición a menor concentración no produce cambios con respecto al control, mientras que, a mayor concentración, MET50, genera un aumento significativo del azúcar residual dando lugar a vinos abocados. Por lo tanto se puede deducir que la adición de glutatión en ambos casos, puede provocar que las levaduras utilicen más azúcar durante la fermentación y como consecuencia los vinos tengan menos azúcar residual. Y que al tener concentraciones elevadas de metionina se inhiba parte del metabolismo de las levaduras en el consumo de azúcar. Este resultado esta en concordancia con las curvas de fermentación. Las fermentaciones con metionina se pararon antes de perder todo el azúcar

El grado alcohólico también presenta valores normales. Teóricamente se parte de un mosto con una concentración de azúcar de 210 g/L, por lo que el grado alcohólico teórico sería de 12,3°. Sin embargo, el grado alcohólico de los vinos es inferior al teórico y por lo tanto el etanol producido es menor. Además, las diferentes adiciones no provocan diferencias significativas con respecto al control. El rendimiento alcohólico de las levaduras respecto a la conversión de etanol es inferior al estándar de 18 g/L de azúcar por grado obtenido

### **Efecto del glutatión y la metionina sobre el consumo de los precursores de mercaptanos polifuncionales**

Los mostos sintéticos se preparan adicionando concentraciones fijas de precursores de mercaptanos polifuncionales. Al acabar la FA se miden los precursores que no han sido

metabolizados durante el proceso. En la tabla 3 se muestran los resultados del análisis de los precursores de los mercaptanos polifuncionales que quedan tras finalizar la FA. En el caso del precursor CYSMP las adiciones de MET50 y GSH50 no producen diferencias significativas en la concentración de este precursor con respecto al control. En cambio los vinos adicionados con MET30 tienen concentraciones significativamente más bajas que el control y con GSH70 significativamente más altas que el control. En el caso del precursor CYSMH, las concentraciones son significativamente menores que las control. Podemos ver en la tabla 3 que el consumo de precursores es superior cuando las concentraciones de MET o GSH son más bajas. Es interesante ver que la concentración de este precursor encontrada en los vinos control, MET50 y GSH70 es superior a la concentración inicial adicionada al mosto. Esto es debido a que a partir del precursor GLUMH se genera CYSMH (des Gachons et al., 2002). Los valores de GLUMP son muy parecidos en todos los vinos. Cuando se añade MET50 se obtienen vinos con concentraciones significativamente mayores que el control, mientras que con MET30 los precursores no son significativamente diferentes a los encontrados en el control. La concentración del precursor GLUMH es significativamente más alta en los vinos adicionados con MET y GSH70. En el caso de la adición de GSH50 no se observan diferencias significativas con respecto al control.

**Tabla 3.** Concentraciones y desviaciones ST de los precursores cisteínicos y de glutatión ( $\mu\text{g/L}$ ) que quedan al final de la fermentación alcohólica de los vinos con y sin adiciones de glutatión y metionina.

	CYSMP	CYSMH	GLUMP	GLUMH
<b>Control</b>	$47,4^b \pm 2,18$	$138^a \pm 3,83$	$16,4^b \pm 0,15$	$240^c \pm 26,7$
<b>MET30</b>	$41,6^c \pm 1,87$	$81,8^d \pm 8,26$	$17,2^b \pm 0,46$	$868^a \pm 200,$
<b>MET50</b>	$46,1^b \pm 2,15$	$115^c \pm 3,23$	$18,6^a \pm 0,97$	$897^a \pm 98,7$
<b>GSH50</b>	$44,6^{bc} \pm 2,56$	$86,1^d \pm 4,81$	$17,4^{ab} \pm 0,16$	$371^c \pm 13,7$
<b>GSH70</b>	$52,0^a \pm 2,51$	$127^b \pm 4,60$	$17,5^{ab} \pm 1,08$	$567^b \pm 67,2$
<b>p(&lt;0,05)</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	<b>0,033</b>	<b>0,000</b>

a, b, c, d Letras diferentes indican diferencias significativas (nivel de significatividad del 95 %).

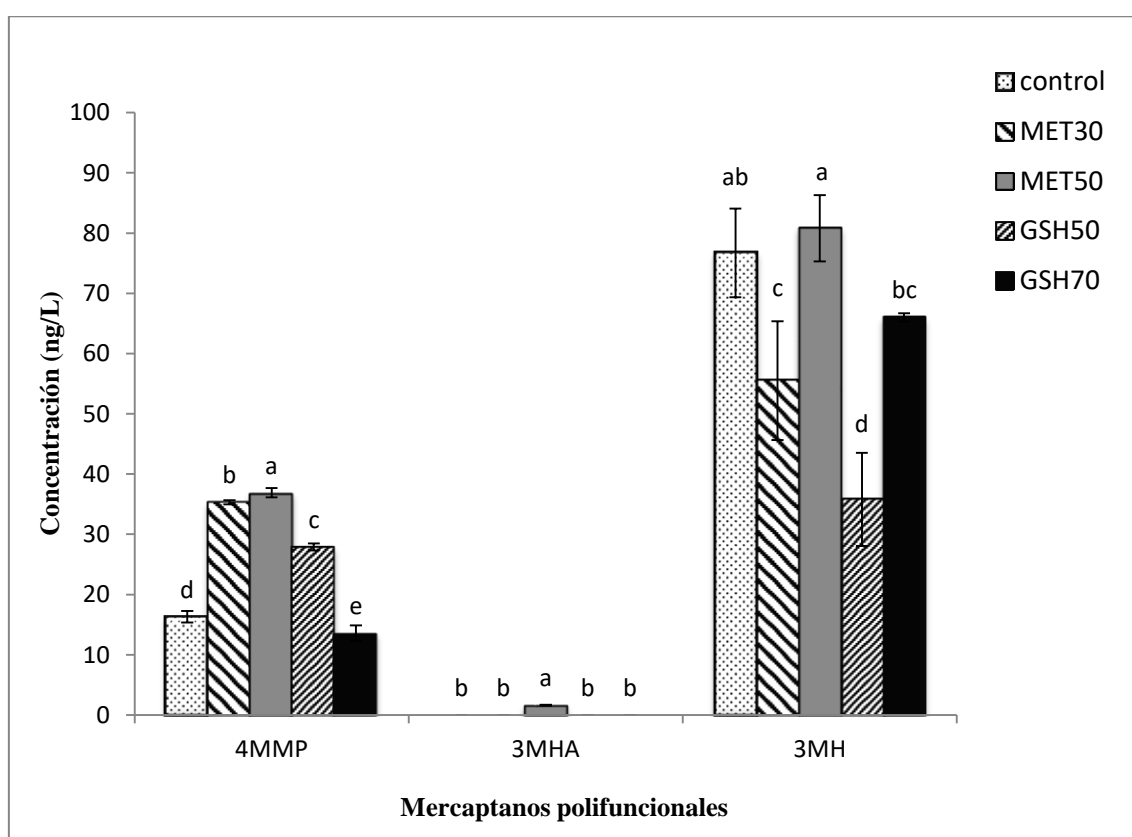
Hay que destacar que en los vinos adicionados con MET, la concentración de GLUMH es casi cuatro veces superior a la encontrada en los vinos control y casi dos veces superior a los vinos obtenidos con GSH70.

Estos resultados nos indican que las levaduras usan este precursor como fuente de azufre cuando no se adiciona nada (control) ya que la concentración de GLUMH es cuatro veces inferior a la adicionada. Si comparamos los dos precursores de la 4MMP

vemos que las levaduras consumen preferentemente el GLUMP, ya que disminuye más del 65 % su concentración durante la FA. Todavía no se ha descrito la transformación de GLUMP en CYSMP, pero podría ser posible.

## Efecto de las adiciones de GSH y metionina sobre la liberación de los mercaptanos polifuncionales

En la figura 6 se representan los resultados de los mercaptanos polifuncionales liberados durante la fermentación alcohólica. En el caso de la 4MMP, las muestras con adición de metionina y GSH muestran una concentración significativamente mayor que el control, salvo la muestra GSH70, cuya concentración es significativamente menor que el control. Por otro lado, las adiciones de GSH y metionina producen un descenso significativo en la liberación del 3MH, a excepción de la muestra MET50 cuya concentración es superior a la encontrada en el control. La formación de 3MHA solo se produce en la muestra MET50 (1,6 ng/L).



**Figura 6.** Concentración y desviación ST de mercaptanos polifuncionales (ng/L) en los vinos con y sin adiciones de glutatión y metionina..

a, b, c, d Letras diferentes indican diferencias significativas (nivel de significatividad del 95 %).

Por lo tanto, está claro que la adición de 50 mg/L de metionina en el mosto aumenta el nivel de mercaptanos polifuncionales en el vino final, potenciando más los aromas. En general MET y GSH hacen que se libere más 4MMP, en comparación con un vino al que no se le ha adicionado nada, pero disminuyen los niveles de 3MH.

Asimismo en el caso de los vinos con adición de metionina, hay más concentración de 4MMP que en los control, observándose también un mayor consumo de CYSMP en MET30. Para esta muestra se observa también un menor consumo de GLUMH (4 veces menor en comparación con el control) con la consecuente disminución en la liberación de 3MH. Por otro lado, en el caso de los vinos adicionados con glutatión, se observa un menor consumo del precursor CYSMP en la muestra GSH70 observándose también una disminución en la liberación de 4MMP. En el caso del 3MH, para esta misma muestra se observa una disminución en su liberación que podría ser debida a un menor consumo del precursor GLUMH. Esto coincide con lo encontrado en otros estudios (des Gachons et al., 2000; Roland, Schneider, Le Guerneve, et al., 2010; Roland, Schneider, Razungles, et al., 2010). Hay que destacar que la concentración de precursores está en  $\mu\text{g/L}$ .

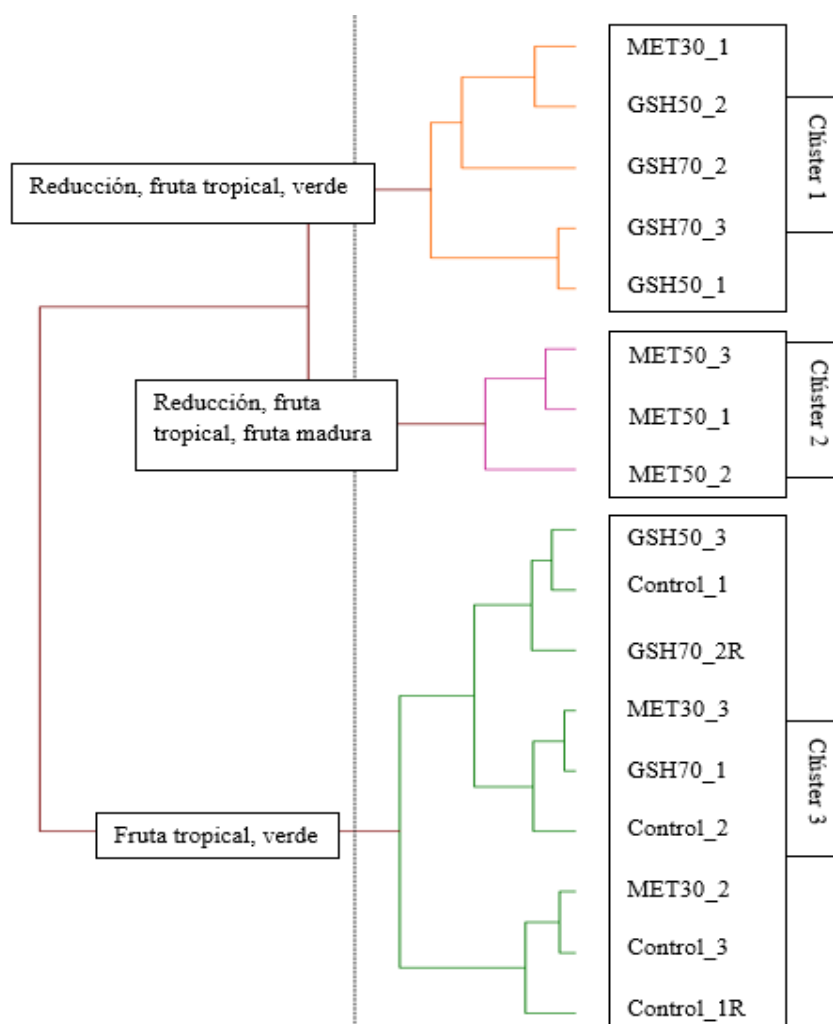
Por ello, se demuestra no solo que glutatión y metionina afectan de manera diferente en la cantidad de mercaptanos polifuncionales liberados, sino que las diferentes concentraciones adicionadas de los mismos en el mosto inicial también dan lugar a resultados diferentes. La concentración de mercaptanos polifuncionales se expresa en  $\text{ng/L}$ . Si vemos las concentraciones obtenidas de mercaptanos polifuncionales, podemos decir que el rendimiento de transformación es mínimo (inferior al 1 %) y que no existe una correlación clara entre la cantidad de precursores consumidos y la de mercaptanos polifuncionales liberados.

### **Efecto del GSH y la metionina sobre el aroma de los vinos finales**

Se ha realizado un análisis sensorial (sorting task) para determinar si los vinos obtenidos con las distintas adiciones generan modificaciones organolépticas. En la figura 7 se observan los resultados del test de agrupación (sorting task) de los vinos con y sin adición de GSH y metionina. Los diferentes vinos se han englobado en tres grupos con diferentes descriptores. El vino control así como las muestras MET30 (agrupados en el clúster 3) se caracterizan por notas predominantes a fruta tropical y verde. Por lo que la adición de 30 mg/L de metionina prácticamente no genera cambios con respecto al



control, dado que se agrupan junto al control y ambas son descritas por los mismos atributos. Por otro lado, las adiciones de GSH generan cambios a ambas concentraciones (50 y 70 mg/L), aunque no hay diferencias entre ellas. En ambos casos predominan notas a reducción, manteniendo las notas a fruta tropical y verdes. Finalmente, la adición de 50 mg/L de metionina provoca cambios tanto en comparación con el control como con MET30, aportando aromas a reducción, así como notas a fruta madura, aparte de mantener las notas a fruta tropical. Asimismo, también se puede ver que las muestras duplicadas (control\_1 y control\_1R) se encuentran ubicadas juntas en el diagrama, a excepción de las muestras (GSH70\_2 y GSH70\_2R) que se encuentran en grupos diferentes cuya única diferencia es el aroma a reducción que podría perderse con el tiempo. Esto sugiere que el panel es reproducible.



**Figura 7.** Dendrograma obtenido a partir del análisis sensorial consistente en el test de agrupamiento de los vinos obtenidos a partir de la fermentación alcohólica de mostos sintéticos a los que se habían adicionado o no diferentes concentraciones de GSH y metionina.

Los resultados del análisis sensorial nos indican que bajas concentraciones adicionadas de metionina no generan cambios en el aroma con respecto al control. Sin embargo, concentraciones suficientemente altas de este compuesto pueden dar lugar a olores desagradables (azufrados, a reducción), así como generar notas a fruta madura. Estas notas a fruta madura pueden deberse al metional que se forma a partir de la metionina por la ruta Ehrlich (Hazelwood, Daran, van Maris, Pronk, & Dickinson, 2008), y es uno de los compuestos presentes en las frutas maduras o pasas. Por otro lado, el glutatión también da lugar a notas a reducción manteniendo los aromas verdes y a fruta tropical presentes en el control. Estos aromas a reducción podrían ser debidos a que tanto la metionina como el GSH son compuestos azufrados que pueden dar lugar a la formación de H<sub>2</sub>S (Henschke & Jiranek, 1993; Swiegers & Pretorius, 2007).

## CONCLUSIÓN

En el aroma del vino influyen multitud de factores, siendo uno de ellos los nutrientes que utilizan las levaduras para llevar a cabo su metabolismo.

En la FA se ha visto que en los vinos en los cuales se ha adicionado glutatión (GSH), las levaduras han fermentado con mayor intensidad, deduciendo así, que ese compuesto sirve como nutriente para las mismas. En cambio, en los vinos en los que se ha adicionado metionina, solo aumenta la actividad fermentativa al adicionar 30 mg/L, ya que la adición de 50 mg/L la ralentiza.

Por ello tiene sentido que las muestras GSH tengan menos azúcar residual, ya que se ha fermentado más y consecuentemente se ha consumido también más azúcar. Y lo mismo pero en sentido contrario los vinos con MET50, tienen más azúcar residual. Podría ser que concentraciones elevadas de metionina fueran tóxicas para la levadura.

La adición de compuestos azufrados produce diferencias significativas en el consumo de precursores durante la fermentación alcohólica. Además la concentración y la forma del compuesto azufrado influye en la metabolización de los mismos.

En cuanto a los mercaptanos polifuncionales, la 4MMP se libera más en las muestras adicionadas que en las control, salvo en las GSH70. Al contrario, el 3MH se libera menos que en las control, a excepción de MET50. El 3MHA solo se encuentra en concentración cuantificable en las muestras MET50. Es decir, la adición de sustancias

azufradas influye significativamente en la liberación de los mercaptanos polifuncionales.

Finalmente, a nivel sensorial la adición de metionina y glutatión se traduce en la generación de notas a reducción consecuencia de la generación de  $\text{H}_2\text{S}$ , pero en todos los casos se mantienen las notas a fruta tropical.

Con toda esta información finalmente concluimos que las levaduras rompen el enlace que une el mercaptano polifuncional con el resto de precursor, por lo que si no ocurriera nada más, la cantidad de mercaptanos polifuncionales en el vino final sería similar a la de sus respectivos precursores. El problema es que se liberan concentraciones de mercaptanos polifuncionales aproximadamente 1000 veces inferiores con respecto a sus precursores. Esto puede deberse a que podría haber alguna ruta química, que influya en esta liberación, o que las levaduras utilicen parte de esos aromas como nutrientes (por su contenido en azufre y nitrógeno). Aún no se conocen las rutas posibles, pero es evidente que el azufre y el nitrógeno son elementos clave en el proceso.

## CONCLUSION

A lot of factors influence the aroma of wine, being one of them the nutrients that yeasts use to carry out their metabolism.

In the alcoholic fermentation (AF) it has been seen that in the wines in which glutathione (GSH) has been added, the yeasts have fermented with greater intensity, this could mean that this compound acts as nutrient for them. In contrast, in wines in which methionine has been added, fermentation activity only increases through the addition of 30 mg/L, since the addition of 50 mg/L slows it down.

Therefore it makes sense that the GSH samples have less residual sugar, since it has been fermented more and consequently more sugar has also been consumed. And the same but in the opposite sense the wines with MET50, which have more residual sugar. It could be that high concentrations of methionine were toxic to yeast.

The addition of sulfur compounds produces significant differences in the consumption of precursors during AF. In addition, the concentration and the form of the sulfur compound influences the metabolization of them.

As for the polyfunctional mercaptans, the 4MMP is released more in the added samples than in the control, except in the GSH70 samples. On the contrary, the 3MH is released less than in the control, except for MET50 samples. The 3MHA is only in a quantifiable concentration in the MET50 samples. That is, the addition of sulfur substances significantly influences the release of the polyfunctional mercaptans.

Finally, at the sensory level the addition of methionine and glutathione results in the generation of notes to reduction resulting from the generation of  $H_2S$ , but in all cases the tropical fruit notes are maintained.

With all this information we finally conclude that the yeast breaks the bond that unites the polyfunctional mercaptan with the precursor, so that if nothing else happened, the amount of polyfunctional mercaptans in the final wine would be similar to that of their respective precursors. The problem is that concentrations of polyfunctional mercaptans are released approximately 1000-fold lower than their precursors. This may be due to the fact that there may be some chemical pathway that influences this release, or that the yeasts use part of those aromas as nutrients (because of their sulfur and nitrogen content). The possible pathways are not yet known, but it is clear that sulfur and nitrogen are key elements in the process.

## **OPINIÓN PERSONAL Y APORTACIONES**

Con este trabajo de investigación, aparte de estudiar el tema elegido en relación con el vino, he aprendido a saber manejar de manera independiente en un laboratorio, por lo que de cara al futuro se resume en más experiencia y más preparación. También he aprendido a trabajar con equipos como un cromatógrafo de gases con detector de llama ionizante (FID), para detectar pequeñas cantidades de analitos de manera precisa. También he podido entrenar mi olfato en diferentes análisis sensoriales realizados, y así, poder conocer y distinguir diferentes tipos de aromas en un vino.

Pero además de esto me ha impresionado las ganas y la dedicación de todo el grupo con el que he convivido estos meses, el buen ambiente y la confianza que me daban en todo momento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bayonove C., Baumes R., Cruzet J., & Z., G. (2000). *Aromas en enología. Fundamentos científicos y tecnológicos*. Editorial Flanzky.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., & Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70(4), 246-252.
- Bell, S. J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242-295.
- Blanchard, L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2001). Formation of furfurylthiol exhibiting a strong coffee aroma during oak barrel fermentation from furfural released by toasted staves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4833-4835.
- Concejero, B., Pena-Gallego, A., Fernandez-Zurbano, P., Hernandez-Orte, P., & Ferreira, V. (2014). Direct accurate analysis of cysteinylated and glutathionylated precursors of 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone and 3-mercaptohexan-1-ol in must by ultrahigh performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 812, 250-257.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., . . . Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food 1* (1), 1-22.
- Cordonni, R., & Bayonove, C. (1974). Disclosure of presence in grape var-muscat of Alexandria of bound monoterpenes revealed by one or several enzymes of that fruit. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D*, 278(26), 3387-3390.
- des Gachons, C. P., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2000). Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc grapes by assaying S-cysteine conjugates, precursors of the volatile thiols responsible for their varietal aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3387-3391.
- des Gachons, C. P., 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 and Food Chemistry*, 50(14), 4076-4079.

- Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Elsey, G. M., & Jeffery, 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 and Food Chemistry*, 57(3), 991-995.
- Hazelwood, L. A., Daran, J.-M., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 74(8), 2259-2266.
- Henschke, P., & Jiranek, V. (1993). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. In F. GH (Ed.), *Wine. Microbiology and biotechnology* (pp. 77-164). Chur, Switzerland: Harwood Academic.
- Loscos, N., Hernandez-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from nonfloral grape odorless flavor precursors fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6674-6684.
- Lund, C. M., Thompson, M. K., Benkowitz, F., Wohler, M. W., Triggs, C. M., Gardner, R., . . . Nicolau, L. (2009). New Zealand Sauvignon blanc distinct flavor characteristics: Sensory, chemical, and consumer aspects. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(1), 1-12.
- Martínez-Gil, A. M., Angenieux, M., Pardo-García, A. I., Alonso, G. L., Ojeda, H., & Salinas, M. R. (2013). Glycosidic aroma precursors of Syrah and Chardonnay grapes after an oak extract application to the grapevines. *Food Chemistry*, 138(2), 956-965.
- Masneuf-Pomarede, I., Mansour, C., Murat, M. L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 385-390.
- Mateo-Vivaracho, L., Zapata, J., Cacho, J., & Ferreira, V. (2010). Analysis, occurrence, and potential sensory significance of five polyfunctional mercaptans in white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10184-10194.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, C. (2008). *Wine chemistry and biochemistry*: Springer New York.
- Ribereau-Gayon, P., Boidron, J. N., & Terrier, A. (1975). Aroma of Muscat grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(6), 1042-1047.
- Roland, A., Schneider, R., Le Guerneve, C., Razungles, A., & Cavelier, F. (2010). Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH)

- using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chemistry*, 121(3), 847-855.
- Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Le Guerneve, C., & Cavelier, F. (2010). Straightforward synthesis of deuterated precursors to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10684-10689.
- Ruffner, H. (1982). Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: A review-Part B. *VITIS*, 21, 246-358.
- San-Juan, F., Ferreira, V., Cacho, J., & Escudero, A. (2011). Quality and aromatic sensory descriptors (mainly fresh and dry fruit character) of Spanish red wines can be predicted from their aroma-active chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7916-7924.
- Schieberle, P. (1993). Studies on the flavour of roasted white sesame. In P. Schreier & P. Winterhalter (Eds.), *Progress in flavour precursor studies*; (pp. 343-360). Carol, Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- Schreier, P., & Jennings, W. G. (1979). Flavor composition of wines: a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 12(1), 59-111.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., & Calderón, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*, 102(1), 10-21.
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J.-M., & Degryse, E. (2008). New insights on 3-mercaptopentanol (3MH) biogenesis in Sauvignon blanc wines: Cys-3MH and (E)-hexen-2-al are not the major precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9230-9235.
- Swiegers, J., Francis, I., Herderich, M., & Pretorius, I. (2006). Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery. *The Australian Wine Research Institute*, 21, 34-42.
- Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2007). Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5), 954-960.
- Tominaga, T., Blanchard, L., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2000). A powerful aromatic volatile thiol, 2-furanmethanethiol, exhibiting roast coffee aroma in wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1799-1802.

- Tominaga, T., des Gachons, C. P., & Dubourdieu, D. (1998). A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc: S-cysteine conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5215-5219.
- Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., & Dubourdieu, D. (1998). Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(3), 159-162.
- Tominaga, T., Guimbertau, G., & Dubourdieu, D. (2003). Contribution of benzenemethanethiol to smoky aroma of certain *Vitis vinifera* L. wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1373-1376.
- Tominaga, T., Murat, M.-L., & Dubourdieu, D. (1998). Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1044-1048.
- Ugliano, M. (2009). Enzymes in winemaking. In M. V. Moreno-Arribas & C. Polo (Eds.), *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 103-126). Nueva York: Springer.
- Withycombe, D. A., & Mussinan, C. J. (1988). Identification of 2-methyl-3-furanthiol in the steam distillate from canned tuna fish. *Journal of Food Science*, 53(2), 658-&.
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1995). Volatile acidity *In, Wine analysis and production* (pp. 192-198). Boston, MA: Springer US.