



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA
ÁREA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

MEJORA DE LA CALIDAD AROMÁTICA DE LOS VINOS ECOLÓGICOS MEDIANTE LA REDUCCIÓN DE AROMAS DE OXIDACIÓN

Tania Balboa Lagunero

Tesis Doctoral. Madrid 2012

Directores de tesis:

Dra. Margarita Aznar Ramos

Dr. Juan Mariano Cabellos Caballero

Tutora académica:

Dra. Laura Jaime de Pablo



A Diego

“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada”.

Karl Popper

VINO color de día,
vino color de noche,
vino con pies de púrpura
o sangre de topacio,
vino,
estrellado hijo
de la tierra,
vino, liso
como una espada de oro,
suave
como un desordenado terciopelo,
vino encaracolado
y suspendido,
amoroso,
marino,
nunca has cabido en una copa,
en un canto, en un hombre,
coral, gregario eres,
y cuando menos, mutuo.
A veces
te nutres de recuerdos
mortales,
en tu ola
vamos de tumba en tumba,
picapedrero de sepulcro helado,
y lloramos
lágrimas transitorias,
pero
tu hermoso
traje de primavera
es diferente,
el corazón sube a las ramas,
el viento mueve el día,
nada queda
dentro de tu alma inmóvil.
El vino
mueve la primavera,
crece como una planta la alegría,
caen muros,
peñascos,
se cierran los abismos,
nace el canto.
Oh tú, jarra de vino, en el desierto
con la sabrosa que amo,
dijo el viejo poeta.

Que el cántaro de vino
al beso del amor sume su beso.

Amor mio, de pronto
tu cadera
es la curva colmada
de la copa,
tu pecho es el racimo,
la luz del alcohol tu cabellera,
las uvas tus pezones,
tu ombligo sello puro
estampado en tu vientre de vasija,
y tu amor la cascada
de vino inextinguible,
la claridad que cae en mis sentidos,
el esplendor terrestre de la vida.

Pero no sólo amor,
beso quemante
o corazón quemado
eres, vino de vida,
sino
amistad de los seres, transparencia,
coro de disciplina,
abundancia de flores.
Amo sobre una mesa,
cuando se habla,
la luz de una botella
de inteligente vino.
Que lo beban,
que recuerden en cada
gota de oro
o copa de topacio
o cuchara de púrpura
que trabajó el otoño
hasta llenar de vino las vasijas
y aprenda el hombre oscuro,
en el ceremonial de su negocio,
a recordar la tierra y sus deberes,
a propagar el cántico del fruto.

Pablo Neruda

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han brindado la oportunidad de trabajar a su lado, aportando su tiempo, experiencia, conocimientos y sobretodo su apoyo, ayudándome a llegar hasta aquí.

Quiero dar las gracias al IMIDRA por haberme proporcionado la oportunidad de realizar este proyecto y a mis directores de tesis, el doctor Mariano Cabellos y la doctora Margarita Aznar, muchas gracias por introducirme en el maravilloso mundo de la Enología, por guiarme a lo largo de todo este trabajo y por toda la paciencia y dedicación que me habéis demostrado. Estoy muy especialmente agradecida a la doctora Teresa Arroyo que para mi ha sido como una tutora; implicándose en este proyecto de principio a fin y ayudándome en todo momento.

Esta tesis ha sido posible también al apoyo de todos mis compañeros de departamento. Le agradezco sobretodo al doctor Gustavo Cordero su amistad, su ayuda cuando la he necesitado y por todas las risas que nos hemos echado juntos en el laboratorio. A la ya doctora Vanessa Penacho, gracias por iniciar conmigo esta locura que es hacer un doctorado y hacer que no me rindiera ante los baches del camino. Gracias Valeria por toda tu ayuda y por llenarnos de anécdotas las mañanas. Gracias Ángel por tantas veces que me has ayudado, sobretodo en la bodega. Gracias Ana, Marga, Javi, Irene, Mar y Alberto por haber sido los mejores compañeros y gracias también a todos los que pasasteis por los laboratorios de Microbiología y de Enología más fugazmente; todos habéis aportado algo a este trabajo. A mis antiguas compis de la planta de arriba, Gema, Blanca, MariLo y Loli, también muchas gracias por tantos buenos momentos.

Tengo que expresar además mi más sincera gratitud a todas las personas que han formado parte de los grupos de cata y olfatometría; sin vosotros esta tesis nunca se habría podido escribir! Mil gracias por aguantar sesiones a veces muy largas; incluso a aquellos que os dormisteis delante del olfatómetro y aquellos que me describisteis los aromas de los vinos de formas tan increíbles...

No puedo olvidarme de los doctores Vicente Ferreira y Antonio César Silva Ferreira por haberme permitido realizar las estancias en sus departamentos de la Universidad de Zaragoza y la Universidade Católica Portuguesa y a todos los miembros de sus equipos de investigación que me acogieron y me hicieron sentir como en casa.

Por supuesto, muchas gracias a mi familia por cuidarme y prestarme vuestro apoyo cuando más lo he necesitado y por haberme escuchado tanto cuando os hablaba de cosas que seguro no tenían mucho sentido para vosotros. Gracias mamá, gracias papá, gracias Didi, María, Aurora y a mis abuelos, os quiero muchísimo. Gracias Jaime por estar cada día en mi vida y por darme tanto ánimo y apoyo.

A mis amigos del cole, a los de la uni y sobretodo a mis amigas del alma, Alejandra, Laura, Lourdes, María, Regina, Diana, Mercedes, Cristina y Karla, muchas gracias por estar siempre a mi lado.

Y gracias a todos aquellos que aunque no he nombrado, de alguna u otra forma también habéis estado presentes en este camino.

AYUDA FINANCIERA Y COLABORACIONES RECIBIDAS O PRESTADAS:

- Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2005-00172 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Beca predoctoral del INIA Nº 19 (BOE núm. 208, 31/08/2006).
- Ayuda técnica y experimental recibida durante la estancia de investigación del 1 al 30 de Abril del 2008 en el Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza (Zaragoza, España).
- Colaboración con el grupo de investigación del Dr. António César Silva Ferreira durante la estancia de investigación en el periodo de tiempo comprendido entre el 1 Marzo al 31 Mayo del 2009 en el departamento de Enología de la Escola Superior de Biotecnología de la Universidad Católica Portuguesa UCP (Oporto, Portugal).
- Colaboración con el proyecto: FP2005-AGR1-LEV (IMIDRA) “Evaluación del estado actual, mantenimiento y conservación de la Colección de Levaduras del IMIDRA. Estudio de propiedades autolíticas de cepas autóctonas de *Saccharomyces cerevisiae*”.
- Ayuda prestada por el Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza para el análisis de aldehídos y compuestos minoritarios en muestras de vinos.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA:

ARTÍCULOS PUBLICADOS:

- **“Sensory and Olfactometric profiles of red wines after natural and forced oxidation processes” (2011).** Tania Balboa-Lagunero, Teresa Arroyo, Juan M. Cabellos & Margarita Aznar. (*American Journal of Enology and Viticulture* 62, 527-535).
- **“Yeast selection as a tool for reducing key oxidation notes in organic wines” (2012).** Tania Balboa-Lagunero, Teresa Arroyo, Juan M. Cabellos & Margarita Aznar. (En prensa en: *Food Research International*. Enviado en Marzo del 2012).
- **“Evaluation of different alternatives for avoiding oxidative and thermal degradation effects in ecological red wines”.** Tania Balboa-Lagunero, Margarita Aznar & António César Silva Ferreira. (Enviado en Mayo del 2012 a: *Journal of Agriculture and Food Chemistry*)

TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS, REUNIONES Y SIMPOSIOS RELACIONADOS CON EL PROYECTO:

Posters presentados:

- *“Selección de levaduras de interés biotecnológico para su aplicación en la elaboración de vinos ecológicos”.* Tania Balboa-Lagunero, Teresa Arroyo, Juan M. Cabellos, Margarita Aznar. III Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana (CMIBM 2010). Noviembre de 2010 (Alcalá de Henares).
- *“Evaluation of different alternatives for avoiding oxidative and thermal degradation effects in ecological red wine”.* T. Balboa-Lagunero, M. Aznar & A.C. Silva Ferreira. 4th Shelf life International Meeting (SLIM 2010). Junio 2010 (Zaragoza).

- *“Aromatic profile of oxidized red wines”*. M. Aznar, T. Balboa, T. Arroyo & J.M. Cabellos. XII Weurman Flavour Research Symposium. Julio 2008 (Interlaken, Suiza).
- *“Evolución del perfil aromático de un vino Tempranillo tras su oxidación”*. T. Balboa-Lagunero, M. Aznar, T. Arroyo y J.M. Cabellos. XIV Congreso Nacional de Enólogos. Junio 2008 (El Escorial, Madrid).
- *“Olfactometric and sensory study of a Tempranillo red wine before and after a forced oxidation process”*. T. Balboa, M. Aznar, T. Arroyo & J.M. Cabellos. WAC 2008 International Conference. Marzo 2008 (Beaune, Francia).

Comunicaciones orales:

- *“Selección de cepas de levaduras autóctonas de la Comunidad de Madrid para la mejora aromática de vinos ecológicos”*. Balboa-Lagunero, T. Arroyo, J.M. Cabellos & M. Aznar. XVII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos (SEM 2010). 21 de Septiembre 2010 (Valladolid).

Comunicaciones publicadas:

- *“Selección de levaduras de interés biotecnológico para su aplicación en la elaboración de vinos ecológicos”*. Tania Balboa-Lagunero, Teresa Arroyo, Juan M. Cabellos, Margarita Aznar. Libro de resúmenes del III Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. Págs. 182 y 183. Ed. Fundación General de la Universidad de Alcalá. Noviembre 2010 (Alcalá de Henares, Madrid, España).
- *“Selección de cepas de levaduras autóctonas de la Comunidad de Madrid para la mejora aromática de vinos ecológicos”*. T. Balboa-Lagunero, T. Arroyo, J.M. Cabellos & M. Aznar. Libro de resúmenes del XVII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Págs. 95, 96 y 97. Sociedad Española de Microbiología. Septiembre 2010 (Valladolid, España).

- *“Alternatives for avoiding degradation in ecological wine”*. T. Balboa-Lagunero, M. Aznar & A.C. Silva Ferreira. Proceedings of SLIM2010. Special Issue of *The Italian Journal of Food Science (IJFS)*. Págs. 55-58. 2011. Chiriotti Editori (Pinerolo, Italia).

- *“Aromatic profile of oxidized red wines”*. M. Aznar, T. Balboa, T. Arroyo & J.M. Cabellos. Expression of Multidisciplinary Flavour Science. Proceedings of the XII Weurman Flavour Research Symposium. Págs. 231-234. Ed. by I. Blank, M. Wüst y C. Yeretzián. Institut für Chemie und Biologische Chemie. 2010 (Zurich, Suiza).

- *“Aromatic profile of oxidized red wines”*. M. Aznar, T. Balboa, T. Arroyo & J.M. Cabellos. XII Weurman Flavour Research Symposium. Pág. 171. Julio 2008 (Interlaken, Suiza).

- *“Olfactometric and sensory study of a Tempranillo red wine before and after a forced oxidation process”*. T. Balboa, M. Aznar, T. Arroyo & J.M. Cabellos. Proceedings of the WAC2008 International Conference. Págs. 120-122. Ed. by D. Chassagne. University of Bourgogne. Oeno Pluri Media. Marzo 2008 (Francia).

RESUMEN:

Los vinos ecológicos son más susceptibles de sufrir degradaciones oxidativas debido a las restricciones establecidas en su elaboración. La limitación en las dosis de empleo del antiséptico y antioxidante dióxido de azufre (SO₂), favorece la tendencia a la oxidación y la formación de aromas de “evolución-oxidación”, lo que conlleva a la disminución de la calidad organoléptica del vino. Es por tanto interesante, el estudio de los fenómenos de oxidación en los vinos ecológicos, la determinación de los aromas asociados a dichos procesos; así como los compuestos volátiles responsables de esos aromas, su origen y parámetros que influyen en su formación. De esta manera, se podría mejorar la calidad aromática y favorecer el mercado de los vinos orgánicos.

Para la presente tesis se ha realizado un estudio de los perfiles aromáticos de diferentes vinos tintos españoles sometidos a procesos de oxidación natural y forzada. Se realizó un estudio olfatométrico, análisis cuantitativos mediante cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID) y espectrometría de masas (GC-MS); así como análisis sensoriales de descriptores específicos de oxidación. Todos los vinos oxidados mostraron un aumento significativo de los descriptores: “coñac / brandy / vino de jerez” y “vino añejo / vino evolucionado”; a la par que perdían parte de sus notas frescas, herbáceas, frutales y florales. Este cambio en el perfil del aroma se relacionó con un aumento en compuestos como el metional, (*Z*)-2-nonenal, (*E*)-2-octenal, furaneol, dodecanal, (*Z*)-whisky lactona, *o*-aminoacetofenona y una disminución de volátiles tales como (*Z*)-3-hexenol, hexanoato de etilo e isoeugenol. Los análisis cuantitativos realizados confirmaron la importancia de los aldehídos en los procesos de oxidación, especialmente en las oxidaciones forzadas, donde la mayoría de los aldehídos alcanzaron concentraciones con valores muy por encima de sus umbrales de olfacción.

Una vez entendidos con más profundidad los cambios químico-sensoriales producidos durante los fenómenos de oxidación, se procedió al estudio de posibles soluciones para disminuir la tendencia a la oxidación de los vinos.

Por una parte, se estudió la resistencia del vino a procesos térmicos y oxidativos después de la adición de distintos compuestos con presunta capacidad antioxidante, mediante el análisis de los cambios en su perfil aromático y el análisis de su estado oxidativo. Los compuestos ensayados fueron el ácido ascórbico, resveratrol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), SO_2 y una mezcla de los polifenoles: ácido gálico, epicatequina y ácido cafeico. Los cambios en el perfil aromático se evaluaron mediante el análisis de los compuestos volátiles y análisis sensoriales y el estado oxidativo se estudió mediante voltametría cíclica. Todas las muestras mostraron una señal de voltametría característica, observándose una notable disminución en la intensidad de corriente en aquellas muestras que habían sufrido una degradación más profunda. Dos de los tratamientos proporcionaron diferencias significativas con respecto a los controles en cuanto a la composición química de compuestos relacionados con la oxidación. Por una parte, la aplicación del quelante de metales EDTA y por otra el tratamiento con SO_2 , influyeron en que las concentraciones de dichos compuestos fueran menores; reduciendo parcialmente el efecto oxidativo. La influencia del EDTA en la composición final del vino confirmó la importante participación de los metales en los procesos oxidativos. Respecto a los resultados de los análisis sensoriales, sólo se encontraron diferencias significativas respecto a los controles del vino en las muestras tratadas con SO_2 y en aquellas a las que se había adicionado la mezcla de polifenoles, debido a la aparición en estas últimas muestras de un aroma vegetal fuerte no perceptible en los otros tratamientos.

Por otra parte, se realizó un intenso estudio de selección de levaduras vínicas para su aplicación en la elaboración de vinos ecológicos, con el objetivo de la obtención de vinos con una menor tendencia a la oxidación. Para ello, se llevó a cabo la búsqueda de cepas de levaduras cuyo metabolismo minimizar las concentraciones residuales de aminoácidos precursores de aromas relacionados con la oxidación (metionina, fenilalanina y leucina) y con una baja producción SO_2 . Inicialmente, se preseleccionaron 19 cepas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* de alta calidad enológica y se realizaron fermentaciones controladas con dichas cepas en mosto sintético. A continuación, se eligieron cinco cepas de entre las anteriormente citadas, autóctonas de la D.O. "Vinos de Madrid", como "óptimas" en base a la metabolización de los aminoácidos. Estas cepas se ensayaron junto a otras dos cepas consideradas como "no óptimas" sobre mosto estéril de uva blanca y posteriormente se realizó un ensayo de envejecimiento de los mostos ya fermentados. Tras un amplio estudio

químico y sensorial se consideraron “óptimas” dos cepas (“CLI 271” y “CLI 87”) en cuanto a la reducción de aminoácidos precursores de aromas negativos y a la menor oxidación de los vinos producidos por ellas, contrastada por el análisis de su composición aromática, especialmente de aldehídos y de descriptores sensoriales específicos de oxidación. Estas dos cepas, junto con una cepa comercial de levadura seca activa, fueron ensayadas a escala de bodega experimental, realizándose un amplio estudio comparativo sobre los parámetros enológicos, químicos y sensoriales de los vinos obtenidos.

Gracias a estos estudios, se ha podido comprobar como el metabolismo de las levaduras influía en los niveles residuales de aminoácidos y en la composición volátil de los mostos fermentados por ellas y la existencia de una intercorrelación entre los niveles de aminoácidos y determinados compuestos volátiles. Se ha demostrado como, tras un proceso de evolución, compuestos como el metionol, β -feniletanol, los ácidos hexanoico y octanoico y ésteres con aromas frescos y frutales, como el octanoato de etilo, hexanoato de etilo y acetato de hexilo disminuyen de una forma significativa y como, por el contrario, se produce un aumento muy marcado del lactato de etilo, el succinato de dietilo, la acetoína (aromas lácticos/cremosos), el furfural y el benzaldehído (aromas almendrosos/licorosos). Además, se ha confirmado la activa participación de los aldehídos en los vinos que mostraron descriptores de oxidación más destacados y la importancia de los descriptores “coñac - brandy - vino jerez - vino oloroso - quina” y “vino viejo, vino añejo - vino evolucionado - vino pasado” en la definición de los vinos oxidados.

ÍNDICE:

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----------|
| 1. OBJETIVOS, ANTECEDENTES E HIPÓTESIS DE TRABAJO | 1 |
| 1.1 OBJETIVOS DE LA TESIS | 2 |
| 1.1.1 OBJETIVO PRINCIPAL | 2 |
| 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 2 |
| 1.2 ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA | 4 |
| 1.2.1 SITUACIÓN DE ESPAÑA EN EL MERCADO VITIVINÍCOLA | 4 |
| 1.2.2 LA AGRICULTURA Y EL “VINO ECOLÓGICO” | 5 |
| 1.2.3 LAS REACCIONES DE OXIDACIÓN EN EL VINO | 7 |
| 1.2.4 SOLUCIONES A LOS PROCESOS DE OXIDACIÓN EN EL VINO ECOLÓGICO | 8 |
| 1.3 HIPÓTESIS DE TRABAJO | 9 |
| 1.3.1 ESTUDIO DEL AROMA | 9 |
| 1.3.2 MICROBIOLOGÍA ENOLÓGICA | 10 |
| 1.4 REFERENCIAS | |

CAPÍTULO 2

| | |
|---|-----------|
| 2. INTRODUCCIÓN | 16 |
| 2.1 EL VINO Y SU NORMATIVA EN ESPAÑA | 17 |
| 2.1.1 LA REGULACIÓN DEL VINO | 18 |
| 2.1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS VINOS ESPAÑOLES | 22 |
| 2.1.3 LOS VINOS ECOLÓGICOS | 26 |
| 2.2 EL AROMA DEL VINO | 27 |
| 2.2.1 EL SISTEMA OLFATIVO | 28 |
| 2.2.2 COMPUESTOS AROMÁTICOS DEL VINO | 31 |
| 2.2.3 DETERIORO AROMÁTICO DEL VINO | 34 |
| 2.3 PROCESOS DE ENVEJECIMIENTO Y OXIDACIÓN EN EL VINO | 35 |
| 2.3.1 FENÓMENOS DE ENVEJECIMIENTO | 35 |
| 2.3.2 FENÓMENOS DE OXIDACIÓN | 36 |
| 2.3.3 USO DE ANTIOXIDANTES EN EL VINO | 39 |

| | |
|---|----|
| 2.4 ESTUDIOS DEL VINO | 42 |
| 2.4.1 ANÁLISIS INSTRUMENTAL | 42 |
| 2.4.2 ANÁLISIS SENSORIAL | 45 |
| 2.4.3 CARACTERIZACIÓN AROMÁTICA DEL VINO. DETECCIÓN OLFATOMÉTRICA. | 47 |
| 2.5 REFERENCIAS | 48 |

CAPÍTULO 3

| | |
|---|-----------|
| 3. ESTUDIO DE LOS PERFILES SENSORIALES Y OLFATOMÉTRICOS DE VINOS TINTOS TRAS PROCESOS DE OXIDACIÓN NATURAL Y OXIDACIÓN FORZADA (<i>SENSORY AND OLFACTOMETRIC PROFILES OF RED WINES AFTER NATURAL AND FORCED OXIDATION PROCESSES</i>) | 58 |
| 3.1 ABSTRACT | 59 |
| 3.2 INTRODUCTION | 60 |
| 3.3 MATERIALS AND METHODS | 61 |
| 3.4 RESULTS AND DISCUSSION | 67 |
| 3.5 CONCLUSIONS | 78 |
| 3.6 LITERATURE CITED | 78 |

CAPÍTULO 4

| | |
|--|-----------|
| 4. EVALUACIÓN DE DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA EVITAR LOS EFECTOS DEGRADATIVOS OXIDATIVOS Y TÉRMICOS EN VINOS TINTOS ECOLÓGICOS. (<i>EVALUATION OF DIFFERENT ALTERNATIVES FOR AVOIDING OXIDATIVE AND THERMAL DEGRADATION EFFECTS IN ECOLOGICAL RED WINE</i>) | 84 |
| 4.1 ABSTRACT | 86 |
| 4.2 INTRODUCTION | 87 |
| 4.3 MATERIALS AND METHODS | 89 |
| 4.4 RESULTS AND DISCUSSION | 93 |
| 4.5 CONCLUSIONS | 105 |
| 4.6 LITERATURE CITED | 106 |

CAPÍTULO 5

5. SELECCIÓN DE LEVADURAS COMO HERRAMIENTA PARA LA REDUCCIÓN DE NOTAS DE OXIDACIÓN EN VINOS ECOLÓGICOS 112

5.1 PARTE I: SELECCIÓN DE LEVADURAS COMO HERRAMIENTA PARA LA REDUCCIÓN DE NOTAS DE OXIDACIÓN EN VINOS ECOLÓGICOS (YEAST SELECTION AS A TOOL FOR REDUCING KEY OXIDATION NOTES

***IN ORGANIC WINES)* 115**

| | |
|------------------------------|-----|
| 5.1.1 ABSTRACT | 116 |
| 5.1.2 INTRODUCTION | 116 |
| 5.1.3 MATERIALS AND METHODS | 118 |
| 5.1.4 RESULTS AND DISCUSSION | 123 |
| 5.1.5 CONCLUSIONS | 135 |
| 5.1.6 LITERATURE CITED | 135 |

5.2 PARTE II: AMPLIACIÓN DEL ESTUDIO DE LA SELECCIÓN DE LEVADURAS COMO HERRAMIENTA PARA LA REDUCCIÓN DE NOTAS DE OXIDACIÓN EN VINOS ECOLÓGICOS 140

| | |
|------------------------------|-----|
| 5.2.1 RESUMEN | 140 |
| 5.2.2 INTRODUCCIÓN | 140 |
| 5.2.3 MATERIALES Y MÉTODOS | 145 |
| 5.2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 153 |
| 5.2.5 CONCLUSIONES | 190 |
| 5.2.6 REFERENCIAS | 192 |

CAPÍTULO 6

6. FERMENTACIONES A ESCALA DE BODEGA PILOTO CON LEVADURAS SELECCIONADAS DE LA D.O. "VINOS DE MADRID" 202

| | |
|----------------------------|-----|
| 6.1 RESUMEN | 203 |
| 6.2 INTRODUCCIÓN | 203 |
| 6.3 MATERIALES Y MÉTODOS | 204 |
| 6.4 RESULTADOS Y DISCUSION | 213 |

| | |
|--|------------|
| 6.5 CONCLUSIONES | 235 |
| 6.6 REFERENCIAS | 236 |
| CAPÍTULO 7 | |
| 7. CONCLUSIONES GENERALES | 243 |
| ANEXOS | 250 |
| ANEXO 1: ABREVIATURAS | 521 |
| ANEXO 2: ENSAYOS PRELIMINARES NECESARIOS PARA EL DESARROLLO DEL CAPITULO 4: “EVALUACIÓN DE DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA EVITAR LOS EFECTOS DEGRADATIVOS OXIDATIVOS Y TÉRMICOS EN VINOS TINTOS ECOLÓGICOS” | 254 |
| 2.1 ENSAYOS DE PRESELECCIÓN DE COMPUESTOS CON PRESUNTA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE PARA LOS ESTUDIOS DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA | 254 |
| 2.2 ENSAYOS DE PRESELECCIÓN DE FIBRAS (SPME) MEDIANTE ANÁLISIS DE GC-O QUE MEJOR CARACTERICEN EL AROMA DEL VINO | 258 |
| ANEXO 3: PROTOCOLOS PARA LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS DE LEVADURA AISLADAS | 261 |
| 3.1 EXTRACCIÓN DEL ADN | 261 |
| 3.2 CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO | 262 |
| 3.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS | 262 |
| 3.4 VISUALIZACIÓN DE LOS PERFILES GENÉTICOS | 263 |
| 3.5 ANÁLISIS GENÓMICO DE LAS LEVADURAS | 266 |
| 3.6 REFERENCIAS | 266 |
| ANEXO 4: PARÁMETROS PARA EL SEGUIMIENTO DE LAS MICROFERMENTACIONES | 267 |
| 4.1 TOMA DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO | 267 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.1 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA EL SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN | 267 |
| 4.1.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE FINAL DE FERMENTACIÓN | 268 |
| 4.1.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE FINAL DE FERMENTACIÓN | 268 |
| 4.2 GRÁFICAS FERMENTACIONES EN MOSTO ARTIFICIAL | 269 |
| 4.3 GRÁFICAS FERMENTACIONES EN MOSTO NATURAL | 275 |
| | |
| ANEXO 5: PARÁMETROS PARA EL SEGUIMIENTO DE LAS VINIFICACIONES A ESCALA BODEGA | 280 |
| 5.1 EVOLUCIÓN DE LA DENSIDAD DE LOS DEPÓSITOS | 280 |
| 5.2 ESTUDIO DE LA IMPOSICIÓN DE LAS CEPAS DE LEVADURAS EN LOS DEPÓSITOS | 283 |
| | |
| ANEXO 6: RECTAS DE CALIBRADO AMINOÁCIDOS (HPLC-FLUORESCENCIA) | 284 |
| | |
| ANEXO 7: RECTAS CALIBRADO COMPUESTOS VOLÁTILES MAYORITARIOS DEL VINO (GC-FID) | 285 |

CAPÍTULO 1

OBJETIVOS, ANTECEDENTES E HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. OBJETIVOS, ANTECEDENTES E HIPÓTESIS DE TRABAJO

1.1 OBJETIVOS DE LA TESIS

1.1.1 OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo fundamental de esta tesis es profundizar en el estudio de los fenómenos de oxidación que se pueden producir en los vinos ecológicos y la búsqueda de alternativas para paliar dichos procesos y alcanzar de esta manera, una mejora de su calidad.

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos se pueden clasificar en dos grupos; los relativos al estudio de los fenómenos de oxidación en los vinos y los relativos a la búsqueda de alternativas para disminuir la tendencia a la oxidación, especialmente en los vinos ecológicos.

A. Objetivos relativos al estudio de los fenómenos de oxidación: Este grupo de objetivos se centra en el estudio del origen y los factores que influyen en los procesos de oxidación, tanto en vinos tintos como en blancos, y de los cambios químicos y sensoriales que se producen en los vinos tras estos fenómenos.

1. Creación de una ficha de cata para descriptores específicos de oxidación en vinos.
2. Estudio mediante análisis sensorial y análisis olfatométrico de los cambios en el perfil aromático de los vinos antes y después de haber sufrido procesos de oxidación forzada y procesos de oxidación natural.
3. Identificación de los compuestos y aromas específicos relacionados con los fenómenos de oxidación.
4. Estudio de la correlación entre los datos obtenidos mediante análisis olfatométricos, análisis cuantitativos de compuestos volátiles y análisis sensoriales.

5. Medida de la capacidad antioxidante de muestras de vino mediante las metodologías analíticas: método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y voltametría cíclica.

Estos objetivos serán abordados en los capítulos 3, 4 y 5 de esta tesis.

B. Objetivos relativos a la búsqueda de alternativas para disminuir los procesos de oxidación en los vinos ecológicos: Este grupo de objetivos tiene como prioridad la búsqueda de alternativas al dióxido de azufre (SO₂), cuyo uso está limitado en la elaboración de vinos ecológicos.

1. Estudio de la influencia de la adición de diversos compuestos con presunta capacidad antioxidante a un vino tinto ecológico en su resistencia a la degradación térmica y oxidativa, evaluando sus cambios en la composición aromática, el perfil sensorial y estado oxidativo.
2. Selección de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de la colección de levaduras del IMIDRA, cuyo metabolismo minimice la producción de aminoácidos precursores de compuestos volátiles relacionados con la oxidación. Estudio de la evolución, a diferentes tiempos de la composición química y del perfil aromático de vinos obtenidos por fermentación con diferentes cepas de levaduras, almacenados en condiciones desfavorables.
3. Ensayo de levaduras seleccionadas como “óptimas” en cuanto a la reducción de los aromas de oxidación en vinificaciones a nivel de bodega experimental.

Estos objetivos serán abordados en los capítulos 4, 5 y 6 de esta tesis.

Este proyecto tiene una gran importancia social y económica si consideramos que puede contribuir a:

- La preservación del medio ambiente, mejorando las propiedades edafológicas del suelo y de las aguas superficiales y subterráneas, gracias al sustento y promoción de los cultivos ecológicos.

- La obtención de vinos de calidad sin productos sintéticos (pesticidas, herbicidas y fungicidas) y con menor cantidad de SO₂; siendo por lo tanto, vinos mejores para la salud del consumidor.
- La ampliación del mercado de los vinos ecológicos y mejora de la renta agraria de viticultores y bodegueros que han invertido en agricultura ecológica.
- Las mejoras económicas que supone en general la producción de vinos de mayor calidad, debido a la importancia del mercado vitivinícola en la economía española.
- Apoyo al Plan Estratégico para la Producción Ecológica que cuenta con acciones concretas que facilitan el desarrollo armónico y duradero del sector ecológico.
- Aprovechar el auge del interés social por el vino ofreciendo a los consumidores un producto de calidad que responda a las demandas de éste: vinos ecológicos de alto potencial aromático y polifenólico.

1.2 ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

1.2.1 SITUACIÓN DE ESPAÑA EN EL MERCADO VITIVINÍCOLA

España es uno de los grandes productores mundiales de vino: el primer país del mundo en lo que se refiere a superficie de viñedo destinada a producción de vino, tercer país productor y segundo exportador mundial en términos de volumen. A pesar de que el cultivo de viñedos se está viendo reducido durante los últimos años, España sigue siendo el primer país del ranking mundial en superficie de viñedo, con más de un millón de hectáreas censadas en 2010, seguida de Francia e Italia. España cuenta con el 14,3% del total de la superficie global de viñedos, Francia del 10,9% e Italia del 10,6%. Según los datos aportados por la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino), la producción mundial de vino en 2010 se redujo en 11,2 millones de hectolitros, situándose en 260 millones. El primer país productor de vino es Francia, (17,3% mundial), seguido por Italia (17,2% mundial), y España (13,1% mundial). Fuera de la Unión Europea, el nivel de producción en 2010 fue también inferior, con 107,1 millones de hl, frente a los 108,3 millones de hl del 2009. Estados Unidos fue el país de mayor producción de vino, seguido de Argentina y Australia.

A pesar del retroceso moderado que se está produciendo en los últimos años respecto a la producción de vino, las exportaciones españolas han crecido un 15,6% en el 2010 y un 26,3% en volumen en 2011, alcanzando un valor record hasta el momento. Los vinos con denominación de origen, tanto tranquilos como espumosos y de licor han avanzado en ventas sobretodo en Norteamérica (Estados Unidos, Canadá y México) y destinos europeos, como Alemania o Reino Unido. Por su parte, las exportaciones de vino sin denominación de origen protegida a granel han tenido como principal destino Francia, Alemania e Italia; sin olvidarse de otros puntos internacionales como Rusia y China. En cuanto al consumo de vino en España, se ha producido un descenso del 1,6% en 2011, debido a la caída registrada en los vinos sin denominación de origen protegida (-2,7%), mientras que los vinos con calificación se mantuvieron (-0,8%) y los cavas crecieron (+6,5%). Con respecto al consumo mundial, Estados Unidos ha pasado a ser el principal consumidor en 2011, según los datos publicados por Vinexpo y el International Wine & Spirits Research (IWSR). Se han consumido en este país más de 2.800 millones de litros de vino durante el 2011, lo que ha hecho que adelante a los clásicos grandes consumidores del mundo Francia e Italia, en lo que se refiere a este producto. También puede destacarse el vertiginoso crecimiento del consumo que han experimentado los mercados de China y de Rusia.

El sector vitivinícola español se encuentra inmerso en un importante proceso de actualización y renovación. Desde el año 2000, la superficie sujeta a reconversión y restructuración ha superado las 130.000 hectáreas, lo cual ha supuesto una inversión próxima a los 800 millones de euros. Alrededor de 4.200 bodegas elaboran en España vinos tranquilos, espumosos y de licor. La mayoría de estas bodegas son de pequeño tamaño, de tipo familiar y un gran número de ellas están constituidas como cooperativas agrarias. Todos estos datos reflejan la importancia del sector vitivinícola en la economía española y la necesidad de una inversión en la mejora de la calidad de nuestros vinos que permita situarnos y permanecer a la altura de los primeros países.

1.2.2 LA AGRICULTURA Y EL “VINO ECOLÓGICO”

El consumo del vino ha ido transformándose con el paso del tiempo y la forma de apreciar el vino ha cambiado de manera radical, pasando de ser considerado exclusivamente por el aporte energético de su materia a ser valorado más por su esencia. La tendencia en la

evolución es la vuelta a la tranquilidad, al buen hacer, a las pequeñas cantidades, a los medios más respetuosos y cercanos a lo natural, todo ello, por supuesto, unido a una alta calidad en el vino elaborado.

Estos conceptos enlazan con la filosofía de los productos orgánicos o ecológicos. La producción ecológica según el Reglamento (CE) N° 834/2007 de entrada en vigor desde el 1 de Enero del 2009, es un “sistema general de gestión agrícola y producción de alimentos que combina las mejores prácticas ambientales, un elevado nivel de biodiversidad, la preservación de recursos naturales, la aplicación de normas exigentes sobre bienestar animal y una producción conforme a las preferencias de determinados consumidores por productos obtenidos a partir de sustancias y procesos naturales”.

Hay que resaltar la importancia que va ganando cada año la agricultura ecológica y por consiguiente el cultivo del viñedo ecológico; aumentando de forma constante no sólo el volumen de ventas de los productos procedentes de la misma, sino también el número de hectáreas cultivadas de este modo en todo el mundo, especialmente en la Unión Europea (ICEX, 2010). En el caso del vino, el mercado evoluciona en materia de calidad, diferenciación y consolidación en los principales países desarrollados; existiendo países como Alemania, Australia y Japón, dispuestos a pagar un sobrepeso del valor por un vino libre de agregados químicos. Según los datos aportados por la Comisión Europea, en la actualidad, los países con una mayor extensión de viñedos ecológicos son Italia (30.341 hectáreas), Francia (21.403 hectáreas) y España (17.665 hectáreas).

Los vinos ecológicos son más susceptibles de sufrir degradaciones oxidativas debido a las restricciones establecidas en su elaboración; siendo la más destacable la limitación en las dosis de empleo del antioxidante y antimicrobiano dióxido de azufre (SO₂). La reducción en el uso de SO₂ favorece la tendencia a la oxidación y la formación de aromas de “evolución-oxidación”, lo que conlleva a la disminución de su calidad organoléptica. Los estudios sobre la oxidación que se han llevado a cabo hasta ahora han sido principalmente en vinos blancos, debido a que su menor contenido en fenoles los hacía más susceptibles a ser oxidados. En el caso de los vinos orgánicos, su susceptibilidad aumenta, extendiéndose el problema de la oxidación también a los vinos tintos. Es, por tanto, interesante el estudio de los fenómenos de

oxidación en los vinos ecológicos, la determinación de los aromas asociados a su oxidación, los compuestos volátiles responsables de esos aromas y el origen y parámetros que influyen en su formación. De esta forma se podría mejorar su estabilidad y calidad aromática y favorecer así el mercado de los vinos orgánicos.

1.2.3. LAS REACCIONES DE OXIDACIÓN EN EL VINO

Durante el proceso de vinificación, las reacciones redox son responsables de cambios importantes en la composición y calidad final del vino. La totalidad de estas alteraciones implican una pérdida de aromas frutales y florales, la aparición de aromas desagradables, tales como: “patata/verdura cocida”, “miel” o “pienso” y un pardeamiento temprano del vino (Escudero et al., 2000a; Silva Ferreira et al., 2002; Silva Ferreira et al., 2003a; Li et al., 2008). Ya se ha demostrado la existencia de varios compuestos volátiles, tales como el metional, fenilacetaldehído, sotolón, t-2-nonenal, benzaldehído, t-2-octenal, hexanal, 1-octen-3-ol, furfural y 5-metilfurfural, entre otros, que han sido relacionados con la oxidación en vinos blancos (Ferreira et al, 1998, Escudero et al., 2000a; Silva Ferreira et al, 2002; Silva Ferreira et al., 2003b; Culleré et al., 2007). Algunos de estos compuestos, como el hexanal, 1-octen-3-ol, t-2-octenal y t-2-nonenal, cuya génesis está relacionada con el efecto del oxígeno, son productos de la degradación oxidativa de ácidos grasos insaturados y otros como el benzaldehído, furfural, 5-metilfurfural, eugenol, 2-nonanona, 2-butoxietanol y 4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona tienen un origen diverso (Escudero et al., 2002). La formación o aumento de la mayoría de los compuestos aldehídicos pueden explicarse gracias a los mecanismos de Maillard. Estas rutas se pueden dividir en las reacciones de Amadori, cuyos productos se forman por ciclación/condensación de las deoxiosonas, generando compuestos tales como el furfural, 5-metilfurfural y 5-hidroxi-metilfurfural; y la degradación de aminoácidos en presencia de compuestos dicarbonílicos o vía Strecker, que genera aldehídos del tipo fenilacetaldehído y metional (Pripis-Nicolau et al., 2000; Oliveira e Silva et al. 2008). Debido a que estas reacciones son dependientes no sólo de la temperatura, sino también del nivel de oxígeno; puede considerarse a los aldehídos generados tras la degradación de sus aminoácidos de partida como claros indicadores del nivel de oxidación de un vino (Bueno et al., 2010). Durante el proceso de oxidación del vino no sólo se observa el aumento de ciertos compuestos y la aparición de nuevos; sino que también, se produce una pérdida de aromas

frescos y varietales del vino, en parte ligada a una disminución de terpenoles como el linalol (Silva Ferreira et al., 2002).

1.2.4. SOLUCIONES A LOS PROCESOS DE OXIDACIÓN EN EL VINO ECOLÓGICO

Para poder resolver el problema de la susceptibilidad a la oxidación en los vinos ecológicos y para de esta forma asegurar su calidad; se han propuesto diferentes alternativas; tales como la optimización de los parámetros de vinificación, la selección de antioxidantes naturales que puedan remplazar parcial o totalmente el uso de SO₂, como los ácidos cafeico y ascórbico y el glutatión (Oliveira et al., 2011; Makhotkina y Kilmartin, 2009; Roussis y Sergianitis, 2008; Lambropoulosa y Roussis, 2007) y la selección de cepas de vid más adaptadas a la agricultura ecológica, capaces de resistir a las enfermedades más comunes de la vid (Cordero-Bueso et al., 2011). El uso de antioxidantes capaces de prevenir o retrasar la oxidación en los alimentos ha sido ampliamente estudiado; especialmente antioxidantes naturales, tales como los compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados clorofílicos, aminoácidos y aminos), carotenoides y el ácido ascórbico. La alta concentración de alguno de estos compuestos en el vino y sus efectos muy favorables para la salud, ha llevado al estudio de las distintas fracciones del vino y su capacidad antioxidante y a la optimización de las técnicas de vinificación y selección de variedades para aumentar su concentración (Landrault et al., 2001; Ghiselli et al., 1998).

La selección de levaduras con ciertas propiedades biotecnológicas ha surgido recientemente como posible alternativa para la mejora y el aseguramiento de la calidad de los vinos (Fleet, 2003; Ugliano y Henschke, 2009). Tradicionalmente la elaboración de vino se ha realizado mediante la utilización de cepas de levaduras procedentes de la superficie de las uvas y del ambiente de las bodegas. Este tipo de vinificaciones con las levaduras presentes de forma natural garantizan una mayor tipicidad del vino, pero el uso de levaduras seleccionadas aporta una mayor estandarización del proceso; ofreciendo a su vez, la elección de características determinadas deseables (Zironi, 1999; Martínez-Rodríguez et al., 2002); lo cual conlleva a una mejora de la calidad de los vinos obtenidos gracias a ellas. Por consiguiente, explorar la biodiversidad de cepas fermentativas indígenas puede llegar a ser una contribución muy

importante para entender la variabilidad de fenotipos específicos y la optimización de la selección de cepas adaptadas a las necesidades de cada bodeguero.

La concentración de aminoácidos es un factor muy importante en la formación de aromas y se han encontrado diferencias significativas en los niveles de algunos volátiles importantes en el vino en función de los aminoácidos añadidos al mosto (Hernández-Orte et al., 2002). Pero no sólo la composición inicial de aminoácidos va a proporcionar variaciones de compuestos volátiles en el vino; sino que también, la composición de aminoácidos residuales que quede en el vino va a influir en el aroma final debido a las reacciones en las que se van a ver implicados también durante los procesos de maduración (Escudero et al., 2000b). Las reacciones de formación de compuestos relacionados con la oxidación, que incluyen tanto peroxidaciones de los alcoholes presentes en el medio como degradaciones de los aminoácidos del mosto; se verán a su vez afectadas por parámetros como la temperatura, el pH, el SO₂ y oxígeno disueltos en el medio y el grado alcohólico.

1.3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El planteamiento del trabajo se ha abordado desde dos áreas: estudio físico-químico del aroma y microbiología enológica.

1.3.1. ESTUDIO DEL AROMA

Para la realización de este trabajo, el estudio de aromas se ha centrado en la determinación de descriptores de oxidación y la determinación analítica de compuestos asociados a los aromas de oxidación mediante cromatografía de gases acoplada a detección con FID y detección por espectrometría de masas (GC-FID y GC-MS), cromatografía de gases acoplada a olfatometría (GC-O) y análisis sensorial. También se determinaron aquellos compuestos volátiles con impacto aromático en el vino, tanto aquellos con un impacto positivo en el aroma como con un impacto negativo.

El análisis sensorial se ha realizado mediante catas olfativas basándose en dos tipos de ficha de cata; una de términos generales y otra de descriptores específicos de oxidación. Esta última se ha elaborado previamente gracias a la selección de términos referentes a oxidación siguiendo el procedimiento AFNOR (NFV-09_021). Esto permitió obtener una base de trabajo para la homogeneización y estandarización de vocablos entre catadores, con términos comunes asociados a sensaciones sensoriales también definidas y concretas.

También se abordó el estudio de parámetros físico-químicos y condiciones de oxidación de posible influencia en los procesos de degradación y oxidación de los vinos. Para ello el trabajo se centró sobretodo en la búsqueda de condiciones de elaboración que permitan paliar los efectos de la oxidación sobre vinos tintos ecológicos. Con este fin se experimentaron diferentes condiciones de degradación y el uso de compuestos químicos, algunos de ellos antioxidantes naturales presentes en el vino. Esto podría suponer una puerta para, si se confirman y se profundiza con más estudios los resultados obtenidos, introducir modificaciones en las técnicas de elaboración y así obtener vinos más estables y de mejor calidad.

Se han empleado dos técnicas de medida de capacidad antioxidante, DPPH y voltametría cíclica, para clasificar y comparar vinos con arreglo a dicha propiedad. La determinación de la capacidad antioxidante por algunas de estas técnicas podría permitir en un futuro reconducir o modificar estrategias de elaboración de vinos, especialmente ecológicos, con fines a evitar o prevenir su posible deterioro por oxidaciones indeseables.

1.3.2. MICROBIOLOGÍA ENOLÓGICA

Para el desarrollo de este trabajo, la experimentación se ha centrado en la selección de cepas de levaduras autóctonas de la D.O. “Vinos de Madrid” existentes en la colección del IMIDRA. La selección se realizó en base a criterios de calidad enológica y de un metabolismo que llevara a una débil producción de SO₂ y de los aminoácidos metionina y fenilalanina en los mostos fermentados. Para ello, se realizaron microvinificaciones a escala de laboratorio en mosto artificial y en un mosto base natural, previamente esterelizados. En ellas se determinarán los niveles de SO₂ y se cuantificarán 20 aminoácidos mediante HPLC. Para la identificación a

nivel de cepa las levaduras fueron genotipadas mediante PCR múltiple de microsátélites. Tras el final de las fermentaciones alcohólicas con mosto natural y a distintos tiempos de evolución (en condiciones desfavorables) de este mosto fermentado se realizaron análisis de composición aromática y un análisis sensorial final comparativo para descriptores de oxidación. Finalmente, las cepas seleccionadas se probaron, tanto de forma independiente como en coinóculo, a escala piloto en la bodega experimental de “El Encín” junto con una cepa comercial.

1.4 REFERENCIAS

Datos oficiales sobre producción y comercialización de vinos obtenidos del ICEX (Instituto Español de Comercio Exterior) y la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino).

Los datos sobre la regulación europea de productos ecológicos se corresponden con la vigente Reglamentación (CE) N° 834/2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos publicada en el Diario Oficial de la Unión Europea el 20 de Julio de 2007 (L. 189/1-23) y el Reglamento (CE) N° 606/2009 que fija determinadas disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) N° 479/2008 del Consejo, por el que se establecía la organización común del mercado vitivinícola, en lo relativo a las categorías de productos vitícolas, las prácticas enológicas y las restricciones aplicables; publicado el 10 de julio de 2009.

Publicaciones citadas:

- Bueno, M., Culleré, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2010). Chemical and sensory characterization of oxidative behavior in different wines. *Food Research International*, 43, 1423–1428.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M.D. & Valero, E. (2011). Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 132-139.

- Culleré, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2007). An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 876-881.
- Escudero, A., Cacho, J. & Ferreira, V. (2000a). Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study. *European Food Research and Technology*, 211, 105-110.
- Escudero, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J. & Ferreira, V. (2000b). Clues about the Role of Methional as Character Impact Odorant of some Oxidized Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4268-4272.
- Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J. & Ferreira V. (2002). Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry*, 77, 325-331.
- Ferreira, V., Escudero, A., López, R. & Cacho, J. (1998). Analytical characterization of the flavor of oxygen-spoiled wines through the Gas-Chromatography-Ion-Trap Mass Spectrometry of ultratrace odorants: Optimization of conditions. *Journal of Chromatographic Science*, 36, 331-339.
- Fleet, G. H. (2003). *Yeast interactions and wine flavour*. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11–22.
- Ghiselli A., Nardini M., Baldi A. y Scaccini C. (1998). Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 361-365.
- Hernández-Orte, P., Cacho, J. & Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2891-2899.
- Lambropoulos, I. & Roussis, I. G. (2007). Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by caffeic acid and gallic acid. *Food Research International*, 40, 176-181.

- Li, H., Guo, A. & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108, 1-13.
- Lrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G. & Teissedre, P.L. (2001). Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3341-3348.
- Makhotkina, O. & Kilmartin, P.A. (2009). Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 633, 165-174.
- Martínez-Rodríguez, A.J., Carrascosa, A.V., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, V., Polo, MC. (2002). Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wines production by the traditional method. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29, 314-322.
- Oliveira, C.M., Silva Ferreira, A.C., De Freitas, V. & Silva, A.M.S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44, 1115-1126.
- Oliveira e Silva, H., Guedes de Pinho, P., Machado, B.P., Hogg, T, Marques, J.C., Câmara, J.S., Albuquerque, F. & Silva Ferreira, A.C. (2008). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11989-11996.
- Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Bertrand A. & Maujean, A. (2000). Formation of Flavor Components by the Reaction of Amino Acid and Carbonyl Compounds in Mild Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3761-3766.
- Roussis, I. G. & Sergianitis, S. (2008). Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulfur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 35-39.
- Silva Ferreira, A.C., Guedes de Pinho, P., Rodrigues, P. & Hogg, T. (2002). Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5919-5924.
- Silva Ferreira, A., Oliveira, C., Hogg, T. & Guedes de Pinho, P. (2003a). Relationship between potentiometric measurements, sensorial analysis and some substances responsible for

aroma degradation of white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4668-4672.

- Silva Ferreira, A., Hogg, T. & Guedes de Pinho, P. (2003b). Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1377-1381.
- Ugliano, M. & Henschke, P.A. (2009). Yeast and Wine Flavour. Capítulo 8D (pp. 313-393) In: Moreno-Arribas, M.V. & Polo, M.C. Ed. *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer.
- Zironi R. (1999). Vinificare secondo natura: il disciplinare di vinificazione *AIAB Vignevini*, 10, 48-50.

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 EL VINO Y SU NORMATIVA EN ESPAÑA

Existen muchas definiciones para el vino; pero una de las más completas es la que se establece en la ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y el Vino en nuestro País. "El vino es el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva". El vino ha sido un componente esencial de la dieta cotidiana; jugando un papel importante en el desarrollo de la sociedad, la religión y la cultura. Hoy en día se pueden beber vinos de gran calidad gracias al mayor conocimiento que tenemos sobre el cultivo de las uvas, la microbiología y bioquímica de la fermentación y el uso de tecnología avanzada en la producción, entre otros factores (Zoecklein et al., 2001).

La producción del vino es un proceso muy complejo, tanto desde el punto de vista microbiológico como bioquímico. Conlleva la transformación del mosto gracias a la actividad metabólica de las levaduras; siendo fundamentalmente las cepas tolerantes al alcohol de *Saccharomyces cerevisiae*, las que pueden considerarse como principales responsables de la fermentación alcohólica (Ribéreau-Gayon, 2006). Durante dicho proceso se transforman las hexosas presentes en el mosto en etanol y CO₂; además de producirse otros compuestos secundarios que van a ser fundamentales para las propiedades organolépticas del vino (Carrascosa et al., 2005).

Durante las últimas décadas se han producido grandes avances en la investigación del papel de las levaduras en la elaboración del vino; encontrándose la existencia de complejas interrelaciones entre la microbiota y los compuestos procedentes de las uvas que van a contribuir en la apariencia, aroma, sabor y "textura" del vino. Aunque muchas bodegas siguen utilizando las levaduras indígenas presentes en el mosto y el ambiente de la propia bodega; cada vez más bodegas cuentan con la ayuda de levaduras seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* con características enológicas determinadas (Ugliano y Henschke, 2009). Además, durante los últimos años, el gusto de los consumidores se ha ido haciendo más exigente y demandando, a su vez, no sólo nuevos productos, sino también de alta calidad. Esta corriente

está estimulando la búsqueda de alternativas en el campo de elaboración de los vinos. Dentro de este objetivo, el uso combinado de una o más cepas de levaduras con buenas propiedades enológicas y unas características metabólicas específicas podría suponer una alternativa interesante a la hora de mejorar la calidad del vino (Fleet, 2003).

La Península Ibérica y las islas Canarias y Baleares son un lugar privilegiado para la producción de vinos de características muy distintas, gracias a su situación geográfica, las diferencias climáticas y la variedad de suelos que las caracterizan. Se cultiva viñedo en la totalidad de las 17 Comunidades Autónomas; aunque cerca de la mitad de la extensión total del cultivo se encuentra en Castilla-La Mancha, con 505.000 has que constituyen el 49,5 % del viñedo total plantado. Esta zona geográfica constituye la mayor extensión del mundo dedicada a su cultivo, seguida de Extremadura (86.000 has), Valencia (73.600 has) y Castilla y León (57.000 has). Sin embargo, es la Comunidad Autónoma de La Rioja la que dedica la mayor extensión al cultivo del viñedo en comparación a su superficie de cultivo total. La media de explotación agraria en España es de 3,34 has, aunque varía entre las distintas regiones; las explotaciones más pequeñas se encuentran en Galicia, mientras que las mayores se dan en Murcia.

2.1.1 LA REGULACIÓN DEL VINO:

El Reglamento (CE) nº 1898/2006 de la Comisión, de 14 de diciembre de 2006, establece disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 510/2006 del Consejo, sobre la protección de las Indicaciones Geográficas y las Denominaciones de Origen de los productos agrícolas y alimenticios.

El Reglamento (CE) 479/2008 (DOUE L 148, de 6-06-2008), establece la organización del mercado (OCM) vitivinícola. Además, implanta una nueva regulación para los nombres geográficos de vinos, desapareciendo los V.C.P.R.D. (vinos de calidad producidos en regiones determinadas) e incorporando las D.O.P. (denominación de origen protegida) e I.G.P. (indicación geográfica protegida). Esta nueva reglamentación, se basa en el refuerzo de la competitividad de los vinos europeos, un mayor equilibrio entre la oferta y la demanda, la supresión de las medidas de intervención en los mercados, un mayor

aprovechamiento de los créditos presupuestarios, una mayor simplificación de la reglamentación, la consolidación del tejido social de las zonas rurales y la protección del medio ambiente.

Vinos con D.O.P.: vinos cuya calidad y características son esencialmente o exclusivamente debidas a su origen geográfico, con sus factores humanos y culturales inherentes. Estos vinos poseen una calidad, reputación u otras características específicas atribuibles a su origen geográfico. El 100% de las uvas de variedades vnicas pertenecientes a *Vitis vinífera*, proceden exclusivamente de la zona geográfica de producción y su elaboración tiene lugar dentro de la zona geográfica.

Vinos con IGP: vinos que poseen una calidad, reputación u otras características específicas atribuibles a su origen geográfico. Al menos el 85% de las uvas procede exclusivamente de la zona geográfica y su elaboración tiene lugar en el área geográfica. Estos vinos se pueden obtener de variedades vnicas pertenecientes a *Vitis vinífera* y a otras especies del género *Vitis*.

Actualmente, los términos tradicionales, tal y como los define la Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino (BOE 11-07-2003), que se utilizan para indicar que el producto se acoge a una DOP o IGP, son:

Para las D.O.P.:

- “*Denominación de Origen*” (D.O.), es el nombre de una región, comarca, localidad o lugar determinado que haya sido reconocido administrativamente para designar vinos que cumplan las siguientes condiciones:
 - Haber sido elaborados en la región, comarca, localidad o lugar determinados con uvas procedentes de los mismos.
 - Disfrutar de un elevado prestigio en el tráfico comercial en atención a su origen.
 - Cuya calidad y características se deban fundamental o exclusivamente al medio geográfico que incluye los factores naturales y humanos.

- Además, han de haber transcurrido, al menos cinco años desde su reconocimiento como vino de calidad con indicación geográfica.
- “*Denominación de Origen Calificada*” (D.O.Ca.), cumple además de los requisitos exigibles a las denominaciones de origen, los siguientes:
 - Que hayan transcurrido, al menos diez años desde su reconocimiento como D.O.
 - Se comercialice todo el vino embotellado desde bodegas inscritas y ubicadas en la zona geográfica delimitada.
 - Cuento con un sistema de control desde la producción hasta la comercialización respecto a calidad y cantidad, que incluya un control físico-químico y organoléptico por lotes homogéneos de volumen limitado.
 - Está prohibida la coexistencia en la misma bodega con vinos sin derecho a la DOCa, salvo vinos de pagos calificados ubicados en su territorio.
 - Ha de disponer de una delimitación cartográfica, por municipios, de los terrenos aptos para producir vinos con derecho a la D.O.Ca.
- “*Vino de Calidad con indicación geográfica*”, es el producido y elaborado en una región, comarca, localidad o lugar determinado con uvas procedentes de los mismos, cuya calidad, reputación o características se deban al medio geográfico, al factor humano o a ambos, en lo que se refiere a la producción de la uva, a la elaboración del vino o a su envejecimiento.
- “*Vino de Pago*”, es el originario de un “pago”, entendiéndose por tal el paraje o sitio rural con características edáficas y de microclima propias que lo diferencian y distinguen de otros de su entorno, conocido con un nombre vinculado de forma tradicional y notoria al cultivo de los viñedos de los que se obtienen vinos con rasgos y cualidades singulares y cuya extensión máxima será limitada reglamentariamente por la Administración competente, de acuerdo con las características propias de cada Comunidad Autónoma, y no podrá ser igual ni superior a la de ninguno de los términos municipales en cuyo territorio o territorios, si fueren más de uno, se ubique. Se entiende que existe vinculación notoria con el cultivo de los viñedos, cuando el

nombre del pago venga siendo utilizado de forma habitual en el mercado para identificar los vinos obtenidos en aquél durante un período mínimo de cinco años.

- “*Vino de Pago Calificado*”. Reciben este nombre aquellos vinos cuando la totalidad del pago se encuentre incluida en el ámbito territorial de una denominación de origen calificada; siempre que acrediten cumplir los requisitos exigidos a los vinos de la D.O.Ca. y se encuentra inscrito en la misma.

Para las I.G.P.:

- Vino de mesa con derecho a la mención tradicional “*Vino de la Tierra*”, es el que ha sido delimitado teniendo en cuenta unas determinadas condiciones ambientales y de cultivo que puedan conferir a los vinos características específicas.

Además, el Reglamento (CE) 110/2009 (DOUE L 37 de 6-02-2009), relativo a la definición, designación, presentación, etiquetado y protección de la indicación geográfica de las bebidas espirituosas. Define el concepto de indicación geográfica (I.G.) para estas bebidas, establece un nuevo procedimiento de reconocimiento de las mismas e incluye las I.G. protegidas por cada Estado miembro, en uno de sus anexos.

La clasificación por Categorías de envejecimiento establece:

1. Los incluidos en la categoría “vino de la tierra” (IGP) y para los vinos con denominación de origen protegida D.O.P. pueden clasificarse en:

- a. *Vino noble*: vinos sometidos a un periodo mínimo de envejecimiento de 18 meses en total en recipientes de madera de roble de una capacidad máxima de 600 litros o en botella.
- b. *Vino añejo*: vinos sometidos a un periodo mínimo de envejecimiento de 24 meses en total en recipiente de madera de roble con una capacidad máxima de 600 litros o en botella.
- c. *Vino viejo*: vinos sometidos a un periodo mínimo de envejecimiento de 36 meses cuando este envejecimiento haya tenido marcado carácter oxidativo debido a la acción de la luz, del oxígeno, del calor o del conjunto de estos factores.

2. Únicamente los Vinos con Denominación de Origen Protegida D.O.P. podrán incluirse en una de las siguientes categorías:

- a. *Vino de crianza*: vinos tintos con un periodo de envejecimiento mínimo de 24 meses de los que al menos 6 serán en madera de roble de 330 litros de capacidad máxima; y para los blancos y rosados con un periodo mínimo de 18 meses.
- b. *Reserva*: vinos tintos con un periodo mínimo de envejecimiento de 36 meses con al menos 12 en madera y el resto en botella; y los blancos y rosados con un periodo de 18 meses, 6 de ellos en madera.
- c. *Gran reserva*: vinos tintos con un periodo mínimo de 60 meses de envejecimiento de los que al menos 18 serán en madera; y los blancos y rosados con periodo de 48 meses, 6 de ellos en madera.

A su vez, los vinos espumosos de calidad pueden utilizar las indicaciones “premium” y “reserva”; la indicación “gran reserva” podrá ser utilizada por los amparados por la denominación cava con un periodo mínimo de envejecimiento de 30 meses desde el tiraje hasta el degüelle.

2.1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS VINOS ESPAÑOLES:

España cuenta con 88 zonas de producción de vinos de calidad con D.O.P. (ver Figura 1); de las cuales 67 son con D.O., 2 con D.O.Ca., 6 con Denominación de Vinos de Calidad y 13 son Vinos de Pago. Las primeras Denominaciones autorizadas se aprobaron en 1932, y se trata de Jerez-Xères-Sherry, Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda, Málaga, Montilla-Moriles, Rioja, Tarragona, Priorato, Alella, Utiel Requena, Valencia, Alicante, Ribeiro, Cariñena, Penedés, Condado de Huelva, Valdepeñas, La Mancha, Navarra y Rueda. Por otra parte, existen 45 clases de vinos con derecho a la mención tradicional Vinos de la Tierra, englobadas todas ellas dentro de la categoría general de I.G.P.

El 61,5% del vino español se produce con variedades blancas, sobre todo en las Comunidades Autónomas de Castilla-La Mancha, Extremadura, Andalucía y Cataluña. Las variedades de uva más extendidas en España son la variedades blancas: Airén, Pardina,

Macabeo y Palomino, y las tintas: Tempranillo, Bobal, Garnacha Tinta y Monastrell, por orden de importancia en cuanto a su cultivo.

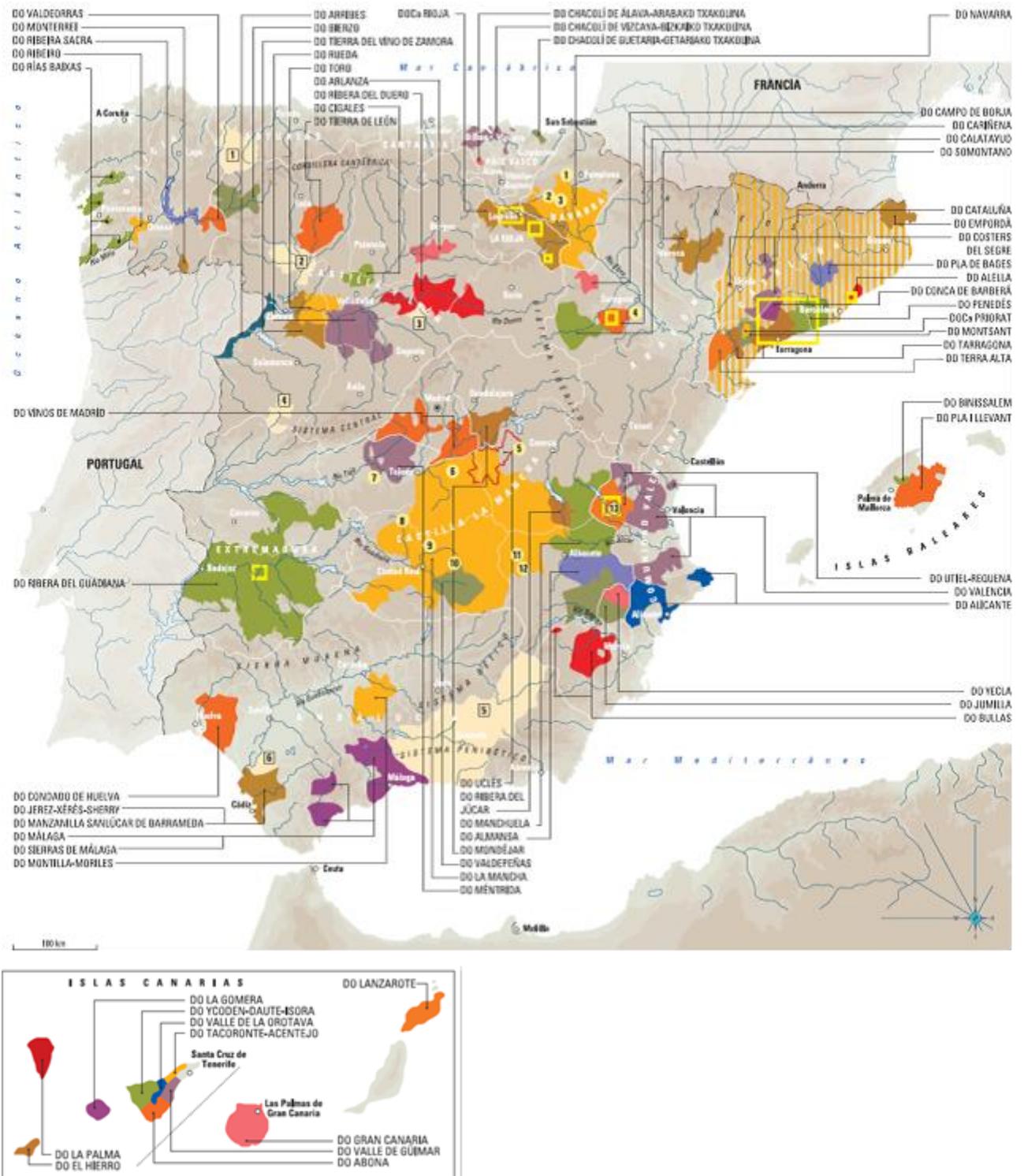


Figura 1. Denominaciones de origen vinícolas en España reconocidas por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (Página oficial Vinos de España a Febrero 2012).

LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN “VINOS DE MADRID”: según los datos oficiales aportados por el consejo regulador de la D.O. “Vinos de Madrid”, en la actualidad existen 7.461,61 hectáreas de viñedo inscritas en la D.O., de las que se ocupan 2.546 viticultores madrileños, repartidas de la siguiente forma:

Tabla 1: Distribución por subzonas DO “Vinos de Madrid”.

| Subzona | Superficie (Has) | Nº Viticultores |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Arganda | 4.190,70 | 1.694 |
| Navalcarnero | 1.694,98 | 488 |
| San Martín de Valdeiglesias | 1.575,93 | 364 |
| Total: | 7.461,61 | 2.546 |

La D.O. “Vinos de Madrid”, aprobada en 1990, está constituida por 46 bodegas repartidas en tres subzonas diferentes (Figura 2): San Martín de Valdeiglesias (10 bodegas), Navalcarnero (8 bodegas) y Arganda del Rey (28 bodegas). Los productores de vino de la región de Madrid basan su producción en el cultivo de las variedades de vid preferentes: Airén, Malvar, Garnacha y Tempranillo (*Vitis vinifera* cv. L.) para la elaboración de nuevos estilos de vino más competitivo en el mercado (Gil et al. 2006). Otras variedades, autorizadas en la D.O. son: Cabernet Sauvignon, Merlot, Moscatel de grano menudo, Parellada, Syrah, Torrontés y Viura o Macabeo.



Figura 2: Mapa de la D.O. “Vinos de Madrid”.

La finca experimental de “El Encín” (Figuras 3 y 4), perteneciente al Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), se encuentra situada en el municipio madrileño de Alcalá de Henares, (40°31’N, 3°17’W, 610m altitud); encuadrado dentro de la subzona de Arganda. Dentro de la finca hay conservadas 2.726 variedades de vid, así como referencias científicas y tecnológicas relacionadas con la producción de vino. El número de variedades que se cultivan en El Encín la convierten en la tercera colección varietal del mundo en importancia. Los bodegueros de la región están realizando intensos trabajos de modernización y de investigación, junto con el IMIDRA, incluyendo tareas destinadas a aumentar el conocimiento acerca de las levaduras nativas presentes tanto en los viñedos, como en las bodegas (Tello et al., 2012).



Figura 3. Vista de la Finca “El Encín”.



Figura 4. Imagen de las vides dentro de la zona cultivada de “El Encín”.

2.1.3 LOS VINOS ECOLÓGICOS:

La Comisión Reguladora CE N° 884/2008, basada en la regulación CE N° 834/2007, ha establecido que los “vinos producidos a partir de uvas de producción ecológica”:

- Se obtienen exclusivamente de uvas certificadas como ecológicas.
- Todos los ingredientes (azúcar, alcohol, mostos) usados en la elaboración del vino, deben tener un origen ecológico.
- El proceso de elaboración de vino, excluye el uso de organismos modificados genéticamente (OMG), así como de aditivos o auxiliares tecnológicos de elaboración producidos por organismos genéticamente modificados.
- El proceso de elaboración de vino debe dar preferencia, cuando sea posible, a los tratamientos biológicos, mecánicos y físicos.
- El proceso de elaboración del vino debe preservar el medio ambiente, en lo posible (recursos energéticos y agua) y evitar las prácticas no sostenibles.
- Los vinos ecológicos, consumidos con moderación, deben ser seguros para la salud de los consumidores.
- En la elaboración de los vinos ecológicos, se usarán aditivos, sólo si es estrictamente necesario y, cuando se utilicen, deberá indicarse en las etiquetas si se trata de productos potencialmente alergénicos.

El Comité Permanente de Agricultura Ecológica (SCOF) ha acordado recientemente unas nuevas normas europeas sobre el «vino ecológico», que se aplicarán a partir de la vendimia de 2012. Los productores de vino ecológico podrán utilizar la expresión «vino ecológico» en sus etiquetas y éstas deberán mostrar también el logotipo ecológico de la UE y el número de código de su organismos de certificación. Aunque ya existían unas normas sobre el «vino elaborado con uvas ecológicas» recogidas en la citada Regulación CE N° 834/2007, estas no cubren las prácticas enológicas, es decir, todo el proceso desde la uva hasta el vino.

El nuevo Reglamento establece un subconjunto de prácticas y sustancias enológicas (vinificación) para los “vinos ecológicos” definidos en el Reglamento (CE) n° 606/2009 sobre la organización común del mercado (OCM) del vino. Entre las prácticas recogidas en la nueva normativa se pueden destacar la prohibición del uso del ácido sórbico y la desulfuración y el

nivel de los sulfitos en el vino ecológico, estableciéndose un mínimo de 30-50 mg por litro más bajo que en sus equivalentes convencionales (dependiendo del contenido en azúcar residual). Además de este conjunto de condiciones, se aplicarán asimismo las normas generales sobre la vinificación definidas en el Reglamento sobre la OCM del vino y su producción a partir de las uvas ecológicas tal como están definidas en el Reglamento (CE) nº 834/2007.

2.2 EL AROMA DEL VINO

Entre los muchos factores que contribuyen a la calidad y tipicidad del vino, el aroma es probablemente la característica organoléptica más importante y una propiedad clave para los consumidores (Perestrelo et al., 2006). Es necesario diferenciar claramente entre el olor de un producto, que es “la sensación puramente olfativa que percibimos al oler el mismo por vía orthonasal”, del aroma, que constituye “el conjunto de sustancias que tiene dicho producto y que son capaces de impactar en nuestro sentido olfativo”, tanto vía orthonasal, como vía retronasal, durante la ingestión y paladeo del producto (Casal del Rey, 2001).

El aroma del vino posee una gran complejidad debida en parte a su origen, ya que es el resultado final de una larga secuencia biológica, bioquímica y tecnológica; y en parte al número elevado de constituyentes, cuyas concentraciones van desde algunos nanogramos por litro hasta incluso algunos miligramos por litro (Flanzy, 2000). El estudio del aroma del vino es muy complejo, no sólo por la existencia de una gran diversidad de vinos con aromas diferentes; sino también porque un mismo vino va a experimentar cambios en su aroma a lo largo de su almacenamiento en botella e incluso cuando está servido en una copa a la espera de ser degustado.

Muchos de los compuestos volátiles del vino poseen aromas determinados, pero sólo un número limitado de ellos se encuentran en concentraciones suficientes como para ser apreciados. Algunos aromas son debidos a un solo compuesto; éste es el caso del característico olor a plátano del acetato de isoamilo; mientras que en otros casos son debidos a la acción sinérgica de un compuesto principal junto con otros que lo potencian, de manera que el umbral de percepción se ve modificado en su conjunto, como por ejemplo el olor a

manzana producido por el 2-metil butirato de etilo como componente principal, siendo el hexenal y el t-2-hexenal compuestos secundarios que lo exaltan o enmascaran en función de su proporción relativa (Atienza et al., 1999).

2.2.1 EL SISTEMA OLFATIVO

Las moléculas que pueden ser detectadas por nuestro sentido del olfato deben tener ciertas propiedades, como por ejemplo ser lo suficientemente pequeñas como para ser volátiles (peso molecular menor de 294 g/mol) o poseer algunas propiedades moleculares, tales como: solubilidad en agua, cierta capacidad para disolverse en grasa, baja polaridad, suficiente presión de vapor y actividad de superficie (Leffingwell, 2002). Dichas moléculas olorosas entran a la cavidad nasal a través del aire inspirado, y gracias a los conductos nasales llegan a una zona en la parte superior interna de la nariz llamada epitelio olfativo (Jackson, 1994). La superficie de dicho epitelio olfativo, que representa unos 2,5 cm² en los humanos, está cubierta por una fina capa mucosa producida por las glándulas de Bowman, que se encuentran en el propio epitelio olfativo. Los lípidos de esta capa ayudan al transporte de moléculas odorantes; ya que sólo las partículas volátiles que sean solubles en este moco podrán interaccionar con los receptores olfativos y producir las señales que nuestro cerebro interpretará como olores (Leffingwell, 2002).

El epitelio olfativo contiene tres tipos de células, las neuronas sensoriales, las células de soporte y las células basales (Buck, 1991). Las neuronas olfativas, que poseen una gran capacidad regenerativa, renovándose aproximadamente cada 40 días, tienen unas prolongaciones en forma de cilios hacia la mucosa olfativa y sus axones se prolongan hacia el bulbo olfativo (Figura 5). Los cilios (entre 8 y 20 por cada neurona olfativa) contienen los receptores olfativos donde se produce la recepción de las moléculas olorosas y comienza el proceso real de transducción química (Leffingwell, 2002). Es en el bulbo olfativo donde la información que llega desde estos receptores, se organiza en patrones que luego el cerebro puede interpretar como diferentes olores. Se ha encontrado que los mamíferos poseen más de mil receptores olfativos distintos y que cada neurona sensorial expresa sólo un tipo de ellos (Malnic et al., 1999). También se ha hallado que, cada receptor es capaz de reconocer múltiples sustancias odoríferas, pero que distintas moléculas odoríficas pueden ser detectadas

por diferentes combinaciones de receptores; por lo que los receptores olfativos son usados de forma combinatoria para codificar identidades de olor, creándose una combinación que puede generar un billón de códigos de olores y por tanto, permitir la discriminación entre un número virtualmente ilimitado de compuestos odoríferos (Malnic et al., 1999; Buck, 2004).

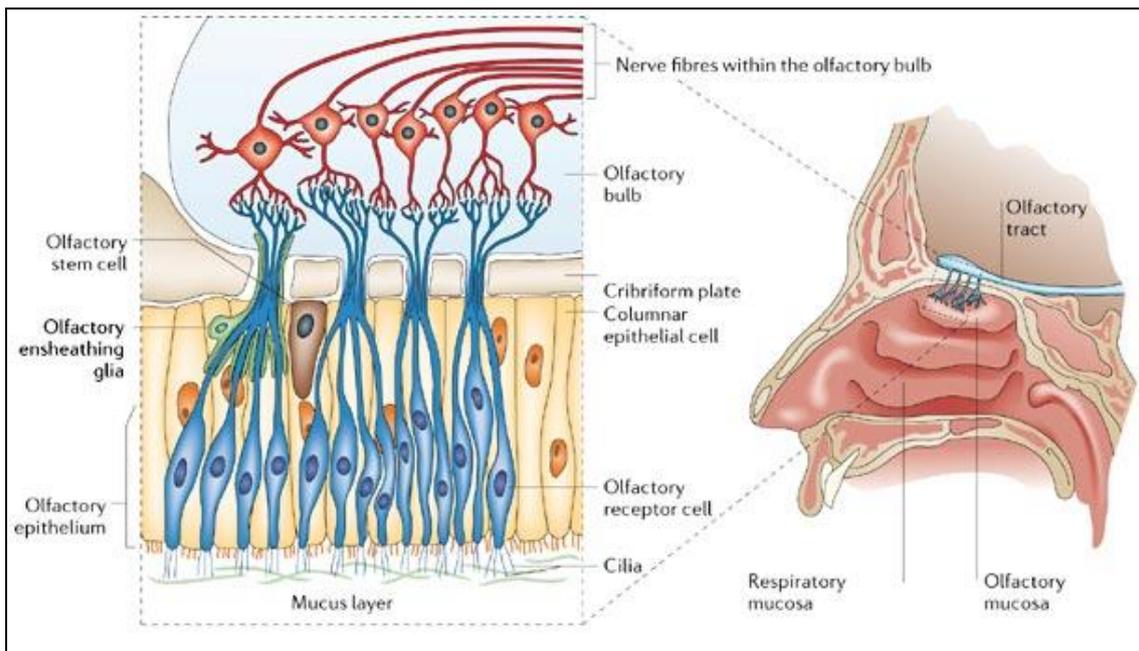


Figura 5. Esquema de la organización general del sistema olfativo. Sección sagital de la cabeza humana (derecha), con una sección del sistema nervioso olfatorio representado con mayor detalle (izquierda) (Thuret et al., 2006).

Existen dos vías diferentes por las que los compuestos volátiles llegan al epitelio olfativo: la vía ortonasal y la vía retronasal (Halpern, 2004) (Figura 6). La vía ortonasal implica que los olores viajan hacia el interior desde el ambiente externo por los orificios nasales anteriores a través de la cavidad nasal, cruzando la mucosa del trigémino, hasta llegar a la mucosa olfativa. La vía retronasal implica que los odorantes que normalmente se originan en la cavidad oral, asciendan a través de los orificios nasales posteriores de la nasofaringe hacia la mucosa olfativa, atravesando el epitelio del trigémino y procediendo a salir a través de las fosas nasales (Duffy et al, 1999); encontrándose diferencias apreciables entre las percepciones ortonasales y retronasales y su procesamiento (Sun et al., 2005; Aubry et al., 2007).

A grandes rasgos, podríamos distinguir entre dos tipos de información: una que va a las zonas superiores de procesamiento olfativo y otra que va a las estructuras límbicas. La primera tiene relación con los procesos relacionados con el reconocimiento consciente de olores y su asociación con la discriminación olfativa, la percepción, el reconocimiento y la memoria. La segunda está asociada con respuestas subconscientes a olores, como las relacionados con las emociones y el comportamiento, incluyendo la regulación de las secreciones hormonales (Macías, 2007).

Se han descubierto hasta el momento 331 genes funcionales de receptores de olores en humanos, además de numerosos *pseudogenes*; que son genes que han perdido su función en el curso de la evolución. También se sabe que existen unos 10 millones de neuronas sensoriales individuales, que expresan, cada una de ellas, tan sólo uno de los receptores. Esta afinidad dependerá de determinadas particularidades químicas del odorante, por lo que puede suceder que una molécula compleja interaccione con dos tipos de receptores olfativos mediante distintas partes de ella misma, con características químicas o estructurales diferentes. Debido a que, tal como se ha mencionado con anterioridad, el funcionamiento del sistema olfativo es combinatorio, se tiene una capacidad prácticamente ilimitada de codificación de odorantes diferentes (Cacho, 2006a).

Al igual que sucede con otros sentidos, la intensidad percibida del olor no está relacionada de forma lineal sino de forma sigmoidea con su concentración; existiendo un umbral por debajo del cual no se detecta el olor, y otro por encima del cual la percepción tampoco aumenta. El comportamiento típico de los olores obedece a dos pautas: olores para los que la intensidad percibida aumenta rápidamente para cambios pequeños en la concentración (lo que implica un rango dinámico de discriminación pequeño), y otros para los que la intensidad percibida aumenta lentamente (con lo que el rango dinámico de discriminación es más amplio) (Macías, 2007). Además, se han designado dos tipos de umbrales olfativos que dependen bastante de las condiciones del sujeto y de las condiciones en las que se haga cualquier medida:

- Umbral de detección: concentración mínima en la que el sujeto es capaz de detectar la presencia de un olor.

- Umbral de identificación: concentración mínima en la que el sujeto es capaz de identificar el olor del que se trata (adaptación de la norma UNE 87-003-95).

El umbral olfativo se mide como valor de actividad aromática (OAV). Este valor se define como el cociente entre la concentración de compuesto y el umbral de percepción de dicho compuesto (Falqué et al., 2001; Peinado et al., 2004); es decir, el OAV de un compuesto “x” en el vino se calcula de acuerdo a la ecuación: $OAV = C_x/A_x$, donde C_x representa la concentración del compuesto “x” en el vino y A_x , la concentración umbral olfatoria del compuesto “x” en el vino. De este modo, se puede distinguir entre aromas activos e inactivos. Los compuestos aromáticos activos son, por tanto, aquellos cuyo OAV es superior a 1.

2.2.2 COMPUESTOS AROMÁTICOS DEL VINO

Los constituyentes del aroma del vino pueden ser clasificados según su origen a lo largo de la cadena biotecnológica de elaboración en:

- Constituyentes varietales provenientes de la uva: estos constituyentes dependerán en gran parte de la variedad de la uva, pero también de factores de tipo climático, fitosanitarios, conducción de la viña, etc. Estos constituyentes son principalmente ácidos grasos, glicósidos, carotenoides y compuestos fenólicos. Sustancias volátiles típicas de cepas concretas son las piracinas (isobutil-metoxipiracina, 2-metoxi-3-isobutilpiracina y 2-metoxi-3-isopropilpiracina) características de la variedad Cabernet Sauvignon, a la que aportan las notas características de pimienta; o los terpenoles que van a caracterizar el aroma de las variedades Moscateles.
- Constituyentes prefermentativos: estos compuestos se forman en el intervalo de tiempo que hay entre la cosecha y el principio de la fermentación alcohólica. Son esencialmente compuestos de seis átomos de carbono y son debidos a la acción de las enzimas de la uva sobre ciertos lípidos.

- Constituyentes fermentativos: estos componentes se forman gracias a la actividad de las levaduras durante la fermentación alcohólica y por las bacterias lácticas, en el caso de los vinos en los que se produce la fermentación maloláctica. Estos compuestos son, de hecho, los productos secundarios del metabolismo de las levaduras y son considerados como los responsables de la “nota vinosa” común a todos los vinos (Flanzy, 2000). La fracción esencial del aroma se forma durante la etapa de fermentación alcohólica y la constituyen principalmente: alcoholes, como por ejemplo el 3-metilbutanol o el 2-feniletanol, ácidos y sus ésteres, como los ácidos hexanoico y octanoico y el hexanoato y octanoato de etilo, compuestos carbonilados, compuestos azufrados, compuestos nitrogenados, lactonas y fenoles volátiles (Martínez et al., 1999). En los vinos en los que se produce fermentación maloláctica se produce una modificación del aroma más sutil, perdiéndose notas vegetales y produciéndose más notas lácticas. En general se produce una disminución de la acidez y se suaviza el vino; aparecen más compuestos carbonilados como el diacetilo y la acetoina que aportan el carácter cremoso o láctico y se forman menos aldehídos y alcoholes; reduciéndose así el carácter vegetal y varietal del vino.

- Constituyentes post-fermentativos: esta fracción está englobada por todos los compuestos volátiles formados durante la conservación del vino. Son sustancias volátiles por sí mismas o procedentes de precursores varietales que se transforman en compuestos volátiles y que a su vez pueden evolucionar (Flanzy, 2000). Forman los también llamados “aromas terciarios” que aparecen durante el envejecimiento del vino, tanto durante su permanencia en bodega como en botella. En general, desaparece parte del aroma afrutado y se produce una evolución a un aroma más complejo. En la bodega, el cambio del aroma es debido principalmente a la extracción de ciertos compuestos de la madera, produciéndose un aumento de notas como: “especias”, “madera” y “vainilla” y una disminución del aroma “vegetal”. Ejemplos de componentes procedentes de la bodega son las whisky lactonas, vainillina y algunos fenoles volátiles. En el caso de la permanencia en botellas, tienen lugar procesos de reducción que proporcionan al vino una cierta armonía, calidad y el denominado “bouquet”. Ejemplos de compuestos característicos de esta fase son los norisoprenoides, como el TDN y la β -damascenona y algunos compuestos azufrados,

como el disulfuro de dimetilo. A su vez se produce una disminución de ésteres y de monoterpenoles, que deriva en una bajada del carácter frutal y varietal.

Hasta el momento se han identificado más de 800 compuestos volátiles que pueden intervenir en el aroma (Rapp, 1998; Perestrelo et al., 2006; Gómez-Míguez et al., 2007). Al analizar de forma cuantitativa los diferentes constituyentes del aroma, se ha descubierto que, de todos ellos, apenas unos 50 pueden estar presentes en concentraciones superiores a su valor umbral de olfacción. Además no se ha encontrado todavía ningún vino en el que estén presentes a la vez los 50 componentes activos. Por ejemplo en un vino joven y aromático se encuentran alrededor de 24 componentes activos; mientras que, incluso en vinos más ricos y complejos, es difícil hallar más de 35. Dentro de estos 50 aromas sólo alrededor de 13 componentes se encuentran prácticamente en todos los vinos por encima de su umbral de olfacción, constituyendo el denominado “aroma del vino”. Alrededor de otros 16 compuestos pueden encontrarse en la mayoría de los vinos, pero no siempre por encima de su umbral de olfacción y serán los que aporten al vino aquellas notas sutiles que marcarán las diferencias entre un vino y otro. Existen además alrededor de otros 20 compuestos que sólo se encuentran activos en vinos de características especiales y que van a ser los responsables de notas aromáticas muy particulares, como el aroma del vino fino de Jerez y el aroma a moscatel (Casal del Rey, 2001).

Además, se ha observado que, de estos componentes activos, 5 de ellos se encuentran normalmente en concentraciones, que pueden superar las 20 unidades de aroma, es decir, concentraciones 20 veces por encima de sus correspondientes valores umbral; aunque los valores pueden diferir considerablemente de unos vinos a otros. Estos compuestos son, por orden de importancia, el octanoato de etilo, la β -damascenona, el hexanoato de etilo, el acetato de isoamilo y el ácido isovaleriánico. Otros ocho compuestos presentan valores de aroma de alrededor de cinco unidades, son los alcoholes de fusel (isoamílico y feniletílico), los ésteres etílicos de los ácidos isobutírico e isovaleriánico, los ácidos butírico, hexanoico y octanoico y el diacetilo (Cacho, 2006b). La Tabla 2 presenta las principales familias de compuestos aromáticos del vino.

Tabla 2. Tabla con compuestos aromáticos característicos del vino. (Datos adaptados de Cacho, 2006c; Jackson, 1994 y Ferreira et al., 2002).

| Familia de compuestos: | Compuestos característicos: |
|----------------------------|---|
| Aldehídos y cetonas | Acetaldehído, acetoína, diacetilo, furfural, fenilacetaldehído, 5-metilfurfural, 5-hidroximetilfurfural, vainillina, acetovainillona, siringaldehído, β -damascenona, α -ionona, β -ionona. |
| Ácidos | Acético, butírico, isovaleriánico, hexanoico, octanoico, decanoico, 2-metilbutírico, fenilacético. |
| Ésteres | Isobutirato de etilo, isovalerato de etilo, acetato de butilo, acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de isoamilo, acetato de feniletilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, lactato de etilo, succinato de dietilo, furoato de etilo, dihidrocinamato de etilo, cinamato de etilo, vanillato de etilo, vanillato de metilo, 2-metilbutirato de etilo. |
| Terpenoles | Linalol, β -citronelol, α -terpineol. |
| Lactonas | δ -octalactona, γ -octalactona, γ -nonalactona, δ -decalactona, γ -decalactona, γ -undecalactona, γ -dodecalactona, c-whiskylactona, t-whiskylactona, γ -butirolactona, sotolón, maltol, furaneol, homofuraneol. |
| Fenoles | Eugenol, guaiacol, isoeugenol, 4-etilfenol, 4-vinilfenol, 4-etilguaiacol, 4-vinilguaiacol, 4-propilguaiacol, 2,6-dimetoxifenol, 4-alil-2,6-dimetoxifenol, m-cresol, o-cresol. |
| Alcoholes | 1-hexanol, 2-etil-1-hexanol, cis-3-hexenol, 1-octen-3-ol, 1-propanol, furfuril alcohol, metionol, isobutanol, alcohol isoamílico, β -feniletanol, alcohol bencílico. |

2.2.3 DETERIORO AROMÁTICO DEL VINO:

Para obtener una buena calidad del vino no sólo es necesaria la presencia de aromas agradables, sino también la ausencia de defectos. Dichos defectos podrían clasificarse en tres tipos, según el momento en el que se originen durante el proceso de elaboración:

- Defectos de la uva, que producen gustos yodados, fenólicos y de alcanfor (debido al ataque de parásitos), aromas de carácter vegetal-verde de tipo herbáceo-fruto verde-vegetal

(debido a la rotura de los tejidos vegetales) o de tipo herbáceo - pimiento verde - patata (debido a la presencia de metoxipiracinas características de variedades como Merlot y Cabernet Sauvignon) o aromas particulares de la viña americana, que aunque no se tratan propiamente de defectos, se han considerado tradicionalmente indeseables en Europa. Además pueden producirse contaminaciones accidentales que pueden generar, entre otros, olores a alquitrán e hidrocarburos.

- Defectos de la fermentación, que pueden provocar aromas azufrados de tipo huevos podridos o coles (debidos a la utilización del azufre elemental durante el metabolismo de las levaduras formándose compuestos azufrados) u olores a “ratón” (debidos a la presencia de tetrahidropiridina).

- Defectos de la conservación, que pueden inducir a la aparición de aromas a geranio, gustos a tapón, almendra amarga, mineral, plástico o a animal o aromas azufrados de tipo col-estiercol, debidos a la degradación de pesticidas azufrados (Flanzy, 2000).

2.3 PROCESOS DE ENVEJECIMIENTO Y OXIDACIÓN EN EL VINO

2.3.1 FENÓMENOS DE ENVEJECIMIENTO

Durante el proceso de envejecimiento, el vino se va a ver sometido principalmente a tres efectos debido a la bodega:

1. Una oxidación prolongada durante todo el añejamiento. Durante este proceso, el oxígeno difunde desde el exterior a través de los poros de la madera hacia el vino. Este fenómeno dependerá principalmente de la clase de roble utilizado en la bodega y del tipo de corte de la madera.
2. La evaporación de etanol y agua del vino hacia el exterior. La proporción etanol/agua evaporada dependerá de la temperatura y humedad relativa del exterior. Una mayor temperatura ambiental favorece la evaporación de agua, mientras que una humedad

relativa alta favorece la del etanol. Esta difusión hacia el exterior también dependerá, del tipo de roble y además del modo de aserrado de las piezas de roble.

3. La cesión al vino de sustancias contenidas en la madera de roble. El vino adquiere muchas sustancias provenientes del roble de la bodega que lo contiene durante su envejecimiento; confiriéndole atributos tales como, vainilla, coco, roble, madera, tostado, medicinal, ahumado y especiado, característicos de los vinos madurados en bodegas. El tipo de sustancias que se extraigan dependerá del tipo de secado y quemado al que se haya sometido a la madera; mientras que la cantidad de sustancias extraídas dependerá del pH y la graduación alcohólica del vino contenido en la bodega.

La acción de estos tres fenómenos durante el envejecimiento en bodega, causará una serie de transformaciones en el vino, que influirán muy significativamente en su bouquet final (Pomar García, 1997).

2.3.2 FENÓMENOS DE OXIDACIÓN

La oxidación se debe principalmente a dos procesos distintos, enzimáticos y químicos, en los que interviene un mismo sustrato: el oxígeno molecular. Estos dos fenómenos intervienen en etapas concretas de la elaboración del vino; siendo el proceso enzimático el predominante en los mostos, mientras que la oxidación química tiene un papel muy importante durante la crianza y el envejecimiento de los vinos (Flanzy, 2000).

Oxidación en mostos: Durante la vinificación, las oxidaciones son más graves en el mosto que en el vino, ya que éste es más sensible y más difícil de proteger. Se produce sobretodo por procesos enzimáticos y afecta más a los mostos provenientes de uvas blancas que de tintas; debido a la presencia en estas últimas de mayor contenido en compuestos fenólicos, que aportan alta capacidad antioxidante. Fundamentalmente los procesos de oxidación en mostos se manifiestan por: oscurecimiento de color, pérdida de aromas varietales y formación de sustancias indeseables desde el punto de vista aromático y gustativo, que aportan matices a olores terrosos y mohosos, así como sabores astringentes y amargos. Uno de los principales factores en la oxidación es la presencia de las enzimas de

oxidación de tipo polifenoloxidasas que actúan sobre las sustancias fenólicas y se encuentran en todas las uvas en proporciones diferentes, según variedades, condiciones, índice de madurez, y sobre todo estado sanitario. Originan modificaciones intensas de color, llegando incluso a producir la quiebra oxidásica y la formación de sustancias acres y amargas, produciéndose un deterioro global del aroma.

Oxidación en vinos: Existe un claro predominio de procesos químicos en la oxidación del vino. La degradación oxidativa del aroma en el vino es dependiente de diferentes factores que incluyen la concentración del oxígeno disuelto, pH, temperatura de almacenamiento y concentración y tipo de compuestos fenólicos, así como la presencia de antioxidantes exógenos, tales como el ácido ascórbico y el SO₂ (Silva Ferreira et al., 2002). De este modo, se puede decir que, la mayor parte de los mecanismos predominantes de oxidación son de tipo no-enzimático. Estos procesos de oxidación implican sobretodo a orto-fenoles, que en presencia de oxígeno son reducidos a orto-quinonas, quedando el oxígeno reducido a peróxido de hidrógeno (Singleton, 1987). Subsecuentemente, se producirán las oxidaciones de otros sustratos, como el etanol, debido a su gran abundancia en el vino, y a otros sustratos oxidables, como por ejemplo el dióxido de sulfuro y los aminoácidos (Jackson, 1994).

En la actualidad, se han realizado muchos avances en el conocimiento de las reacciones de oxidación en el vino; especialmente en los estudios de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la participación de las sustancias polifenólicas contenidas de forma natural en los vinos (Killmartin et al., 2001; Danilewicz, 2003; Waterhouse y Laurie, 2006; Li et al., 2008). Estas reacciones fenólicas, tanto enzimáticas como no enzimáticas, dan como resultado la generación de las mencionadas quinonas. Sin embargo, en la oxidación no enzimática, el oxígeno no reacciona directamente con los compuestos fenólicos. La limitación de la reactividad del oxígeno en estado triplete es superada por la adición de un electrón, que puede ser proporcionado por la reducción de los iones de metales de transición, esencialmente hierro (II) y cobre (I). Dicha transferencia de electrones conduce a la formación de radicales hidropéroxido (HOO[•]), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (HO[•]). Este último radical puede oxidar prácticamente cualquier molécula orgánica que se encuentra en el vino (Oliveira et al., 2011).

Durante la oxidación química del vino, los procesos oxidativos se ven favorecidos por la oxidación de los polifenoles que contienen un resto orto-dihidroxibenceno (un anillo catecol) o un radical 1,2,3-trihidroxibenceno (un resto galóilo), tales como la (+)-catequina / (-)-epicatequina, galocatequina, ácido gálico y sus ésteres y ácido cafeico, que son los constituyentes más fácilmente oxidables del vino (Singleton, 1987; Kilmartin et al., 2001; Danilewicz, 2003; Li et al, 2008). Estos sustratos se oxidan de forma secuencial a los radicales semiquinona y benzoquinonas, mientras que el oxígeno se reduce a peróxido de hidrógeno, estando todo el proceso mediado por los pares redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ y $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$ (Figura 6) (Danilewicz et al., 2008). Las quinonas formadas como productos primarios a partir de la oxidación de los polifenoles, son inestables y pueden sufrir reacciones posteriores, formando dímeros o polímeros; que a su vez pueden reorganizar su estructura y formar nuevos restos dihidroxibenceno (Li et al., 2008).

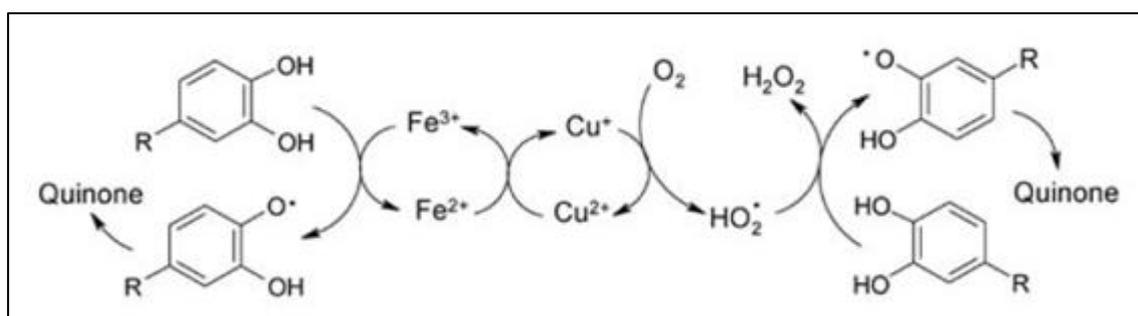


Figura 6: Mecanismo propuesto de la acción catalítica de los iones de hierro y cobre en la oxidación de los catecoles para producir quinonas y peróxido de hidrógeno (Danilewicz et al., 2008).

Los fenómenos de oxidación producidos en el vino conllevan a cambios organolépticos en el producto final. A parte del pardeamiento característico de los vinos blancos también se produce la aparición de aromas con descripciones características como por ejemplo: “verdura cocida”, “sidra”, “cartón”, “madera”, “licor”, “punzante”, “miel”, “heno” y “pienso” (Escudero et al. 2000, Escudero et al., 2002, Silva Ferreira et al., 2002 y Silva Ferreira et al., 2003). Siendo para algunos autores el descriptor más relacionado con la oxidación el olor a “pienso” (Silva Ferreira, 2002) y para otros, el principal contribuyente al aroma de oxidación el término “verdura cocida” (Escudero et al., 2002). En bajas concentraciones dichos aromas pueden añadir cierta complejidad al vino, pero a medida que

éstos aumentan, comienza a disminuir la calidad del vino (Oliveira et al., 2011). Gran parte de estos aromas se han relacionado con la aparición o el aumento de ciertos compuestos, tales como el metional, fenilacetaldehído, sotolón, t-2-nonenal, benzaldehído, t-2-octenal, hexanal, 1-octen-3-ol, furfural y 5-metilfurfural (Ferreira et al, 1998, Escudero et al., 2000; Silva Ferreira et al, 2002 y Silva Ferreira et al., 2003). Su formación se puede deber a diferentes mecanismos; entre ellos cabe destacar las reacciones de Maillard, que por una parte se pueden dividir en las reacciones de Amadori, cuyos productos se forman por ciclación/condensación de las deoxiosonas, generando compuestos tales como el furfural, 5-metilfurfural y 5-hidroxi-metilfurfural (con aromas caramelosos); y por otra, envuelven la condensación de los azúcares reductores con los aminoácidos mediante la llamada “degradación de Strecker” (Oliveira e Silva, 2008). Los aminoácidos en presencia de compuestos α -dicarbonilos son descarboxilados y desaminados formando aldehídos con un átomo de carbono menos que su aminoácido correspondiente (Marchand et al., 2002; Pripis-Nicolau et al., 2000). Son compuestos tales como, el metional (con aroma a patata/verdura cocida) y el fenilacetaldehído (con olor característico a miel) y se les conoce como “aldehídos de Strecker. Estos compuestos a su vez, se pueden formar mediante la oxidación directa de sus respectivos alcoholes; pero su mecanismo principal de formación no se ha establecido claramente hasta el momento (Oliveira et al., 2011). A su vez, aldehídos como el 1-octen-3-ol, (*E*)-2-octenal, (*E*)-2-nonenal y el hexanal, deben su formación a la acción directa del oxígeno; siendo productos resultantes de la degradación de sus respectivos ácidos grasos insaturados (Escudero et al., 2002; Ferreira et al., 1998).

2.3.3 USO DE ANTIOXIDANTES EN EL VINO

Actualmente, se utilizan compuestos tales como el dióxido de azufre (SO₂) y ácido ascórbico para prevenir los procesos de oxidación durante todo el proceso de elaboración de los vinos. A lo largo del almacenamiento son de especial utilidad, debido a que dichos compuestos son capaces de reducir las quinonas formadas durante la oxidación de los polifenoles (Oliveira et al., 2011).

La mayor parte del SO₂ que se encuentra en el vino es aquel que se ha añadido durante su vinificación; aunque una cierta cantidad se puede formar a partir de los sulfatos del mosto

gracias al metabolismo fermentativo de las levaduras. La cantidad de sulfuroso producido por las levaduras va a depender de las características genéticas de la cepa y las condiciones del medio. Se producen entre 10-30 mg/L de media, aunque existen cepas super productoras (>100 mg/L) (Usseglio-Tomasset, 1998; Aleixandre y Álvarez, 2003). El SO₂ protege a los mostos y a los vinos gracias a sus propiedades antisépticas, ya que a dosis adecuadas inhibe y preserva de las alteraciones; antioxidantes, debido a sus propiedades reductoras; antioxidásicas, inhibiendo las enzimas oxidasas causantes de la oxidación típica enzimática de los mostos e incluso, se le ha atribuido en dosis pequeñas la propiedad de ser un estimulante de la fermentación (Aleixandre y Álvarez, 2003). Además, el SO₂ es el único compuesto conocido capaz de prevenir el pardeamiento del vino con eficacia durante los procesos de oxidación (Li et al., 2008). Un papel esencial del SO₂ en la oxidación química consiste en unirse, de forma reversible, al acetaldehído y a otros aldehídos y cetonas (Boulton, 2003), formando aductos de bisulfito no volátiles, evitando de esta forma, efectos sensoriales no deseado de muchos de estos compuestos (Danilewicz, 2007). Además, el SO₂ es de gran importancia porque reduce y recicla la quinona de vuelta a su forma fenólica, eliminando un electrófilo reactivo (Waterhouse & Laurie, 2006; Danilewicz et al., 2008). Uno de los efectos más importantes de SO₂ en el vino no va a consistir en su reacción directa con el oxígeno; sino con su forma reducida, el peróxido de hidrógeno. De esta forma, el SO₂ ayuda a inhibir la formación de aldehídos gracias a esta “competición” por el peróxido de hidrógeno (Elias et al., 2010).

Hasta el momento el SO₂ es el antioxidante más eficaz y de empleo más generalizado en las bodegas de todo el mundo. Sin embargo, la adición de SO₂ en los vinos plantea ciertas objeciones sobretodo relacionadas con la salud, debido a que destruye parte de la vitamina B1 y a que puede generar reacciones alérgicas en personas sensibles a los sulfitos, afectando a la circulación sanguínea, las vías respiratorias y generando dolor de cabeza (Delteil, 2003; Li et al., 2008). Debido a esto, existe una tendencia general hacia la reducción en el uso del SO₂ para poder cumplir con las necesidades de los consumidores y los requerimientos regulatorios que se están estableciendo durante los últimos años, tanto por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), como de la Organización Internacional de la viña y el vino (OIV) (Warner et al., 2000; Frivik & Ebeler, 2003; Zhou et al., 2004). La OMS ha determinado que la dosis diaria admisible de SO₂ es 0,7 mg/kg/día y por tanto, la Unión

Europea ha establecido unos niveles máximos legales de SO₂ total en el vino, dependiendo no sólo del tipo de vino, sino también del contenido en azúcares reductores (Tabla 3).

Tabla 3. Valores máximos establecidos por la UE de SO₂ total.

| Contenido en azúcares reductores | Concentración máxima de SO ₂ | | |
|----------------------------------|---|--------------|-------------------------|
| | Vinos blancos y rosados | Vinos tintos | Vinos dulces |
| < 4 g/L | 200 mg/L | 150 mg/L | - |
| > 4 g/L | 300 mg/L | 300 mg/L | 400 mg/L ^(*) |

(*): Valor excepcional máximo para vinos dulces blancos elaborados con uvas botrificadas.

Fuente: *Recueil of International Methods of Analysis for Wines and Musts*.

En: International Code of Oenological Practices (OIV Code Sheet) – Issue 2012/01.

Además, la preocupación sobre el uso de SO₂ no reside sólo en sus consecuencias sobre la salud; sino también en su implicación en la calidad final del vino. Un uso excesivo puede comprometer drásticamente la calidad del vino, ya que la utilización de cantidades excesivas de SO₂ puede generar aromas y sabores desagradables e incluso dotar al vino de una apariencia nublada durante su almacenamiento (Li et al., 2005). Por lo tanto, se está produciendo una tendencia a la reducción en su uso e incluso la necesidad de encontrar un producto sustituto; pero hasta la fecha, no se ha encontrado un compuesto que pueda reemplazarlo completamente.

Otro compuesto con conocidas propiedades antioxidantes es el **ácido ascórbico** que, por una parte puede eliminar eficazmente el oxígeno molecular y por otra, debido a su carácter reductor puede, de una manera similar al SO₂, también reducir de vuelta las quinonas a fenoles (Bradshaw et al., 2001; Oliveira et al., 2011). Pero dependiendo de su concentración y de las condiciones del medio puede tener el efecto contrario, como pro-oxidante (Bradshaw et al., 2003). En condiciones de concentración alta de oxígeno, el ácido ascórbico se oxida rápidamente, produciendo radicales peróxido (Bradshaw et al., 2001). En la actualidad, las

concentraciones en las que se añade este compuesto, principalmente a los vinos blancos, se sitúan entre 50 y 150 mg/L (Barril et al., 2009).

En estudios recientes, se están barajando nuevas alternativas al empleo de SO₂ y ácido ascórbico para proteger la composición aromática de los vinos durante el tiempo de almacenamiento. Estas opciones incluyen la adición de **ácido cafeico, ácido gálico y glutatión** (Lambropoulou y Roussis, 2007; Roussis y Sergianitis, 2008; Makhotkina y Kilmartin, 2009).

2.4 ESTUDIOS DEL VINO

El aroma del vino es una percepción sensorial que varía de un individuo a otro, dependiendo del contexto de la experiencia de cada consumidor y la composición química del producto. La respuesta final va a ser el resultado de unas complejas interacciones quimicosensoriales que son difíciles de predecir debido a la influencia de muchas variables (Fleet, 2003). Para poder estudiar e intentar entender mejor las características organolépticas de los vinos, se pueden realizar dos tipos de análisis fundamentales; el análisis químico de sus compuestos y el análisis sensorial.

2.4.1 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

La química analítica está jugando un papel cada vez más importante en la industria del vino. El análisis químico del mosto y del vino es esencial para la comprensión de los aspectos fundamentales del cultivo de la vid y de la producción del vino para mejorar los procesos de elaboración; así como para garantizar la seguridad de los productos y su conformidad con la reglamentación que rige el mercado internacional. Dentro de este campo, se está desarrollando especialmente el área del análisis instrumental, en el cual se ha producido un gran avance en los métodos espectroscópicos y cromatográficos (deVilliers et al., 2011).

Para la realización de los estudios de cuantificación de compuestos aromáticos de los vinos se han tenido que proceder a distintos tipos de análisis con una metodología,

preparación de muestra, instrumentación y procesado de datos diferente. Esto es debido al gran número de sustancias a estudiar, su amplio intervalo de concentración, así como su disparidad de polaridades. Esto supone que se tenga que disponer de una metodología para el análisis de los compuestos volátiles mayoritarios, otra para los minoritarios y otra distinta para cada molécula o familia de moléculas que, por su importancia sensorial, baja concentración, o particularidad química, exija tratamientos específicos (Cacho, 2004).

Los **compuestos volátiles mayoritarios** ($C > 0,1$ mg/L), tales como alcoholes de fusel, ácidos grasos y sus ésteres de etilo, pueden determinarse por inyección directa en un cromatógrafo de gases con detección de ionización de llama (GC-FID). Se pueden emplear diferentes técnicas de preconcentración: simple extracción con un disolvente (extracción líquido-líquido o LLE), microextracción con un disolvente, extracción por sorción en barra agitadora (SBSE), extracción dinámica en el espacio de cabeza o microextracción en fase sólida (SPME) (Ferreira y Cacho, 2009). Los **compuestos volátiles minoritarios** ($1 > C > 0,2$ mg/L) pueden determinarse mediante análisis directo en un cromatógrafo de gases con detección de espectrometría de masas (GC-MS) y utilizando el mismo tipo de técnicas de preparación de muestras citadas anteriormente. Las dificultades se encuentran cuando los analitos de interés no se pueden determinar utilizando un único paso de preconcentración no selectiva. Esto ocurre cuando los analitos son difíciles de extraer, debido a su naturaleza muy polar y/o baja volatilidad o cuando están presentes en niveles muy bajos. El nivel de concentración en el que el análisis de un compuesto aromático se vuelve complicado está relacionado con su polaridad y con la calidad de su espectro de masas (Ferreira y Cacho, 2009). Para estos compuestos difíciles de analizar y que en algunos casos tienen un importante impacto aromático en el vino, se han tenido que desarrollar estrategias específicas:

- **Compuestos carbonilos:** Para el análisis de este tipo de compuestos, tales como el metional, fenilacetaldehído, 2-metilbutanal o (*E*)-2-nonenal, va a ser necesario en la mayoría de los casos la formación de derivados con pentafluorobencil hidroxilamina (Culleré et al., 2004; Mateo-Vivaracho et al., 2006) o con 3-methylbenzothiazolidin-2-ona hidrazona (Ledauphin et al., 2006) para su análisis cromatográfico.

- **Compuestos volátiles de azufre:** La detección de este tipo de compuestos se realiza mediante cromatografía de gases con un detector acoplado altamente sensible y específico. Los dos tipos de detección más utilizados son el detector fotométrico de llama (FPD) y el detector de quimioluminiscencia de azufre (SCD). Las técnicas más habituales para su extracción son la LLE y las extracciones en el espacio de cabeza; siendo la de más reciente aplicación la SPME (Mestres et al. 2000; López et al. 2007). Mediante este último procedimiento es posible determinar satisfactoriamente compuestos tales como, sulfuro de hidrógeno, metanotiol, etanotiol, sulfuro de dimetilo, sulfuro de dietilo y disulfuro de dimetilo (Mestres et al. 2002).

- **Mercaptanos:** Los mercaptanos presentes en el vino se encuentran en concentraciones extremadamente bajas; lo cual hace muy difícil su determinación. Los métodos desarrollados para su análisis hacen uso de una separación selectiva utilizando *p*-hidroxi-mercuribenzoato (Tominaga y Dubourdiou, 2006; Ferreira et al., 2007), con cromatografía covalente (Schneider et al., 2003) o mediante la derivación con bromuro de pentaflurobencil (Mateo-Vivaracho et al., 2006, 2007). Recientemente se ha logrado optimizar algunos de estos métodos, obteniéndose determinaciones fiables en concentraciones de ng/L de mercaptanos traza polifuncionales de impacto aromático de los vinos, tales como el 2-metil-3-furantiol, 2-furfuriltiol, 4-mercapto-4-metil-2-pentanona, acetato de 3-mercaptohexilo o 3-mercaptohexanol (Mateo-Vivaracho et al., 2009).

- **Compuestos polares traza:** Este tipo de compuestos, como el sotolón y el furaneol, se pueden determinar directamente por GC-MS cuando se encuentran en concentraciones relativamente altas (Camara et al., 2004; Moreno et al., 2005); sin embargo cuando se encuentran en concentraciones bajas, se ha propuesto la utilización de extracción en fase sólida (SPE) como método de concentración previo al análisis (Ferreira et al., 2003)

- **Metoxipiracinas:** Los métodos propuestos para la determinación de metoxipiracinas, tales como 3-isobutil-2-metoxipiracina, 3-sec-butil-2-metoxipiracina y 3-isopropil-2-metoxipiracina, se realizan mediante extracción simple (Falcao et al., 2007) o por un procedimiento con SPME optimizado (Chapman et al., 2004; Prouteau et al., 2004), usando

en la mayoría de los casos estándares internos marcados con isótopos para compensar los efectos-matriz (Ferreira y Cacho, 2009).

2.4.2 ANÁLISIS SENSORIAL

Según la definición de la norma UNE 87-001-94 referente al vocabulario de cata, el análisis sensorial es “el examen de las propiedades organolépticas de un producto realizable con los sentidos”. El análisis sensorial da una información que no podría ser obtenida con otro tipo de análisis, aunque pueda ser correlacionada con ellos. Por ejemplo, dos vinos pueden tener la misma composición química y dar lugar a sabores diferentes debido a las interacciones tan complejas y en gran parte desconocidas que pueden darse entre sus muchos componentes. Debido a esto, necesitamos disponer de un método que sirva para medir lo más objetivamente posible los factores sensoriales; siendo el análisis sensorial la mejor herramienta para percibir, identificar y expresar las cualidades y defectos organolépticos del vino (Casal de Rey, 2001). Pero en este proceso tiene mucho que ver el aspecto afectivo del catador hacia las sensaciones, emociones y recuerdos que pueden despertar en él determinados olores. Para limitar al máximo posible esta subjetividad, degustar un vino con el máximo rigor y estandarizar la descripción de los vinos; estamentos como la CEE, OIV e ISO, han establecido una serie de normas y criterios relativos a la metodología del análisis, tipo de copas a utilizar, salas de catas, entrenamientos de los catadores, descriptores, etc (Aleixandre, 2006).

En el análisis sensorial de un vino es muy común el uso de la Rueda de los Aromas de Ann C. Noble (Figura 7). A.C. Noble y colaboradores propusieron en 1987 una terminología estandarizada para describir el aroma del vino. Esta clasificación constituye es un instrumento muy útil al incluir los términos más frecuentemente utilizados para describir el aroma de los vinos. De las doce categorías primarias (situadas en el centro de la rueda): afrutados, florales, especiados, microbiológicos, oxidados, punzantes, químicos, terrosos, madereros, caramelizados, frutos secos y herbáceos o vegetales; se pasa a más de 85 descriptores finales de aromas que constituyen las categorías terciarias (situadas en el exterior de la rueda). Es interesante resaltar, que dichos términos de cata, corresponden a percepciones integradas por nuestro cerebro, y no tienen por qué responder al olor de un compuesto determinado. Todos

estos términos componen, ya sea en el lado positivo, o en el negativo, las distintas percepciones detrás de las cuales hay un grupo de compuestos.



Figura 7. Rueda de los Aromas de Ann C. Noble.

Los pasos para la realización de un análisis sensorial son los siguientes: determinación de los objetivos, selección de un panel de cata, entrenamiento del panel y consenso de un vocabulario común y selección de la metodología y pruebas normalizadas de análisis sensorial. Existen diferentes tipos de pruebas; siendo las más comunes las pruebas afectivas/hedónicas, las pruebas de clasificación con escalas que pueden ser de tipo: categórica, cuantitativa - estructurada o no estructurada, las pruebas discriminativas y las pruebas descriptivas.

2.4.3 CARACTERIZACIÓN AROMÁTICA DEL VINO. DETECCIÓN OLFATOMÉTRICA.

La Cromatografía de gases acoplada a Olfatometría (GC-O) o “sniffing” es la técnica analítica capaz de correlacionar el análisis sensorial con el instrumental. Los compuestos aromáticos, una vez separados y eludidos en una columna de cromatografía de gases, se huelen (esnifan) a través de un puerto olfatorio. Gracias a esta herramienta, las respuestas humanas y electrónicas se combinan para maximizar las capacidades de detección posibles (Mayol & Acree, 2001). Debido a la mayor parte de los compuestos volátiles se encuentran en concentraciones cercanas o incluso inferiores a los umbrales de detección humana, hace difícil establecer la contribución de cada compuesto al aroma final de un vino. Debido a esta complejidad, es muy adecuado y de gran utilidad para entender el aroma del vino, realizar análisis de GC-O; ayudándonos a establecer cuáles son los compuestos volátiles más importantes (Gómez-Míguez et al., 2007), permitiendo establecer el perfil aromático del vino durante las diferentes fases de su elaboración y detectar, en el caso de que sufra alguna alteración organoléptica, cuáles son los compuestos alterados responsables del cambio aromático (Aleixandre, 2006). En términos generales, el principal objetivo de los análisis de GC-O es listar y clasificar los compuestos aromáticos presentes en un vino a estudiar de acuerdo a su potencial importancia dentro todo su aroma (Ferreira & Cacho, 2009). El método se optimiza con la introducción del factor de dilución y la evaluación de series de diluciones de la muestra. Las técnicas de dilución más empleadas son el *análisis Charm* y el *AEDA* (*Aroma Extract Dilution Analysis*). (Acree et al., 1984; Schieberle & Grosch, 1987; Ullrich & Grosch, 1987).

La técnica de GC-O ha sido ampliamente utilizada durante los últimos años aportando información sobre el impacto e importancia de muchos compuestos individuales y familias de compuestos volátiles en los diferentes tipos de vinos. Estudios relevantes utilizando esta técnica han sido por ejemplo los publicados por Aznar et al., 2001; Ferreira et al., 2001; Gürbüz et al., 2006; Escudero et al., 2007; Bailly et al., 2009 y Ferreira et al., 2009. Aunque esta técnica tiene una serie de limitaciones como son la falta de sensibilidad para aquellos compuestos cuyo umbral de percepción es menor que el de detección, la discriminación de compuestos durante la extracción y concentración, y la incapacidad de interpretar los efectos

de sinergia y antagonismo que se pueden producir entre diferentes compuestos aromáticos presentes en el vino (Aleixandre, 2006).

2.5 REFERENCIAS

- Acree, T.E., Barnard, J. & Cunningham, D.G. (1984). A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chemistry*, 14, 273-286.
- Aleixandre, J.L. & Álvarez, I. (2003). *Tecnología Enológica*. Madrid: Síntesis Ed. 4.5. El sulfitado (pp. 127-137).
- Aleixandre, J.L. (2006). *La Cultura del Vino. Cata y Degustación*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia Ed. 3. Técnicas de Cata de vinos (pp. 45-65).
- Atienza J., Esteve, M.D., Aragón, P. & Climent, M.D. (1999). La espectrometría de masas y el aroma del vino. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia: L.A.V, S.L. Ed.
- Aubry, V., Etievant, P., Sauvageot, F. & Issanchou, S. (2007). Sensory analysis of Burgundy Pinot Noir wines: A comparison of orthonasal and retronasal profiling. *Journal of Sensory Studies*, 14, 97-117.
- Aznar, M., López, R., Cacho, J.F. & Ferreira, V. (2001). Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2924-2929.
- Bailly, S., Jerkovic, V., Meurée, A., Timmermans, A. & Collin, S. (2009). Fate of key odorants in Sauternes wines through aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8557-8563.
- Barril, C., Clark, A. C., Prenzler, P. D., Karuso, P., & Scollary, G. R. (2009). Formation of pigment precursor (+)-1-methylene-6-hydroxy-2H-furan-5-one-catechin isomers from (+)-catechin and a degradation product of ascorbic acid in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9539–9546.
- Boulton, R.B. (2003). A radical view of oxidative reactions in wine. In *IX Congreso latinoamericano de viticultura y enología*. Pszczółkowski, P. (Ed.). Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile (pp. 107-123).

- Bradshaw, M. P., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2001). Ascorbic acid induced browning of (+)-catechin in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 934-939.
- Bradshaw, M. P., Prenzler, P. D., Scollary, G. R., & Cheynier, V. (2003). Defining the ascorbic acid crossover from anti-oxidant to pro-oxidant in a model wine matrix containing (+)-catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4126–4132.
- Buck L.B. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65, 175-187.
- Buck L.B. (2004). The search for odorant receptors. *Cell*, 116, 117-119.
- Cacho, J. (2004). El reto del análisis del aroma de los vinos. *Boletín de la Sociedad Española de Química Analítica* 9, 6-11.
- Cacho J. (2006a) El aroma de los vinos: retos y soluciones del análisis sensorial. *ACE Revista de Enología*, 66.
- Cacho J. (2006b) La percepción de notas aromáticas del vino y el efecto de ciertas moléculas volátiles. *ACE Revista de Enología*, 66.
- Cacho J. (2006c) Estudio comparativo del perfil volátil del vino tinto durante su crianza en barricas de roble. *ACE Revista de Enología*, 76.
- Camara, J.S., Marques, J.C., Alves, M.A., and Ferreira, A.C.S. (2004). 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone levels in fortified Madeira wines, Relationship to sugar content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6765–6769.
- Carrascosa, A.V., Muñoz, R. & González, R. (2005). *Microbiología del vino*. Madrid: AMV Ed. (pp. 19-56).
- Casal del Rey, J. (2001). *Análisis sensorial y cata de los vinos de España*. Unión Española de Catadores. Madrid: Agrícola Española Ed.
- Chapman, D.M., Thorngate, J.H., Matthews, M.A., Guinard, J.X. & Ebeler, S.E. (2004). Yield effects on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine concentration in Cabernet Sauvignon using a solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5431–5435.
- Culleré, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Analysis for wine C5-C8 aldehydes through the determination of their O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge. *Analytica Chimica Acta*, 524, 201-206.

- Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 73–85.
- Danilewicz, J.D. (2007). Interactions of sulfur dioxide, polyphenols and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and cooper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 53-60.
- Danilewicz, J. C., Seccombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, 128–136.
- DeVilliers, A., Alberts, P., Tredoux, A.G.J. & Nieuwoudt, H.H. (2011). Analytical techniques for wine analysis: An African perspective. *Analytica Chimica Acta*. (Online 21 Diciembre 2011).
- Delteil, D. (2003). Enological yeast effect on the SO₂ content and management in wines. En: *Beverages, Fermentation and Health*. San Francisco: Lallemant, (capítulo 4).
- Duffy, V.B., Cain, W.S. & Ferris, A.M. (1999). Measurement of sensitivity to olfactory flavor: application in a study of aging and dentures. *Chemical Senses*, 24, 671-677.
- Elias, R. J., Andersen, & Waterhouse, A. L. (2010). Controlling the Fenton reaction in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1699–1707.
- Escudero, A., Cacho, J. & Ferreira, V. (2000). Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study. *European Food Research and Technology*, 211, 105-110.
- Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J. & Ferreira, V. (2002). Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry*, 77, 325-331.
- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2007). Analytical Characterization of the Aroma of five Premium Red Wines. Insights into de Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4501-4510.
- Falcao, L.D., De Revel, G., Perello, M.C., Moutsiou, A., Zanús, M.C., & Bordignon-Luiz, M.T. (2007). A survey of seasonal temperatures and vineyard altitude influences on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, C-13-norisoprenoids, and the sensory profile of Brazilian Cabernet Sauvignon wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3605-3612.

- Falqué, E., Fernández, E. & Dubourdieu, D. (2001). Differentiation of white wines by their aromatic index. *Talanta*, 45, 271-281.
- Ferreira V., Escudero A., López R. & Cacho J. (1998) Analytical characterization of the flavor of oxygen-spoiled wines through the Gas-Chromatography-Ion-Trap Mass Spectrometry of ultratrace odorants: Optimization of conditions. *Journal of Chromatographic Science*, 36, 331-339.
- Ferreira, V., Aznar, M., López, R. & Cacho, J. (2001). Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4818-4824.
- Ferreira V., López R. & Aznar M. (2002). *Molecular methods of plant analysis*. Vol. 21. Berlín: Springer Germany.
- Ferreira, V., Jarauta, I., López, R., & Cacho, J. (2003). Quantitative determination of sotolon, maltol and free furaneol in wine by solid-phase extraction and gas chromatography-ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1010, 95-103.
- Ferreira, V., Ortin, N., & Cacho, J.F. (2007). Optimization of a procedure for the selective isolation of some powerful aroma thiols - Development and validation of a quantitative method for their determination in wine. *Journal of Chromatography A*, 1143, 190-198.
- Ferreira, V. & Cacho, J. (2009). Identification of Impact Odorants of Wines. Capítulo 8E (pp. 393-415) In: Moreno-Arribas, M.V. & Polo, M.C. Ed. *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer.
- Flanzky, C. (2000). *Enología: Fundamentos Científicos y tecnológicos*. Madrid: Mundi Prensa Ed.
- Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11–22.
- Frivik, S. & Ebeler, S. (2003). Influence of Sulfur Dioxide on the Formation of Aldehydes in White Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 31-38.
- Gil, M., Cabellos, J.M., Arroyo, T. & Prodanov, M. (2006). Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (Spain). *Analytica Chimica Acta*, 563, 145-153.

- Gürbüz, O., Rouseff, J.M. & Rouseff, R.L. (2006). Comparison of Aroma Volatiles in Commercial Merlot and Cabernet Sauvignon Wines Using Gas Chromatography-Olfactometry and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3990 -3996.
- Gómez-Míguez, M.J., Cacho, J., Ferreira, V., Vicario, I.M. & Heredia, F.J. (2007). Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100, 1464-1473.
- Halpern, B.P. (2004). Retronasal and orthonasal smelling. *Chemosense*, 6, 1-7.
- Jackson R.S. (1994). *Wine Science. Principles and Applications*. California: Academic Press, Inc.
- Kilmartin, P. A., Zou, H. & Waterhouse, A. L. (2001). A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1957–1965.
- Lambropoulos, I. & Roussis, I. G. (2007). Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by caffeic acid and gallic acid. *Food Research International*, 40, 176–181.
- Ledauphin, J., Barillier, D. & Beljean-Leymarie, M. (2006). Gas chromatographic quantification of aliphatic aldehydes in freshly distilled Calvados and Cognac using 3-methylbenzothiazolin-2-one hydrazone as derivative agent. *Journal of Chromatography A*, 1115, 225-232.
- Li, H., Wang, H., Yuan, C. & Wang, S. (2005). *Wine chemistry*. Beijing: Scientific Publishing Company. En: Li, H., Guo, A. & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108, 1-13.
- Li, H., Guo, A. & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108, 1-13.
- Leffingwell, J.C. (2002). Olfaction. *Leffingwell Reports*, 2, 1-34.
- López, R., Lapena, A.C., Cacho, J. & Ferreira, V. (2007). Quantitative determination of wine highly volatile sulfur compounds by using automated headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-pulsed flame photometric detection – Critical study and optimization of a new procedure. *Journal of Chromatography A*, 1143, 8-15.
- Macías, J. (2007). Los sistemas del olfato y del gusto. Temario Ingeniería Neurosensorial del Departamento de Ingeniería Electrónica, UPM. (Online:

<http://insn.die.upm.es/docs/INSN0506-TemaElOlfatoYElGusto-JMG-v29.pdf>. Consulta: 10/12/2007).

- Makhotkina, O. & Kilmartin, P.A. (2009). Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 633, 165-174.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. & Buck, L.B. (1999). Combinational receptor codes for odors. *Cell*, 96, 713-723.
- Marchand, S., De Revel, G. & Bertrand, A. (2002). Possible mechanism for involvement of cysteine in aroma production in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6160–6164.
- Martínez, J., Bilbao, A., Superviola, J. & Aznárez, J. (1999). Evolución de la Composición Aromática de Tempranillo durante el Proceso de Envejecimiento: IV Congreso Nacional de Enólogos. Nº 2768, 2975-2980.
- Mateo-Vivaracho, L., Ferreira, V. & Cacho, J. (2006). Automated analysis of 2-methyl-3-furanthiol and 3-mercaptohexyl acetate at ng L⁻¹ level by headspace solid-phase microextracion with on-fibre derivatisation and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometric determination. *Journal of Chromatography A*, 1121, 1-9.
- Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2007). Quantitative determination of wine polyfunctional mercaptans at nanogram per liter level by gas chromatography-negative ion mass spectrometric analysis of their pentafluorobenzyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, 1146, 242–250.
- Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2009). Selective preconcentration of volatile mercaptans in small SPE cartridges: quantitative determination of trace odor-active polyfunctional mercaptans in wine. *Journal of Separation Sciences*, 32, 3845-53.
- Mayol, A.R. & Acree, T.E. (2001). Advances in gas chromatography-olfactometry. En Leland, J.V., Schieberle, P., Buettner, A., Acree, T.E. (Eds.). Gas chromatography-olfactometry. The state of the art. *ACS Symposium series*, 782 (pp. 1-10). Washington D.C.
- Mestres, M., Busto, O. & Guasch, J. (2000). Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A*, 881, 569-581.

- Mestres, M., Busto, O. & Guasch, J. (2002). Application of headspace solid-phase microextraction to the determination of sulphur compounds with low volatility in wines. *Journal of Chromatography A*, 945, 211-219.
- Moreno, J.A., Zea, L., Moyano, L., and Medina, M. (2005). Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Control*, 16, 333–338.
- Noble, A.C., Arnold, R.A., Buechsenstein, J., Leach, E.J., Schmidt, J.O. & Stern, P.M. (1987). Modification of a standardized system of wine aroma terminology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 143-146.
- Oliveira, C.M., Silva Ferreira, A.C., De Freitas, V. & Silva, A.M.S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44, 1115-1126.
- Oliveira e Silva, H., Guedes de Pinho, P., Machado, B.P., Hogg, T, Marques, J.C., Câmara, J.S., Albuquerque, F. & Silva Ferreira, A.C. (2008). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11989-11996.
- Peinado, R.A., Moreno, J., Bueno, J.E., Moreno, J.A., Mauricio, J.C. (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, 84, 585-590.
- Perestrelo, R., Fernandes, A., Albuquerque, F.F., Marques, J.C. & Câmara, J.S. (2006). Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Analytica Chimica Acta* 563, 154-164.
- Pomar García, M. (1997). Tesis Doctoral: Envejecimiento de vino tinto de la D.O. Tacoronte-Acentejo: Influencia de la madera de roble y de las condiciones de vinificación em la evolución de parâmetros fisicoquímicos de interés enológico y su impacto organoléptico. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de la Laguna.
- Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Bertrand A. & Maujean, A. (2000). Formation of Flavor Components by the Reaction of Amino Acid and Carbonyl Compounds in Mild Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3761-3766.
- Prouteau, C., Schneider, R., Lucchese, Y., Nepveu, F., Renard, R. & Vaca-Garcia, C. (2004). Improving headspace-solid-phase microextraction of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine by experimental design with regard to stable isotope dilution gas

- chromatography-mass spectrometric analysis of wine. *Analytica Chimica Acta*, 513, 223-227.
- Rapp, A. (1998). Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung*, 42, 351-363.
 - Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche & B., Lonvaud, A., (2006). The Microbiology of wine and vinifications. En: *Handbook of Enology*, vol 1, (pp. 1-51). West Sussex (Inglaterra): John Wiley and Sons.
 - Roussis, I. G. & Sergianitis, S. (2008). Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulfur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 35-39.
 - Schieberle, P. & Grosch, W. (1987). Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *European Food Research and Technology / Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 185, 111–113.
 - Schneider, R., Kotseridis, Y., Ray, J.L., Augier, C. & Baumes, R. (2003). Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. 2. Development and application of a stable isotope dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3243–3248.
 - Silva Ferreira A., Guedes de Pinho P., Rodrigues P. & Hogg T. (2002) Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5919-5924.
 - Silva Ferreira, A., Hogg, T. & Guedes de Pinho, P. (2003). Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1377-1381.
 - Singleton, V.L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 69-77.
 - Sun, B.C. & Halpern, B.P. (2005). Identification of Air Phase Retronasal and Orthonasal Odorant Pairs. *Chemical Senses*, 30, 693-706.
 - Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos J.M. & Arroyo, T. (2012). Genetic diversity in commercial wineries: effect of the farming system and vinification management on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 302-315.

- Thuret, S., Moon L.D.F. & Gage, F.H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 628-643.
- Tominaga, T. & Dubourdieu, D. (2006). A novel method for quantification of 2-methyl-3-furanthiol and 2-furanmethanethiol in wines made from *Vitis vinifera* grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 29-33.
- Ugliano, M. & Henschke, P.A. (2009). Yeast and Wine Flavour. Capítulo 8D (pp. 313-393) In: Moreno-Arribas, M.V. & Polo, M.C. Ed. *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer.
- Ullrich, F., & Grosch, W. (1987). Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *European Food Research and Technology / Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 184, 277–282.
- Usseglio-Tomasset, L. (1998). *Química Enológica*. Capítulo 21: El anhídrido sulfuroso en enología. Madrid: Mundi-Prensa Eds. (pp. 337-353).
- Warner, C. R., Diachenko, G. W. & Bailey, C. J. (2000). Sulfites: An important food safety issue. *Food Testing and Analysis*, 6, 1-4.
- Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 306–313.
- Zhou, D., Zhang, S., & Xin, S. (2004). Review on the function and application of sulphite in food processing. *Food Science in China*, 25(12), 198–201.
- Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. & Nury, F.S (2001). *Análisis y producción de vino*. Zaragoza: Acribia SA. Ed. (pp. XVII)

Nota: Aunque el reglamento (CE) 479/2008 está derogado, por el Reglamento (CE) 491/2009 (DOUE L 154 de 17/06/2009, Pág. 1), su contenido se mantiene vigente, al haber quedado incluido en el Reglamento (CE) 1234/2008 (DOUE L 334 de 12/12/2008, Pág. 7). Éste, regula la OCM única para todo el sector agrícola, donde queda integrada la vitivinícola.

CAPÍTULO 3

ESTUDIO DE LOS PERFILES SENSORIALES Y OLFATOMÉTRICOS DE VINOS TINTOS TRAS PROCESOS DE OXIDACIÓN NATURAL Y OXIDACIÓN FORZADA

3. ESTUDIO DE LOS PERFILES SENSORIALES Y OLFATOMÉTRICOS DE VINOS TINTOS TRAS PROCESOS DE OXIDACIÓN NATURAL Y OXIDACIÓN FORZADA (*SENSORY AND OLFACTOMETRIC PROFILES OF RED WINES AFTER NATURAL AND FORCED OXIDATION PROCESSES*)

Artículo publicado en:

American Journal of Enology and Viticulture 62(4):527-535 (2011).

Tania Balboa-Lagunero, Teresa Arroyo, Juan M. Cabellos and Margarita Aznar.

RESUMEN:

Los perfiles aromáticos de diferentes vinos tintos españoles sometidos a procesos de oxidación natural y forzada, fueron examinados mediante análisis sensoriales, cromatografía de gases/olfatometría (CG/O) y análisis cuantitativos. Tras la oxidación de los vinos, se observó un aumento significativo en los descriptores de oxidación, tales como “coñac / brandy / vino de jerez” y “vino añejo / vino evolucionado”; perdiendo estos vinos a su vez, parte de sus notas herbáceas, frescas, frutales y florales. Este cambio en el perfil de aroma se relacionó con un aumento en compuestos como el metional, (*Z*)-2-nonenal, (*E*)-2-octenal, furaneol, dodecanal, (*Z*)-whisky lactona, *o*-aminoacetofenona y una disminución de compuestos volátiles relacionados con descriptores frutales, herbales y florales, tales como (*Z*)-3-hexenol, hexanoato de etilo e isoeugenol. Los análisis cuantitativos confirmaron la importancia de los aldehídos en los procesos de oxidación, especialmente en las oxidaciones forzadas, donde la mayoría de los aldehídos alcanzaron concentraciones muy altas, como el metional (83,6 µg/L), fenilacetaldehído (90,2 µg/L), furfural (183,7 µg/L), 5-hidroxiacetilfurfural (89,9 µg/L) y 2-metilpropanal (197,7 µg/L).

3.1 ABSTRACT

The aromatic profiles of different Spanish red wines undergoing natural and forced oxidation were examined using sensory, gas chromatography/olfactometry (GC/O), and

quantitative analyses. A significant increase in oxidation descriptors such as “cognac / brandy / sherry wine” or “old wine / matured wine” was observed after wine oxidation, and wines also lost some of their herbal, fresh, fruity, and flowery notes. This change in the aroma profile was linked to an increase in compounds such as methional, (*Z*)-2-nonenal, (*E*)-2-octenal, furaneol, dodecanal, (*Z*)-whiskey lactone, and *o*-aminoacetophenone and a decrease of some volatiles with herbal, fruity, and flowery descriptors, such as (*Z*)-3-hexenol, ethyl hexanoate and isoeugenol. Quantitative analyses confirmed the importance of aldehydes in the oxidation processes, especially in forced oxidations, where most of the aldehydes reached very high concentrations, such as methional (83.6 µg/L), phenylacetaldehyde (90.2 µg/L), furfural (183.7 µg/L), 5-hydroxymethylfurfural (89.9 µg/L), and 2-methylpropanal (197.7 µg/L).

Key words: wine, aroma, oxidation, olfactometry, GC/O

3.2 INTRODUCTION

Redox reactions are responsible for important changes in the chemical composition of wine, producing negative effects on aroma quality. These reactions, which lead to oxidative spoilage, comprise the loss of fruit and floral aromas and the development of off-flavors such as honeylike, boiled potato, and farm/feed and early wine yellowing or browning (Silva Ferreira et al. 2002, 2003b). These modifications in wine composition play a key role in final wine quality. The association of some odorants with white wine oxidation has recently been demonstrated, including methional, phenylacetaldehyde, sotolon, (*E*)-2-nonenal, benzaldehyde, (*E*)-2-octenal, hexanal, 1-octen-3-ol, furfural, and 5-methylfurfural (Ferreira et al. 1998, Escudero et al. 2000a, Silva Ferreira et al. 2003a). Some of these compounds, such as 1-octen-3-ol, (*E*)-2-octenal, (*E*)-2-nonenal, and hexanal, whose origin is related to the effect of oxygen, are products of the oxidative degradation of unsaturated fatty acids. However, other compounds such as furfural, 5-methylfurfural, benzaldehyde, eugenol, 2-nonanone, 2-butoxyethanol, and 4-hydroxy-4-methylpentan-2-one have miscellaneous origins (Ferreira et al. 1998, Escudero et al. 2002).

Many descriptors related to oxidation-spoiled white wines have been noted in the literature, including cooked vegetable, cider, woody, licorice, pungent, boiled potato, honeylike, hay, and farm/feed (Silva Ferreira et al. 2002, 2003a, Escudero et al. 2000a, 2002). For some authors, the term cooked vegetable is the most related to oxidation (Escudero et al. 2002); for others, some of the main contributors are honeylike and farm/feed odors (Silva Ferreira et al. 2002). Wine oxidation not only entails an increase in the quantity of certain compounds and the formation of new ones but also a decrease in fresh and varietal wine aromas (Silva Ferreira et al. 2002) and a disappearance of Sauvignon-like aromas that come from odorants such as 4-methyl-4-mercaptopentatone and 3-mercaptohexanol (Flanzy 2000).

Most of the research on wine oxidation has been performed on white wines (Martins et al. 2008, Silva Ferreira et al. 2003b, Escudero et al. 2000a, 2000b, 2002, Oliveira et al. 2002), as they are more prone to oxidation reactions, but it could also be of great interest to study the type of chemical reactions, the changes in the concentration of aromatic compounds, and the development of new aromas that occur during the evolution processes in red wines. It could also be an advantage to standardize all the oxidation terms used to describe both red and white wines. To our knowledge, no detailed sensory and chemical comparison of nonoxidized, naturally oxidized, and controlled oxidized red wines has been published to date. For this reason, the main aim of this work was to study the aromatic profile of oxidized red wines using sensory, chemical, and gas chromatography/olfactometry (GC/O) analyses. Sensory analysis will provide information about wine aroma perception, chemical analysis will allow us to determine wine chemical composition, and GC/O, which has been widely used in the study of nonoxidized red wines aromatic profiles (Aznar et al. 2001, Ferreira et al. 2001, López et al. 1999), will provide information about key aroma compounds. The final aim of the study was to correlate the data obtained by the three techniques.

3.3 MATERIALS AND METHODS

Wines. The wines used in this study were chosen from 65 red and white Spanish wines produced in nine experimental wineries located in different Spanish regions that had been analyzed previously in a research study carried out in our laboratory (Arroyo et al. 2005)

and from a new set of 10 commercial wine samples from the market. Red wines were from the varieties Tempranillo, Cabernet Sauvignon, Sauvignon, Garnacha, Graciano, Bobal, Merlot, Monastrell, Cabernet, Calado, Mencía, and Cencibel, and white wines were from the varieties Pardina, Montua, Macabeo, Chardonnay, Ciguentes, Riesling, Viognier, Gewürztraminer, Airén, Viura, and Malvasia. In the previous study, an expert wine panel from the IMIDRA Institute evaluated, among other descriptors, the aroma quality and the degree of oxidation on a scale from 1 (low) to 5 (very high) and the modified frequency percentage (MF%) was calculated. MF% was calculated as the square root of the detection frequency of an aromatic attribute expressed as a percentage (F%) multiplied by the average intensity expressed as a percentage of the maximum intensity (I%) (Dravnieks 1985). Wines used for this study were selected on the basis of their MF% values for aroma quality and oxidation degree.

Four wine sets were defined: nonoxidized, forced oxidized, naturally oxidized, and sensory protocol. The nonoxidized set was composed of three red Tempranillo wines (coded as TE1, TE2, and TE3) chosen because of their high aroma quality and low oxidation degree. TE1 was a young (2006) wine from Castilla León; TE2 was a young (2007) organic wine from Madrid; and TE3 was a young (2007) wine produced in the experimental winery of El Encín (Madrid). The forced oxidized set was composed of three wines coded as TE1FO, TE2FO, and TE3FO, which were obtained after having subjected TE1, TE2, and TE3, respectively, to a forced oxidation protocol described below.

The naturally oxidized set was composed of three red wines (coded as 026NO, 036NO, and 065NO) chosen because of their high degree of oxidation and their characteristic oxidation notes. 026NO was a young (2001) Merlot from Valencia; 036NO was an aged (2000) Cabernet Sauvignon from Valencia; and 065NO was an aged (2007) Tempranillo produced in the experimental winery of El Encín (Madrid). The sensory protocol set was composed of the five red wines and the five white wines with the highest degree of oxidation.

Each set of wines was composed of three 0.75 L bottles. Bottles were mixed homogeneously before the experiments.

Reagents. All reagents used were of analytical quality. LiChrolut En resin, dipotassium phosphate, and potassium dihydrogen phosphate were from Merck (Darmstadt, Germany); alkane compound, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and HPLC-quality dichloromethane and methanol were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Switzerland); and HPLC-quality ethanol, sodium bicarbonate, sodium chloride, and ascorbic acid were from Panreac (Barcelona, Spain). The pure reference aroma compounds used for the analysis were analytical quality and were purchased from Merck, Sigma-Aldrich, Fluka (Buchs, Switzerland), PolyScience (Niles, IL), Chem Service (West Chester, NY), Lancaster (Strasbourg, France), and Panreac. Pure water was obtained from a Milli-Q purification system from Millipore (Molsheim, France).

Forced wine oxidation protocol. During the forced oxidation protocol, 0.75 L wine bottles were separately oxidized by forcing an air stream against the wine under controlled laboratory conditions. The concentration of dissolved oxygen was measured with an OXI45 oximeter (Crison Instruments SA, Barcelona, Spain) until the wine reached 100% saturation. Each saturated wine was kept in a closed glass bottle and all the bottles were incubated together in the same oven at 60°C for 10 days. This forced aging implementation has been previously conducted in similar experiments with white wines (Silva Ferreira et al. 2003a, Martins et al. 2008). The forced oxidation protocol was applied to three bottles of each wine in the nonoxidized wines. After oxidation, the three bottles of each wine were mixed and homogenized.

Antioxidative capacity measurement. The antioxidative capacity of the wine samples was determined by a modification of the published 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method (Brand-Williams et al. 1995). This is a common method for measuring the antioxidant capacity of organic samples and has been widely used for wine experiments (Salaha et al. 2008, Arnao 2000, De Beer et al. 2003, Larrauri et al. 1999). A Helios spectrophotometer (Thermo Electron Corp., Waltham, MA) was used and the sample absorbance was measured at 515 nm.

Descriptive sensory analysis. Sensory analyses were performed by a trained panel of 12 people (seven women and five men) from the IMIDRA Institute. This panel had been

previously trained in the laboratory in the recognition of wine aromas, first using standards and then real wine samples (Lozano et al. 2007). During the sensory sessions, a maximum of six wines were evaluated and the duration of each session was about 40 min. For tasting, 20 mL wine, served at ~18°C, was poured into winetasting glasses that fulfilled the ISO 3591-1977 standards.

The sensory evaluation of the nine wines from the nonoxidized, forced oxidized, and naturally oxidized sets was carried out using two tasting cards: one with terms for general wine descriptors and one with different descriptors for oxidative aromas. All terms from the two cards were evaluated on a scale from 1 (low intensity) to 5 (high intensity). Free descriptions and indications of the dominant aromas were also allowed. Each wine was tasted once by each panelist.

The general card, which had been previously designed by wine experts from the IMIDRA Institute (Lozano et al. 2007), included the terms overall intensity, overall quality, and off-flavors, and the descriptors fruity, flowery, spicy, herbal, phenolic, lactic/yeast, oxidation, and chemical. The substances ethyl butyrate, β -phenylethyl alcohol, eugenol, (*Z*)-3-hexenol, 4-ethylphenol, 2,3-butanodione, acetaldehyde, and decanal were used as reference standards during the training sessions of these descriptors.

The tasting card for oxidation descriptors was prepared following the AFNOR (NFV-09_021) procedure for the set of 10 sensory protocol wines. For the preparation of the card, these wines were described by the members of the panel, who were allowed to use all the terms they found in each wine. All aromatic terms that were clearly not related to oxidation were eliminated and all descriptors that were synonymous were combined to obtain a final list of 17 descriptors. These 10 wines were retasted by the same panel, who evaluated the presence of the resulting 17 descriptors. Those descriptors that were not mentioned by at least 50% of the panel were eliminated. Finally, nine different descriptors for oxidative aromas were selected: very ripe fruit/raisin/overripe fruit, cognac/brandy/sherry wine, old wine/matured wine/evolved wine, varnish/paint/glue/resin/rubber/solvent, herbal/plant stem/tannin, hay/dry grass/straw, honey/molasses, cooked potato/cooked vegetables, and licorice/curry. The degree of oxidation was also evaluated. For these descriptors, real samples

were used as reference standards during the training sessions (raisins, cognac, old wine, glue, grass, hay, honey, cooked potatoes, curry).

Panelists for GC/O. The first step in the GC/O analysis was the training of the panel. Two training solutions included 12 volatile compounds generally present in wines (ethyl butyrate, ethyl 2-methylbutyrate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate, (*Z*)-3-hexenol, ethyl octanoate, linalool, butyric acid, guaiacol, (*Z*)-whiskey lactone, β -phenylethanol, and (*E*)-whiskey lactone) and 10 compounds related to oxidation according to the literature (hexanal, 1-octen-3-ol, methional, furfural, benzaldehyde, (*E*)-2-nonenal, phenylacetaldehyde, eugenol, sotolon, and acetovanillone). All were prepared in a range of concentrations that can be found in wines. Fifteen panelists carried out the olfactometric analyses of these solutions until they became familiar with the procedure and were able to describe and determine the intensity of the training compounds. Finally, eight panelists were selected on the basis of their sensitivity and aptitude for aroma recognition.

Wine extracts for GC/O. Wine GC/O extracts from TE1, TE1FO, 026NO, 036NO, and 065NO were obtained by dynamic headspace extraction following a published procedure (Campo et al. 2005). In this method, an 80 mL aliquot of wine was mixed with 20 mL artificial saliva (0.168 g NaHCO₃, 0.048 g K₂HPO₄, 0.166 g KH₂PO₄, and 0.088 g NaCl for every 100 mL water) (Roberts and Acree 1996) and then heated for 200 min at a constant temperature of 37°C while a controlled stream of nitrogen (100 mL/min) was flushed through it. Volatile compounds were released into the headspace and trapped in a LiChrolut En SPE cartridge. Next, volatiles were eluted from the cartridge with 2.3 mL dichloromethane. The extract was kept overnight at -30°C to eliminate any possibility of including water and was finally concentrated to a final volume of 0.2 mL with a stream of pure nitrogen. This system was intended to represent an artificial mouth, whereby the artificial saliva helps to obtain the retronasal perception of the odorants (Gómez-Míguez et al. 2007). Although some recent publications have established that artificial saliva does not behave exactly as human saliva in terms of aroma release (Genovese et al. 2009), this method is considered a good approximation of the real situation and helps to standardize a common methodology between laboratories.

GC/O analysis. Wine extracts TE1, TE1FO, 026NO, 036NO, and 065NO were used for the GC/O analyses. The experiment was carried out using a 5890 series II GC (Hewlett-Packard [HP], Palo Alto, CA) equipped with a flame ionization detector (FID) and an OP 275 olfactory port (ATAS GL International, Eindhoven, The Netherlands) connected by a tee to the column exit. The column used was a HP FFAP (32 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). The oven program was as follows: 40°C for 5 min, temperature increased to 70°C at 4°C/min, and to 200°C at 7°C, and the final temperature was kept at 200°C for 5 min. Helium was used as a carrier gas at a constant pressure of 22 psi and the injection volume was 1 μ L. The identification of the odorants was carried out by a comparison of odors and chromatographic retention times with those of pure reference compounds. Compounds were further confirmed by GC–MS in an HP 6890 series equipped with an HP 5973 mass selective detector. The olfactometry of each GC/O wine extract was performed once by each of the eight GC/O panelists. They were asked to describe the aromas perceived and their intensity on a 4-point category scale (0 = not detected; 1 = weak, hardly recognizable odor; 2 = clear but not intense odor; and 3 = intense odor); half values were also allowed. The modified frequency percentage (MF%) was calculated for each odorant perceived.

Volatile quantification. Major, minor, and trace compounds and aldehydes were quantified in wines from the nonoxidized, forced-oxidized, and naturally oxidized sets using the techniques optimized in the laboratories of the Analytical Chemistry Department, Sciences Faculty of the University of Zaragoza (Ortega et al. 2001, López et al. 2002, Ferreira et al. 2006.). One replicate of each analysis was performed.

The analysis of the major volatile compounds was carried out by liquid-liquid extraction with dichloromethane, followed by a GC–FID analysis of the microextracts. The analyzed compounds were acetaldehyde, ethyl propanoate, 2,3-butanedione, ethyl butyrate, isobutanol, isoamyl acetate, 1-butanol, isoamyl alcohol, ethyl hexanoate, hexyl acetate, acetone, ethyl lactate, 1-hexanol, (*Z*)-3-hexenol, ethyl octanoate, ethyl 3-hydroxybutyrate, isobutyric alcohol, γ -butyrolactone, butyric acid, diethyl succinate, hexanoic acid, benzyl alcohol, β -phenylethanol, octanoic acid, and decanoic acid.

The quantification of minor and trace compounds was performed by solid-phase extraction (SPE) using cartridges with LiChrolut En resin, elution with dichloromethane, and analysis of the extracts by GC–MS. The following compounds were analyzed: ethyl isobutyrate, isobutyl acetate, ethyl 2-methylbutyrate, ethyl isovalerate, butyl acetate, furfural, linalool, 5-methylfurfural, ethyl decanoate, 3-methylbutyric acid, 2-methylbutyric acid, furfuryl alcohol, α -terpineol, methionol, β -citronellol, phenylethyl acetate, β -damascenone, geraniol, α -ionone, guaiacol, ethyl hydrocinnamate, (*E*)-whiskey lactone, β -ionone, (*Z*)-whiskey lactone, δ -octalactone, *o*-cresol, 4-ethylguaiacol, γ -nonalactone, *m*-cresol, 4-propylguaiacol, γ -decalactone, ethyl cinnamate, eugenol, 4-ethylphenol, 4-vinylguaiacol, δ -decalactone, 2,6-dimethoxyphenol, isoeugenol, 4-vinylphenol, benzoic acid, 5-hydroxymethylfurfural, 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol, phenylacetic acid, vanillin, methyl vanillate, ethyl vanillate, acetovanillone, syringaldehyde, and ethyl furoate.

Aldehydes were analyzed by SPE using cartridges with LiChrolut En resin and the derivatization was carried out in the same cartridges with PFBHA (5 mg/mL). The analysis was performed by GC–MS and the studied compounds were 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 1-octen-3-one, methional, (*E*)-2-octenal, phenylacetaldehyde and (*E*)-2-nonenal.

Statistical analysis. Pearson correlation studies, analysis of variance (ANOVA), and principal component analysis (PCA) were performed. The statistical analyses were carried out with the software SPSS ver. 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) and The Unscrambler ver. 9.1 (Camo, Asa, Norway).

3.4 RESULTS AND DISCUSSION

Sensory analysis for general descriptors. The average aromatic profiles for the nonoxidized, forced oxidized, and naturally oxidized wines and the significant differences between them were determined (Figure 1A). A spider graph was chosen to represent the sensory results as it gives a general view of the aromatic profile. Results show a decrease in the overall quality of wines (47 to 26%) after undergoing a forced oxidation, as well as an

increase in their overall intensity (11 to 19%), probably because the volatiles formed during the oxidation processes had a higher aromatic intensity. The average overall quality was also lower in the naturally oxidized wines than in the nonoxidized wines (19%), but the degree of this decrease was smaller than in the forced oxidized wines, probably because forced oxidation induced more drastic changes in the wines than natural oxidation. These results are in agreement with those obtained from the measurement of the antioxidant capacity of wines by the DPPH method, with 5.37, 3.61, and 4.65 g/L ascorbic acid equivalents for the nonoxidized, forced oxidized, and naturally oxidized wines, respectively. A common aromatic wine profile was obtained for forced and natural oxidation (Figure 1A), although significant differences between them were found for the descriptors fruity, oxidation, lactic/yeast, chemical, and off-flavors, which reached higher values in the forced oxidized wines (36, 85, 32, 61, and 89%, respectively). After a forced oxidation, there was a decrease in the intensity of descriptors such as herbal (35%), flowery (13%), fruity (7%), and lactic/yeast (8%), although differences were only significant for the flowery and herbal notes. Conversely, there was an increase in the intensities of the descriptors phenolic (31%), oxidation (139%), and off-flavors (114%).

Sensory analysis for oxidation descriptors. The tasting card for describing the aromatic profile of oxidized wines contained nine aroma descriptors, some of which, such as honey/molasses or cooked potato/cooked vegetables, had been used previously in the description of white oxidized wines, while others were new descriptors more related to red oxidized wines, such as cognac/brandy/sherry wine. The average aromatic profile for each set of wines (nonoxidized, forced oxidized, and naturally oxidized) and the significant differences between them are shown (Figure 1B). A significant increase in the perception of the descriptors cognac/brandy/sherry wine, old wine/matured wine, very ripe fruit/raisin/overripe fruit, varnish/paint/glue/resin/rubber/solvent, and honey/molasses was observed for the oxidized wines. Even though no significant differences were found between naturally and forced oxidized wines, the intensity of these descriptors was higher in the forced oxidized wines, possibly due to the additional effect of the temperature applied during the forced oxidation process. This temperature could lead to the formation of compounds generated in temperature-dependent reactions such as furaneol, resulting from sugar degradation. The aromatic profile of oxidized red wines shows similar notes to Madeira

wines, such as dried fruit, nutty, or brown sugar (Oliveira e Silva et al. 2008), the production of which typically includes exposure to mildly high temperatures. On the other hand, some descriptors, such as hay/dry grass/straw and cooked potato/cooked vegetables, did not show a significant increase and, in the case of herbal/plant stem/tannin, decreased from 70.0 to 36.3% after the forced oxidation. These descriptors have been defined as key aroma compounds in the description of white wine oxidation (Ferreira et al. 1998, Escudero et al. 2000a, 2002), which suggests that the sensory pattern related to red wine oxidation is different from that observed in white wine oxidation.

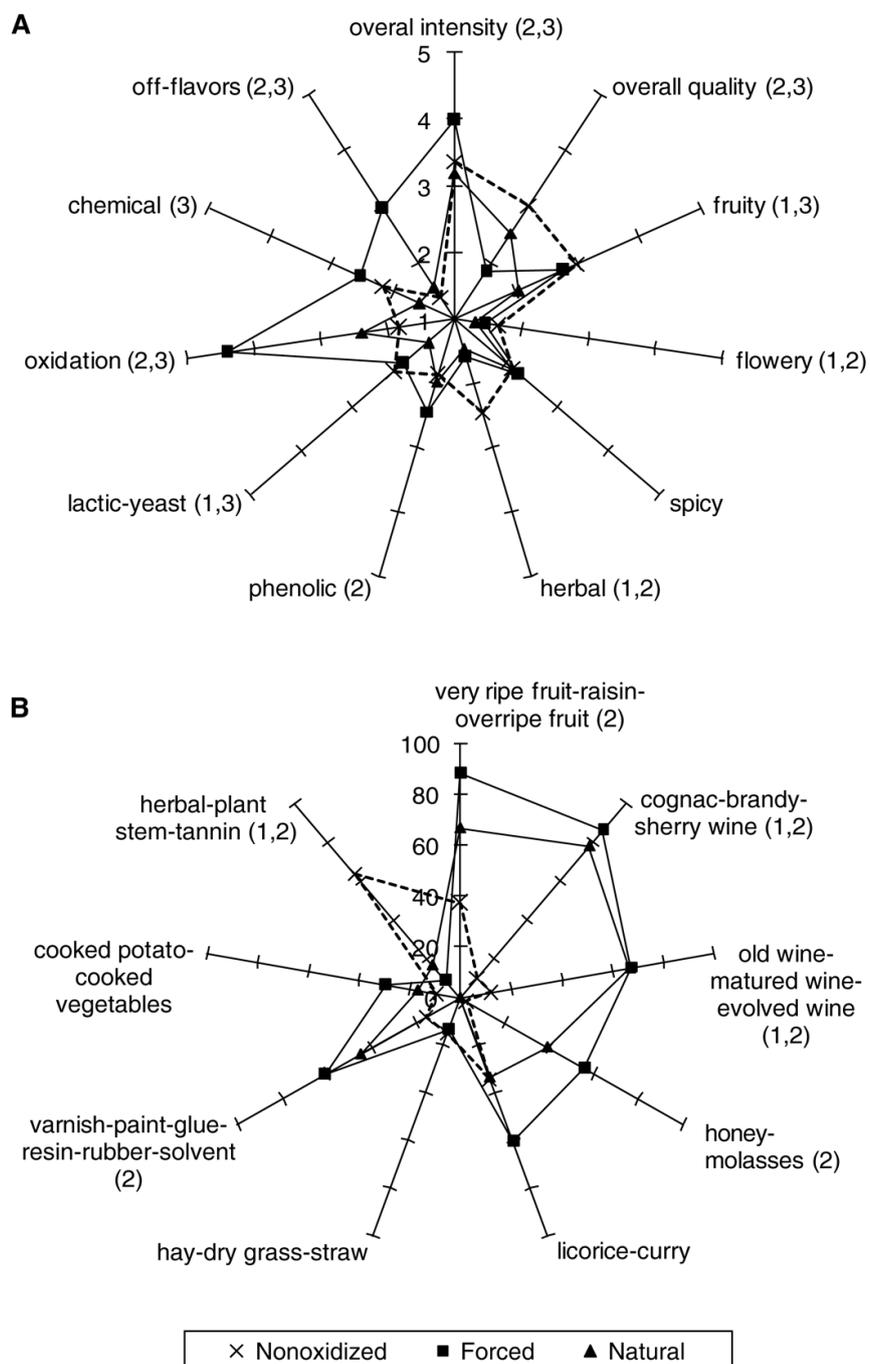


Figure 1 Aromatic profiles for nonoxidized, forced oxidized, and naturally oxidized sets of wines for general descriptors (A) and for oxidation descriptors (B). Significant differences ($p < 0.05$) between nonoxidized and naturally oxidized wines (1), between nonoxidized and forced oxidized wines (2), and between naturally and forced oxidized wines (3).

Olfactometry analysis. The purpose of the GC/O analysis was to study the key aroma compounds of three naturally oxidized wines and to check their formation after the forced oxidation of a nonoxidized wine. The MF% values for the 026NO, 036NO, 065NO, TE1, and

TE1FO wines are shown (Table 1). Only those compounds with a MF% greater than 30% and those compounds greater than 20% and detected in at least in two of the wines were taken into account. A total of 58 odorant zones were obtained.

A comparison of the nonoxidized reference (TE1) and the same sample after forced oxidation (TE1FO) offers key information about the odorants formed and destroyed during this process. GC/O scores of six odorant compounds (methional, (*Z*)-2-nonenal, furaneol, dodecanal, (*Z*)-whiskey lactone, and *o*-aminoacetophenone) increased significantly in the forced oxidized wine. Methional has been previously identified as the key odorant in the oxidation of white wine (Silva Ferreira et al. 2003, Escudero et al. 2000b), (*Z*)-2-nonenal has been recently identified in high-quality aged wines (Ferreira et al. 2009), furaneol is a well-known sweet odorant linked to sugar degradation, which is probably present due to the temperature applied during forced oxidation (Hofmann et al. 2000, Hofmann and Schieberle 2000), dodecanal is a typical product of fatty acid degradation (Escudero et al. 2002, Gómez et al. 1993), *o*-aminoacetophenone has been related to the aging of German white wines (Rapp et al 1993), and (*Z*)-whiskey lactone is a typical wood product that has, however, been previously reported as a constituent of unwooded wine (López et al. 1999) or even of grape aroma precursor hydrolysates (Loscos et al. 2007). On the other hand, GC/O scores of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine, 2-acetylpyrazine, γ -decalactone, and (*Z*)-3-hexenol decreased significantly during forced oxidation. For pyrazines, this decrease could be due to a volatilization of these compounds because of the temperatures applied during forced oxidation. This effect has been previously observed in wines subjected to thermovinification (Roujou de Boubee 2003). With respect to the GC/O profile of naturally oxidized wines, the interpretation is slightly more difficult, since some of the observed differences could be due to aromas formed during wine aging or differences in the winemaking process. During wine aging, as with oxidation processes, several modifications take place, such as ester hydrolysis, glycoside hydrolysis, or acetalization. These reactions result in the formation of compounds such as some ethyl esters, furfural, homofuraneol, and 2-methyl-3-furanthiol (Escudero et al. 2002, Campo et al. 2007, Cacho 2006, Tominaga et al. 2003), which could enhance the perception of typical oxidation descriptors. Nevertheless, leaving aside these compounds, results of a Pearson correlation study between differences in the average MF% after a forced oxidation and after natural oxidation showed a significant positive correlation (+0.753, $p <$

0.05). Those compounds with a tendency to increase during oxidation according to the literature, such as methional, (*E*)-2-octenal, dodecanal, decanal, *o*-aminoacetophenone, and furaneol, were found in the set of naturally oxidized wines at quite high concentrations, confirming that these compounds are relevant contributors to the sensory profile of oxidized wines. The exception was (*Z*)-2-nonenal, with a GC/O score in the natural oxidized wines similar to that found in the nonoxidized wines.

GC/O data were also studied from two classifications, aroma categories and families of chemical compounds. For aroma, nine different categories were defined, based on the Wine Aroma Wheel (Noble et al. 1987). The categories were fruity (C1), green/fresh/herbal (C2), pungent/chemical (C3), earthy/farm (C4), flowery (C5), spicy (C6), fatty/fusel (C7), caramel/sweet (C8), and phenolic (C9). The MF% values for TE1, TE1FO, and the average of the three naturally oxidized wines are compared (Figure 2A). The categories caramel/sweet and particularly earthy/farm showed a high impact in the oxidized wines; therefore, those compounds classified in these categories, such as furfural, homofuraneol, furaneol, 2-methyl-3-furanthiol, methional, (*E*)-2-octenal, dodecanal, decanal, and an unidentified compound (LRI 2435), had a major effect on the sensory perception of oxidation. Conversely, the categories green/fresh/herbal, flowery, spicy, and phenolic related to compounds such as (*Z*)-3-hexenol, linalool, the LRI 2448 compound, 4-vinylphenol, and 4-ethylphenol showed lower values in the oxidized wines.

The second classification was based on the families of chemical compounds (Figure 2B). Oxidized wines showed major concentrations of lactones, aldehydes, and ketones and also of some indeterminate unpleasant odors. These results were expected, as it has been previously reported that compounds such as esters, lactones, aldehydes, and ketones appeared in high concentrations in wines that had undergone chemical or biological aging/oxidative processes (Escudero et al. 2000a, Flanzky 2000, Culleré et al. 2007). Conversely, phenols, pyrazines, terpenols, and the group of unknown compounds with a pleasant odor stood out in the nonoxidized wine.

Table 1 Compounds detected during GC/O, their linear retention index (LRI), aromatic description, aroma category (AC), and percentage of modified frequency (MF%) for TE1, TE1FO, 065NO, 036NO, and 026NO wine samples.

| LRI | Aromatic description | Compound | AC | Modified frequency (%) | | | | |
|------|--|--|----|------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | TE1 | TE1FO | 065NO | 036NO | 026NO |
| 1005 | Sweet, fruity, custard | Isobutyl acetate ^a | C1 | 22 | 40 | 31 | 28 | 13 |
| 1024 | Fruity, sweet syrup, apple | Ethyl butyrate ^a | C1 | 65 | 69 | 53 | 71 | 56 |
| 1037 | Fruity, sweet syrup, anise | Ethyl 2-methylbutyrate ^a | C1 | 55 | 36 | 68 | 81 | 30 |
| 1053 | Sweet, cream, fruity | 2,3-Pentanedione ^a | C8 | 26 | 0 | 41 | 31 | 42 |
| 1058 | Fruity, sweet, banana | Ethyl isovalerate ^a | C1 | 25 | 44 | 41 | 57 | 25 |
| 1083 | Bitter, fusel, stable, cheese | Isobutanol ^a | C7 | 12 | 25 | 0 | 36 | 37 |
| 1110 | Banana, sweet, fruity | Isoamyl acetate ^a | C1 | 32 | 8 | 0 | 0 | 5 |
| 1124 | Sweet, fruity | Ethyl pentanoate ^a | C1 | 0 | 8 | 41 | 10 | 13 |
| 1125 | Soap, fatty, diesel | 1-Butanol ^a | C7 | 22 | 34 | 0 | 37 | 0 |
| 1140 | Fruity, pineapple, orange blossom | Ethyl 2-methylpentanoate ^b | C1 | 0 | 0 | 14 | 40 | 6 |
| 1196 | Fruity, medicine | Ethyl 4-methylpentanoate ^b | C1 | 0 | 0 | 27 | 34 | 47 |
| 1210 | Unpleasant, feet, cheese, rancid, fusel | Isoamyl alcohol ^a | C7 | 86 | 69 | 75 | 72 | 42 |
| 1218 | Spicy-sweet, alcohol, whiskey | 2-Methyl-1-butanol ^b | C7 | 0 | 25 | 0 | 32 | 43 |
| 1239 | Pineapple, tropical fruits, apple | Ethyl hexanoate ^a | C1 | 82 | 55 | 78 | 73 | 41 |
| 1285 | Sweet, fruity, green | Hexyl acetate ^a | C1 | 10 | 0 | 7 | 25 | 19 |
| 1356 | Unpleasant, animal feed, vegetables, burnt | 2-Methyl-3-furanthiol ^c | C4 | 0 | 8 | 18 | 47 | 35 |
| 1368 | Green, bitter almond, grass, fresh | 1-Hexanol ^a | C2 | 42 | 8 | 36 | 32 | 19 |
| 1388 | Lemon, fresh, air freshener | (Z)-3-Hexenol ^a | C2 | 47 | 14 | 20 | 28 | 19 |
| 1413 | Chemical | (E)-2-Octenal ^a | C4 | 0 | 12 | 0 | 68 | 11 |
| 1427 | Unpleasant, bitter, chloride | Furfuryl mercaptan ^a | C3 | 0 | 0 | 30 | 25 | 0 |
| 1448 | Fresh, pineapple, flowery, fruity | Ethyl octanoate ^a | C1 | 58 | 26 | 20 | 7 | 28 |
| 1455 | Cereals, dirty grass, unpleasant, dung, rotten | Methional ^a | C4 | 0 | 47 | 38 | 23 | 27 |
| 1467 | Clean, acid, vinegar | Acetic acid ^a | C3 | 31 | 0 | 0 | 18 | 0 |
| 1493 | Bread, bakery, candy, toasty | Furfural ^a | C8 | 0 | 8 | 34 | 41 | 30 |
| 1495 | Gas, medicine, plastic, rancid, farm, chemical | (Z)-2-Nonenal | C3 | 18 | 59 | 14 | 16 | 13 |
| 1508 | Chemical, latex | Decanal ^d | C4 | 0 | 10 | 0 | 0 | 43 |
| 1521 | Sweet, candy, wood | Benzaldehyde ^a | C8 | 36 | 22 | 0 | 25 | 14 |
| 1539 | Spices, nuts, toasty | 3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazine ^b | C6 | 33 | 0 | 29 | 0 | 0 |
| 1559 | fresh, green fruit, flowery | Linalool ^a | C2 | 23 | 8 | 0 | 13 | 11 |
| 1610 | Sweet, nuts | 2-Acetylpyrazine ^b | C8 | 30 | 0 | 0 | 7 | 6 |
| 1620 | Cheese, unpleasant, chemical | Butyric acid ^a | C3 | 14 | 14 | 50 | 7 | 6 |

| | | | | | | | | |
|--|---|---|----|----|----|----|----|----|
| 1684 | Unpleasant, acid, cheese, rancid | Isovaleric acid ^a | C3 | 54 | 10 | 25 | 31 | 22 |
| 1730 | Flowery, green fruit, bitter almond | Dodecanal ^c | C4 | 0 | 25 | 22 | 7 | 17 |
| 1762 | Flowery, perfume, fruity | ni (1772 LRI, flowery, licorice) ^e | C5 | 0 | 0 | 0 | 32 | 11 |
| 1812 | Flowery, lilac | 2-Phenylethyl acetate ^a | C5 | 34 | 29 | 27 | 27 | 19 |
| 1832 | Peach, baked apple, pear, flowery | β -Damascenone ^a | C1 | 79 | 79 | 61 | 44 | 36 |
| 1882 | Unpleasant, veterinary clinic, medicinal | Guaiacol ^d | C9 | 48 | 0 | 28 | 31 | 6 |
| 1902 | Flowery, coconut, fruity | Ethyl hydrocinnamate ^a | C5 | 31 | 22 | 31 | 18 | 17 |
| 1931 | Flowery, roses, jasmine | β -Phenylethanol ^a | C5 | 62 | 78 | 54 | 44 | 61 |
| 1984 | Coconut, fresh, flowery, toasty | (Z)-Whiskey lactone ^a | C8 | 0 | 25 | 41 | 33 | 11 |
| 2044 | Sweet, coconut, oil, flowery | γ -Nonalactone ^a | C8 | 26 | 25 | 22 | 14 | 11 |
| 2045 | Sweet, caramel, burnt sugar | Furaneol ^b | C8 | 0 | 32 | 0 | 18 | 0 |
| 2097 | Unpleasant, cheese, acid | Octanoic acid ^a | C3 | 29 | 44 | 9 | 10 | 22 |
| 2100 | Sweet, cake | Homofuraneol ^d | C8 | 0 | 0 | 20 | 43 | 0 |
| 2147 | Veterinary clinic, bitumen, stable, wood | <i>m</i> -Cresol ^a | C9 | 31 | 8 | 29 | 29 | 11 |
| 2170 | Flowery, candy, coconut | Ethyl cinnamate ^b | C5 | 16 | 30 | 27 | 7 | 0 |
| 2199 | Spices, curry | Eugenol ^a | C6 | 22 | 0 | 41 | 20 | 9 |
| 2222 | Flowery, coconut, childrens aspirin, perfume | γ -Decalactone ^a | C5 | 29 | 0 | 35 | 7 | 29 |
| 2236 | Chemical, phenolic, chlorine, burnt, bitumen | 4-Ethylphenol ^b | C9 | 31 | 32 | 0 | 0 | 0 |
| 2245 | Curry, licorice, spices, burnt wood | Sotolon ^a | C6 | 51 | 53 | 52 | 46 | 51 |
| 2250 | Pleasant, sweet, medicine | <i>o</i> -Aminoacetophenone ^b | C8 | 0 | 25 | 0 | 16 | 11 |
| 2300 | Unpleasant, sweat, rotten fruit, rancid | Decanoic acid ^a | C3 | 20 | 40 | 14 | 7 | 9 |
| 2308 | Spices, incense, phenolic | 2,6-Dimethoxyphenol ^b | C9 | 19 | 10 | 0 | 7 | 17 |
| 2334 | Flowery, coconut, sweet, phenolic | Isoeugenol ^b | C5 | 30 | 8 | 18 | 7 | 18 |
| 2385 | Flowery, fresh, sunflower seeds | ni (2380 LRI flowery) ^e | C5 | 18 | 18 | 0 | 10 | 30 |
| 2407 | Burnt rubber, spices, toasted almonds, chemical | 4-Vinylphenola | C6 | 33 | 13 | 7 | 13 | 6 |
| 2435 | Unpleasant, feet, stew | Not identifie ^d | C4 | 0 | 11 | 20 | 0 | 13 |
| 2448 | Sweet, deodorant, spicy, flowery, pleasant | Not identifie ^d | C5 | 30 | 0 | 7 | 14 | 0 |
| Aromas detected | | | | | | | | |
| Aromas with MF% \geq30 | | | | | | | | |
| | | | | 41 | 44 | 42 | 53 | 49 |
| | | | | 24 | 17 | 20 | 23 | 15 |

^aIdentification based on the similarity of odor, coincidence of GC retention data, and MS data with those of the pure standards compounds and the library spectral matching.

^bIdentification based on the similarity of odor and on coincidence of GC retention data with those of the pure standards compounds.

^cIdentification based on the similarity of odor and coincidence of the LRI value with literature LRI values.

^dIdentification based on the similarity of odor, coincidence of the LRI value with literature LRI values, and MS data.

^eNon identified (ni) compound from Table 2 in Gómez-Míguez et al. (2007).

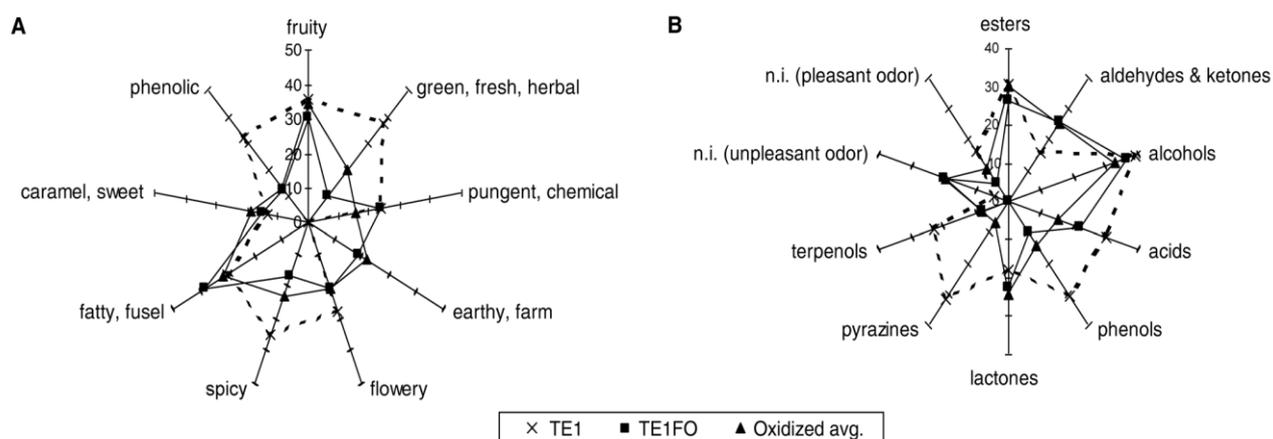


Figure 2 Profiles of aroma categories (A) and chemical families (B) for TE1 wine, TE1FO wine, and the average of the naturally oxidized wines set.

Quantitative analysis. The concentrations of those compounds that showed the greatest differences between nonoxidized, naturally oxidized, and forced oxidized wines sets were determined (Table 2). Principal component analysis (PCA) of this data (Figure 3) determined which compounds were responsible for wine set differentiation. Four principal components (PCs) were necessary to explain 80% of the data variance. PCA results showed a good grouping of the wine sets.

Naturally oxidized wines were grouped based on their low concentrations of some alcohols with herbal notes, such as (*Z*)-3-hexenol, geraniol, and β -citronellol, some acids with fatty notes, such as octanoic and hexanoic acids, and other compounds, such as 2,3-butanodione (milky notes) and ethyl 3-hydroxybutyrate. These results would explain the low intensity of the descriptors herbal, herbal/plant stem/tannin, and lactic/yeast obtained in these wines during the sensory analysis (Figure 1). These wines also showed high concentrations of some esters with fruity notes such as ethyl 2-methylbutyrate and ethyl isovalerate, some phenols such as *o*- and *m*-cresol, 4-propylguaiacol and 4-ethylguaiacol, and (*Z*)-whiskey lactone (flowery). Most of these results were also reflected in the GC/O analysis; however, the changes expected in the sensory profile were not observed, likely because these notes were hidden by oxidation notes. Forced oxidized wines were grouped based on high concentrations of most of the aldehydes analyzed: acetaldehyde, phenylacetaldehyde, furfural, 5-methylfurfural, 5-

hydroxymethylfurfural, vanillin, 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, methional, (*E*)-2-octenal, syringaldehyde, and (*E*)-2-nonenal. These results agreed with those obtained in the GC/O analysis and also with those previously related in the literature for oxidized white wines (Ferreira et al. 1998, Escudero et al. 2000a, 2002, Silva Ferreira et al. 2003a). Some of the aldehydes quantified were also found in the naturally oxidized wines, but usually at a lower concentration, probably because of the effect of the temperature applied during forced oxidation in some temperature-dependent reactions such as Maillard reactions. Maillard reactions can explain the formation or increase of most of the compounds related to oxidation. The mechanisms of these reactions can be divided into the Amadori reactions, whose products are formed by cyclization/condensation of the deoxyosones, leading to the generation of compounds such as 5-methylfurfural, 5-hydroxymethylfurfural, and furfural, among others, and the Strecker degradation of amino acids in the presence of dicarbonylic compounds, which forms aldehydes such as phenylacetaldehyde and methional (Oliveira e Silva et al. 2008). The aldehydes analyzed could therefore be considered the main responsible compounds for new aromas perceived in the forced oxidized wines such as honey/molasses, varnish/paint/glue/resin/rubber/solvent, or very ripe fruit/raisin/overripe fruit. The descriptors old-wine/mature wine/evolved wine and cognac/brandy/sherry wine, with similar intensities in naturally and forced oxidized wines, could be particularly linked to the aldehydes vanillin, syringaldehyde, and (*E*)-2-nonenal, also with similar concentrations in both types of oxidation.

These results also confirmed the high concentrations of some compounds in naturally oxidized wines because of wine aging processes, such as ethyl isovalerate or ethyl 2-methylbutyrate, or because of differences in winemaking processes, such as (*Z*)-whiskey lactone and syringaldehyde, compounds that can arise from wood, since two of the naturally oxidized wines were aged wines.

Table 2 Concentrations of the compounds with differences between nonoxidized, forced oxidized, and naturally oxidized wine sets.

| Compounds | Nonoxidized | Forced oxidized | Naturally oxidized |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| 2-Methylpropanal (µg/L) | 14.65 ± 7.88 | 197.7 ± 77.9 | 40.80 ± 19.82 |
| 2-Methylbutanal (µg/L) | 17.13 ± 4.93 | 96.30 ± 26.77 | 28.21 ± 14.36 |
| 3-Methylbutanal (µg/L) | 43.26 ± 10.89 | 252.0 ± 58.5 | 81.44 ± 51.12 |
| 2,3-Butanedione (mg/L) | 2.51 ± 1.10 | 1.50 ± 0.50 | 0.28 ± 0.01 |
| Ethyl 2-methylbutyrate (µg/L) | 1.73 ± 0.10 | 2.14 ± 0.86 | 30.75 ± 22.78 |
| Ethyl isovalerate (µg/L) | 4.51 ± 1.31 | 7.44 ± 3.50 | 49.42 ± 33.66 |
| (Z)-3-Hexenol (mg/L) | 0.16 ± 0.00 | 0.13 ± 0.00 | 0.05 ± 0.01 |
| (E)-2-Octenal (µg/L) | 0.04 ± 0.01 | 0.08 ± 0.05 | 0.04 ± 0.04 |
| Methional (µg/L) | 2.24 ± 0.66 | 83.56 ± 56.78 | 23.91 ± 31.54 |
| Furfural (µg/L) | 8.42 ± 34.00 | 183.7 ± 71.5 | 11.83 ± 2.24 |
| Ethyl 3-hydroxybutyrate(mg/L) | 0.80 ± 0.23 | 0.73 ± 0.26 | 0.30 ± 0.12 |
| 5-Methylfurfural (µg/L) | nd ^a | 10.59 ± 0.40 | 0.90 ± 1.56 |
| (E)-2-Nonenal (µg/L) | 0.28 ± 0.20 | 0.65 ± 0.24 | 0.51 ± 0.18 |
| Phenylacetaldehyde (µg/L) | 8.74 ± 3.07 | 90.18 ± 23.93 | 23.00 ± 10.99 |
| β-Citronellol (µg/L) | 6.59 ± 1.66 | 3.21 ± 0.73 | 1.79 ± 1.69 |
| Hexanoic acid (mg/L) | 3.12 ± 0.80 | 2.80 ± 0.89 | 1.10 ± 0.04 |
| Geraniol (µg/L) | 7.42 ± 2.41 | 1.07 ± 0.50 | 1.87 ± 0.94 |
| Guaiacol (µg/L) | 3.02 ± 2.69 | 9.16 ± 6.76 | 7.56 ± 4.27 |
| (Z)-Whiskey lactone (µg/L) | nd | 2.19 ± 3.10 | 456.2 ± 83.8 |
| <i>o</i> -Cresol (µg/L) | 0.43 ± 0.40 | 0.64 ± 0.10 | 1.39 ± 0.43 |
| 4-Ethylguaiacol (µg/L) | 1.36 ± 1.17 | 0.68 ± 1.17 | 5.28 ± 3.30 |
| Octanoic acid (mg/L) | 1.28 ± 0.13 | 1.63 ± 0.67 | 0.56 ± 0.06 |
| <i>m</i> -Cresol (µg/L) | 0.12 ± 0.13 | 0.20 ± 0.19 | 1.04 ± 0.75 |
| 4-Propylguaiacol (µg/L) | nd | nd | 1.41 ± 1.25 |
| 2,6-Dimethoxyphenol (µg/L) | 1.86 ± 3.22 | 72.74 ± 48.29 | 35.90 ± 12.36 |
| 5-Hydroxymethylfurfural (µg/L) | nd | 89.92 ± 23.03 | 5.77 ± 9.22 |
| Phenylacetic acid (µg/L) | 15.75 ± 10.03 | 18.04 ± 8.40 | 58.91 ± 37.16 |
| Vanillin (µg/L) | 3.99 ± 6.90 | 57.66 ± 11.80 | 59.42 ± 25.75 |
| Syringaldehyde (µg/L) | 6.55 ± 8.48 | 36.62 ± 5179 | 64.66 ± 34.06 |

^and: not detected

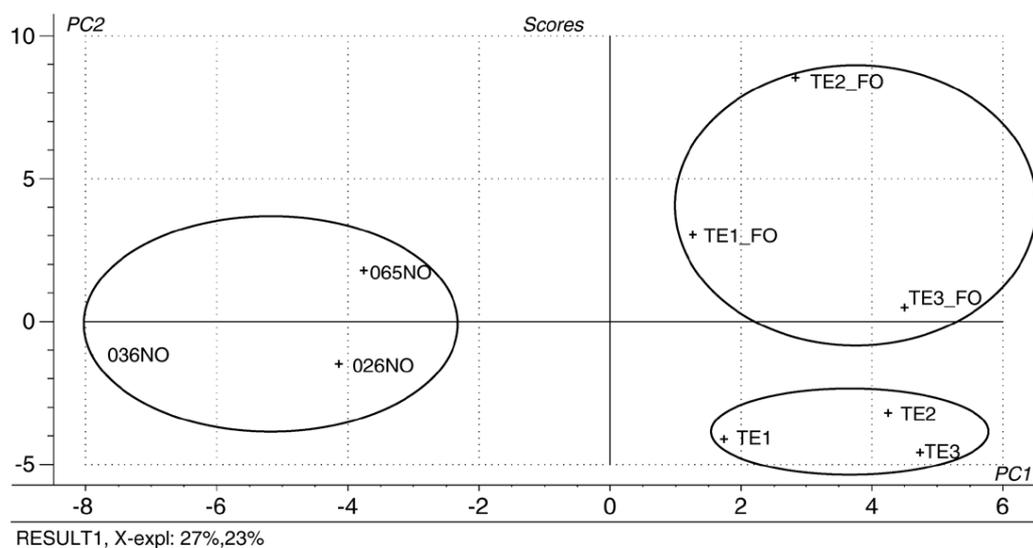


Figure 3 Principal component analysis of the chemical concentration data from nonoxidized, forced oxidized, and naturally oxidized wine sets.

3.5 CONCLUSIONS

Drastic changes in red wine aromatic profiles were observed after forced and natural wine oxidation. Descriptors such as honey/molasses, varnish/paint/glue/resin/rubber/solvent, and very ripe fruit/raisin/overripe fruit increased significantly in intensity after forced oxidation. Information obtained from the olfactometric analysis, together with the quantitative results, showed that the compounds linked to these aromas were mostly aldehydes, agreeing with findings previously obtained with white oxidized wines. Aldehyde concentration increased, especially during forced oxidation processes.

3.6 LITERATURE CITED

- Arnao, M.B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends Food Sci. Tech.* 11:419-421.
- Arroyo, T., J.M. Cabellos, M. Gil, and M. Aznar. 2005. Classification of varietal Spanish wines according to their aroma attributes. *In Recent Highlights in Flavor Chemistry and Biology: Proceedings for the 8th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biology.* T. Hofmann et al. (eds.), pp. 252-254. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Eisenach, Germany.
- Aznar, M., R. López, J.F. Cacho, and V. Ferreira. 2001. Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *J. Agric. Food Chem.* 49:2924-2929.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 28:25-30.
- Cacho, J. 2006. Estudio comparativo del perfil volátil del vino tinto durante su crianza en barricas de roble. *ACE Rev. Enol.* 74 (www.acenologia.com/ciencia76_04.htm).

- Campo, E., V. Ferreira, and J. Cacho. 2005. Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfactometry data. *J. Agric. Food Chem.* 53:5682-5690.
- Campo, E., J. Cacho, and V. Ferreira. 2007. Solid phase extraction, multidimensional gas chromatography mass spectrometry determination of four novel aroma powerful ethyl esters. Assessment of their occurrence and importance in wine and other alcoholic beverages *J. Chromatogr., A* 1140:180-188.
- Culleré, L., J. Cacho, and V. Ferreira. 2007. An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* 55:876-881.
- De Beer, D., E. Joubert, C.A.W. Gelderblom, and M. Manley. 2003. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.* 51:902-909.
- Dravnieks, A. 1985. *Atlas of Odor Character Profiles*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Escudero, A., J. Cacho, and V. Ferreira. 2000a. Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: A gas chromatography-olfactometric study. *Eur. Food Res. Technol.* 211:105-110.
- Escudero, A., P. Hernández-Orte, J. Cacho, and V. Ferreira. 2000b. Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. *J. Agric. Food Chem.* 48:4268-4272.
- Escudero, A., E. Asensio, J. Cacho, and V. Ferreira. 2002. Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chem.* 77:325-331.
- Ferreira, V., A. Escudero, R. López, and J. Cacho. 1998. Analytical characterization of the flavor of oxygen-spoiled wines through the gas-chromatography-ion-trap mass spectrometry of ultratrace odorants: Optimization of conditions. *J. Chromatogr. Sci.* 36:331-339.
- Ferreira, V., M. Aznar, R. López, and J. Cacho. 2001. Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* 49:4818-4824.
- Ferreira, V., L. Culleré, N. Loscos, and J. Cacho. 2006. Critical aspects of the determination of pentafluorobenzyl derivatives of aldehydes by gas

chromatography with electron-capture or mass spectrometric detection. Validation of an optimized strategy for the determination of oxygen-related odor-active aldehydes in wine. *J. Chromatogr.*, A 1122:255-265.

- Ferreira, V., F. San Juan, A. Escudero, L. Culleré, P. Fernández-Zurbano, M.P. Saenz-Navajas, and J. Cacho. 2009. Modeling quality of premium Spanish red wines from gas chromatography-olfactometry data. *J. Agric. Food Chem.* 57:7490-7498.
- Flanzky, C. 2000. Aromas. In *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*, pp. 137-176. AMV and Mundi Prensa, Madrid.
- Genovese, A., P. Piombino, A. Gambuti, and L. Moio. 2009. Simulation of retronasal aroma of white and red wine in a model mouth system. Investigating the influence of saliva on volatile compound concentrations. *Food Chem.* 114:100-107.
- Gómez, E., A. Martínez, J. Laencina, and J.M. López-Roca. 1993. El aroma del vino. *Vitivinicultura* 1-2:40-45.
- Gómez-Míguez, M.J., J. Cacho, V. Ferreira, I.M. Vicario, and F.J. Heredia. 2007. Volatile components of Zalema white wines. *Food Chem.* 100:1464-1473.
- Hofmann, T., P. Münch, and P. Schieberle. 2000. Quantitative model studies on the formation of aroma-active aldehydes and acids by Strecker-type reactions. *J. Agric. Food Chem.* 48:434-440.
- Hofmann, T., and P. Schieberle. 2000. Formation of aroma-active Strecker-aldehydes by a direct oxidation degradation of Amadori compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48:4301-4305.
- Larrauri, J.A., C. Sánchez-Moreno, P. Rupérez, and F. Saura-Calixto. 1999. Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines. *J. Agric. Food Chem.* 47:1603-1606.
- López, R., V. Ferreira, P. Hernández, and J.F. Cacho. 1999. Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: A comparative study. *J. Sci. Food Agric.* 79:1461-1467.
- López, R., M. Aznar, J. Cacho, and V. Ferreira. 2002. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr.*, A 966:167-177.
- Loscos, N., P. Hernández-Orte, J. Cacho, and V. Ferreira. 2007. Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from

nonfloral grape odorless flavor precursors fractions *J. Agric. Food Chem.* 55:6674-6684.

- Lozano, J., J.P. Santos, T. Arroyo, M. Aznar, J.M. Cabellos, M. Gil, and M.C. Horrillo. 2007. Correlating e-nose responses to wine sensorial descriptors and gas chromatography–mass spectrometry profiles using partial least squares regression analysis. *Sens. Actuators, B* 127:267-276.
- Martins, R.C., R. Oliveira, F. Bento, D. Geraldo, V.V. Lopes, P. Guedes de Pinho, C.M. Oliveira, and A.C. Silva Ferreira. 2008. Oxidation management of white wines using cyclic voltammetry and multivariate process monitoring. *J. Agric. Food Chem.* 56:12092-12098.
- Noble, A.C., R.A. Arnold, J. Buechsenstein, E.J. Leach, J.O. Schmidt, and P.M. Stern. 1987. Modification of a standardized system of wine aroma terminology. *Am. J. Enol. Vitic.* 38:143-146.
- Oliveira, C.M., A.C. Silva Ferreira, P. Guedes de Pinho, and T.A. Hogg. 2002. Development of a potentiometric method to measure the resistance to oxidation of white wines and the antioxidant power of their constituents. *J. Agric. Food Chem.* 50:2121-2124.
- Oliveira e Silva, H., P. Guedes de Pinho, B.P. Machado, T. Hogg, J.C. Marques, J.S. Câmara, F. Albuquerque, and A.C. Silva Ferreira. 2008. Impact of forced-aging process on Madeira wine flavor. *J. Agric. Food Chem.* 56:11989-11996.
- Ortega, C., R. López, J. Cacho, and V. Ferreira. 2001. Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *J. Chromatogr., A* 923:205-214.
- Rapp, A., G. Versini, and H. Ullemeyer. 1993. 2-Aminoacetophenon: Verursachende komponente der “Untypischen Alterungsnote” (Naphtalinton, Hybridton) bei Wein. *Vitis* 32:61-62.
- Roberts, D.D., and T.E. Acree. 1996. Effects of heating and cream addition on fresh raspberry aroma using retronasal aroma simulator and gas chromatography olfactometry. *J. Agric. Food Chem.* 44:3919-3925.
- Roujou de Boubée, D. 2003. 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in Grapes and Wine. Analytical, Biological and Agronomical Approach. Thesis, University of Bordeaux, France.

- Salaha, M.I., S. Kallithraka, I. Marmaras, E. Koussissi, and I. Tzourou. 2008. A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *J. Food Comp. Anal.* 21:660-666.
- Silva Ferreira, A.C., P. Guedes de Pinho, P. Rodrigues, and T. Hogg. 2002. Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *J. Agric. Food Chem.* 50:5919-5924.
- Silva Ferreira, A.C., T. Hogg, and P. Guedes de Pinho. 2003a. Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *J. Agric. Food Chem.* 51:1377-1381.
- Silva Ferreira, A.C., C. Oliveira, T. Hogg, and P. Guedes de Pinho. 2003b. Relationship between potentiometric measurements, sensorial analysis and some substances responsible for aroma degradation of white wines. *J. Agric. Food Chem.* 51:4668-4672.
- Tominaga, T., G. Guimbertau, and D. Dubourdieu. 2003. Role of certain volatile thiols in the bouquet of aged champagne wines. *J. Agric. Food Chem.* 51:1016-1020.

Acknowledgments: This work was supported by the Spanish INIA with the project RTA2005-00172. T.B. Lagunero acknowledges the Spanish INIA for her grant. The authors are grateful to the LA AE group, Department of Analytical Chemistry, University of Zaragoza.

Manuscript submitted July 2010, revised Sept 2010, July 2011, accepted Aug 2011.

Copyright © 2011 by the American Society for Enology and Viticulture. All rights reserved.

doi: 10.5344/ajev.2011.10080

CAPITULO 4

EVALUACIÓN DE DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA EVITAR LOS EFECTOS DEGRADATIVOS OXIDATIVOS Y TÉRMICOS EN VINOS TINTOS ECOLÓGICOS

4 EVALUACIÓN DE DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA EVITAR LOS EFECTOS DEGRADATIVOS OXIDATIVOS Y TÉRMICOS EN VINOS TINTOS ECOLÓGICOS. (EVALUATION OF DIFFERENT ALTERNATIVES FOR AVOIDING OXIDATIVE AND THERMAL DEGRADATION EFFECTS IN ECOLOGICAL RED WINE)

Artículo enviado al:

Journal of Agricultural and Food Chemistry

Ver ANEXO 2: ENSAYOS PRELIMINARES NECESARIOS PARA EL DESARROLLO DEL CAPITULO 4.

Tania Balboa-Lagunero, Margarita Aznar and António César Silva Ferreira

RESUMEN:

Los vinos ecológicos son susceptibles a la degradación oxidativa debido a las restricciones establecidas durante su elaboración. Este trabajo estudia la influencia de las diferentes rutas químicas, debidas a los procesos térmicos y de oxidación, en el perfil aromático del vino y en la aparición de notas de oxidación. Se ha evaluado la resistencia a dichos procesos después de la adición de los compuestos con presunta capacidad antioxidante: ácido ascórbico, resveratrol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), dióxido de azufre (SO₂) y los polifenoles: ácido gálico, epicatequina y ácido cafeico. Se llevaron a cabo análisis del estado oxidativo mediante voltametría cíclica, de la composición aromática mediante GC-MS y análisis sensoriales; con la obtención de interesantes diferencias en función del tratamiento aplicado. Todas las muestras dieron una señal de voltametría característica, mostrando una notable disminución en la intensidad de corriente en aquellas que habían sufrido una degradación más profunda. En cuanto a los resultados del análisis químico, la aplicación del quelante de metales EDTA fue la alternativa más eficiente a la utilización de SO₂ para reducir parcialmente el efecto oxidativo; confirmando a su vez, la implicación de ciertos metales en los procesos de oxidación. Los niveles de *cis/trans*-5-hidroxi-2-metil-1,3-dioxano y

cis/trans-4-hidroximetil-2-metil-1,3-dioxolano pudieron ser parcialmente limitados por el tratamiento de SO₂; pero también, en menor grado, por los tratamientos de polifenoles y EDTA. Este último compuesto fue el más eficaz limitando el aumento en la concentración de compuestos relacionados con la oxidación, tales como metional y benzaldehído. Las muestras tratadas con SO₂ mostraron los mejores resultados desde un punto de vista sensorial.

4.1 ABSTRACT

Organic wines are prone to suffer from oxidative degradation due to some of the restrictions that must be fulfilled during its winemaking. This work firstly studied the influence of different chemical routes, related to thermal and oxidative processes, on the wine aromatic profile and on the apparition of oxidation notes. It was also evaluated how the addition of compounds with a presumably antioxidant capacity could reduce these processes. Ascorbic acid, resveratrol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sulfur dioxide (SO₂) and the polyphenols: gallic acid, epicatechin and caffeic acid, were tested. The oxidative estate of the wines was analyzed by cyclic voltammetry and the volatiles analysis was performed by GC-MS. Sensory analyses were also performed in order to evaluate the changes in wines aroma profiles. Results showed interesting differences depending on the applied treatment. All wine samples gave a characteristic voltammetry profile, showing a remarkable decrease in the current intensity on those samples that suffer a deeper degradation. Regarding the chemical analysis, results showed that the application of the metal chelator EDTA was the most efficient alternative to the use of SO₂ to partially reduce the oxidation effects; confirming in turn the involvement of certain metals on the oxidation processes. The levels of *cis/trans*-5-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxane and *cis/trans*-4-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-dioxolane, can be partly limited with SO₂, but also, to a lesser extent, by the polyphenols and EDTA treatments. This last compound was the most efficient, by limiting the concentration of oxidation related compounds such as methional and benzaldehyde. Sensory analysis showed the best results for those samples treated with SO₂.

KEYWORDS: antioxidant capacity; ascorbic acid; resveratrol; EDTA; SO₂; polyphenols; cyclic voltammetry; wine aroma; oxidation

4.2 INTRODUCTION

Oxidative degradation affects the final colour and aroma of wine, producing negative effects on its quality. The susceptibility for the development of the oxidative spoilage is related to three factors: the wine's redox potential, the dissolved oxygen concentration and the type and concentration of intrinsic and added antioxidants (1). The first step in the chemical oxidation of wine is the oxidation of polyphenols (2). Among these polyphenols, those containing an ortho-diphenol (catechol) group; such as caffeic acid and its esters, catechin, epicatechin, anthocyanins and their derivatives and also other phenols such as gallic acid with a triphenol group, are the most prone to oxidation (3). The oxidative process can be abridged as the oxidation of , *o*-diphenols to *o*-quinines, producing semi-quinone free radicals, while oxygen is initially reduced to hydrogen peroxide, mediated by redox cycling of $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (4, 5).

Most of the research about wine oxidation has been performed on white wines (1, 6-10), as they are more prone to experience oxidation reactions; mainly due to their lower content in phenolic compounds. In the case of organic wines, this susceptibility to oxidation is more significant, as there are important restrictions during the wine making, such as the limitations in the SO_2 levels that can be employed, broadening the problem to both, white and red wines.

Addition of SO_2 has become practically essential during the winemaking process in wineries all around the world. This compound is employed as a preservative due to its important antiseptic and antioxidant properties (11) and at the same time, it is the most widely used chemical to prevent wine from browning (3). Since it has the capacity to join to carbonyl compounds and form non-volatile bisulfite adducts, the apparition of undesirable sensory properties will be avoided (12). All these characteristics make that nowadays, there is no other substance or treatment that can entirely substitute the use of SO_2 (13). Nevertheless, because of its potential health problems, possible allergic reactions to sulphites (14, 15) and the general increasing suspicious of food additives; there is a common tendency to progressively decrease the maximum authorised levels in musts and wines of this preservative and to pursuit other non-toxic substances with antimicrobial and antioxidant properties (16-18).

In this work, the evolution of an ecological red wine kept under spoilage conditions and subjected to different antioxidative treatments was studied. Compounds with widely known properties for preventing oxidation processes, such as ascorbic acid, SO₂, and some polyphenols (5, 19-21), were tested; together with the phytoalexin resveratrol and the metal chelator EDTA. A combination of ascorbic acid and resveratrol was as well incorporated as an experimental treatment. Ascorbic acid antioxidative properties are based on its ability to remove molecular oxygen from the media, and also, due to its reducing character, it can reduce, in a similar manner to SO₂, the quinones back to phenols (19, 21). EDTA was chosen in the present study because it is a powerful metal chelator with antioxidant proved effects and neutral flavour; which according to the literature prevents changes in colour, rancidity and texture of foodstuff; it stabilizes vitamins and avoids that metals present in food can be harmful for the final products (22, 23). Resveratrol was as well studied because its potential antioxidant properties; it effectively scavenges free radicals and other oxidants (24) and inhibits low density lipoprotein (LDL) oxidation (25, 26).

The oxidative state was evaluated in all the samples by cyclic voltammetry. This technique has been recently incorporated for studying the resistance to oxidation of white wines (9, 27-29); considering its future application for monitoring aging processes and characterizing wines by their antioxidant protection. Voltammetry enables grouping information that concerns antioxidants both, in a quantitative and a qualitative way. The most easily oxidized compounds are detected at lower potentials while less reactive compounds will be noticed at higher voltages. White wine voltammograms of non diluted samples show two different bands from the electrochemical oxidation of the wine. The first one had a potential at around 0.7 V that corresponds to the more easily oxidizable compounds and a second band, close to 1.0 V, which is related to the less easily oxidizable compounds (10). Therefore, it can be assumed that when two wines show similar magnitudes at these voltages, they will contain similar concentrations of these less or more readable oxidizable compounds. Some first results have also been published about the use of cyclic voltammetry in red wines. The general information obtained from the voltammogram of red wines is very similar to the white wines voltammogram. Low potentials of diluted red wines (voltage range between 0.25 and 0.5 V) were related to the phenolic antioxidants with low formal potentials (*ortho*-diphenols mainly) and ascorbic acid and at a higher voltages

(voltage interval between 0.7 and 1.0 V), the signal was related to harder-to-oxidize functional groups such as vanillic or *p*-coumaric acids and to the second oxidation of the flavonoids present in the wine. But, unlike white wines, there was an intermediate peak at around 0.65 V that was correlated to the malvidin anthocyanins present in red wines. Malvin, a compound with the same phenolic backbone as the malvidins, some non-flavonoid polyphenols as resveratrol and the hydroxycinnamic acids: caffeic and ferulic acids, also contributed to this peak potential between 0.6 and 0.7 (27). In conclusion, each type and concentration of a compound that has antioxidant activity will show a different voltammetric oxidation curve (10).

The main aim of this work was to study the evolution of an organic red wine during spoilage conditions and to determine if the addition of specific compounds with a presumably antioxidant capacity could influence the final oxidative level, aromatic profiles and sensorial characteristics. This would allow obtaining alternatives to the use of sulfur dioxide; and therefore, improving organic wines aromatic quality.

4.3 MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All the reagents used were analytical quality. Chemicals and standards were obtained from Sigma-Aldrich (high purity grade, >99.0%); except for dichlorometane, anhydrous sodium sulphate, tartaric acid, sodium hydroxide and ethanol that were purchased from Merck, Darmstadt, Germany.

Wine. Spanish young red wine: *Viña Bosquera 2007* of the Denomination of Origin (D.O.) “Vinos de Madrid”. It was elaborated with Tempranillo variety ecological crops.

Forced wine aging protocol and preparation of wine samples. The programs used for the forced aging protocol were a thermal program (T) and a thermal and aeration (T & O₂) program. The thermal program was as follows: initial incubating temperature was set at 60°C and samples were kept at this temperature for the first day of the protocol; afterwards temperature was set at 50°C during 3 days and finally it was set at 40°C for another 4 days. In the thermal and aeration program, samples were oxygenated to a saturation level at the beginning of the experiment at 6.8 mg/L O₂ before being submitted to the thermal program. In addition, at each sampling time, the samples were

resaturated with oxygen. The concentration of dissolved oxygen was measured using an YSI-5010 oxygen probe.

First, 18 bottles of 750 mL of the wine selected were mixed homogeneously. One aliquot of 1L was kept as reference of “non spoiled wine” and it was bottled under an inert atmosphere of nitrogen at room temperature. Two aliquots of 1.5L were kept in 2.5L closed amber bottles and were submitted to a thermal program and a thermal and aeration program respectively. Six aliquots of 1.5L were added with different antioxidant treatments and kept in 2.5L closed amber bottles for being submitted to the thermal and aeration program (antioxidants treatments and sample codes are shown in Table 1).

Samples were stored in the dark during the whole protocol. Sampling times were at 0, 1, 4 and 8 days (t0, t1, t4 and t8) of the spoilage period.

Table 1: Codes of samples submitted to the different degradation treatments, samples composition, degradation treatments applied and remarks.

| Sample code | Sample composition | Degradation treatment* | Remarks |
|-------------|---|------------------------|---|
| REF | Wine | None | Sample used as reference |
| CT | Wine | T | Sample used as temperature control |
| CTO2 | Wine | T & O ₂ | Sample used as temperature & O ₂ control |
| AA | Wine + ascorbic acid 0.5 mM (88.065 mg/L) | T & O ₂ | Value of ascorbic acid under the European Union legal limit of 100 mg/L |
| RS | Wine + resveratrol (7.5 mg/L) | T & O ₂ | Concentration five times higher its average concentration in wines |
| AARS | Wine + ascorbic acid 0.5 mM (88.065 mg/L) + resveratrol (7.5 mg/L) | T & O ₂ | - |
| SO2 | Wine + free SO ₂ (50 mg/L) | T & O ₂ | Added as sodium metabisulfite |
| EDTA | Wine + EDTA (500 mg/L) | T & O ₂ | Quantity in excess necessary to chelate ion metals with +2 and +3 charges that were present in the wine |
| PPHE | Wine + gallic acid (475 mg/L) + caffeic acid (50 mg/L) and epicatechin (400 mg/L) | T & O ₂ | Concentrations five times higher their average concentrations in wines |

*T: Thermal program ; T & O₂: Thermal and aeration program.

Voltammetry. Cyclic voltammetry experiments were performed using a potentiostat (Autolab type PGSTAT30, Ecochemie) controlled by the GPES 4.9 software provided

by Ecochemie. Voltammograms were obtained in the oxidation range of potentials (between ca. 0.2 and 1.2 V) at a scan rate of 100 mV/s using a 3 mm glassy carbon disk (BAS M-2012) working electrode. The electrode surface was cleaned between runs by polishing with 3 μ m alumina powder (PK-4 polishing kit) for 2 min between scans. The saturated calomel electrode (SCE) was used as reference electrode in combination with a platinum counter electrode.

Voltammetry preliminary experiments: Preliminary experiments were performed in order to evaluate the differences in the voltammetry response among the following compounds: ascorbic, caffeic, gallic, ferulic and α -lipoic acids, catequin, epicatequin, EDTA, resveratrol and potassium ferrocyanide. All of them gave a characteristic voltammetry signal. Calibration curves were obtained for each compound in synthetic wine solution and in a real red wine. The voltage at which the highest current intensity was obtained for the oxidation cycle was plotted versus each compound concentration. Dilution and pH tests were also performed to establish the best working conditions; which were a 1:10 wine dilution in a hydroalcoholic solution adjusted at pH 3.4. Different red wines without any addition of chemical compounds and from diverse wineries were analyzed as well by voltammetry to establish the average pattern for non-spoiled red wines.

The reference wine sample and all the samples from the different treatments taken at the different times (from t0 to t8 days) were submitted to a voltammetry analysis. Wine samples were diluted with synthetic wine at a 1:10 proportion. The synthetic solution consisted of 12% ethanol (v/v), 0.033 M tartaric acid and pH 3.4 was adjusted with a NaOH solution. Wine samples were analyzed directly without the addition of any supporting electrolyte. Deoxygenation was not carried out in samples prior to the voltammogram measurements, as the oxygen in forced aged samples did not interfere with the voltammetric signal (28). At least five determinations were performed for each sample and the data for the representations and statistical analysis was obtained from the average of the determinations obtained.

Volatile analysis. Two analyses were performed in all the samples, including the reference wine sample and all the samples from the different treatments taken at the different times (from t0 to t8 days):

- *Liquid-liquid extraction – gas chromatography-mass spectrometric detection (GC-MS)*. The extraction procedure, as well as the analysis methodology, was selected from the literature (30). Samples were analyzed using a Varian CP-3800 gas chromatograph equipped with a Varian Saturn 2000 mass selective detector and a Saturn GC/MS workstation software version 5.51 (Varian, Sunnyvale, CA, USA). The column used was Stabilwax-Da (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) fused silica (Restek, USA). The carrier gas was helium C-60 (Gasin, Portugal), at 1 mL/min, constant flow. The oven temperature program was 40 °C (for 1 min), then increased at 2 °C/min to 220 °C and held for 30 min. The acquisition was performed in SCAN mode (mass range between 33-350 m/z), with a scan rate of 6 scans. The injection was splitless and the injection volume was 1 µL. Identification was attempted using mass spectra obtained from the sample with those from pure standards injected in the same conditions, by comparison of the Kovat's index and the mass spectra present in the NIST 2000 MS Library Database or in the literature. A quantification analysis was performed for the following compounds: (Z)-3-hexenol, methional, furfural, benzaldehyde, linalool, 5-methyl-2-furfural, phenylacetadehyde and guaiacol. The results for the rest of the 95 detected compounds were interpreted by a comparison of normalized areas.

- *Solid phase microextraction (SPME) – GC-MS*. The volatile analysis was performed by direct SPME sampling and injection into the GC-MS system. The whole methodology was based on that described in the literature (31) and the system and the column was the same as the one previously reported for the liquid-liquid extraction - GC-MS analysis. The fiber used was a CarboxenTM/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, Pa., U.S.A.) fiber, 75 µm. The following modifications in the sampling method and the oven program were applied: the water-bath incubation temperature was 40°C and the headspace sampling time was 5 minutes. The oven program was as follows 40 °C (for 1 min); then it was increased at 3 °C/min to 220 °C and held for 5 min. Results of the 19 detected compounds were interpreted by a comparison of normalized areas.

Sensory analysis. The analyses were performed by a total of 8 trained judges (4 women and 4 men) with a long experience in sensory analysis. All samples (20 mL at 20°C)

were coded with three-digit random numbers and presented in black tulip-shaped wine glasses covered by glass Petri dishes. Two sensory analyses were performed:

- *First sensory analysis:* The analysis was performed at each spoilage time (t1, t4 and t8) separately. The panel was asked to establish for each group of samples the level of similarity in a 0 (equal) to 10 (very dissimilar) continuous scale, of each sample to the “T & O₂” control sample. One repetition of the control sample was also included and free descriptions of the wines were allowed.

- *Second sensory analysis:* In a second session, the comparison was established between a 10-year-old Porto wine and all the samples included at the three sampling times, following the same methodology as in the first sensory analysis.

SO₂ measurement. The amount of free SO₂ was determined according to the Ripper method (32). All samples that had the initial addition of SO₂ were subjected to a SO₂ analysis along the experiment to check the evolution of this compound.

Statistical analysis. Principal Components Analyses (PCA) were carried out with the software *The Unscrambler* v.9.6 (CAMO Software, Asa, Norway).

4.4 RESULTS AND DISCUSSION

Voltammetry analysis. Figure 1 shows the voltammetry profile collected for the three cycles recorded of a diluted red wine sample. As it can be observed, most of the information is obtained from the first cycle of oxidation (forward scan) and the reverse reduction (reverse scan). Two different bands can be observed from the electrochemical oxidation of the wine. The first one had a potential at around 0.7 V that, as it is mentioned in the literature, corresponds to the more easily oxidizable compounds; and a second band at a higher voltage, which is related to the less easily oxidizable compounds (10).

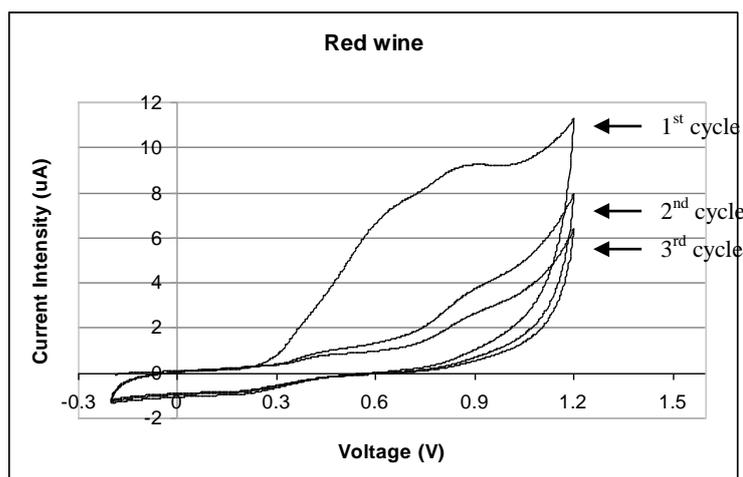


Figure 1. Cyclic voltammogram of a red wine (1:10 dilution of wine in synthetic wine solution).

Figure 2 shows the voltammograms of the ecological red wine at t0 (REF) and the wine samples acquired at different times of the accelerated spoilage period (t0, t1, t4 and t8); after being submitted to the thermal program (T) (figure 2A) or the thermal and aeration program (T & O₂). One important observation of the present study was the decrease in the voltammetry intensity when the wine suffered degradation, especially in the presence of oxygen. Samples that were only submitted to the thermal program (but not to the aeration), showed a decreased in the intensity only during the first 24 hours; on the other hand, samples submitted to the temperature and aeration programs showed a decrease in the intensity during all the study (Figure 2B). This gradual decrease in the intensity of the mentioned voltage bands in the voltammograms had been previously reported in white wines submitted to an accelerated spoilage (28). This indicated a decrease in the concentration of the species oxidized at these potential ranges.

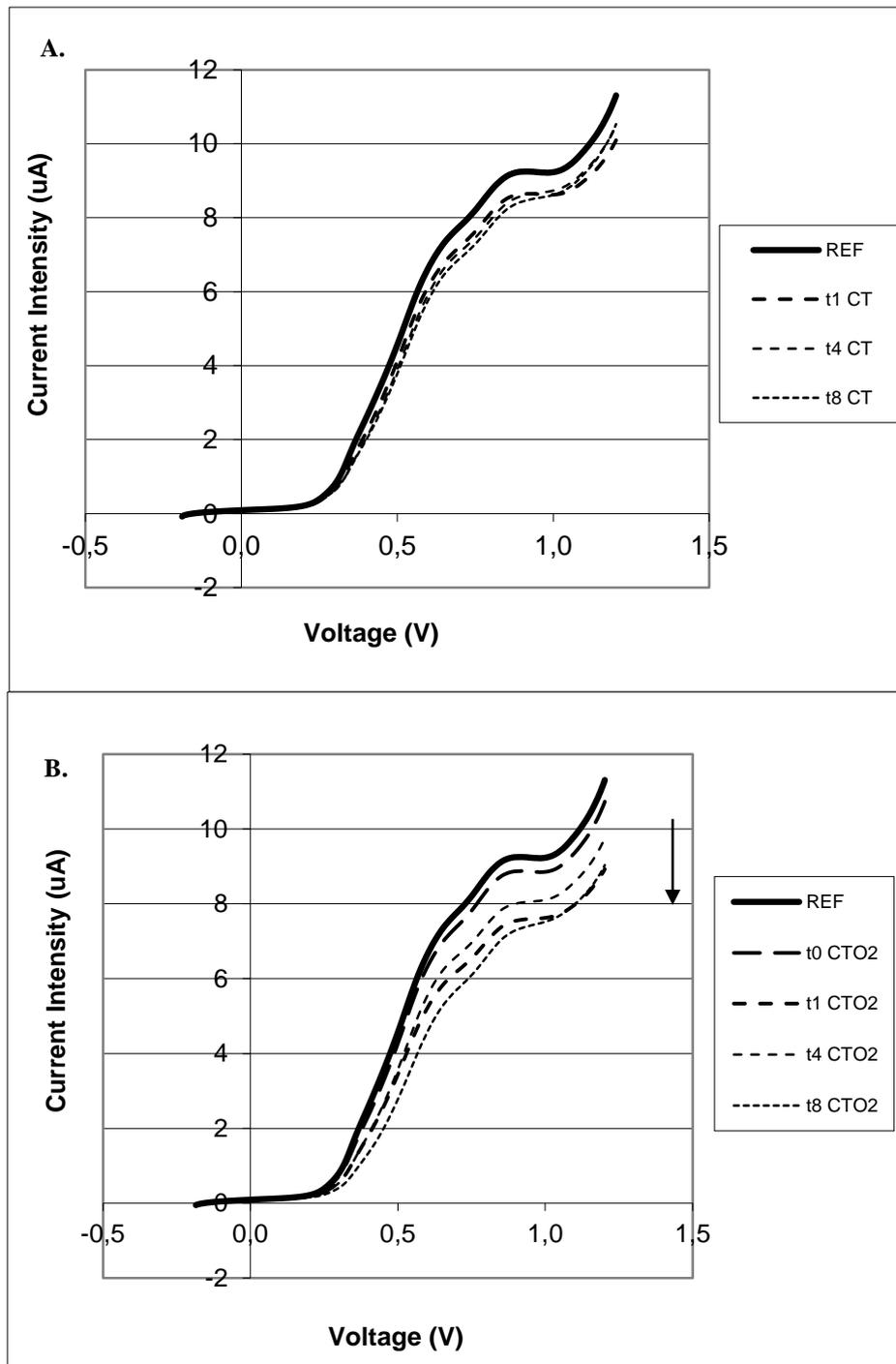


Figure 2. Forward scan of the voltammograms of the ecological red wine control at t0 (REF) and the wine samples acquired at different times of the accelerated spoilage period (t0, t1, t4 and t8). A: Samples submitted to the thermal program (CT) and B: Samples submitted to the thermal and aeration program (CTO2).

Figure 3 shows the comparison of the average voltammograms among the sample used as reference (REF), the sample used as temperature & O₂ control (CTO₂) and the wine samples with the different treatments (AA, RS, AARS, SO₂, EDTA,

PPHE) at different times. When all the samples were compared at t_0 , the most remarkable observation was that those samples where the polyphenols have been added as antioxidant treatment (PPHE), showed significantly higher intensities from 0.42 V onwards compared to the rest of the samples. As it was observed in previous experiments, polyphenol oxidation to a quinone gave rise to the anodic (positive) peak on the forward scan of the cyclic voltammograms, while reduction of the quinone back to the polyphenol produced the cathodic (negative current) peak on the reverse scan (29).

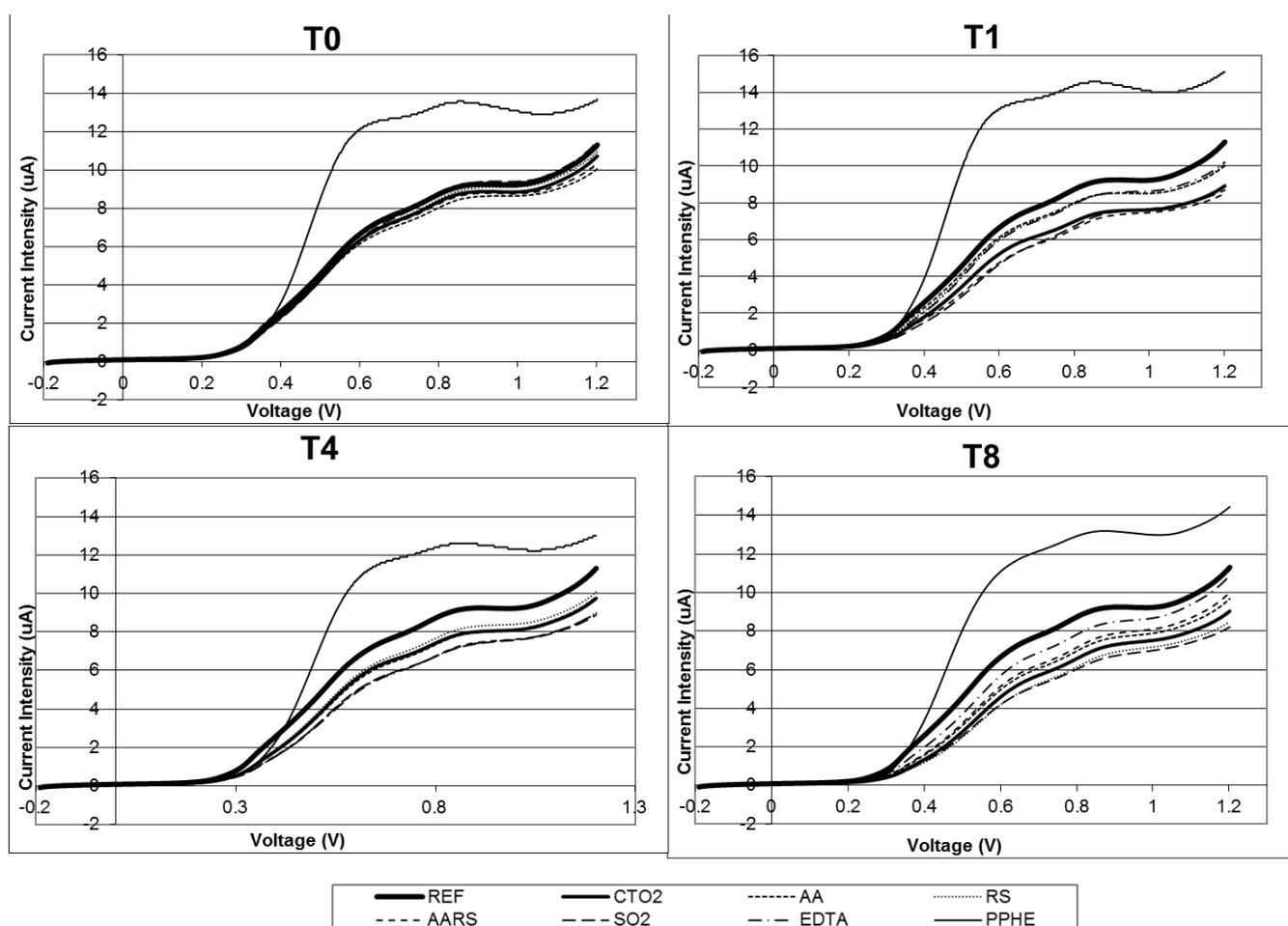


Figure 3. Forward scan of the voltammograms of the reference wine (REF) and the different treatments samples at t_0 , t_1 , t_4 and t_8 . Treatments are named as follows: T Control: “CT”, T & O₂ Control: “CT02”, Ascorbic acid: “AA”, Resveratrol: “RS”, Ascorbic acid + Resveratrol: “AARS”, SO₂: “SO₂”, EDTA: “EDTA” and Polyphenols: “PPHE”.

The deviation showed in figure 3 was expected, as it has been previously reported; the voltage interval between 0.4 and 0.6 represents the most powerful reducing

agents of the wine; which are, apart from ascorbic acid and SO₂ (present to some extent in all samples), polyphenols with a triphenol group on the flavonid B-ring (10). The three polyphenols tested contained an easily oxidizable *ortho*-diphenol group that is the responsible of the increase in the signal in the rage of voltage between 0.36 and 0.42. Furthermore, these type of polyphenols have the characteristic of showing a second oxidation process at potential values close to 0.8 V, differing from other phenolic compounds. For instance, the increase in the voltammogram signal of a sample with epicatechin is due to the *meta*-diphenol groups on the A-ring; but for gallic acid the appearance of this band is due to a third phenol group adjacent to the *ortho*-diphenol already oxidized (27). The same behaviour was also observed at t1, t4 and t8, which reflected that the PPHE treatment, from a theoretical voltammographic point of view, was the most effective in the enhancement of wine antioxidative state.

The treatment with resveratrol alone (RESV) also showed a higher signal intensity than the sample used as temperature & O₂ control (CTO₂) during the spoilage times t1 and t4, which reflected that also the addition of resveratrol improved the wine antioxidative state. A clear pattern along the time was not found with the rest of the treatments.

Due to the complexity of the data obtained by voltametry analysis, a principal component analysis (PCA) was performed using the first oxidation-reduction curve as a voltammetric fingerprinting, in order to classify the oxidation status. Figure 4 displays the score plot combining PC1 & PC2 showing a high value of explained variance (99%) which demonstrates that the electrochemical features are different in samples and that the sensor is able to captured those characteristics. Results from the PCA confirmed that all samples with the polyphenols treatment were grouped separately from the rest of the treatment samples and controls. This treatment seemed to have a remarkable effect on the oxidative state of the wine.

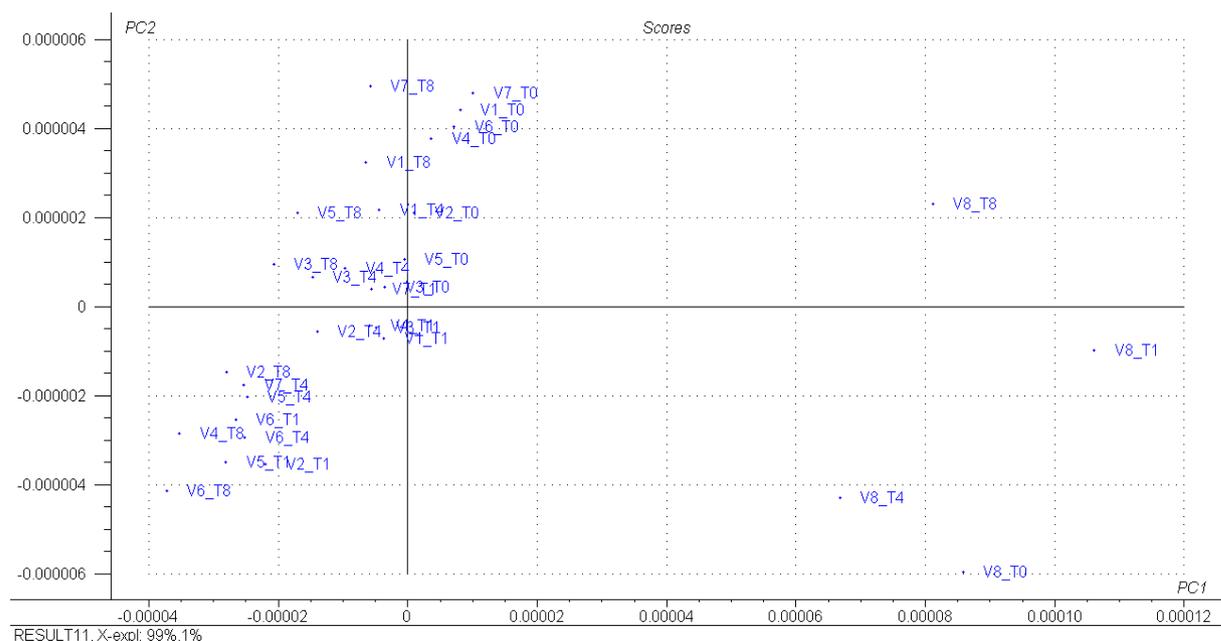


Figure 4. PCA from the voltammograms data from the average of the first oxidation-reduction cycle of the repetitions from each sample. Times studied: 0, 1, 4 and 8 days. Treatments coded as: V1: CT, V2: CTO2, V3: AA, V4: RS, V5: AARS, V6: SO2, V7: EDTA and V8: PPHE.

Volatiles analysis. The samples were analyzed following the methodologies described in the Materials and Methods section at the four times of the spoilage period (t0, t1, t4 and t8). One of the extraction methods used was the SPME; this technique has some advantages compared with traditional sample preparation, as being environmentally friendly, faster than classic extraction techniques as liquid-liquid extraction, steam distillation or solid phase extraction (SPE), solvent free or requiring less sample volume, among others (33, 34). Nevertheless, in this study it was obtained more information from the liquid-liquid extraction than from the SPME extraction samples. After the liquid-liquid - GC-MS analysis of the samples, a total of 103 compounds were detected; which included those considered relevant from the SPME analysis. The most remarkable volatiles, due to their behaviour along the experimental time, are shown in figures 5 and 6. Methional, furfural, benzaldehyde, 5-methyl-2-furfural and phenylacetadehyde increased in all the samples during the spoilage period, especially after the fourth day. These compounds have been previously reported as compounds typically present in aged and oxidized white wines and responsible of oxidation notes, such as “honey-like”, “boiled potato”, “cooked vegetable”, “cider”, “liquorice” or “farm feed” (6, 8, 30, 35, 36). In addition, guaiacol is a typically oak maturation-related

compound (37) that has been correlated with a toasted odor nuance (38); in this study its concentration has increased along the spoilage period of a young red wine even though the wine did not have any contact with wood. Nevertheless, guaiacol levels did not rise as much as the other mentioned compounds.

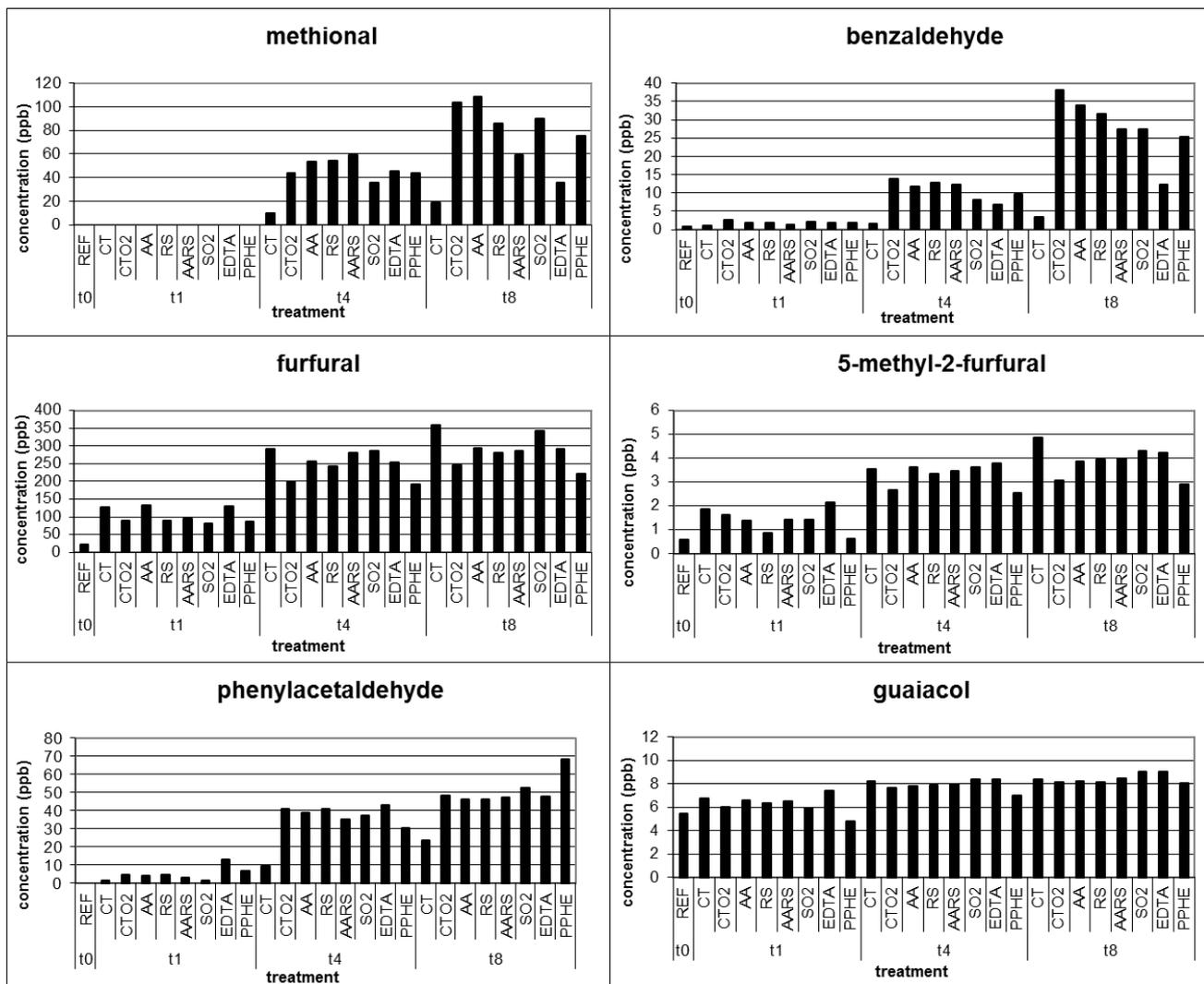


Figure 5. Evolution of the concentration of methional, furfural, benzaldehyde, 5-methyl-2-furfural, phenylacetaldehyde and guaiacol from t0 to t8 days. The different treatments are named as follows: Reference wine at t0: “REF”, T Control: “CT”, T & O₂ Control: “CTO2”, Ascorbic acid: “AA”, Resveratrol: “RS”, Ascorbic acid + Resveratrol: “AARS”, SO₂: “SO₂”, EDTA: “EDTA” and Polyphenols: “PPHE”.

The concentrations of the compounds shown in figure 5 increased due to thermal reactions (CT Control group); although concentrations of methional, benzaldehyde and phenylacetaldehyde were as well highly dependent on the presence of oxygen in the

medium, suffering a significant increase in all the aerated wine samples (CTO₂ and the six treatment groups). Taking into account the different treatments applied, the combination of ascorbic acid with resveratrol and EDTA limited part of the increase with time of methional and the SO₂, EDTA and polyphenols treatments could prevent as well partially an increase in the benzaldehyde concentration. In both cases, the EDTA treatment was the most powerful one, partly avoiding the rise in the concentration of these oxidation related compounds. In the case of phenylacetaldehyde none of the treatments could avoid its intensification after such a strong thermal and oxidative degradation action; but at the beginning of the spoilage action (t1 day), SO₂ could still make some palliative action.

There are four important compounds that are formed because of the condensation reaction between glycerol and acetaldehyde under acid conditions. These compounds are: *cis*- and *trans*-5-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxane and *cis*- and *trans*-4-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-dioxolane; which contribute to the old Port wine aroma. As it can be observed in figure 6 these compounds increase greatly along the spoilage protocol. It can be stated that this increase is mainly due to the oxygenation; as the temperature controls did not suffer this significant increase. The levels of both types of compounds (*cis/trans*-5-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxane and *cis/trans*-4-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-dioxolane) can be partly limited with SO₂, as it was suggested by Silva Ferreira *et al.* (39); but also, to a lesser extent, by the EDTA and polyphenols treatments. On the contrary, the treatments including the addition of ascorbic acid seem to enhance the increase of these compounds in the wine. As it was described by Bradshaw *et al.* (19), under oxygen-rich conditions, ascorbic acid will quickly oxidize, producing hydrogen peroxide, which will generate the powerful oxidants hydroxyl radicals in the presence of ferrous ions via the Fenton reaction (5, 12, 40). These hydroxyl radicals will react with ethanol producing acetaldehyde (3, 12); which content is going to be a key factor in the formation of the mentioned *cis/trans*-5-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxane and *cis/trans*-4-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-dioxolane. Acetaldehyde in wine is not only be produced by the coupled auto-oxidation of ethanol and phenolic compounds, but also by yeasts and acetic acid bacteria (41). A lower formation of *cis/trans*-5-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxane and *cis/trans*-4-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-dioxolane in those samples with the SO₂ treatment, is due to the combining action of SO₂ with the acetaldehyde, obstructing therefore the acetalization

reaction, leaving acetaldehyde-bisulfite compounds that cannot react with glycerol to give acetals (39). On the other hand, EDTA bases its antioxidative mechanism in wines on chelation of transition metals implicated in the redox reactions, especially iron and copper (22). The observation that cyclic acetals from glycerol and ethanal are found in lower concentration on samples with EDTA additions, highlights the role of metals on the wine oxidation mechanism and suggests a potential path to modulate the extension process. Therefore, in the wine from the present study, EDTA might chelate the metal ions that mediate the oxidation of polyphenols to semiquinone radicals and benzoquinones and also might directly form complexes with the ferrous ions responsible for the Fenton reactions. In both ways, the formation of aldehydes and especially of acetaldehyde, which is the major aldehyde in wine, will be reduced with the consequent decrease of *cis/trans*-5-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxane and *cis/trans*-4-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-dioxolane formation that, as it was previously mentioned, are formed by the condensation reaction between glycerol and acetaldehyde.

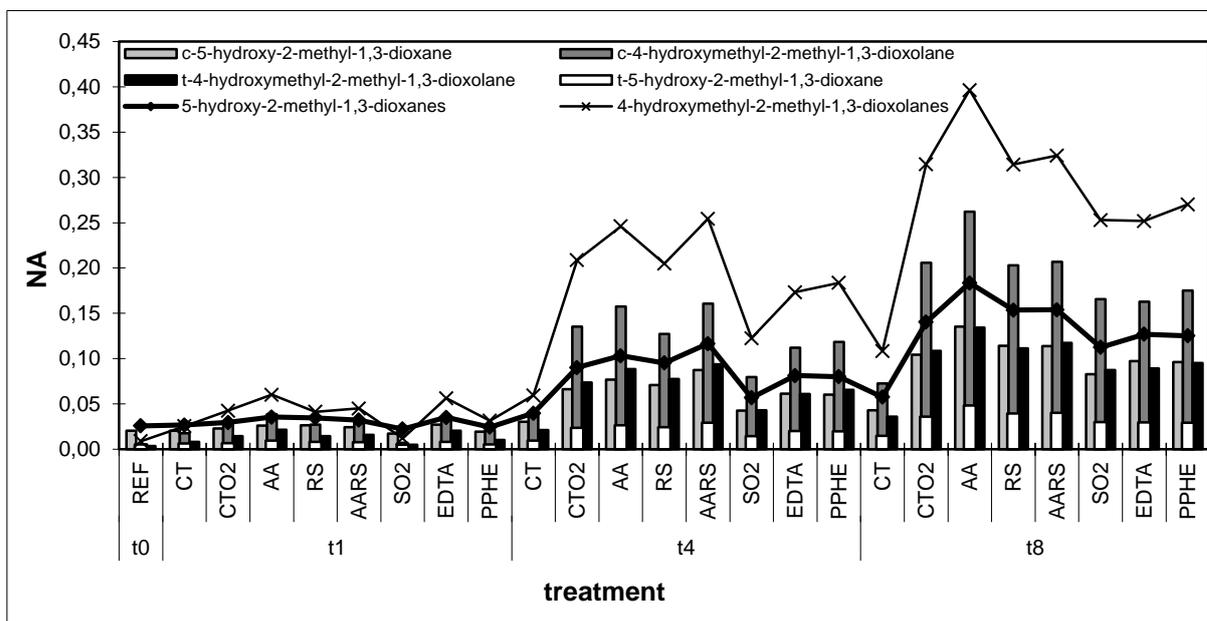


Figure 6. Evolution of *cis*- and *trans*-5-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxane and *cis*- and *trans*-4-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-dioxolane from t0 to t8 days (column graph). Evolution of both 5-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxanes and 4-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-dioxolanes from t0 to t8 days (line graph). NA: normalized area. The different treatments are named as follows: Reference wine at t0: “REF”, T Control: “CT”, T & O₂ Control: “CTO2”, Ascorbic acid: “AA”, Resveratrol: “RS”, Ascorbic acid + Resveratrol: “AARS”, SO₂: “SO2”, EDTA: “EDTA” and Polyphenols: “PPHE”.

A principal components analysis (PCA) with the quantification data of all the samples taken along the experiment is shown in figure 7. Initial control wine coded as: T0_V1 (REF sample: the least evolved sample) is highlighted with a black ellipse. Wine after the temperature and oxygen degradation period without a treatment: T8_V2 (supposedly the most evolved sample) is highlighted with a red ellipse. PCA results showed a good sample grouping depending on the evolution state. The least evolved sample (T0_V1) showed the lowest values of the PC1, followed by the samples taken at 1, 4 and the 8 days; this last ones with the highest values of PC1, which corresponds with aldehyde compounds such as: methional, furfural, 5-methyl-2-furfural, benzaldehyde and phenylacetaldehyde and the heterocyclic acetals *cis/trans*-5-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxane and *cis/trans*-4-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-dioxolane. Control samples that were not submitted to the aeration process, which followed only the thermal program, suffered a significant less degradation. After 8 days SO₂ (V6), EDTA (V7) and polyphenols (V8) treatments samples grouped together; showing a slightly lower evolution compared with the control sample submitted to the whole oxygen and thermal process without any treatment (T & O₂ Control: T8_V2). Conversely, resveratrol (V4), ascorbic acid (V3) and ascorbic acid + resveratrol (V5) treatments samples, grouped closer to this control sampler. The two treatments including ascorbic acid were further shifted into a deeper evolution state; meaning that ascorbic acid acted as a pro-oxidant instead of an antioxidant.

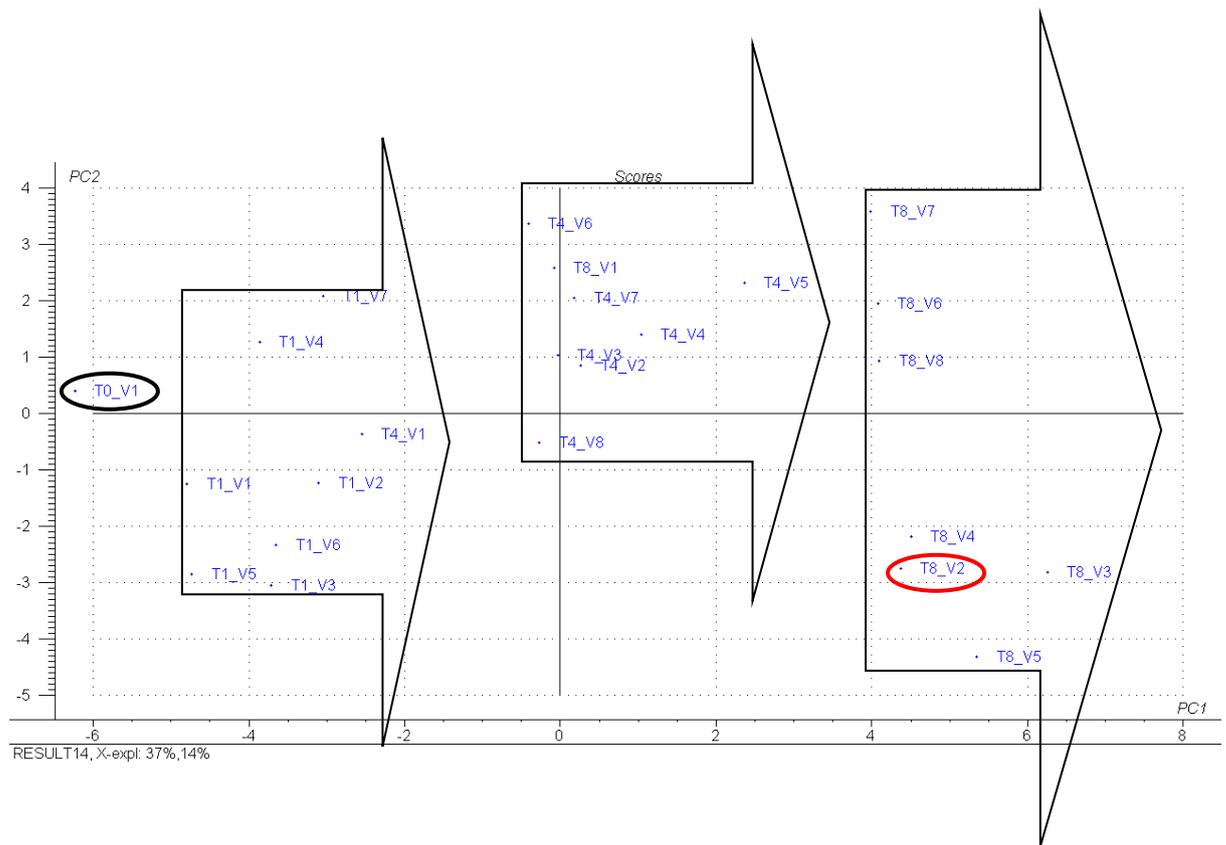


Figure 7. PCA from the quantification analysis data. Times studied: 0, 1, 4 and 8 days. Treatments coded as: V1: CT, V2: CTO2, V3: AA, V4: RS, V5: AARS, V6: SO₂, V7: EDTA and V8: PPHE.

Sensory analysis. The results from the first sensory test, in which samples were divided in 3 time groups, are shown in figure 8. The figure represents the level of similarity between each sample and the CTO₂ sample (T & O₂ Control) at times t1, t4 and t8. Low values indicate higher similarity with respect to this CTO₂ sample and high values show less similarity to the mentioned control sample. At all the times studied, the SO₂ and polyphenols treatments were the most different ones with respect to the CTO₂. CTO₂ would represent the most spoiled sampled, as it did not have any protective treatment. The ascorbic acid, resveratrol, ascorbic acid + resveratrol and the EDTA samples had a similar general odour between them and with respect to the CTO₂ sample. But with time, this similarity was shorten and at times 4 and 8 days of the degradation period all these samples only differed in 1.0 and 1.5 units between them, respectively; showing an aroma that reminded to “overripe fruit” and “raisins”. On the other hand, the SO₂ and the polyphenols treatments samples were scored as very dissimilar to the CTO₂ sample; although for the polyphenols samples, the difference was due to the appearance of a distinct vegetable aroma.

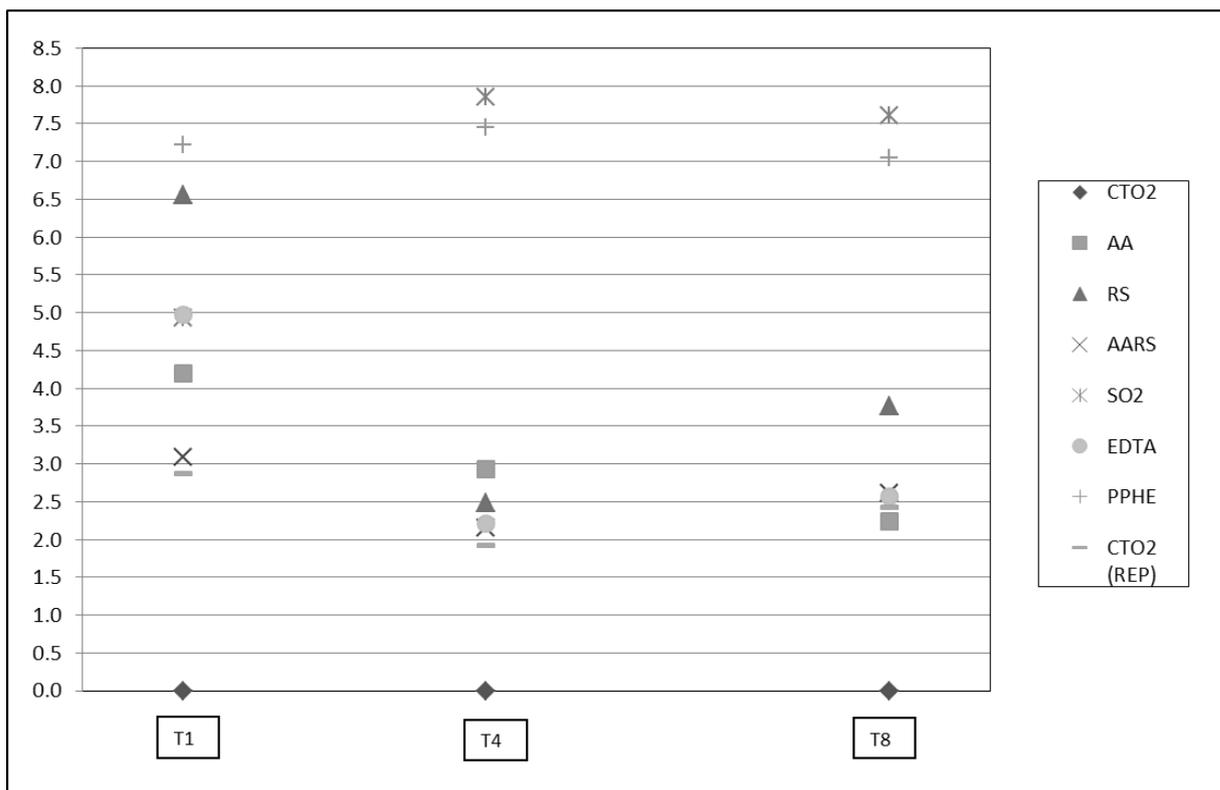


Figure 8. First sensory test: Distance from 0 to 10 of the t1, t4 and t8 days samples to the corresponding T & O₂ Control (CTO₂) (0 = equal; 10 = very dissimilar). The different treatments are named as follows: T & O₂ Control: “CTO₂”, Ascorbic acid: “AA”, Resveratrol: “RS”, Ascorbic acid + Resveratrol: “AARS”, SO₂: “SO₂”, EDTA: “EDTA” and Polyphenols: “PPHE”. A repetition of the “CTO₂” sample of each sampling time was included: “CTO₂ (REP)”.

The results from the second sensorial test, in which the comparison was established between a 10-year-old Porto wine and all the samples included in the three sampling times, are shown in figure 9. It was confirmed that samples from a wine that has suffered a degradation process have a very similar general odour with Porto wines. This can be due to the increase in these spoiled samples of compounds characteristic of oxidized wines, such as methional or benzaldehyde and the *cis/trans*-5-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxane and *cis/trans*-4-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-dioxolane characteristic of Porto wines. Again, the SO₂ and the polyphenols treatments samples, mostly these last ones, showed the greatest dissimilarity with respect to the Porto wine; which were the samples with the lowest concentrations of the mentioned compounds. The EDTA treatment samples showed also a significant dissimilarity with the Porto wine during the first half of the degradation period at times t1 and t4. At time t8, all samples, with the exception of the mentioned SO₂ and polyphenols treatments, resulted very similar to the Porto wine.

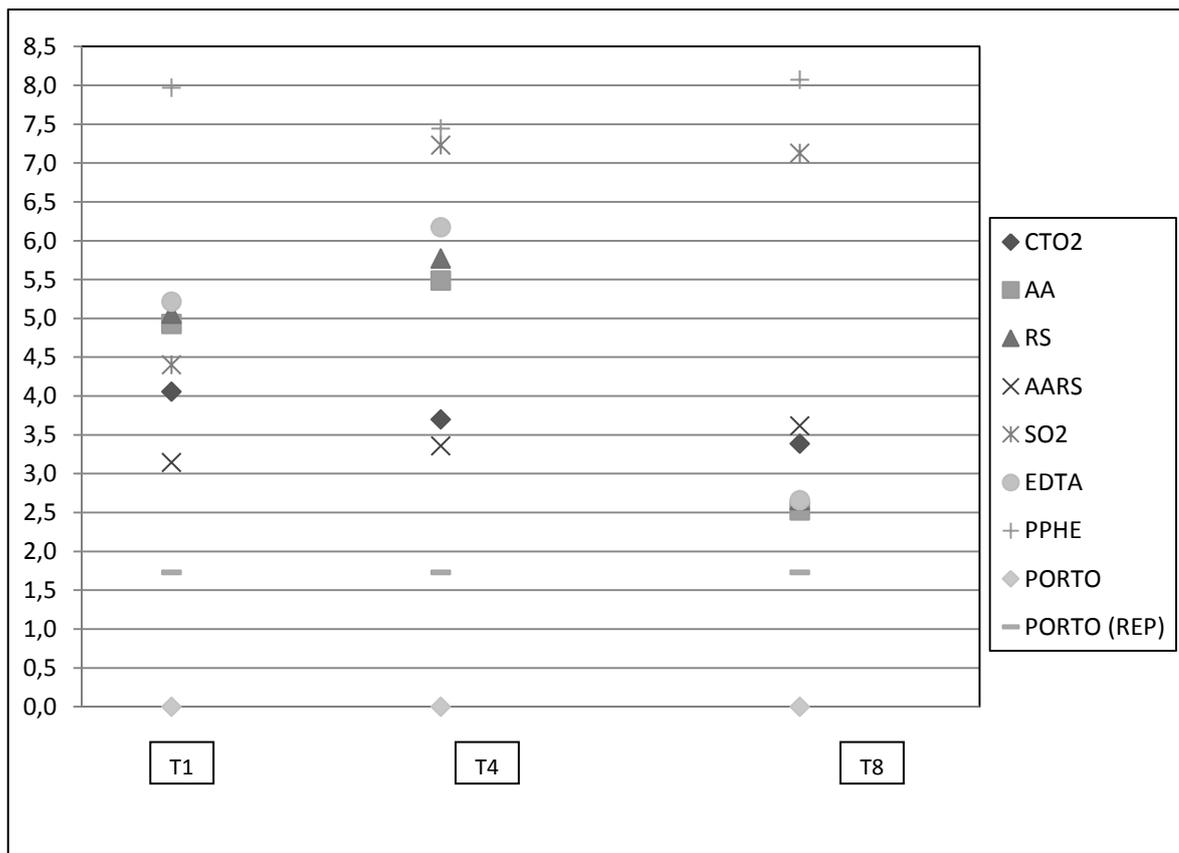


Figure 9. Second sensory test: Distance from 0 to 10 of the t1, t4 and t8 days samples to a reference 10-year-old Porto wine: “PORTO” (0 = equal; 10 = very dissimilar). Repetition of the Porto wine sample: “PORTO (REP)”, Ascorbic acid: “AA”, Resveratrol: “RS”, Ascorbic acid + Resveratrol: “AARS”, SO₂: “SO₂”, EDTA: “EDTA” and Polyphenols: “PPHE”.

In future works, a less aggressive treatment at longer experimental time should be performed in order to compare and check the ability of these treatments as an alternative to the actual technological interventions to control oxidation during winemaking and maximize product shelf-life.

4.5 CONCLUSIONS

The main conclusions of this study were as follows: 1. the influence of different chemical routes, due to thermal and mostly oxidative processes, in the wine aromatic profile was fully confirmed; 2. the use of cyclic voltammetry was determined as a powerful tool for monitoring oxidation processes, even in red wine; 3. the application of the metal chelator EDTA, apart from the SO₂ treatment, might be of interest to partly reduce the oxidative effect in wines after forced degradation processes; 4. Sensorial data

could be correlated with the main volatile analysis results. SO₂, EDTA and the polyphenols treatments were those ones with less similarity to the non supplemented control spoiled samples; 5. The levels of *cis/trans*-5-hydroxy-2-methyl-1,3-dioxane and *cis/trans*-4-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-dioxolane can be partly limited with SO₂, but also, to a lesser extent, by EDTA and the polyphenols treatments and 6. a curious strong vegetable aroma was found in those samples that came from the wine that was supplemented with polyphenols. This former effect should be deeper investigated.

4.6 LITERATURE CITED

- (1) Silva Ferreira, A. C.; Oliveira, C.; Hogg, T.; Guedes de Pinho, P. Relationship between potentiometric measurements, sensorial analysis and some substances responsible for aroma degradation of white wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4668-4672.
- (2) Singleton, V. L. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, *38*, 69-77.
- (3) Li, H.; Guo, A.; Wang, H. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem.* **2008**, *108*, 1-13.
- (4) Danilewicz, J. C. Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.* **2003**, *54*, 73-85.
- (5) Waterhouse, A. L.; Laurie, V. F. Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 306-313.
- (6) Escudero, A.; Cacho, J.; Ferreira, V. Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *211*, 105-110.
- (7) Escudero, A.; Hernández-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V. Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4268-4272.
- (8) Escudero, A.; Asensio, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chem.* **2002**, *77*, 325-331.

- (9) Oliveira, C. M.; Silva Ferreira, A. C.; Guedes de Pinho, P.; Hogg, T. A. Development of a potentiometric method to measure the resistance to oxidation of white wines and the antioxidant power of their constituents. *J. Agr. Food Chem.*, **2002**, *50*, 2121-2124.
- (10) Martins, R. C.; Oliveira, R.; Bento, F.; Geraldo, D.; Lopes, V. V.; Guedes de Pinho, P.; Oliveira, C. M.; Silva Ferreira, A. C. Oxidation management of white wines using cyclic voltammetry and multivariate process monitoring. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 12092-12098.
- (11) Salaha, M. I.; Kallithraka, S.; Marmaras, I.; Koussissi, E.; Tzourou, I. A natural alternative to sulfur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *J. Food Comp. Anal.* **2008**, *21*, 660-666.
- (12) Danilewicz, J. D. Interactions of sulfur dioxide, polyphenols and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.* **2007**, *58*, 53-60.
- (13) Hidalgo, J. El anhídrido sulfuroso y otros compuestos complementarios. In *Tratado de Enología, Vol. II*; Mundi-Prensa Ed.: Madrid (Spain), 2002.
- (14) Delteil, D. Enological yeast effect on the SO₂ content and management in wines. In: *Beverages, Fermentation and Health*; Lallemand: San Francisco, 2003.
- (15) Ribereau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. Uso del dióxido de azufre (anhídrido sulfuroso) en el tratamiento de mostos y vinos. In *Tratado de Enología. Vol. I. Microbiología del vino. Vinificaciones*; Mundi-Prensa Ed.; Hemisferio Sur: Buenos Aires (Argentina), 2003.
- (16) Warner, C. R.; Diachenko, G. W.; Bailey, C. J. Sulfites: An Important Food Safety Issue, Food Testing and Analysis, US Food and Drug Administration, Target Group, September 2000, *6*, 1-4. (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fssulfite.html>).
- (17) Frivik, S.; Ebeler, S. Influence of Sulfur Dioxide on the Formation of Aldehydes in White Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2003**, *54*, 31-38.
- (18) Zhou, D.; Zhang, S.; Xin, S. Review on the function and application of sulphite in food processing. *Food Science* **2004**, *25*, 198-201.
- (19) Bradshaw, M. P.; Prenzler, P. D.; Scollary, G. R. Ascorbic acid induced browning of (+)-catechin in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 934-939.
- (20) Danilewicz, J. C.; Secombe, J. T.; Whelan, J. Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2008**, *59*, 128-136.

- (21) Oliveira, C. M.; Silva Ferreira, A. C.; De Freitas, V.; Silva, A. M. S. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1115-1126.
- (22) Trela, B.C. Thesis: *Improving wine stability with phytic acid*. Suranaree University of Technology (Thailand). ISBN 974-533-523-1, 2005.
- (23) Andjelkovic, M.; Van Camp, J.; De Meulenaer, B.; Depaemelaere, G.; Socaciu, C.; Verloo, M.; Verhe, R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem.* **2006**, *98*, 23-31.
- (24) Stojanovic, S.; Sprinz, H.; Brede, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch Biochem Biophys.* **2001**, *391*, 79-89.
- (25) Frankel, E. N.; Waterhouse, A. L.; Kinsella, J.E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* **1993**, *341*, 1103-1104.
- (26) Brito, P.; Almeida, L. M.; Dinis, T. C. The interaction of resveratrol with ferrylmyoglobin and peroxynitrite; protection against LDL oxidation. *Free Radic Res.* **2002**, *36*, 621-631.
- (27) Kilmartin, P.A.; Zou, H.; Waterhouse, L. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agr. Food Chem.*, **2001**, *49*, 1957-1965.
- (28) Rodrigues, A.; Silva Ferreira, A. C.; Guedes de Pinho, P.; Bento, F.; Geraldo, D. Resistance to oxidation of white wines assessed by voltammetric means. *J. Agr. Food Chem.*, **2007**, *55*, 10557-10562.
- (29) Makhotkina, O.; Kilmartin, P. A. Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *633*, 165-174.
- (30) Silva Ferreira, A. C.; Hogg, T.; Guedes de Pinho, P. Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *J. Agr. Food Chem.*, **2003**, *51*, 1377-1381.
- (31) Silva Ferreira, A. C.; Guedes de Pinho, P. Analytical method for determination of some aroma compounds on white wines by Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography. *J. Food Sci.*, **2003**, *68*, 2817-2820.
- (32) Ribereau-Gayon, J.; Peynaud, E.; Ribereau-Gayon, P.; Sudraud, P. *Traite d'Oenologie. Sciences et Techniques du Vin*; Dunod: Paris (France), 1976.
- (33) Pawliszyn, J. New directions in sample preparation for analysis of organic compounds. *Trends Anal. Chem.*, **1995**, *14*, 113-122.

- (34) Kataoka, H.; Lordb, H.L.; Pawliszynb, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromat. A*, **2000**, *880*, 35-62.
- (35) Ferreira, V.; Escudero, A.; López, R.; Cacho, J. Analytical characterization of the flavor of oxygen-spoiled wines through the Gas-Chromatography-Ion-Trap Mass Spectrometry of ultratrace odorants: Optimization of conditions. *J. Chromat. Sci.* **1998**, *36*, 331-339.
- (36) Silva Ferreira, A. C.; Guedes de Pinho, P.; Rodrigues, P.; Hogg T. Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *J. Agr. Food Chem.* **2002**, *50*, 5919-5924.
- (37) Bailly, S.; Jerkovic, V.; Meurée, A.; Timmermans, A.; Collin, S. Fate of key odorants in Sauternes wines through aging. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8557-8563.
- (38) Escudero, A.; Campo, E.; Fariña, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4501-4510.
- (39) Silva Ferreira, A. C.; Barbe, J. C.; Bertrand, A. Heterocyclic acetals from glycerol and acetaldehyde in Port wines: Evolution with aging. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2560-2564.
- (40) Choe, E.; Min, D. B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, R142–R159.
- (41) Liu, S. Q.; Pilone, G. J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Int. J. Food Sci. & Tech.*, **2000**, *35*, 49-61.

ABBREVIATION AND NOMENCLATURE

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; SPME, solid phase microextraction; PCA, principal components analysis.

Acknowledgments: This work was supported by the Spanish INIA with the project RTA2005-00172. T. Balboa Lagunero acknowledges the Spanish INIA for her grant.

The authors are also grateful to the Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa (Porto, Portugal) where all the experimental part was developed.

Manuscript submitted to the *Journal of Agricultural and Food Chemistry* on May 2012.

CAPÍTULO 5

SELECCIÓN DE LEVADURAS COMO HERRAMIENTA PARA LA REDUCCIÓN DE NOTAS DE OXIDACIÓN EN VINOS ECOLÓGICOS

5 SELECCIÓN DE LEVADURAS COMO HERRAMIENTA PARA LA REDUCCIÓN DE NOTAS DE OXIDACIÓN EN VINOS ECOLÓGICOS

El capítulo 5 consta de dos secciones:

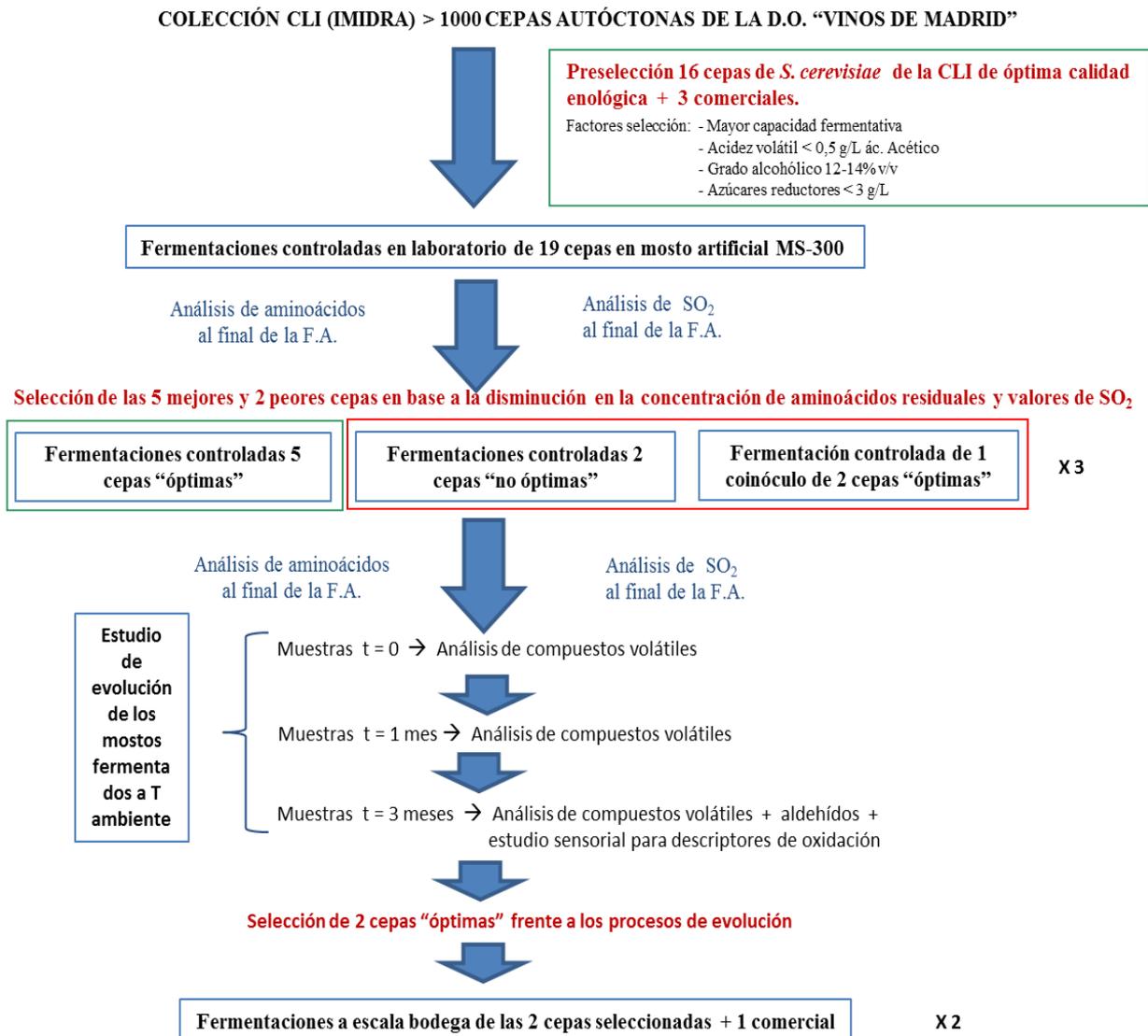
- **PARTE I: Selección de levaduras como herramienta para la reducción de notas de oxidación en vinos ecológicos** (*Yeast selection as a tool for reducing key oxidation notes in organic wines*). Artículo en prensa en el *Food Research International*.
- **PARTE II: Ampliación del estudio de la selección de levaduras como herramienta para la reducción de notas de oxidación en vinos ecológicos.**

En el capítulo 5-Parte I se muestran los resultados del estudio de la selección de levaduras como herramienta para la reducción de notas de oxidación en vinos ecológicos, en los que tras un estudio en mosto sintético con 18 cepas de levaduras, cinco de ellas fueron seleccionadas para llevar a cabo fermentaciones en mosto natural y se estudió el perfil de compuestos volátiles y el perfil aromático tras la fermentación y durante un periodo de evolución forzada. Los resultados de este trabajo fueron mandados a publicar con el título “Yeast selection as a tool for reducing key oxidation notes in organic wines” en la revista *Food Research International*.

Posteriormente se llevaron a cabo nuevos trabajos de investigación que incluyeron el estudio de dos nuevas cepas así como el de un coinóculo de dos de las cepas seleccionadas. Debido al interés de estos nuevos experimentos los resultados se muestran en la parte II de este capítulo, que representan una ampliación del trabajo mostrado en el capítulo 5-Parte I. Además, esta parte del trabajo muestra experimentos adicionales llevados a cabo durante las fermentaciones que debido a la amplitud de los mismos no pudieron ser incluídos en la publicación correspondiente a la parte I del trabajo, así como las tablas de los datos cuantitativos de todos los análisis realizados. A

continuación, se muestra un esquema del trabajo realizado en este capítulo. Las cepas utilizadas en la parte I aparecen recuadradas en verde y las cepas utilizadas en la parte II recuadradas en rojo.

ESQUEMA DE TRABAJO:



PARTE I:

5.1 SELECCIÓN DE LEVADURAS COMO HERRAMIENTA PARA LA REDUCCIÓN DE NOTAS DE OXIDACIÓN EN VINOS ECOLÓGICOS (*YEAST SELECTION AS A TOOL FOR REDUCING KEY OXIDATION NOTES IN ORGANIC WINES*)

Artículo en prensa en:

Food Research International

Tania Balboa-Lagunero, Teresa Arroyo, Juan M. Cabellos and Margarita Aznar.

RESUMEN:

La selección de levaduras con propiedades biotecnológicas determinadas se ha iniciado recientemente como una alternativa posible para mejorar y asegurar la calidad del vino. El objetivo de este trabajo fue la aplicación de la selección de levaduras a la elaboración de vinos ecológicos, con el fin de reducir la aparición de notas de oxidación vinculados a la limitación en los niveles de SO₂ permitidos en su elaboración. Para ello, cinco cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, autóctonas de la Denominación de Origen "Vinos de Madrid", se seleccionaron en base a su alto consumo de aminoácidos precursores de notas de oxidación, tales como: fenilalanina, metionina y leucina. Posteriormente, se realizaron con estas cepas fermentaciones controladas en mosto natural y se efectuaron diferentes análisis químicos y sensoriales de las muestras después de la fermentación alcohólica y a tiempos de 1 y 3 meses después de un proceso de envejecimiento. Los resultados mostraron que gracias a la selección de levaduras se pueden obtener vinos menos "evolucionados", con cantidades más bajas de aldehídos relacionados con la oxidación, tales como el 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal y fenilacetaldehído, y las puntuaciones más bajas para la mayoría de los descriptores aromáticos relacionados con la oxidación. En particular, los vinos elaborados con la cepa *CLI 271* obtuvieron las calificaciones más bajas para las notas de oxidación: "fruta muy madura - fruta pasa - uva pasa", "coñac - brandy - vino jerez - vino oloroso - quina", "vino viejo, vino añejo - vino evolucionado - vino pasado", "barniz - pintura - pegamento - resinas - gomas -disolvent", "miel - melaza" y "regaliz".

5.1.1 ABSTRACT

The selection of yeasts with certain biotechnology properties has recently emerged as a possible alternative for improving and ensuring wine quality. The aim of this work was to applied yeast selection to the elaboration of organic wines in order to reduce the apparition of oxidation notes linked to the limitation in the levels of SO₂ allowed in its elaboration. For this purpose, five autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains from the Origin Appellation "Vinos de Madrid" were selected on the basis of their high consumption of amino acids precursors of oxidation notes, such as phenylalanine, methionine and leucine. Afterwards, controlled fermentations were carried out on natural must with these yeast. Chemical and sensory analyses of the samples were performed after the alcoholic fermentation and at months 1 and 3 of an aging process. The use of selected yeasts during the alcoholic fermentation led to less "evolved" wines with lower amounts of aldehydes related to oxidation, such as 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal and phenylacetaldehyde and lower scores for most oxidation related aroma descriptors. In particular, wines elaborated with strain *CLI 271* had the lowest scores for: "very ripe fruit - raisin - overripe fruit", "cognac - brandy - sherry wine", "old wine - matured wine - evolved wine", "varnish - paint - glue - resin - rubber - solvent", "honey - molasses" and "liquorice - curry" oxidation notes.

Key words: organic wine; *Saccharomyces cerevisiae*; amino acids; oxidation; aroma.

5.1.2 INTRODUCTION

Organic wines tend to oxidize more easily than conventional wines due to the limitation in the levels of the antiseptic and antioxidant SO₂ allowed in their elaboration, stabilization and preservation. Oxidation in wines is linked to the formation of "evolution-oxidation" off-flavours and to the loss of fruity and floral notes, leading to a decrease in the final wine aroma quality (Usseglio-Tomasset, 1998; Boulton, Singleton, Bisson & Kunkel, 1996).

In order to solve the problem of susceptibility to oxidation of organic wines and to assure their quality, several alternatives have been proposed, all of them focused on the reduction of oxidation processes, such as optimizing the parameters of the

winemaking, the use of natural antioxidants allowed in these kind of wines, such as ascorbic, caffeic and gallic acids and glutathione (Oliveira, Silva Ferreira, De Freitas & Silva, 2011; Makhotkina & Kilmartin, 2009; Roussis & Sergianitis, 2008; Lambropoulos & Roussis, 2007) or the selection of more adapted grape varieties for organic farming resistant to the most common vineyard diseases (Cordero-Bueso et al., 2011).

The aim of this work was to reduce the formation of the “evolution-oxidation” aroma notes, not by reducing the oxidation mechanisms but by reducing the concentration of those compounds precursors of the volatile compounds responsible of these oxidation notes.

According to the literature, methional and phenylacetaldehyde have been described as the main responsible volatiles for some of the most important off-flavours formed during the oxidation of white wines (Silva Ferreira, Guedes de Pinho, Rodrigues & Hogg, 2002). These aldehydes can be synthesized either by direct peroxidation of their alcohols, or by Strecker degradation of their original amino acids; pointing to the Strecker degradation pathway as the principal route of formation (Silva Ferreira et al., 2002; Escudero, Hernández-Orte, Cacho & Ferreira, 2000a). Pripis-Nicolau, De Revel, Bertrand and Maujean (2000) studied the main reaction products formed from amino acids, such as methionine, leucine, isoleucine and phenylalanine and α -dicarbonyl compounds in solutions of synthetic wine, obtaining aldehydes, such as methional, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal and phenylacetaldehyde, characterized for showing aromas of alteration and particularly low perception thresholds, leading to olfactory defects in wines.

Therefore, the main objective of the work was to obtain wines with low initial contents of methionine, leucine and phenylalanine. The amino acid content in the must will be influenced by the variety and maturity of the grape, the region from which it came and the year of harvest. On the other hand, the final concentration of amino acids in the wine will be dependent on the malolactic fermentation but mainly on the yeasts metabolism used during the alcoholic fermentation (Soufleros, Bouloumpasi, Tsarchopoulos & Biliaderis, 2003; Hernández-Orte, Guitart & Cacho, 1999). During the last few decades, winemakers have studied the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

extensively, as it is the main microorganism involved in the alcoholic fermentation. *S. cerevisiae* has several amino acid transport systems; certain amino acids such as phenylalanine, leucine, isoleucine and tryptophan are preferentially incorporated, whereas others, such as alanine, arginine and proline, are poorly assimilated (Ought, Huang & Stevers, 1991). Moreover, the initial amino acid profile, together with environmental and physiological factors specific from each strain, will influence the order in which the different amino acids are used by the yeast (Barrajón, Capece, Arévalo-Villena, Briones & Romano, 2011; Hernández-Orte, Cacho & Ferreira, 2002).

The approach selected in this work for achieving a low content of methionine, leucine and phenylalanine in wine was to employ *S. cerevisiae* yeasts with a high consumption of these amino acids during the alcoholic fermentation. For this purpose it was used the yeast collection of the Instituto Madrileño de Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) (Madrid, Spain). The IMIDRA has isolated more than 500 *S. cerevisiae* strains from spontaneous fermenting musts from different vineyards, in order to study and preserve the biodiversity of these autochthonous populations; as well as to identify promising yeast strains for winemaking.

Several analytical and sensory studies were performed in the musts fermented with the selected yeast in order to confirm that the low initial content of these two amino acids in wines reduced the formation of the volatiles responsible of the “evolution-oxidation” off-flavours. To our knowledge, yeast selection as a tool for reducing oxidation notes in organic wines has not yet been deeply studied. Thus, the main objective and the goal of this study is to provide a novel solution for reducing oxidation related aromas in organic wines by selecting the best indigenous *S. cerevisiae* yeast strains belonging to the Origin Appellation “Vinos de Madrid” on the basis of their metabolism, which minimizes the content of amino acid precursors of negative flavours. This will generate a remarkable improvement in the quality of organic wines, which nowadays represent a significant growing market.

5.1.3 MATERIALS AND METHODS

Yeast strains: Yeast strains used in this work belonged to the yeast collection of the IMIDRA Institute, named “*CLP*”. More than 500 *S. cerevisiae* strains have been isolated

over the years from different vineyards of the Madrid winegrowing region and were characterized by high genetic variability.

Yeast strains-Set 1:

This set was formed by 16 strains chosen among the yeast strains of the *CLI* collection, they were selected because of their high performance in laboratory-scale wine fermentations previously performed at the IMIDRA. The criteria for the selection were: a low volatile acidity production (< 0.5 g/L acetic acid); an alcoholic degree between 12-14% v/v; residual sugars below 3 g/L and a good growing rate. All strains were genotyped by Microsatellite Multiplex PCR analysis with three microsatellite loci, SC8132X, YOR267C and SCPTSY7. The PCR reaction mix and the amplification protocols followed were the same as those used by Vaudano and García-Moruno (2008).

Yeast strains-Set 2:

This set was formed by 5 strains selected among set 1 of yeast strains. Yeasts for set 2 were selected on the basis of the lowest values obtained in methionine, phenylalanine, leucine and SO₂ concentrations after a fermentation process performed using synthetic must and yeasts from set 1. The 5 strains selected in this previous study were *CLI 87*, *CLI 275*, *CLI 542*, *CLI 706* and *CLI 271*.

Fermentations:

Fermentations of set 1 yeast strains in synthetic must: The synthetic must was *MS300*, which approximates a natural must (300 mg/l of assimilable nitrogen) as previously described (Bely, Sablayrolles & Barre, 1990). Fermentations were conducted at laboratory scale using the synthetic filtered-sterilized must. Fermenters of 2.5L capacity containing 1.5 L of must were inoculated with 10⁶ cells/mL previously grown at 28°C for 24 hours in YPD medium (yeast extract 1% w/v, meat peptone 1% w/v, glucose 2% w/v and agar 2% w/v). The fermenters were flasks with two openings, one at the top for filling and the other in the middle for sampling. The two openings were taped with a rubber stopper, the top one with a capillary to allow the CO₂ of the fermentation to escape. The fermenters were placed in a temperature controlled chamber at 20°C with mechanical agitation of 90 rpm to maintain the homogeneity of the must. The fermentation progress was monitored daily by weight loss determination. Other parameters such as: sugar consumption and CO₂ release, fermentation kinetics and cellular viability were also studied following the ECC (1990) protocols. The

fermentations were considered finished once the difference between two consecutive fermenter weights was less than 0.2 g and sugar levels were below 4 g/L. The fermented juice was separated from the lees after fermentation was completed.

The fermented musts obtained from this experiment were coded as “fermented synthetic musts”.

Fermentations of set 2 yeast strains in real must: Fermentations were conducted on laboratory scale using natural filtered-sterilized must obtained from *Palomino* white wine grapes placed in the experimental vineyard "El Encín", Alcalá de Henares, Madrid (40°31'N, 3°17'W, 610m altitude). The selected yeasts were tested by triplicate. One liter capacity fermenters containing 750 mL of must were inoculated with 10^6 cells/mL previously grown at 28°C for 24 hours in YPD medium. Fermentation procedure and conditions were the same as the ones described for the synthetic must. The fermented juice was separated from the lees after fermentation was completed.

Fermented musts obtained from this experiment were coded as “fermented real musts”

Physicochemical analyses: These analyses were performed in “fermented synthetic musts” and in “fermented real musts”. The most relevant physicochemical parameters were analysed once the alcoholic fermentations were finished, following the protocols of the official methodologies for must and wine analyses. pH and total acidity (g/L tartaric acid) were determined by titration. Both analyses were performed by using a Compact Crison Tritrator from Crison Instruments (Barcelona, Spain). Volatile acidity (g/L acetic acid) was determined by steam distillation and titration following the modified Rebelein Method (1973). Results from all analyses were similar for all the fermented musts obtained from the different strains employed and within the limits established by the CEE regulations for wine elaboration. The data are not shown as they are not relevant for the final aim of this study.

Wine evolution study: This study was performed on “fermented real musts”. In order to simulate a natural post-fermentation process, wines were left for 3 months at room temperature (18-22°C) under periodic aeration. Samples were studied at times: “t0” (end

of the alcoholic fermentation), “t1” (after 1 month of the simulated evolution) and “t3” (after 3 months of the simulated evolution). Amino acids analysis was performed on the initial real must and at t0. Major volatiles quantifications were performed at t0, t1 and t3 and aldehydes and sensorial analyses were carried out at t3.

Amino acids analysis: This analysis was performed on the initial real must, “fermented synthetic musts” and “fermented real musts” at the end of the alcoholic fermentation. The concentration of 20 amino acids was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection, following the methodology proposed by Hernández-Orte, Ibarz, Cacho and Ferreira (2003).

Reagents and materials: The *AccQ-Fluor*TM reagent Kit was obtained from Waters (Milford, MA, USA). The standard 2.5 mM amino acid solution containing aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), serine (Ser), glycine (Gly), threonine (Thr), alanine (Ala), histidine (His), proline (Pro), arginine (Arg), valine (Val), cysteine (Cys), tyrosine (Tyr), methionine (Met), isoleucine (Ile), leucine (Leu), phenylalanine (Phe), lysine (Lys) and ammonium sulphate was supplied by Pierce H (Rockford, IL, USA). Individual amino acids and α -aminobutyric acid (α -ABA, internal standard), ornithine (Orn), γ -aminobutyric acid (γ -ABA), asparagine (Asn) and calcium disodium EDTA were supplied by Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Sodium acetatetrihydrate and triethylamine (TEA) were purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain) phosphoric acid was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland) and acetonitrile by Panreac (Barcelona, Spain). Water was supplied by a Milli-Q purification system from Millipore (Bedford, MA, USA).

The HPLC used was a Waters Alliance system consisting of a 600 LCD controller, a 717 plus autosampler, a thermostat-controlled column oven and a Waters 2475 multi-X fluorescence detector. Separation was carried out using a 20 x 4.6 mm Sentry guard column connected to a 250 x 4.6 mm column (Luna C₁₈ bonded silica) from Analytical Phenomenex (Torrance, CA, USA).

SO₂ analysis: This analysis was performed on “fermented synthetic musts” and “fermented real musts” at the end of the alcoholic fermentation. SO₂ was determined with the *r-biopharm Roche*[®] sulfite kit from Roche (Darmstadt, Germany); which is a

photometric method based on the enzymatic activity of the sulfite oxidase and the NADH peroxidase.

Volatile quantification:

- Major volatile compounds analysis: Quantification was carried out by GC-FID following the method proposed by Ortega, López, Cacho and Ferreira (2001). The GC system employed was an Agilent 6850 with a FID detector. Separation was carried out using a 60 m x 0.32 mm x 0.5 μ m film thickness DB-Wax column from J&W Scientific (Folsom, CA, USA).

Reagents and materials: Analytical quality dichloromethane was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Switzerland) and ammonium sulphate from Panreac (Barcelona, Spain). The pure reference aroma compounds and the internal standards (2-butanol, 4-methyl-2-pentanol, 4-hydroxy-4-methyl-pentanoate and 2-octanol) used for the analysis were analytical quality and were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), Sigma-Aldrich (Steinheim, Switzerland), Fluka (Buchs, Switzerland), PolyScience (Niles, IL, USA), ChemService (West Chester, NY, USA), Lancaster (Strasbourg, France) and Panreac (Barcelona, Spain). Pure water was supplied by a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

The analysed compounds were: ethyl propanoate, 2,3-butanedione, ethyl butyrate, ethyl isobutyrate, ethyl isovalerate, isobutanol, isoamyl acetate, 1-butanol, isoamyl alcohol, ethyl hexanoate, hexyl acetate, acetoin, 1-propanol, ethyl lactate, 1-hexanol, (*Z*)-3-hexenol, ethyl octanoate, ethyl 3-hydroxybutyrate, isobutyric alcohol, γ -butyrolactone, furfural, benzaldehyde, butyric acid, isovalerianic acid, diethyl succinate, methionol, 2-phenylethyl acetate, hexanoic acid, benzylic alcohol, β -phenylethanol, octanoic acid and decanoic acid.

- Aldehydes analysis: Quantifications were performed in the laboratories of the Analytical Chemistry Department, Sciences Faculty of the University of Zaragoza, following the methodology published by Zapata, Mateo-Vivaracho, Cacho and Ferreira (2010). The studied compounds were: 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, methional, (*E*)-2-octenal, phenylacetaldehyde and (*E*)-2-nonenal.

Sensory analysis: The sensory analysis was performed by a trained panel from the IMIDRA Institute. The panel was composed of 8 people (4 women and 4 men). This panel had been previously trained in the laboratory in the recognition of wine aromas, first using standards and afterwards real wine samples. During the sensory sessions a maximum of 6 wines were evaluated and the duration of each session was about 20 minutes. For wine tasting, 20 mL of wine, served at around 18°C, were poured into wine tasting glasses that fulfilled the ISO 3591-1977 standards. The wine tasting card for oxidation descriptors was the one described in Balboa-Lagunero, Arroyo, Cabellos and Aznar (2011) and included the 9 specific descriptors shown in table 3.

Statistical analyses: Pearson correlation studies and a principal components analysis (PCA) were performed. The statistical analyses were carried out with the softwares SPSS v19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) and *The Unscrambler* v9.1 (Camo, Asa, Norway).

5.1.4 RESULTS AND DISCUSSION

The main aim of this work was to study the influence of yeast selection on the reduction of key oxidation notes in organic wines. Yeast strains were selected on the basis of the residual content of methionine, leucine and phenylalanine amino acids in the fermented must, since, as previously mentioned, the Strecker aldehydes coming from these amino acids are known to play a significant role in wine oxidation notes (Ledl & Schleicher, 1990). In this sense, 3-methylbutanal (malty aroma) and phenylacetaldehyde (honey-like aroma) would be formed from the corresponding amino acids leucine and phenylalanine, respectively (Hoffman & Schieberle, 2000) and similarly, the most likely pathway for the natural synthesis of methional (cooked vegetables odor) would be the Strecker degradation of methionine (Escudero et al., 2000a). Because these aldehyde formation reactions are dependent not only on temperature but also on the level of oxygen (Silva Ferreira et al., 2002), aldehyde compounds can be considered as strong indicators of the level of oxidation of the wine (Bueno, Culleré, Cacho & Ferreira, 2010).

1. The influence of the yeast strain used in the alcoholic fermentation on the amino acids profile and volatile composition at the end of the alcoholic fermentation

The main objective of the first part of the present research was the selection of *S. cerevisiae* strains, whose metabolism minimized the content of amino acid precursors of negative flavors at the end of the alcoholic fermentation. For this purpose, 16 wine yeast strains from the IMIDRA collection were selected on the basis of their optimal winemaking properties. These fermentations were performed in synthetic must and they served as a preliminary step for this investigation. Once the alcoholic fermentation had finished the amino acids profile and the SO₂ levels were analyzed (data not shown). As a result, five yeast strains were selected: *CLI 87*, *CLI 275*, *CLI 542*, *CLI 706* and *CLI 271*. They were selected because of their low residual values of methionine, phenylalanine, leucine and SO₂ (see table 1). Strain *CLI 706*, which showed the lowest concentration values for the mentioned amino acids, presented a high concentration of SO₂ (30.48 ppm), but it was still chosen because its remarkable low values of residual amino acids.

Table 1. Concentration of methionine (Met), phenylalanine (Phe), leucine (Leu) and SO₂ (expressed as ppm) in synthetic must before alcoholic fermentation (Must) and after alcoholic fermentation with yeast strains-set 2 (*CLI 542*, *CLI 87*, *CLI 271*, *CLI 275* and *CLI 706*) and the minimum and maximum values obtained with yeast strains-set 1 (Min-Max).

| | Met | Phe | Leu | SO₂ |
|----------------|------------|------------|------------|-----------------------|
| Must | 31.20 | 37.70 | 48.10 | - |
| <i>CLI 542</i> | 0.60 | 0.48 | 1.04 | 12.25 |
| <i>CLI 87</i> | 0.87 | 0.13 | 0.28 | 18.63 |
| <i>CLI 271</i> | 1.02 | 1.48 | 1.88 | 6.66 |
| <i>CLI 275</i> | 0.64 | 2.03 | 2.02 | 19.23 |
| <i>CLI 706</i> | 0.40 | 0.13 | 0.19 | 30.48 |
| Min-Max | 0.40-2.23 | 0.13-4.93 | 0.19-5.37 | 6.66-36.17 |

For the current study, these 5 selected yeast strains were submitted to a fermentation process in real must and its evolution was as well studied. The amino acids content was analyzed once the fermentation was finished. Results are shown in table 2 and figure 1. Table 2 shows the amino acids content in the natural must before and after the alcoholic fermentation for each yeast strain studied. As expected, there was a remarkable consumption of amino acids in all fermenters; since amino acids serve as nutrients for yeasts during the alcoholic fermentation. Ammonium and proline data are not shown because ammonium was totally consumed after all fermentations and proline, which is hardly metabolised by the yeasts, remained at similar levels after the alcoholic fermentation (294.81 ppm). With regard to the general consumption of amino acids, *CLI 87* and *CLI 271* strains showed a nearly three times higher consumption of most of the amino acids compared with the other strains; especially for amino acids such as glutamic acid, arginine, γ -aminobutyric acid, isoleucine, leucine and phenylalanine. Conversely, *CLI 542* strain showed the lowest consumption of amino acids, leaving the highest residual values for most of the studied amino acids. All the tested yeast strains showed very small SO_2 values, between 3.5 and 5.9 ppm.

Table 2. Amino acids content (ppm) in the natural must before alcoholic fermentation (Must) and after alcoholic fermentations with yeast strains-set 2 (*CLI87*, *CLI271*, *CLI542*, *CLI275* and *CLI706*) (Analyses performed by triplicate).

| Amino acid | Must | <i>CLI87</i> | <i>CLI271</i> | <i>CLI542</i> | <i>CLI275</i> | <i>CLI706</i> |
|--------------------------------|--------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Asp | 16.48 | 0.84 ± 0.26 | 1.01 ± 0.08 | 1.35 ± 0.17 | 1.30 ± 0.14 | 1.31 ± 0.41 |
| Asn | 6.30 | 0.00 ± 0.00 | 0.06 ± 0.05 | 0.32 ± 0.05 | 0.15 ± 0.05 | 0.00 ± 0.00 |
| Ser | 38.69 | 0.13 ± 0.02 | 0.19 ± 0.07 | 0.08 ± 0.02 | 0.10 ± 0.02 | 0.42 ± 0.51 |
| Glu | 87.47 | 0.15 ± 0.06 | 0.08 ± 0.07 | 3.22 ± 0.37 | 1.86 ± 0.90 | 1.35 ± 0.60 |
| His | 42.53 | 1.88 ± 0.44 | 1.36 ± 0.42 | 8.79 ± 0.06 | 4.33 ± 1.18 | 0.47 ± 0.06 |
| Gly | 48.70 | 0.70 ± 0.04 | 0.11 ± 0.02 | 0.05 ± 0.01 | <0.04 | 1.67 ± 0.61 |
| Arg | 585.49 | 1.42 ± 0.42 | 2.65 ± 0.34 | 8.43 ± 0.67 | 6.26 ± 1.27 | 14.93 ± 5.89 |
| Thr | 22.92 | <0.03 | <0.03 | 0.07 ± 0.04 | <0.03 | <0.03 |
| Ala | 43.21 | 0.43 ± 0.25 | 0.20 ± 0.12 | 2.16 ± 0.13 | 0.73 ± 0.40 | 2.00 ± 0.63 |
| γ-ABA | 29.49 | 0.03 ± 0.00 | 0.02 ± 0.01 | 1.34 ± 0.34 | 0.27 ± 0.23 | 0.64 ± 0.20 |
| Tyr | 6.06 | 0.18 ± 0.05 | 0.05 ± 0.06 | 0.79 ± 0.07 | 0.56 ± 0.27 | 0.57 ± 0.22 |
| Val | 11.29 | 0.31 ± 0.08 | 0.28 ± 0.08 | 1.01 ± 0.08 | 0.71 ± 0.25 | 0.74 ± 0.24 |
| Met | 4.35 | 0.12 ± 0.03 | 0.16 ± 0.02 | 0.27 ± 0.03 | 0.20 ± 0.06 | 0.26 ± 0.09 |
| Orn | 3.01 | 0.18 ± 0.02 | 0.26 ± 0.13 | 0.28 ± 0.04 | 0.26 ± 0.06 | 0.49 ± 0.36 |
| Lys | 0.98 | 0.36 ± 0.03 | 0.28 ± 0.11 | 0.66 ± 0.07 | 0.48 ± 0.16 | 1.34 ± 0.54 |
| Ile | 6.71 | 0.25 ± 0.08 | 0.21 ± 0.02 | 0.68 ± 0.04 | 0.56 ± 0.18 | 1.28 ± 0.27 |
| Leu | 8.79 | 0.25 ± 0.12 | 0.12 ± 0.03 | 1.52 ± 0.12 | 0.74 ± 0.46 | 1.35 ± 0.40 |
| Phe | 9.76 | 0.13 ± 0.07 | 0.05 ± 0.03 | 1.96 ± 0.44 | 0.73 ± 0.36 | 0.94 ± 0.35 |

Figure 1 represents the amount of methionine, leucine and phenylalanine in the fermenters once the alcoholic fermentation of the natural must was finished. Some variability within the same strain repetitions was observed. This variability of wine's constituents, especially for volatiles, is considered as normal because the micro-metabolism of each yeast (Usseglio-Tomasset, 1998). Results showed that *CLI 87* and *CLI 271* strains consumed the highest amounts of methionine, leucine and phenylalanine compared with the other 3 strains; leaving therefore, a smaller quantity of precursors of oxidation related compounds in the wine. It can also be observed that the final content of phenylalanine and leucine showed a higher variability among yeast strains than the final content of methionine that was more similar among all the yeast strains studied.

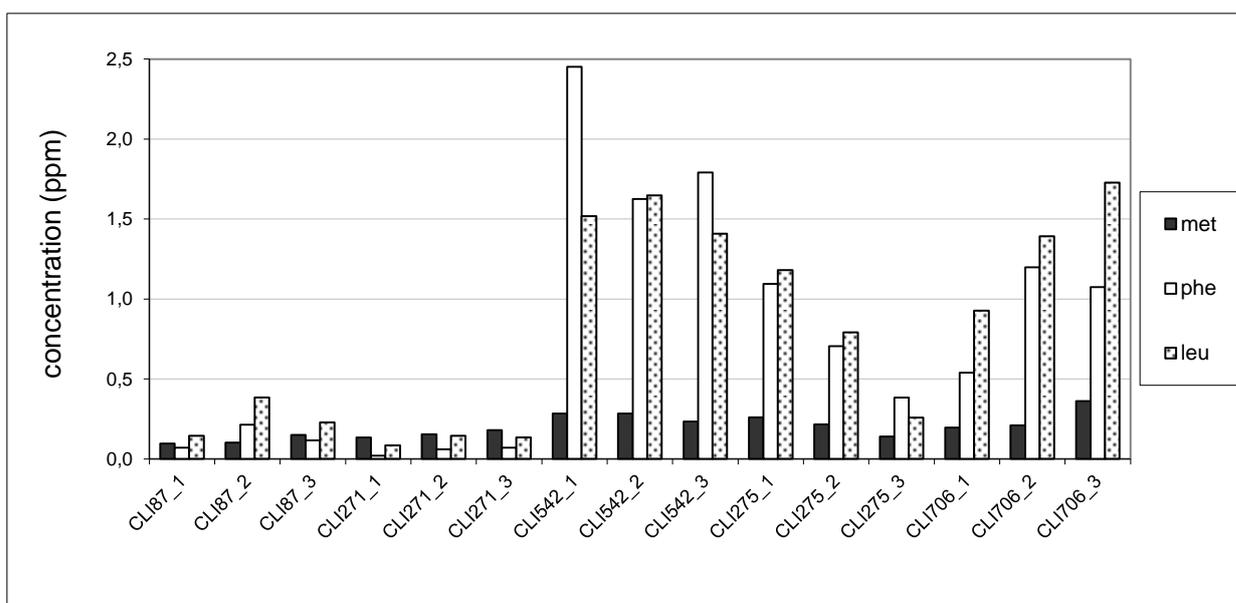


Figure 1. Concentration of methionine, phenylalanine and leucine in natural must after alcoholic fermentation with yeast strains-set 1 (CLI87, CLI271, CLI542, CLI275 and CLI706). (Fermentations carried out by triplicate).

A study of the major volatile constituents was also carried out in the natural musts after the alcoholic fermentation with the 5 yeasts selected, in order to determine the effect of the inoculated yeasts on the final composition of wine. Figure 2 shows the analyzed volatiles grouped in four families: “alcohols”, “acids”, “esters” and “aldehydes and ketones”. As it can be observed at time t0 (just after the end of the alcoholic fermentation), the 5 yeast profiles were very similar among them; with the alcohols being quantitatively the largest group of volatiles. This chemical similarity was

somewhat expected, as approximately half of aromatic compounds are significantly correlated with the initial must composition (Hernández-Orte et al., 2002) and in this study all the fermentations were carried out using the same initial monovarietal must (see *Fermentations* section from the *Materials and Methods*). Nevertheless, certain differences were found within each chemical group. Higher alcohols concentration is closely related with yeast metabolism (Romano, Fiore, Paraggio, Caruso & Capece, 2003) and as Callejón, Clavijo, Ortigueira, Troncoso, Paneque and Morales (2010) had studied, compounds inside this chemical family show differences depending on the strain employed for wine production. As an example, *CLI 87* and *CLI 271* strains had higher values compared with the other strains of β -phenylethanol (110.20 ppm and 112.32 ppm, respectively), and lower values of isoamyl alcohol (188.92 ppm and 222.33, respectively) and *CLI 706* samples showed twice the amount of isobutanol (61.43 ppm) than the rest of the samples. This last strain, besides *CLI 275* and *CLI 542*, showed high concentrations of alcohols, above 400 mg/L; which, instead of giving “vegetal” and “herbal” notes to wines, could conferred negative quality factors (Rapp & Versini, 1991). The esters profile for each strain was also very similar; with ethyl lactate being the most abundant one, with values above 5 ppm in all cases, although not exceeding its threshold (154 ppm). *CLI 275* showed the highest amounts of acetate esters (0.40 ppm) and *CLI 542* of ethyl esters (17.25 ppm). Within the acids family, hexanoic acid was the most abundant acid of the studied ones; which was in a higher amount in *CLI 542* and *CLI 87* samples (around 4 ppm), exceeding its threshold (0.4 ppm). Regarding the aldehydes and ketones concentrations, *CLI 275* and mostly *CLI 542* fermented musts showed the highest levels of this group of volatiles. This result can be mainly explained because the higher acetoin values found in these samples; which were 6.90 ppm for *CLI 275* and 14.73 ppm for *CLI 542*.

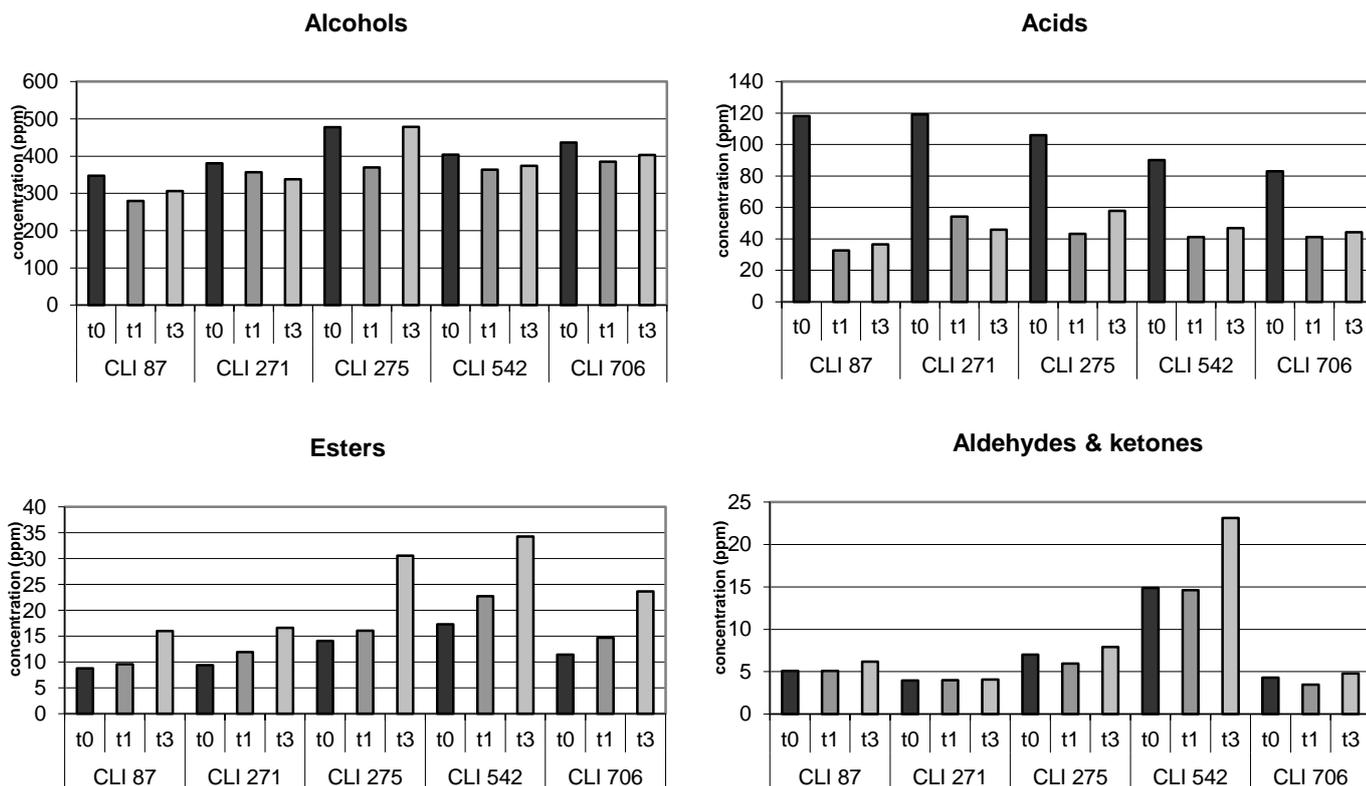


Figure 2. Total content of alcohols, acids, esters and aldehydes and ketones in the natural must after fermentation with yeast strains-set 2 (CLI87, CLI271, CLI542, CLI275 and CLI706) at different times: t0, t1 and t3.

In order to clarify the implication of these chemical results and their relationship with the amino acids consumption, a Principal Components Analysis (PCA) was performed. The PCA with the amino acids and major volatiles data is shown in figure 3. A good grouping of the replicates of each of the tested yeasts was obtained, which indicates a clear differentiation within the strain level of *S. cerevisiae* due to amino acids and volatile composition of the fermented must. This confirms previous reports (Barrajón et al., 2011; Tosi, Azzolini, Guzzo & Zapparoli, 2009; Romano et al., 2003), which state that the production of certain compounds influencing wine aroma is strain dependent. It was observed as well, that *CLI 87* and *CLI 271* were closely grouped; which corresponded with the previously mentioned high consumption of amino acids. A higher content in the alcohols methionol and β -phenylethanol was observed in samples from the fermentations with these two strains. This can be explained due to the higher consumption of methionine and phenylalanine that generated these two compounds via the Ehrlich pathway. In this route amino acids are converted to the corresponding

higher alcohols following a reaction sequence comprising transamination, decarboxylation and reduction. In this sense, methionol is produced from methionine (Etschmann, Kötter, Hauf, Bluemke, Entian & Schrader, 2008) and β -phenylethanol from phenylalanine (Hazelwood, Daran, van Maris, Pronk & Dickinson, 2008). Therefore, we can confirm the direct correlation between the present amounts in wine of methionol and β -phenylethanol and their corresponding amino acids that has already been reported by Hernández-Orte et al. (2002). Other differences, such as a higher content of 1-butanol, hexyl acetate and ethyl isovalerate and a lower present amount of isovaleric and decanoic acids, isoamyl alcohol and some esters, such as ethyl lactate, ethyl isobutyrate and isoamyl acetate, were found between these two strains (*CLI 87* and *CLI 271*) and the others. A Pearson correlation study showed that methionine consumption was correlated to hexyl acetate and ethyl isovalerate production ($p < 0.01$) and leucine with β -phenylethanol ($p < 0.01$).

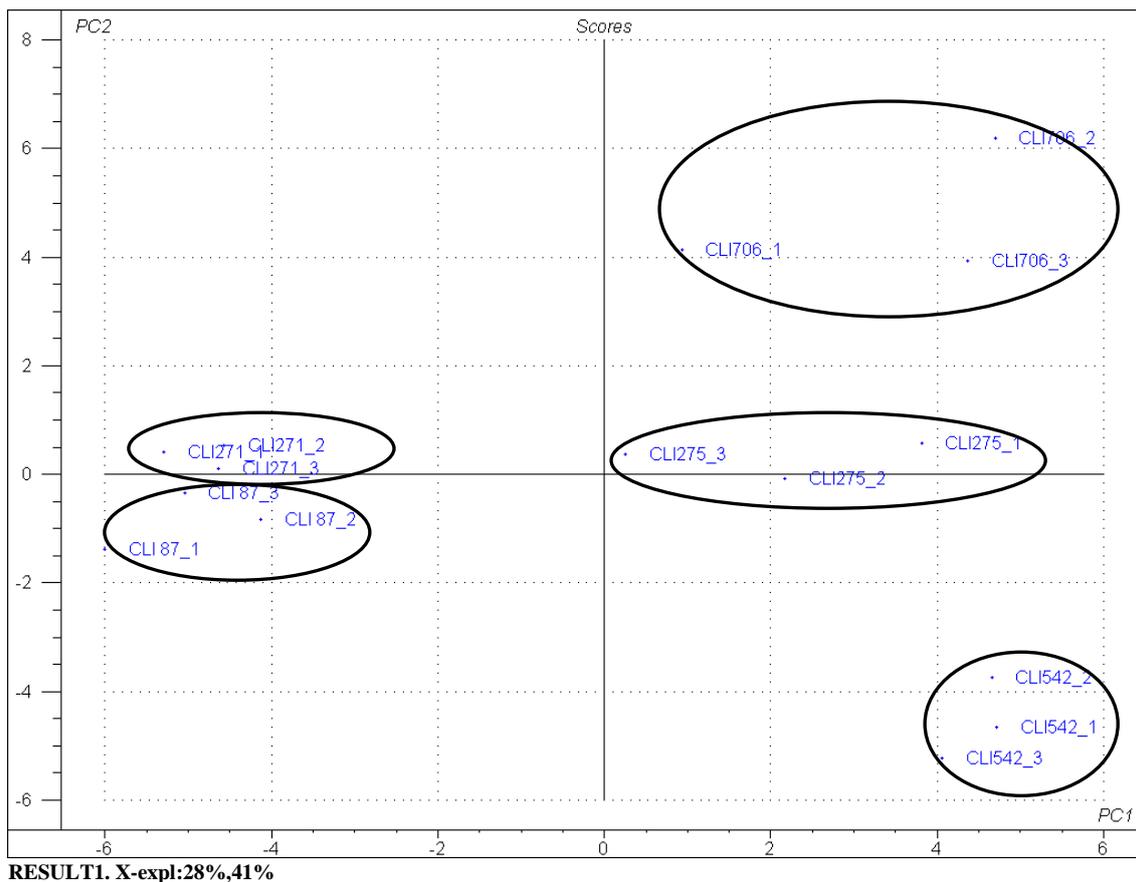


Figure 3. Principal Components Analysis (PCA) of natural must samples after alcoholic fermentation with yeast strains-set 2 (CLI87, CLI271, CLI542, CLI275 and CLI708) at time t0.

2. Evolution study: Chemical and sensory analyses of wines produced by different *S. cerevisiae* strains during a post-fermentation period.

During the second part of the present study, “fermented real musts” were left for 3 months at room temperature under periodic aeration in order to simulate a natural post-fermentation process. Samples were studied at times: “t0” (end of the alcoholic fermentation), “t1” (after 1 month of the simulated evolution) and “t3” (after 3 months of the simulated evolution). The composition of amino acids is not only important at the beginning of the fermentation, as previously stated; but also during the maturing process, since the remaining amino acids in wine have a clear influence on aromas (Escudero et al., 2000a). Therefore, we studied if the strains assayed with a lower concentration of residual amino acids such as methionine and phenylalanine had really an influence in an evolved wine from a sensorial and chemical point of view.

A study of the major volatiles constituents was performed on samples at times “t1” and “t3” of the evolution period. The studied volatiles were grouped again in four families: “alcohols”, “acids”, “esters” and “aldehydes and ketones” and are represented at “t0”, “t1” and “t3” times in figure 2. A general pattern of a decrease of acids and an increase of esters, aldehydes and ketones with the progression of time was observed. As previously reported, compounds such as esters, lactones, aldehydes and ketones appeared in high concentrations in wines that had suffered chemical or biological aging oxidative processes (Escudero, Cacho & Ferreira, 2000b; Flanzky 2000). This increase was significantly higher for *CLI 275* and *CLI 542* strains. Aldehydes and ketones concentration values were already higher for *CLI 542* than for other yeast strains at t0 (more than double the amount compared with the others); but the values went up to three times higher at the end of the evolution period, leading to more aged wines from a chemical point of view. Results from a PCA using all the volatiles quantification results from sampling times t0, t1 and t3 (figure 4), showed a clear grouping and directionality of samples depending on the oxidation state. The most evolved wines (t3) showed higher values in oxidation related aldehydes, as well as higher values of furfural, benzaldehyde, γ -butyrolactone, ethyl lactate (all with sweet-caramel or almond like aromas), diethyl succinate and propanol. *CLI 87* and *CLI 271* samples, with very similar composition results, were grouped at time t3 with samples from time t1; which indicated a lower oxidation state in these samples. *CLI 87* and *CLI 271* samples had lower amounts of all these last mentioned compounds and higher amounts of fresh-fruity or flowery compounds, such as hexyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl isovalerate and β -phenylethanol. This means that *CLI 87* and *CLI 271* showed a lower degradation level than the rest of the strains; which was afterwards corroborated by the sensorial analysis (table 3).

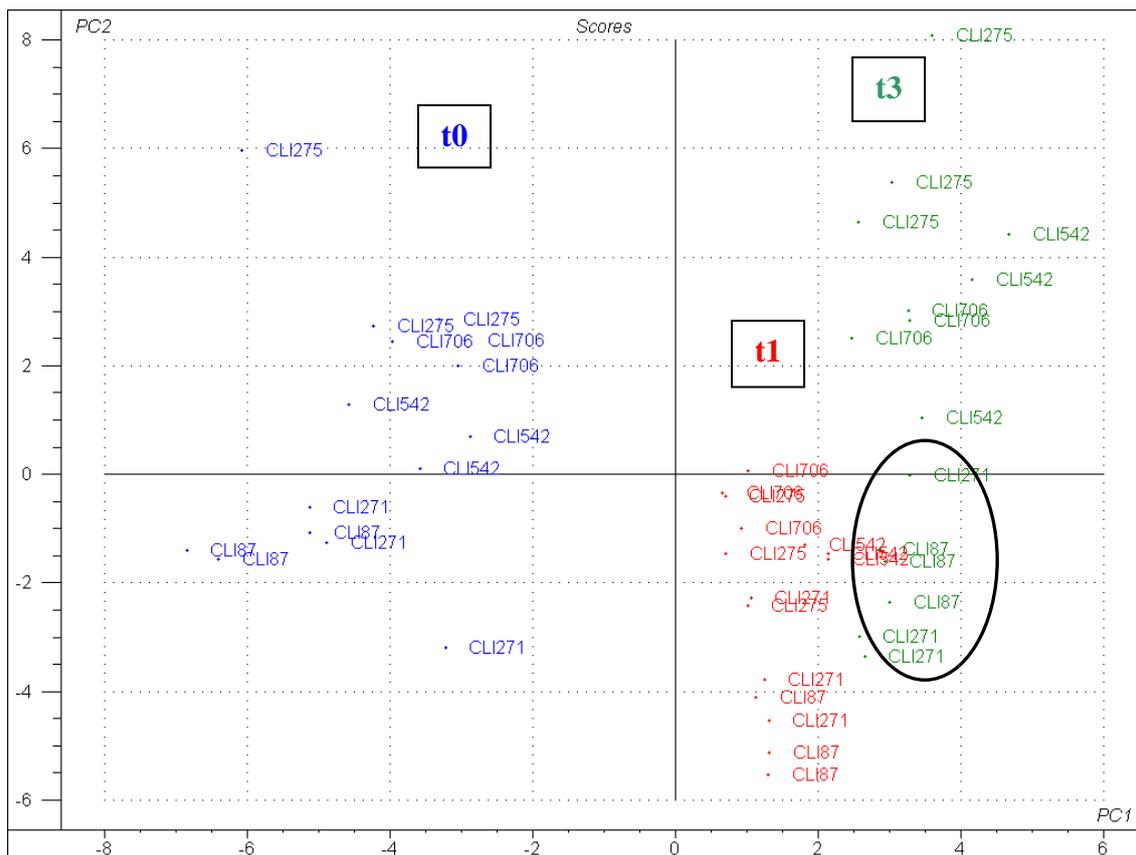


Figure 4. Principal Components Analysis (PCA) of natural must samples after alcoholic fermentation with yeast strains-set 2 (CLI87, CLI271, CLI542, CLI275 and CLI708) at times t0, t1 and t3.

Table 3. Oxidation descriptors scores (0-5) and oxidation degree values (0-5) of natural must fermented with yeast strains-set 2 (CLI87, CLI271, CLI542, CLI275 and CLI706) at time t3. (Average value of 8 panelists).

| Oxidation descriptor | CLI 87 | CLI 271 | CLI 275 | CLI 542 | CLI 706 |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| very ripe fruit-raisin-override fruit | 1.67 ± 0.3 | 0.79 ± 0.1 | 1.02 ± 0.1 | 2.47 ± 0.5 | 2.61 ± 0.2 |
| cognac-brandy-sherry wine | 2.55 ± 0.6 | 1.24 ± 0.4 | 1.98 ± 0.3 | 2.97 ± 0.5 | 2.25 ± 0.3 |
| old wine-matured wine-evolved wine | 2.45 ± 0.5 | 1.55 ± 0.4 | 1.79 ± 0.2 | 2.69 ± 0.2 | 2.50 ± 0.4 |
| honey-molasses | 0.98 ± 0.1 | 0.43 ± 0.1 | 0.81 ± 0.1 | 0.94 ± 0.3 | 0.89 ± 0.1 |
| herbal-plant stem-tannin | 0.83 ± 0.3 | 1.07 ± 0.2 | 1.10 ± 0.1 | 1.17 ± 0.5 | 1.06 ± 0.5 |
| hay-dry grass-straw | 0.05 ± 0.0 | 0.62 ± 0.3 | 0.29 ± 0.1 | 0.17 ± 0.1 | 0.44 ± 0.2 |
| varnish-paint-glue-resin-rubber-solvent | 0.48 ± 0.2 | 0.43 ± 0.2 | 0.48 ± 0.2 | 1.00 ± 0.1 | 0.89 ± 0.3 |
| cooked potato-cooked vegetables | 0.19 ± 0.0 | 0.81 ± 0.3 | 0.33 ± 0.2 | 0.56 ± 0.2 | 0.83 ± 0.4 |
| liquorice-curry | 0.31 ± 0.1 | 0.24 ± 0.1 | 0.48 ± 0.1 | 0.61 ± 0.1 | 0.78 ± 0.0 |
| Oxidation degree | 3.43 ± 0.3 | 2.76 ± 0.3 | 3.43 ± 0.4 | 3.61 ± 0.2 | 3.47 ± 0.7 |

An specific analysis of aldehydes was carried out on “t3” samples and the results are shown in table 4. All odour activity values (OAV) of these compounds, with the exception of (*E*)-2-nonenal, were above 1, meaning that they had an aroma impact in the final wines. Two of the studied strains, *CLI 271* and *CLI 87*, showed lower amounts of these compounds when compared with the rest of the samples. The *CLI 271* strain had the lowest concentration values of compounds that had been correlated negatively with wine’s quality, such as methional and phenylacetaldehyde (San-Juan, Ferreira, Cacho & Escudero, 2011); showing average concentrations of 1.72 ppb and 6.64 ppb, respectively and the second lowest values of concentration for the rest of the aldehydes analysed: 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal and (*E*)-2-nonenal. Regarding the sensory results, *CLI 271* had the lowest scores in the sensorial test (table 3) for 6 of the 9 oxidation related descriptors: “very ripe fruit - raisin - overripe fruit”, “cognac - brandy - sherry wine”, “old wine - matured wine - evolved wine”, “varnish - paint - glue - resin - rubber - solvent”, “honey - molasses”, and “liquorice - curry” and in addition, for the total oxidation degree evaluated. This strain showed the lowest value of phenylacetaldehyde and the lowest score for the “honey - molasses” in the sensory analysis.

The other strain with the lowest amounts of aldehydes at “t3”, *CLI 87*, obtained the lowest concentrations values for 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal and (*E*)-2-nonenal and the lowest total amount of aldehydes. Regarding the sensory results, this strain showed the lowest scores in the sensorial analysis for “herbal - plant stem - tannin”, “hay - dry grass - straw” and “cooked potato - cooked vegetables”.

Conversely, the *CLI 542* and *CLI 706* samples, with the highest amounts of 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal scored the highest for “very ripe fruit - raisin - overripe fruit”, “old wine - matured wine - evolved wine”, “varnish - paint - glue - resin - rubber - solvent”, “liquorice - curry” descriptors and for the total degree of oxidation (table 3). A high content in wines of these aldehydes, along with furfural, methional or (*E*)-2-nonenal, has been previously correlated with oxidation related aromas, such as “honey - molasses”, “varnish - paint - glue - resin - rubber - solvent” or “very ripe fruit - raisin - overripe fruit” in Balboa-Lagunero et al. (2011).

Table 4. Aldehydes concentration (ppb) of natural musts fermented with yeast strains-set 2 (CLI 87, CLI 271, CLI 542, CLI 275 and CLI 706) at time t3 and odour threshold value (in ppb) for each aldehyde. (Analyses performed by triplicate).

| | Odour threshold * | CLI 87 | CLI 271 | CLI 275 | CLI 542 | CLI 706 |
|---------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 2- Methylpropanal | 6 | 80.39 ± 15.46 | 98.34 ± 6.04 | 102.93 ± 27.33 | 122.49 ± 8.26 | 142.60 ± 13.32 |
| 2- Methylbutanal | 16 | 17.02 ± 2.04 | 25.68 ± 1.92 | 34.17 ± 10.49 | 38.80 ± 10.96 | 36.62 ± 2.17 |
| 3-Methylbutanal | 4.6 | 60.47 ± 8.43 | 108.73 ± 6.55 | 121.58 ± 48.88 | 132.19 ± 34.60 | 141.49 ± 12.47 |
| Methional | 0.5 | 6.40 ± 2.16 | 1.72 ± 0.42 | 10.38 ± 1.96 | 3.58 ± 1.28 | 4.00 ± 0.75 |
| Phenylacetaldehyde | 1 | 10.40 ± 2.73 | 6.64 ± 2.06 | 17.13 ± 6.79 | 13.82 ± 4.89 | 9.46 ± 1.24 |
| E-2-Nonenal | 0.6 | 0.17 ± 0.03 | 0.22 ± 0.07 | 0.45 ± 0.18 | 0.32 ± 0.19 | 0.29 ± 0.05 |
| Total: | | 174.85 ± 30.85 | 241.33 ± 17.05 | 286.64 ± 95.63 | 311.20 ± 60.18 | 334.46 ± 30.00 |

* Values taken from Culleré et al, 2007 and Escudero et al., 2000a

Results confirmed that the production of oxidation aromas in wine was linked to the initial content of certain amino acids and that the selection of yeast strains that consumed a high quantity of these amino acids during the alcoholic fermentation, could be a useful tool for minimizing wines aroma degradation notes.

Some conclusions were also obtained from a Pearson's correlation study of the residual amino acids and the aldehydes levels after the aging process. Methionine showed a significant positive correlation with 2-methylpropanal (+0.913, $p < 0.05$), 2-methylbutanal (+0.972, $p < 0.01$) and 3-methylbutanal (+0.917, $p < 0.05$); meaning that those samples that had higher values of methionine at the beginning of an aging process, had higher values of these oxidation related aldehydes once the period was finished.

In the case of methional, results were inconclusive. *CLI 87*, with the lowest amount of methionine, together with *CLI 275*, had at the end of the evolved period (t3) the highest values of methional. One possible explanation could be that methional was not only formed from the Strecker degradation of methionine, but also from the direct peroxidation of the alcohol methionol, which precisely, had the highest values in *CLI 87* at t0 and suffered the greatest drop (82.85%) after the evolved period (t3), leaving very low values of this compound (2.55 ppm). *CLI 275* samples, which also suffered a steep drop in methionol levels (62.43%), had the highest values of methional (10.38 ppm) and residual methionine; therefore it can be assumed that both pathways of the aldehyde formation could have taken place. This result corroborates previous studies of aldehyde

and ketones formation from oxidation of alcohols in wine (Waterhouse & Laurie, 2006; Escudero et al., 2000a).

5.5 CONCLUSIONS

Results showed that concentrations of amino acids and therefore of many volatiles compounds, were significantly influenced by the yeast strain employed for the fermentation. The residual amino acids left in the wine before starting an aging period of 3 months, seemed to partly influence the final volatile concentration, mostly in the aldehydes fraction, and in the sensorial perceptions. The used of two *S. cerevisiae* strains, which showed lower residual values of pro-oxidative amino acids, such as phenylalanine, methionine and leucine after the alcoholic fermentation, allowed obtaining wine samples that after an aging process presented a lower total amount of aldehydes and a lower score in most of oxidation related descriptors measured, as well as a lower value in the overall oxidation degree. Even though these results should be confirmed by the application of the selected yeast strains in a pilot scale cellar, yeast selection could be proposed as a tool for reducing oxidation notes in organic wines.

5.6 LITERATURE CITED

- Balboa-Lagunero, T., Arroyo, T., Cabellos, J.M. & Aznar, M. (2011). Sensory and olfactometric profiles of red wines after natural and forced oxidation processes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62, 527-535.
- Barrajón, N., Capece, A., Arévalo-Villena, M., Briones, A. & Romano, P. (2011). Co-inoculation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains and influence on volatile composition of wines. *Food Microbiology*, 28, 1080-1086.
- Bely, L., Sablayrolles, J. & Barre, P. (1990). Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 319-324.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. & Kunkee, R.E. (1996). Principles and Practices of Winemaking. New York: Chapman & Hall Ed.

- Bueno, M., Culleré, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2010). Chemical and sensory characterization of oxidative behavior in different wines. *Food Research International*, 43, 1423–1428.
- Callejón, R.M., Clavijo, A., Ortigueira, P., Troncoso, A.M., Paneque, P. & Morales, M.L. (2010). Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Analytica Chimica Acta*, 660, 68-75.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M.D. & Valero, E. (2011). Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 132-139.
- Escudero, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J. & Ferreira, V. (2000a). Clues about the Role of Methional as Character Impact Odorant of some Oxidized Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4268-4272.
- Escudero, A., Cacho, J. & Ferreira, V. (2000b). Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study. *European Food Research and Technology*, 211, 105-110.
- Etschmann, M.M.W., Kötter, P., Hauf, J., Bluemke, W., Entian K.D. & Schrader, J. (2008). Production of the aroma chemicals 3-(methylthio)-1-propanol and 3-(methylthio)-propylacetate with yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 579-587.
- Flanzky, C. (2000). Aromas. In *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. (pp. 137-176). Madrid: AMV and Mundi Prensa Ed.
- 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, 2259–2266.
- Hernández-Orte, P., Guitart, A. & Cacho, J. (1999). Changes in the concentration of amino acids during the ripening of *Vitis vinifera* Tempranillo variety from the Denomination d’Origine Somontano (Spain). *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 144-154.
- Hernández-Orte, P., Cacho, J. & Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments

with model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2891-2899.

- Hernández-Orte, P., Ibarz, M.J., Cacho, J. & Ferreira, V. (2003). Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method for amino acid analysis. *Chromatographia*, 58, 29-35.
- Hofmann, T. & Schieberle, P. (2000). Formation of Aroma-Active Strecker-Aldehydes by a Direct Oxidative Degradation of Amadori Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4301-4305.
- Lambropoulos, I. & Roussis, I. G. (2007). Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by caffeic acid and gallic acid. *Food Research International*, 40, 176-181.
- Ledl, F. & Schleicher, E. (1990). New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 29, 565-594.
- Makhotkina, O. & Kilmartin, P.A. (2009). Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 633, 165-174.
- Oliveira, C.M., Silva Ferreira, A.C., De Freitas, V. & Silva, A.M.S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44, 1115-1126.
- Ortega, C., López, R., Cacho, J. & Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and Validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*, 923, 205-214.
- Ough, C., S., Huang, Z. & Stevers, D. (1991). Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: Effects on urea excretion and reabsorption. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 26-40.
- Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Bertrand A. & Maujean, A. (2000). Formation of Flavor Components by the Reaction of Amino Acid and Carbonyl Compounds in Mild Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3761-3766.

- Rapp, A. & Versini, G. (1991). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. In J. Rantz (Ed.), *Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wines* (pp.156-164). Seattle. In: Gómez-Míguez, M.J., Cacho, J., Ferreira, V., Vicario, I.M. & Heredia, F.J. (2007). Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, *100*, 1464-1473.
- Rebelein H. (1973). *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*, *2*, 33-38.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, *86*, 169–180.
- Roussis, I. G. & Sergianitis, S. (2008). Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulfur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flavour and Fragrance Journal*, *23*, 35-39.
- 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*, 7916-7924.
- Silva Ferreira, A.C., Guedes de Pinho, P., Rodrigues, P. & Hogg, T. (2002). Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 5919-5924.
- Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Tsarchopoulos, C. & Biliaderis, C.G. (2003). Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chemistry*, *80*, 261-273.
- Tosi, E., Azzolini, M., Guzzo, F. & Zapparoli, G. (2009). Evidence of different fermentation behaviours of two indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* isolated from Amarone wine. *Journal of Applied Microbiology*, *107*, 210-218.
- Usseglio-Tomasset, L. (1998). *Química Enológica*. (pp. 190-198). Madrid: Mundi-Prensa Eds.
- Vaudano, E. & García-Moruno, E. (2008). Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology*, *25*, 56-64.

- Waterhouse, A.L. & Laurie, V.F. (2006). Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 306-313.
- Zapata, J., Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2010). Comparison of extraction techniques and mass spectrometric ionization modes in the analysis of wine volatile carbonyls. *Analytica Chimica Acta*, 660, 197–205.

Acknowledgments: This work was supported by the Spanish INIA with the project RTA2005-00172. T.B. Lagunero acknowledges the Spanish INIA for her grant. The authors are grateful to the LAAE group, Department of Analytical Chemistry, University of Zaragoza.

Manuscript submitted to the *Food Research International* on March 2012.

PARTE II:

5.2 AMPLIACIÓN DEL ESTUDIO DE LA SELECCIÓN DE LEVADURAS COMO HERRAMIENTAS PARA LA REDUCCIÓN DE NOTAS DE OXIDACIÓN EN VINOS ECOLÓGICOS

5.2.1 RESUMEN

En esta sección se muestra una ampliación del trabajo presentado en la Parte I de este capítulo, cuya finalidad fue la selección de levaduras como herramienta para la reducción de notas de oxidación en vinos ecológicos. Se mostraron los resultados de las fermentaciones y estudios de evolución realizados con cinco cepas de levaduras *S. cerevisiae*, inicialmente seleccionadas debido a su metabolismo caracterizado por minimizar las concentraciones de aminoácidos precursores de aromas de oxidación. Posteriormente se llevaron a cabo nuevos trabajos de investigación que incluyeron el estudio de dos nuevas cepas con características opuestas a las anteriormente seleccionadas, así como de un coinóculo de dos de estas cepas seleccionadas. Debido al interés de estos nuevos experimentos, los resultados se muestran en esta parte II. Además, se muestran experimentos adicionales llevados a cabo durante las fermentaciones que debido a la amplitud de los mismos no pudieron ser incluidos en la publicación correspondiente a la parte I del presente trabajo.

5.2.2 INTRODUCCIÓN

El aroma es una característica esencial e imprescindible cuando se habla de calidad en el vino. Se han realizado hasta el momento numerosos estudios para determinar los compuestos volátiles responsables de la mayor parte de las percepciones aromáticas de esta bebida; algunos ejemplos son los ensayos llevados a cabo por San-Juan et al., 2011, Escudero et al., 2007 y Perestrelo et al., 2006. Existen tres factores críticos en la producción de compuestos volátiles del vino: la composición del mosto de partida, las especies de levaduras presentes en él y las añadidas de manera artificial y las condiciones de fermentación (temperatura, aireación, NH_4^+ adicionado, tiempo de contacto con la levadura, enzimas pectolíticas adicionadas, etc.). Durante los últimos años y en gran parte gracias al avance de la Biotecnología y la Genética, se ha podido estudiar la influencia que tiene en el aroma final del vino la aplicación de

diferentes cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Callejón et al., 2010; Torrens et al., 2008); ya que hasta hace pocos años no se disponía de la tecnología suficiente para poder llegar a diferenciar a nivel de cepa dentro de las especies de levaduras. Esta capacidad de influir en la calidad aromática viene determinada por dos hechos: la habilidad única que tiene cada cepa de levadura de liberar volátiles varietales a partir de los compuestos precursores de las propias uvas y la capacidad de sintetizar “de novo” compuestos aromáticos derivados del metabolismo fermentativo producido durante la fermentación alcohólica (Wondra et al., 2001; Ugliano et al., 2006; Vilanova et al., 2006).

Antiguamente el vino se elaboraba mediante fermentaciones espontáneas realizadas por las levaduras procedentes de la superficie de las uvas y del propio ambiente de las bodegas. Este tipo de vinificaciones con las levaduras presentes de forma natural pueden garantizar una mayor tipicidad del vino. Actualmente, la mayor parte de las bodegas utilizan levaduras secas activas comerciales como cultivos iniciadores. El uso de este tipo de levaduras seleccionadas aporta una mayor estandarización y fiabilidad al proceso de vinificación; ofreciendo a su vez, la elección de características determinadas deseables, tales como la capacidad de fermentar a temperaturas bajas, conducir fermentaciones con cortas fases de latencia, ser tolerantes al etanol o evitar la formación de aromas no deseados (Carrascosa et al., 2005; Zironi, 1999); lo cual en definitiva mejora la calidad de los vinos. Pero el uso masificado de un pequeño número de levaduras seleccionadas como starters, ha llevado a una cierta reducción en la biodiversidad de las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* a pesar de la gran variabilidad que siempre ha existido en las bodegas (Barrajón-Simancas et al., 2011). Además, el uso de levaduras autóctonas, en lugar de cepas estándar comerciales, es en muchos casos muy recomendable ya que están mejor aclimatadas a las condiciones medioambientales de su región de origen y ayudan a asegurar el mantenimiento de las propiedades sensoriales típicas de los vinos de una región determinada (Callejón et al., 2010).

Los aminoácidos sirven como nutrientes a las levaduras a lo largo de la fermentación alcohólica. Su contenido, tanto en el mosto como en el vino, puede verse influenciado por la variedad y madurez de la uva de partida, la región de la que proviene, el año de vendimia, la fermentación maloláctica y sobretodo, su concentración

final en el vino va a ser en gran parte dependiente del metabolismo de las propias levaduras (Soufleros et al., 2003; Hernández-Orte et al., 1999). *S. cerevisiae* puede incorporar directamente los aminoácidos, o bien, utilizarlos como fuente de nitrógeno mediante desaminación oxidativa (excepto para la lisina e histidina). De forma alternativa, un aminoácido puede ser degradado liberando nitrógeno para la biosíntesis de otros constituyentes nitrogenados de las células de las levaduras (Large, 1986). Además, el propio perfil de aminoácidos y factores ambientales, fisiológicos y específicos de cada cepa, influirán en el orden en el que los diferentes aminoácidos van a ser utilizados por la levadura; lo cual, a su vez, influye en la relación de los metabolitos secundarios secretados durante la fermentación (Barrajón-Simancas et al., 2011; Hernández-Orte et al., 2002; Salmon y Barre, 1998). Los distintos aminoácidos presentes en el mosto de partida van a ir sufriendo una serie de biotransformaciones, generándose compuestos tales como, alcoholes superiores, ácidos orgánicos, ésteres, aldehídos, lactonas e incluso terpenos y compuestos fenólicos, entre otros (Suárez Lepe, 1997); lo cual modulará la composición y propiedades organolépticas finales del vino (Vilanova et al. 2007).

Pero la influencia de las cepas de levaduras presentes en el mosto en el aroma final del vino no va a ser sólo debida la formación de compuestos volátiles durante los procesos de fermentación, sino también a su influencia en la concentración final de aminoácidos precursores de compuestos volátiles. Estos compuestos precursores de aromas pueden dar lugar en condiciones de oxidación del vino a compuestos volátiles con aromas desagradables que reducirán la calidad organoléptica del vino. Las reacciones redox que tienen lugar durante la vinificación son responsables de cambios importantes en la composición y calidad final del vino y la limitación en las dosis de empleo del antiséptico y antioxidante dióxido de azufre (SO₂) permitidas en la elaboración de los vinos ecológicos favorece estos procesos.

Las alteraciones debidas a procesos de oxidación, implican entre otros cambios, la aparición de aromas desagradables, tales como: “patata/verdura cocida”, “miel” o “pienso” y un pardeamiento temprano del vino (Escudero et al., 2000a; Silva Ferreira et al., 2002; Silva Ferreira et al., 2003a), relacionados con la presencia de compuestos tales como el metional, fenilacetaldehído, sotolón, t-2-nonenal, benzaldehído, t-2-octenal, hexanal, 1-octen-3-ol, furfural y 5-metilfurfural (Ferreira et al, 1998, Escudero et al.,

2000b; Silva Ferreira et al, 2002 y Silva Ferreira et al., 2003b). Algunos de estos compuestos, cuya génesis está relacionada con el efecto del oxígeno, son productos de la degradación oxidativa de ácidos grasos insaturados, como el hexanal, 1-octen-3-ol, t-2-octenal y t-2-nonenal; pero otros como el benzaldehído, furfural, 5-metilfurfural, 5-hidroxi-metilfurfural, eugenol, 2-nonanona, 2-butoxietanol y 4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona tienen un origen diverso (Escudero et al., 2002). Se ha estudiado cómo dentro de este último grupo de compuestos, la formación o aumento de por ejemplo, el furfural, 5-metilfurfural y el 5-hidroxi-metilfurfural puede explicarse gracias a las reacciones de Amadori, cuyos productos se forman por ciclación/condensación de las deoxisonas. En cambio, otras reacciones, que también están englobadas en los mecanismos de Maillard, consisten en la degradación de aminoácidos en presencia de compuestos dicarbonílicos o vía Strecker, que genera aldehídos del tipo fenilacetaldehído y metional (Oliveira e Silva et al., 2008). Estos últimos compuestos pueden ser sintetizados por peroxidación directa de sus alcoholes (Hazelwood et al., 2008); pero estudios como los de Escudero et al. (2000a) han apuntado a la degradación vía Strecker como vía principal de formación. Tanto si son formados mediante las reacciones de Amadori o gracias a la vía Strecker, una variación en la concentración inicial de aminoácidos precursores de estos compuestos influiría en su concentración final en el vino.

Trabajos previos han estudiado los productos de reacción de aminoácidos y compuestos dicarbonílicos. Los compuestos dicarbonílicos tienen importancia en el aroma del vino debido a su impacto sensorial y a su reactividad con otros componentes del vino. Existen dos posibles fuentes de compuestos dicarbonílicos en el vino que son capaces de generar la reacción de Strecker. Por una parte se encuentran los compuestos α -dicarbonílicos que se dan de forma natural en el vino; cuyos principales representantes son: glioxal, metilglioxal, diacetilo y pentano-2,3-diona. Estos compuestos se encuentran en todos los tipos de vinos; aunque existen en mayores concentraciones en los vinos tintos, debido en gran parte a la fermentación maloláctica y en los vinos blancos dulces producidos a partir de uvas botritizadas; los cuales pueden contener niveles elevados de glioxal y metilglioxal (Castellucci, 2010). Pripis-Nicolau et al. (2000), estudiaron los principales productos de reacción formados a partir de ciertos aminoácidos y compuestos α -dicarbonílicos en soluciones de vino sintéticas, obteniendo aldehídos, tales como metional, 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, y fenilacetaldehído (ver Tabla 1), característicos por mostrar aromas de

alteración y umbrales de percepción particularmente bajos, conllevando a defectos olfativos en los vinos. La segunda fuente de compuestos dicarbonílicos se corresponde con las orto-quinonas provenientes de la oxidación de orto-difenoles. Las orto-quinonas se sabe que son responsables de inducir reacciones tipo Strecker a partir de aminoácidos; siendo esta vía la más probable en los procesos de oxidación (Singleton, 1987; Escudero et al., 2000a). Debido a que estas reacciones son además dependientes no sólo de la temperatura, sino también del nivel de oxígeno (Silva Ferreira et al., 2002); se puede considerar a este tipo de compuestos aldehídicos generados tras la degradación de sus aminoácidos de partida como claros indicadores del nivel de oxidación de un vino (Bueno et al., 2010).

Tabla 1. Productos de reacción identificados tras la reacción de los aminoácidos metionina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y cisteína, en presencia de compuestos α -dicarbonílicos en soluciones independientes hidroalcohólicas a pH 3,5. (Adaptada de Pripis-Nicolau, 2000).

| Sustratos | Productos formados | Descripción aromática | |
|---------------------|--|---|--------------------------|
| aminoácido | compuestos α-dicarbonilos | | |
| metionina | glioxal, metilglioxal, diacetilo y pentano-2,3-diona | metional, metanotiol, disulfuro de dimetilo | patata, repollo |
| valina | glioxal, metilglioxal, diacetilo y pentano-2,3-diona | 2-metilpropanal | queso |
| leucina | glioxal, metilglioxal, diacetilo y pentano-2,3-diona | 3-metilbutanal | aromas amílicos |
| isoleucina | glioxal, metilglioxal, diacetilo y pentano-2,3-diona | 2-metilbutanal | frutal |
| fenilalanina | glioxal, metilglioxal, diacetilo y pentano-2,3-diona | benzaldehído, fenilacetaldehído | floral |
| cisteína | glioxal, metilglioxal, diacetilo y pentano-2,3-diona | metanotiol y diferentes piracinas, tiazoles y oxazoles (ej. 2,5-dimetilpiracina, 2,6-dimetilpiracina, 2,6-dietil-3,5-dimetilpiracina, 2-acetil tiazol, 2,4-dimetil-5-etil oxazol) | repollo, tostado, azufre |

Debido a que tanto en el mosto, como en el vino, la concentración de aminoácidos es un factor decisivo en la formación de aromas y por lo tanto en la calidad organoléptica del vino (Escudero et al., 2000a; Hernández-Orte et al., 2002) y que las levaduras que producen altos niveles de SO₂ también originan aromas intensos de alteración relacionados con el azufre y concentraciones más altas de acetaldehído

(Delteil, 2003); es lógico pensar que, la selección de mostos con perfiles de aminoácidos concretos y/o la selección de levaduras que metabolicen de manera específica los aminoácidos precursores de aromas negativos y sean productoras de bajas concentraciones de SO₂ puede constituir una vía de estudio para la mejora aromática de los vinos ecológicos. El hecho de que no se pueda seleccionar a priori la composición de aminoácidos del mosto que se va a obtener en cada vendimia; hace pensar en la selección de levaduras como un punto clave a la hora de obtener vinos con características sensoriales determinadas. Para ello, este estudio se ha centrado concretamente en la selección de cepas de la colección de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas de la D.O. “Vinos de Madrid” existente en el IMIDRA, cuyo metabolismo minimice el contenido de aminoácidos precursores de aromas negativos y produzcan niveles bajos de SO₂, para a la par, no sobrepasar los niveles admitidos en la elaboración de los vinos ecológicos. De esta forma se podría mejorar y asegurar la calidad y favorecer el mercado de los vinos orgánicos.

5.2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

LEVADURAS: Inicialmente se emplearon 19 cepas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* preseleccionadas por sus buenas aptitudes fermentativas y enológicas. De éstas, 16 son levaduras autóctonas estudiadas en el capítulo 5- parte I de la colección del IMIDRA (CLI 748, CLI 631, CLI 633, CLI 589, CLI 277, CLI 706, CLI 54, CLI 275, CLI 271, CLI 77, CLI 87, CLI 542, CLI 63, CLI 876, CLI 889 y CLI 892) y tres cepas (EC1118, QA 23 y NA 33) de la casa comercial Lalvin® de Lallemand Inc.. Estas 16 cepas de la colección han sido recogidas a lo largo de los años en numerosas bodegas de las diferentes subzonas de la D.O. “Vinos de Madrid”. Con anterioridad se había realizado, la identificación y caracterización de levaduras vínicas de la colección mediante técnicas de taxonomía clásica, basadas en sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Kreger-van Rij, 1984).

TÉCNICAS DE DIFERENCIACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS:

TEST LISINA: El test de crecimiento en L-lisina como única fuente de nitrógeno (Barnett et al. 1990) conduce a la división de las cepas de levaduras aisladas en dos grandes grupos, *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* y se basa en la incapacidad de las

levaduras del género *Saccharomyces* a crecer en un medio con lisina como única fuente de carbono. Para la realización del test son necesarios dos medios de cultivo, el primero llamado YNB (Yeast Nitrogen Base) Lys –, compuesto por YNB sin aminoácidos y con sulfato amónico 0,67%, glucosa 2%, agar 2% y el segundo medio con lisina como única fuente de nitrógeno YNB Lys + compuesto por YNB sin aminoácidos ni sulfato amónico 0,67%, glucosa 2%, agar 2% y lisina 0,2%. Ambos medios son previamente autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Las levaduras que no presentaron crecimiento en medio con lisina como única fuente de nitrógeno se asocian al género *Saccharomyces*, las que si crecen en el medio con lisina se consideraron levaduras no-*Saccharomyces* (Figura 1).

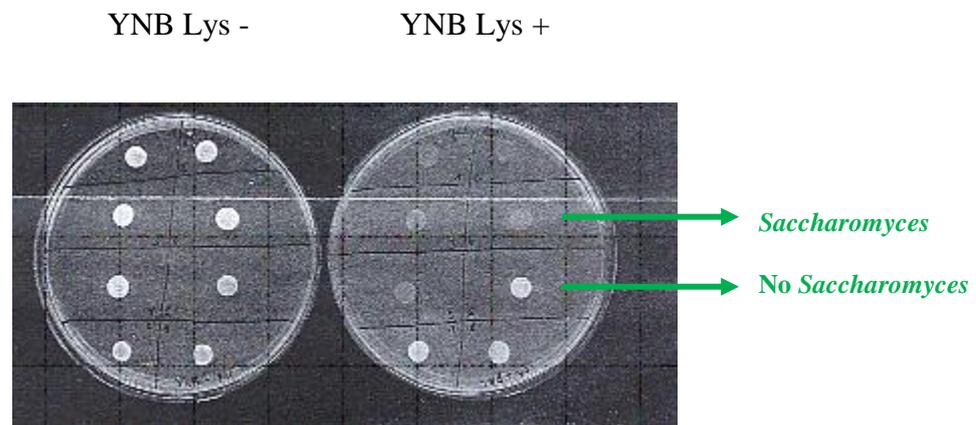


Figura 1. Test de la lisina. La placa con medio YNB Lys – muestra crecimiento de todas las levaduras, por el contrario en la placa con medio YNB Lys + se observa crecimiento de aquellas especies capaces de asimilar lisina como única fuente de nitrógeno.

IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS DE LEVADURA AISLADAS: Los pasos a seguir en la identificación genética de las cepas de levadura aisladas fueron:

- Extracción del ADN
- Cuantificación del ADN extraído
- Identificación molecular de las levaduras mediante:
 - A. Estudio de las secuencias de los espaciadores intergénicos: regiones ITS del ADNr mediante PCR
 - B. Análisis de los fragmentos de restricción del polimorfismo de longitud (RFLP)

C. Análisis mediante Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR)
(Simple Sequences Repeats Multiplex)

- Visualización de los perfiles genéticos
- Análisis genómicos de las levaduras

(Ver ANEXO 3: “Protocolos para la identificación genética de las cepas de levaduras aisladas” con la información detallada del procesamiento de las muestras y las técnicas de identificación empleadas).

PRESELECCIÓN DE LEVADURAS. FERMENTACIONES EN MOSTO ARTIFICIAL:

FERMENTACIONES: La metodología seguida para las fermentaciones en mosto sintético está descrita en la parte I, en la sección material y métodos.

Se siguieron a lo largo de la fermentación los siguientes parámetros: consumo de azúcar, liberación de CO₂, cinética de la fermentación, caracterización de la población de levaduras, medida de la biomasa y viabilidad celular. Para la monitorización y control de la fermentación se calculó el desprendimiento de CO₂ gracias a los datos aportados por la toma diaria de los pesos de los fermentadores. La validación de esta técnica ha sido previamente descrita por Sablayrolles et al. (1987) y El Haloui et al. (1988). Se consideraron las fermentaciones como terminadas cuando la diferencia entre dos pesos consecutivos era <0,2 g. El cálculo de la población de levaduras se realizó mediante la medida de Absorbancia a 600 nm de las muestras de los fermentadores a diferentes tiempos de fermentación. La biomasa se estimó mediante las medidas de los pesos secos y la viabilidad celular mediante siembra en placas con medio de cultivo LM de diluciones seriadas de muestras de los fermentadores tomas a diferentes tiempos durante la fermentación.

(Ver ANEXO 4: “Parámetros para el seguimiento de las microfermentaciones”. Apartado 4.1: “Toma de muestras y procesamiento”)

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS: La metodología seguida para el análisis de aminoácidos está descrita en la parte I, en la sección material y métodos. La Figura 3

muestra a modo de ejemplo, un cromatograma de los distintos aminoácidos analizados en una muestra de vino. (Ver ANEXO 6: “Rectas de calibrado de aminoácidos”).

De este estudio se seleccionaron las cepas en función de la concentración final de metionina y fenilalanina para llevar a cabo las fermentaciones en mosto natural.

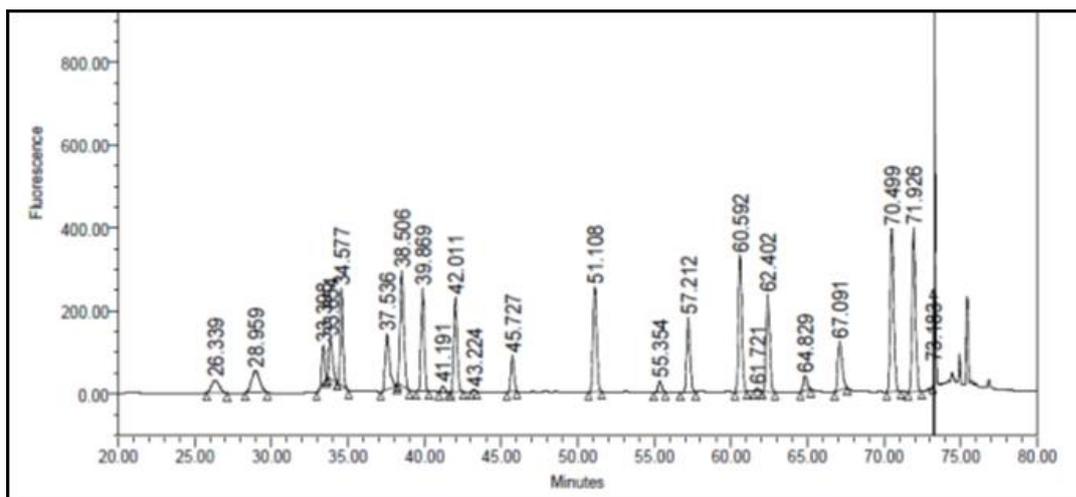


Figura 3. Cromatograma de un análisis de aminoácidos de una muestra de vino mediante HPLC-Fluorescencia. El orden de los aminoácidos de izquierda a derecha es el siguiente: Asp, Asn, Ser, Glu, His, Gly, Arg, Thr, NH₄⁺, Ala, Pro, γ -ABA, α -ABA (standard interno), Cys, Tyr, Val, Met, Orn, Lys, Ile, Leu y Phe.

ANÁLISIS DE SO₂: Se determinó la cantidad total de SO₂ presente en las muestras de cada fermentación mediante la utilización de un método fotométrico basado en la actividad enzimática de la sulfito-oxidasa y la NADH-peroxidasa, con el kit de Sulfito de R-Biopharm de Roche (Darmstadt, Alemania). Las muestras se midieron con un espectrofotómetro UV-Vis de la casa Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific (EEUU).

SELECCIÓN DE LEVADURAS EN MOSTO NATURAL:

FERMENTACIONES: La metodología seguida para las fermentaciones en mosto natural de la variedad blanca Palomino está descrita en la parte I, en la sección de Materiales y métodos. Las fermentaciones, se llevaron a cabo con cinco “cepas

óptimas”: CLI 87, CLI 271, CLI 275, CLI 542 y CLI 706 (parte I) y 3 cepas “no óptimas”: CLI 277 y CLI 748. Además se realizó un coinóculo al 50% de las cepas CLI 706 y CLI 542 (CLI 706+542). Las cepas se seleccionaron en base a la concentración de aminoácidos y SO₂ (las óptimas desde el punto de vista de mayor metabolización de fenilalanina y metionina y menor concentración residual de SO₂ y las “no óptimas” en cuanto a una menor metabolización de dichos aminoácidos).

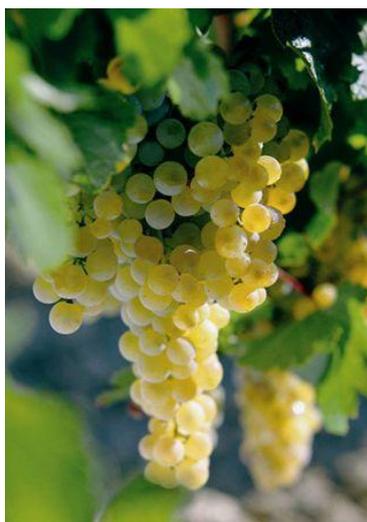


Figura 5. Variedad *Palomino*.

Los valores del mosto al inicio de la fermentación fueron los siguientes: 19,4 °Brix, equivalente a 11,0 GAP (grado alcohólico probable), pH 3,53 y 5,57 g/L de ácido tartárico. Se siguió la fermentación gravimétricamente mediante pesada diaria y se estudió la cinética fermentativa de cada cepa. El poder fermentativo (PF) se ha calculado evaluando la pérdida de peso debido a la liberación de CO₂ entre el inicio y el final de la fermentación por volumen de mosto, mediante la siguiente estimación (Vaughan-Martini y Martini, 1988):

$$\%PF (\text{° Etanol}) = [P \text{ final (g)} - P \text{ inicial (g)}] * v/V * 100$$

P = Peso del fermentador

v = Constante con valor: 1,3

V = Volumen inicial de mosto (500 ml)

ANÁLISIS DEL PORCENTAJE DE IMPLANTACIÓN DE CADA CEPA PARA LOS

COINÓCULOS: Se tomaron muestras de los tres fermentadores del coinóculo CLI 706+542 al final de la fermentación. Se realizaron diluciones en serie y se incubaron en placas con medio sólido YPD (extracto de levadura 1%, peptona 1%, glucosa 2% y agar 2%). De cada fermentador se seleccionó una placa con un número de colonias estaba entre 30 y 300 y se tomaron al azar 30 colonias. Estas 30 colonias fueron sometidas a un análisis de Microsatélites para determinar el porcentaje de implantación de cada una de las dos levaduras coinoculadas al final de la fermentación alcohólica (ver subapartado: “Identificación genética de las cepas de levadura aisladas” dentro de la sección “Técnicas de diferenciación e identificación de levaduras” de este mismo capítulo).

ANÁLISIS ENOLÓGICOS GENERALES: El mosto de partida fue sometido a una evaluación de varios parámetros:

- Grado alcohólico probable (GAP) y grado Brix: La determinación se realizó mediante el método de referencia por refractometría. Se utilizó un refractómetro digital PR-100 de Atago® con sensor de temperatura y ajuste previo del cero con agua destilada.
- Acidez total y pH: La acidez total es la suma de los ácidos valorables del vino o mosto cuando se lleva el pH a 7 añadiendo una solución de hidróxido de sodio. La determinación del pH en el mosto y el vino es una medida complementaria de la acidez total porque permite medir la fuerza de los ácidos que contienen. Para la obtención de los valores de acidez total se hizo una valoración potenciométrica con una disolución de NaOH 0,5M factorizada. Se empleó el titrador automático Crison modelo Compact Tritator (Crison Instruments, Barcelona). Los resultados de acidez total vienen expresados en g/L de ácido tartárico.

Al terminar la fermentación alcohólica, se analizaron además los siguientes parámetros:

- Acidez volátil: La acidez volátil es el conjunto de ácidos grasos de la serie acética que se hallan en el vino libres o combinados formando sales. La determinación se consigue mediante una destilación previa del vino por

arrastre del vapor, seguida de una valoración del destilado con NaOH 0,1M. Los resultados de acidez volátil vienen expresados en g/L de ácido acético.

- Grado alcohólico volumétrico: Por definición el grado alcohólico volumétrico es el número de litros de etanol y de sus homólogos (metanol, alcoholes superiores, 2,3-butanodiol, etc.) contenidos en 100 L de vino, medidos ambos volúmenes a la temperatura de 20°C. Se ha utilizado el método oficial CEE 1990, por destilación y medida del grado mediante un densitómetro Mettler Toledo (Mettler Toledo, Barcelona) modelo “Densito 30P” a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Se eliminó previamente el CO₂ a las muestras mediante agitación en un baño de ultrasonido.
- Azúcares reductores: se determinaron mediante el método de Rebelein modificado (1973), basado en la capacidad reductora de la glucosa y fructosa sobre las sales cúpricas. La calibración previa se realizó con cinco patrones de Glucosa de concentraciones crecientes de 5 a 25 g/L. Se empleó el titrador automático Crison modelo Compact Tritator (Crison Instruments, Barcelona).

ESTUDIO EVOLUTIVO: El estudio evolutivo llevado a cabo con las “cepas óptimas” en la parte I, se llevó a cabo con las “cepas no óptimas” y el coinóculo. Una vez terminada la fermentación alcohólica se dejaron los fermentadores durante tres meses a temperatura ambiente y con aireación periódica, para simular un proceso evolutivo. Se tomaron muestras a tres tiempos: “t0” (final de la fermentación), “t1” (después de 1 mes de evolución) y “t3” (después de 3 meses de evolución). Se realizó un análisis de los niveles de aminoácidos y de SO₂ del mosto original y de las muestras “t0”. Un análisis de compuestos volátiles mayoritarios también se llevó a cabo sobre todas las muestras del estudio, “t0”, “t1” y “t3” y un análisis de compuestos aldehídicos sobre las muestras más evolucionadas, es decir, las pertenecientes al grupo “t3”. Además se realizó un análisis sensorial de descriptores específicos de oxidación sobre estas últimas muestras “t3”.

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS: El análisis de aminoácidos está descrito en la parte I, en la sección de “Materiales y Métodos” (página 121).

ANÁLISIS DE SO₂: El análisis de aminoácidos está descrito en la parte I, en la sección de “Materiales y Métodos” (página 121).

ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES: La metodología seguida para el análisis de compuestos volátiles esta descrita en la parte I, en la sección de “Materiales y métodos” (página 122). La Figura 5 muestra a modo de ejemplo, un cromatograma de los distintos compuestos volátiles analizados en una muestra de vino.

Ver Anexo 6: “*Rectas de calibrado de compuestos volátiles mayoritarios del vino (GC-FID)*”.

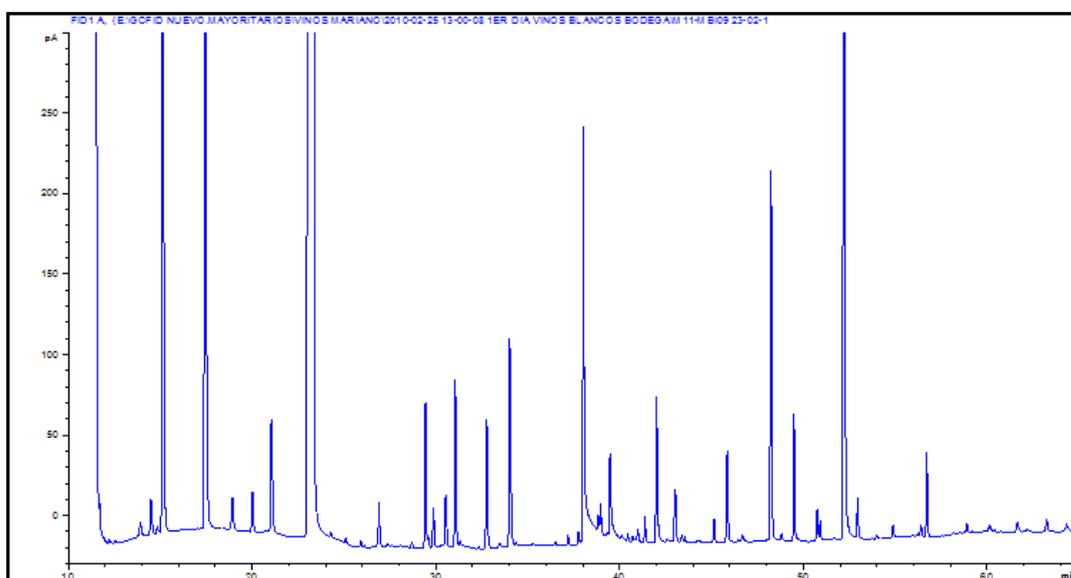


Figura 5. Cromatograma de una muestra de vino blanco analizado mediante GC-FID.

ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS: La metodología seguida en el análisis de aldehídos esta descrita en la parte I, sección de “Materiales y métodos” (página 122).

ANÁLISIS SENSORIAL: La metodología seguida en el análisis sensorial está descrita en la parte I, sección de “Materiales y métodos” (página 123). La ficha de cata para descriptores de oxidación se muestra en la Figura 6.

CATA OLFATIVA DESCRIPTORES DE OXIDACIÓN

CATADOR:

FECHA:

Indicar la presencia o ausencia de los siguientes descriptores. En caso de presencia, valorar en una escala de 0 a 5 la intensidad del aroma.
 Nota: Para cada muestra uno o más descriptores pueden estar presentes. Igualmente, puede no detectarse ninguno de ellos.

| DESCRIPTORES | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 |
|--|----|----|----|----|----|----|
| fruta muy madura - fruta pasa - uva pasa | | | | | | |
| coñac - brandy - vino jerez - vino oloroso - quina | | | | | | |
| vino viejo - vino añejo - vino evolucionado - vino pasado | | | | | | |
| miel - melaza | | | | | | |
| herbáceo - tallo vegetal - raspón | | | | | | |
| heno - hierba seca - paja | | | | | | |
| barniz - pintura - pegamento - resinas -gomas - disolvente | | | | | | |
| patata cocida - verdura cocida | | | | | | |
| regaliz | | | | | | |
| Nivel Oxidación Global (0-5) | | | | | | |

Muchas gracias por tu colaboración

Figura 6. Ficha modelo de cata sensorial para descriptores de oxidación

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Se realizaron estudios de correlación de Pearson y análisis de componentes principales (PCA) utilizando los software *SPSS v19.0* (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU) y *The Unscrambler v9.1* (Camo, Asa, Noruega).

5.2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CEPAS DE LEVADURAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO Y SU IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

La preselección de las cepas de levaduras de entre las que conforman la colección del IMIDRA se llevó a cabo por selección clásica de levaduras vínicas (Suárez Lepe e Íñigo Leal, 2003) tras realizar unos experimentos previos de microfermentaciones. Se emplearon diferentes criterios de selección, entre ellos: poseer una correcta cinética fermentativa (rápido arranque y acabado, duración de la

fermentación, regularidad durante la fermentación...), acidez volátil baja, poder fermentativo elevado (producción y tolerancia al etanol, ausencia de problemas de acabado) y ausencia de defectos olfativos. Las levaduras finalmente seleccionadas de entre más de 1000 cepas de *S. cerevisiae*, junto con sus parámetros enológicos más destacados, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros generales de fermentación de las 16 cepas preseleccionadas de la colección del IMIDRA.

| CODIGO | ESPECIE | Acidez Volátil (g/L ácido acético) | Azúcares reductores (g/L) | Grado alcohólico potencial | pH |
|---------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------|----------------------------|-----|
| CLI 631 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,29 | 2,00 | 14,0 | 3,5 |
| CLI 748 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,29 | 2,00 | 14,0 | 3,5 |
| CLI 87 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,32 | 1,31 | 14,1 | 3,5 |
| CLI 54 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,33 | 2,50 | 13,9 | 3,5 |
| CLI 542 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,35 | 2,56 | 14,2 | 3,5 |
| CLI 77 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,35 | 2,17 | 14,2 | 3,6 |
| CLI 275 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,36 | 1,88 | 14,0 | 3,4 |
| CLI 63 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,39 | 2,40 | 14,2 | 3,6 |
| CLI 633 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,40 | 1,68 | 14,0 | 3,5 |
| CLI 277 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,41 | 2,04 | 14,0 | 3,4 |
| CLI 706 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,42 | 2,14 | 14,0 | 3,6 |
| CLI 271 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,43 | 2,17 | 14,2 | 3,5 |
| CLI 589 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,45 | 2,26 | 13,9 | 3,7 |
| CLI 644 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,48 | 2,34 | 14,0 | 3,5 |
| CLI 876 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,40 | 1,20 | 11,9 | 3,8 |
| CLI 889 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,40 | 1,50 | 12,9 | 3,8 |
| CLI 892 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,50 | 1,30 | 11,9 | 3,8 |

Se realizó un análisis de los fragmentos de restricción del polimorfismo de longitud (RFLP) como estudio previo a todas las levaduras con las que se trabajó. Mediante esta técnica se confirmó que todas las levaduras objeto de estudio pertenecían a la especie *S. cerevisiae* (se obtuvo un producto de digestión con las enzimas de restricción HaeIII, CfoI e HinfI que se pudo visualizar tras la realización de un gel de electroforesis). La Figura 7 muestra los ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacers) digeridos por las enzimas de restricción. A su vez, se realizó un análisis mediante microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) de todas las cepas. El perfil

genético de las 21 cepas genotipadas mediante PCR múltiple de microsatélites se puede observar en la Figura 8.

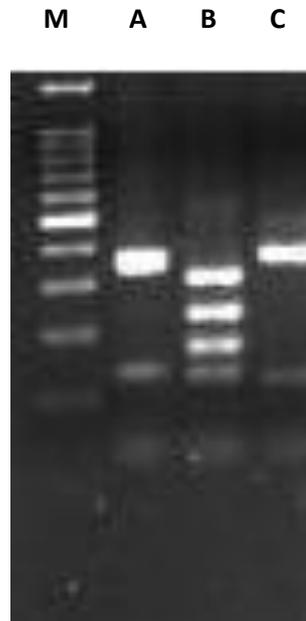


Figura 7. RFLPs característicos de *Saccharomyces cerevisiae*. M: marcador 100pb; A: fragmento ITS1-5.8S-ITS2 digerido con CfoI, B: digerido con HaeIII y C: digerido con HinfI.

En la Tabla 3, se muestran los tamaños de los fragmentos de los tres microsatélites amplificados para cada cepa de levadura, junto con su código designado de la colección del IMIDRA (CLI) y la procedencia dentro de la Comunidad de Madrid. En total se estudiaron 16 cepas autóctonas de la D.O. “Vinos de Madrid” y tres cepas comerciales (las cepas designadas con los números 18 y 19 en la Figura 8 no se utilizaron para el presente estudio y por tanto no se muestran en la Tabla 3).

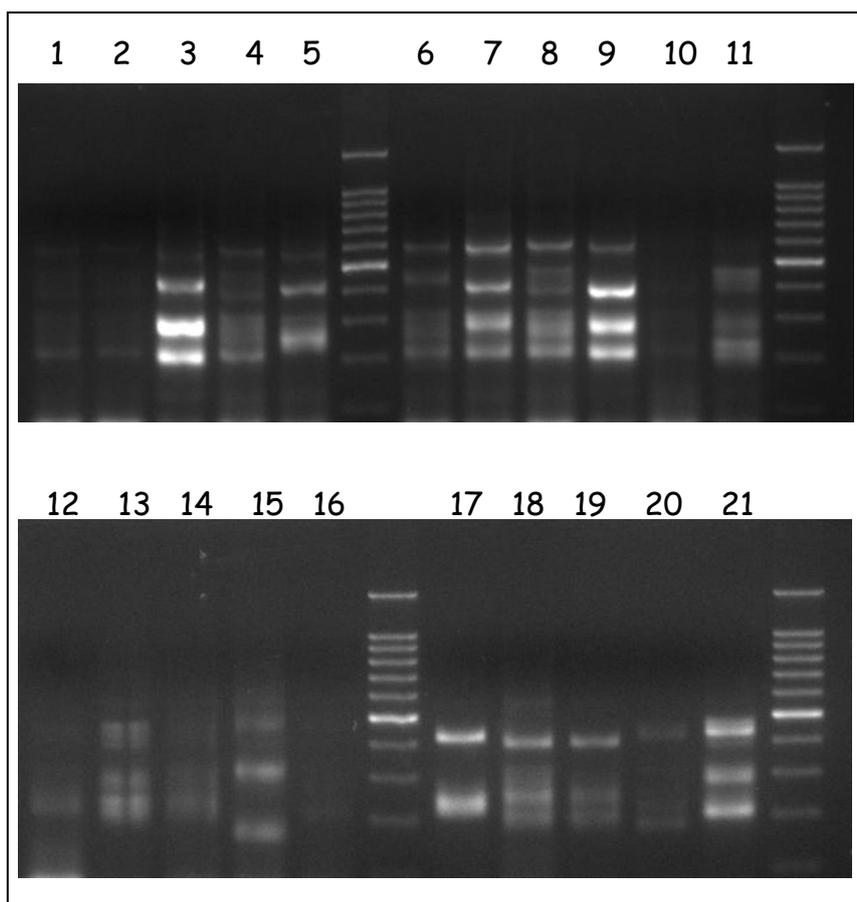


Figura 8. Foto de los geles de agarosa con el perfil genético de las 21 cepas genotipadas mediante PCR múltiple de microsatélites (método Vaudano y García-Moruno, 2008). Marcador ADN de 100bp (Promega). Cada número indica una de las cepas estudiadas. Los códigos correspondientes se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Tamaño de los fragmentos (pdb) de los microsatélites amplificados para cada cepa de levadura.

| Código: | Procedencia | Nombre | SCPTSY7 | SCPTSY7 | SC8132X | SC8132X | YOR267C | YOR267C |
|---------|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | Navalcarnero | CLI 54 | 262 | 292 | 212 | 212 | 389 | 433 |
| 2 | Navalcarnero | CLI 63 | 265 | 292 | 212 | 212 | 389 | 433 |
| 4 | Navalcarnero | CLI 77 | 271 | 292 | 212 | 212 | 389 | 433 |
| 5 | Navalcarnero | CLI 87 | 256 | 256 | 230 | 230 | 413 | 413 |
| 6 | San Martín | CLI 271 | 256 | 268 | 206 | 209 | 430 | 430 |
| 7 | San Martín | CLI 275 | 280 | 280 | 209 | 209 | 407 | 407 |
| 8 | San Martín | CLI 277 | 256 | 268 | 206 | 209 | 389 | 430 |
| 9 | Navalcarnero | CLI 542 | 271 | 271 | 206 | 206 | 389 | 389 |
| 10 | Arganda | CLI 589 | 280 | 280 | 212 | 212 | 389 | 389 |
| 11 | Navalcarnero | CLI 631 | 226 | 268 | 196 | 206 | 389 | 421 |
| 12 | Navalcarnero | CLI 633 | 265 | 265 | 203 | 206 | 389 | 421 |
| 13 | San Martín | CLI 706 | 226 | 268 | 196 | 206 | 389 | 421 |
| 14 | Navalcarnero | CLI 748 | 226 | 268 | 196 | 206 | 389 | 433 |
| 15 | Colmenar de Oreja | CLI 876 | 303 | 303 | 164 | 164 | 454 | 454 |
| 16 | Colmenar de Oreja | CLI 889 | 268 | 268 | 209 | 209 | 451 | 451 |
| 17 | Colmenar de Oreja | CLI 892 | 235 | 235 | 215 | 215 | 416 | 416 |
| 3 | COMERCIAL | NA-33 | 283 | 283 | 206 | 206 | 430 | 430 |
| 20 | COMERCIAL | EC-1118 | 226 | 268 | 184 | 196 | 389 | 389 |
| 21 | COMERCIAL | QA-23 | 283 | 283 | 206 | 206 | 389 | 430 |

PRESELECCIÓN DE CEPAS DE LEVADURAS. FERMENTACIONES EN MOSTO SINTÉTICO

Se realizaron fermentaciones con las 16 cepas seleccionadas y las tres comerciales utilizando el mosto sintético MS-300 (300 mg/l de nitrógeno asimilable), que se aproxima a uno natural, tal como han descrito Bely et al. (1990). A lo largo de la fermentación alcohólica se realizaron análisis de seguimiento (Ver datos obtenidos en *ANEXO 4: “Parámetros seguimiento microfermentaciones”*. Apartado 4.2. “*Gráficas fermentaciones en mosto artificial*”) y una vez terminada la fermentación se efectuaron análisis de aminoácidos y análisis de SO₂ (ver Tabla 4).

Todos los parámetros de fermentación medidos (crecimiento de levaduras, peso seco, medidas de Absorbancia a 600nm y desprendimiento de CO₂) resultaron en unos rangos normales. Puede destacarse dentro del estudio de crecimiento una clara división de las cepas de analizadas en dos grupos. Aquellas con un crecimiento más rápido (crecimiento máximo a las 48 horas) y otras con un crecimiento más lento (crecimiento máximo pasadas 48 horas). Ver Apartado 4.2. Figura 4.2.5 del *ANEXO 4: “Parámetros seguimiento microfermentaciones”*.

Tabla 4. Concentraciones de aminoácidos y SO₂ (ppm) para las cepas de levaduras estudiadas tras la fermentación alcohólica en mosto artificial.

| | NA 33 | QA 23 | EC1118 | CLI 892 | CLI 889 | CLI 876 | CLI 542 | CLI 87 | CLI 77 | CLI 63 | CLI 54 | CLI 271 | CLI 275 | CLI 706 | CLI 277 | CLI 589 | CLI 631 | CLI 633 | CLI 748 |
|-----------------------------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Tyr | 2,23 | 2,44 | 2,03 | 2,18 | 7,01 | 1,49 | <0,30 | 1,14 | <0,30 | 0,42 | <0,30 | 5,04 | 0,47 | 3,67 | 1,77 | 1,32 | 3,34 | 3,53 | 3,42 |
| Ile | 11,96 | 17,27 | 8,56 | 14,43 | 8,15 | 18,08 | 19,48 | 10,84 | 14,59 | 14,38 | 8,42 | 7,66 | 18,1 | 6,50 | 11,93 | 7,88 | 7,50 | 5,10 | 9,29 |
| Asp | 0,80 | 1,41 | 1,13 | 8,45 | 7,84 | 1,00 | 0,16 | 0,19 | 0,85 | 1,31 | 0,52 | 2,51 | 2,37 | 0,03 | 0,81 | 0,70 | 1,39 | 2,43 | 3,01 |
| Glu | 13,28 | 4,25 | 14,21 | 35,62 | 54,24 | 3,12 | 13,54 | 5,03 | 15,97 | 15,99 | 6,66 | 13,90 | 15,07 | 8,36 | 3,78 | 11,44 | 4,39 | 2,50 | 7,48 |
| Arg | 208,37 | 21,10 | 167,22 | 158,70 | 213,25 | 98,35 | 174,40 | 209,87 | 35,55 | 178,01 | 160,75 | 131,95 | 135,27 | 132,77 | 17,40 | 124,20 | 173,22 | 31,97 | 43,80 |
| Leu | 1,33 | 6,95 | 0,49 | 1,83 | 2,19 | 3,84 | 1,04 | 0,28 | 0,34 | 0,73 | 0,36 | 1,88 | 2,02 | 0,19 | 1,91 | 0,44 | 2,38 | 2,12 | 5,37 |
| Ala | 42,67 | 17,15 | 36,80 | 92,50 | 117,40 | 8,42 | 16,70 | 56,00 | 31,85 | 56,47 | 36,22 | 43,02 | 26,47 | 36,82 | 15,77 | 21,37 | 19,22 | 7,00 | 22,77 |
| Val | 1,77 | 3,15 | 0,57 | 3,02 | 3,02 | 1,46 | 0,69 | 0,91 | 0,45 | 0,74 | 0,87 | 2,22 | 1,39 | 2,22 | 1,43 | 0,82 | 2,57 | 1,51 | 3,19 |
| Met | 0,72 | 2,23 | 1,01 | 1,83 | 0,74 | 1,35 | 0,60 | 0,87 | 0,73 | 0,89 | 0,95 | 1,02 | 0,64 | 0,40 | 1,15 | 1,00 | 1,12 | 1,48 | 1,98 |
| Phe | 2,40 | 4,92 | 0,12 | 0,67 | 1,92 | 1,02 | 0,47 | 0,12 | 1,57 | 0,75 | 0,32 | 1,47 | 2,02 | 0,12 | 2,20 | 0,22 | 1,82 | 1,15 | 3,60 |
| Ser | 1,24 | 1,53 | 3,22 | 5,43 | 24,01 | 0,00 | 0,92 | 0,81 | 2,56 | 3,23 | 0,71 | 0,81 | 2,00 | 0,51 | 0,37 | 0,77 | 0,30 | 0,46 | 1,23 |
| His | 0,32 | 0,16 | 0,03 | 0,03 | 2,32 | 0,19 | 0,09 | 0,05 | 0,07 | 0,077 | 0,06 | 0,00 | 0,50 | 0,01 | 0,12 | 0,04 | 0,14 | 0,27 | 0,34 |
| Lys | 0,23 | 1,49 | 0,00 | 0,09 | 0,12 | 0,19 | 0,00 | 0,00 | 0,02 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,41 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,56 |
| Pro | 690,62 | 746,85 | 570,30 | 644,70 | 668,25 | 667,30 | 748,60 | 749,50 | 502,22 | 902,20 | 877,70 | 670,70 | 582,12 | 682,12 | 672,20 | 669,02 | 619,57 | 616,60 | 544,92 |
| NH₄⁺ | 0,19 | 0,33 | 0,28 | 0,56 | 2,42 | 0,19 | 0,10 | 0,14 | 0,22 | 0,30 | 0,24 | 0,28 | 0,28 | 0,20 | 0,17 | 0,29 | 0,26 | 0,20 | 0,41 |
| SO₂ | 13,45 | 26,64 | 11,85 | 31,04 | 23,03 | 34,75 | 12,25 | 18,63 | 30,29 | 36,17 | 26,93 | 6,66 | 19,23 | 30,48 | 18,44 | 35,19 | 31,42 | 29,10 | 27,46 |

Se obtuvo un notable consumo de aminoácidos en todos los fermentadores (Figura 9 y Figura 10). Los valores de prolina tanto en el mosto inicial como en el fermentado fueron los más altos. La prolina es el aminoácido más abundante en el mosto y tras la fermentación alcohólica (Valero et al., 2003; Moreno-Arribas et al., 1998), ya que apenas es metabolizada por las levaduras. Se mantuvo en valores próximos a los iniciales en mosto, incluso viéndose aumentados en muchos de los fermentadores (Tabla 4). Este hecho se puede explicar entendiendo el metabolismo concreto de la prolina en las levaduras. Las células de levadura biosintetizan prolina gracias al glutamato en el citoplasma a través de la misma vía que se ha encontrado en bacterias y plantas; pero también convierten el exceso de prolina en glutamato en la mitocondria. Tomando en cuenta el hecho de que la prolina posee actividad protectora contra el stress celular al principio de la fermentación, cuando hay una elevada concentración osmótica debida a la alta concentración en azúcares reductores, no toda la prolina se dirige a la vía del glutamato y una gran cantidad se excreta en el medio (Barrajón-Simancas et al., 2011).

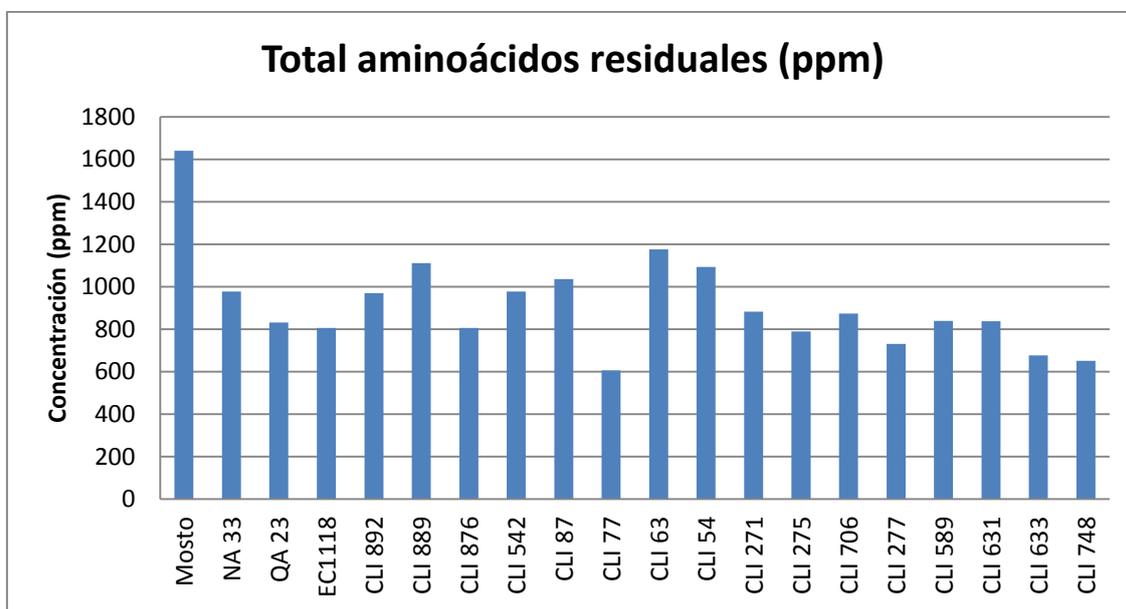


Figura 9. Sumatorio de las cantidades residuales de aminoácidos totales (ppm) de las muestras de final de fermentación alcohólica en mosto sintético en función de las cepas de estudio.

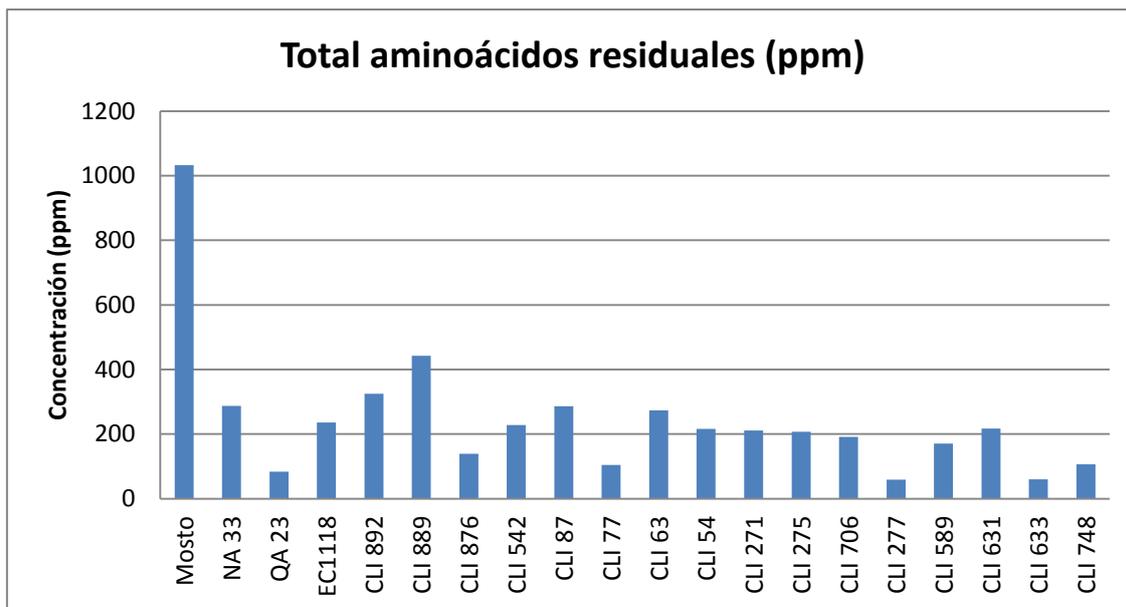


Figura 10. Sumatorio de las cantidades residuales de aminoácidos totales (ppm) de las muestras de final de fermentación alcohólica en mosto sintético de las cepas de estudio. (Valores de prolina no incluidos).

También se pudo observar una gran variación de los valores residuales en función de la cepa de levadura estudiada (Figura 9), con muestras con valores residuales en torno a 600 ppm (QA 77, CLI 633 y CLI 748) y otras con valores entorno a 1100 ppm (CLI 889, CLI 63 y CLI 54). Este hecho concuerda con las explicaciones dadas en la bibliografía (Hernández-Orte et al., 1999; Soufleros et al., 2003); quienes estudiaron cómo la concentración de aminoácidos en el vino final, dependía en gran medida del metabolismo de cada levadura.

Tal como se ha mencionado con anterioridad, los aminoácidos leucina (Leu), metionina (Met) y fenilalanina (Phe), son precursores de compuestos con aromas relacionados con la oxidación, tales como los aldehídos de Strecker (Ledl y Schleicher, 1990). Estos aldehídos que suelen contribuir a los sabores indeseables en los alimentos, también pueden ser producidos a partir de la reacción entre los α -aminoácidos y los α -dicarbonilos (Hoffmann et al., 2000). En este sentido, compuestos como el de 3-metilbutanal (aroma a malta) y el fenilacetaldehído (aroma a miel) se forman a partir de los correspondientes aminoácidos leucina y fenilalanina, respectivamente (Hoffman y Schieberle, 2000). Del mismo modo, la vía más probable para la síntesis natural de metional (olor a verduras cocidas) es de la degradación de Strecker de los aminoácidos metionina (Escudero et al., 2000a).

Las siguientes figuras muestran los niveles de SO₂ de las muestras a final de fermentación (Figura 11), el sumatorio de metionina y fenilalanina (Figura 12) y los niveles independientes de metionina y fenilalanina (Figura 13). En base a estos valores se seleccionaron cinco cepas de levaduras como “óptimas”: CLI 87, CLI 275, CLI 542, CLI 706 y CLI 271 (parte I del presente capítulo) y dos como “no óptimas”: CLI 277 y CLI 748.

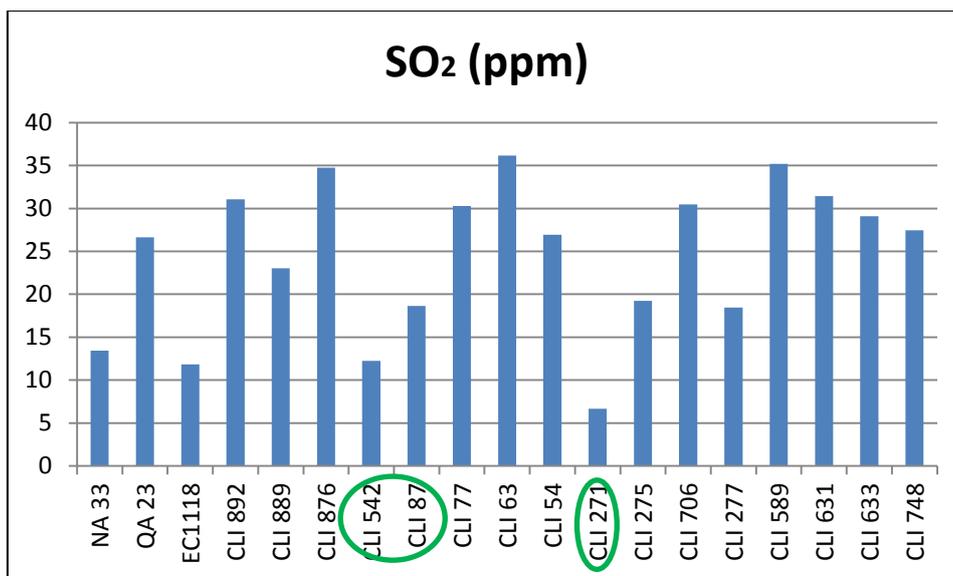


Figura 11. Niveles de SO₂ (ppm) de las muestras de final de fermentación alcohólica en mosto sintético para las cepas de estudio. Destacadas en color verde se muestran las cepas autóctonas con valores más bajos.

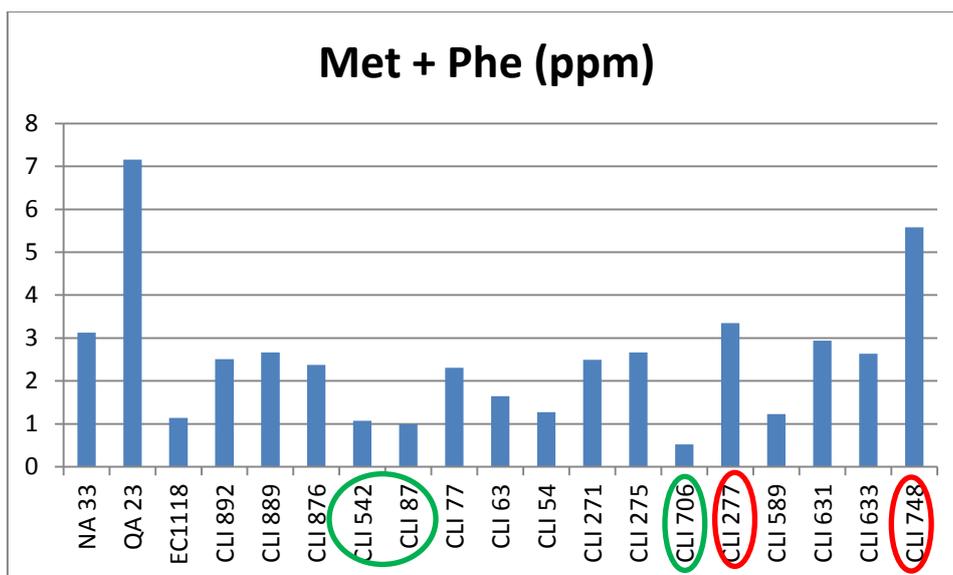


Figura 12. Niveles del sumatorio de metionina y fenilalanina (ppm) de las muestras de final de fermentación alcohólica en mosto sintético de las cepas de estudio. (En verde se muestran las cepas autóctonas con valores de los aminoácidos más bajos y en rojo los valores más altos).

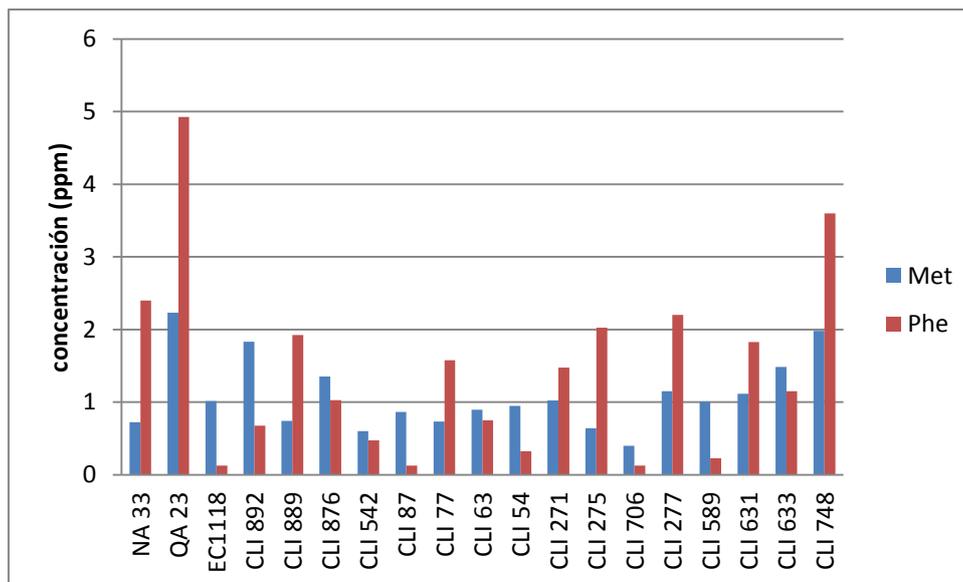


Figura 13. Niveles de metionina y fenilalanina (ppm) de las muestras de final de fermentación alcohólica en mosto sintético de las cepas de estudio.

Las razones de la selección de las “cepas óptimas” están descritas en la parte I del presente capítulo. Las cepas seleccionadas fueron CLI 706, CLI 87, CLI 542, CLI 271 y CLI 275. Las dos cepas seleccionadas como “no óptimas” fueron aquellas que mostraron el sumatorio de metionina y fenilalanina más alto: CLI 277 y CLI 748. Para el coinoculo se seleccionaron las cepas CLI 706 y CLI 542 (CLI 706+572), dos de las cepas con menor contenido final de metionina y fenilalanina, tanto de forma individual como el sumatorio; además la cepa CLI 542 mostró uno de los valores más bajos de SO₂, con una concentración inferior a 15 ppm. Con respecto a las cepas comerciales, la EC1118 fue la que menores valores de metionina y fenilalanina mostró. Esta cepa es mundialmente utilizada debido a sus diferentes propiedades tecnológicas, que incluyen un alto rendimiento de fermentación, buena habilidad para fermentar en un rango muy amplio de temperaturas y alta capacidad de resistencia al etanol (Novo et al., 2009), lo cual la hace muy apropiada para su uso comercial. En el presente estudio el interés prioritario fue la selección de cepas autóctonas de la D.O. “Vinos de Madrid”; pero se quiso incluir esta cepa comercial para su comparación con las cepas de la colección CLI.

SELECCIÓN DE CEPAS DE LEVADURAS. FERMENTACIONES EN MOSTO NATURAL

Se realizaron fermentaciones en mosto natural con las siete cepas de levaduras seleccionadas, cinco “óptimas” (parte I del presente capítulo) y dos “no óptimas”. Las microvinificaciones se realizaron por triplicado y se hizo a su vez un cultivo mixto con dos de las cepas que habían obtenido mejores resultados en los experimentos previos en mosto artificial (CLI 706 y CLI 542). En total se realizaron 24 fermentaciones tal como se ha detallado en el apartado anterior de Materiales y Métodos.

A lo largo de la fermentación alcohólica se desarrollaron diferentes análisis de seguimiento (Ver datos obtenidos en *ANEXO 4: “Parámetros para el seguimiento de las microfermentaciones”*. Apartado 4.3 “*Gráficas fermentaciones en mosto natural*”). Todas las fermentaciones alcohólicas se completaron aproximadamente a los 13 días. Los parámetros enológicos medidos en los vinos obtenidos fueron satisfactorios y dentro de los rangos esperados. Teniendo en cuenta la finalidad del ensayo, se estudiaron más detalladamente tres de los parámetros fundamentales establecidos como **criterios de selección de levaduras vínicas**: acidez volátil, poder fermentativo y la inética fermentativa. La media de **acidez volátil** (expresada en g/L de ácido acético) del conjunto de las fermentaciones fue de $0,40 \pm 0,11$ g/L, sin superar en ninguna de las muestras tomadas el valor de 0,51 g/L, lo cual indica unos valores adecuados de acidez volátil y muy alejado de los límites establecidos para vinos ecológicos $\leq 0,7$ g/L y para vinos blancos y rosados $\leq 1,08$ g/L (Reglamento CE 1493/99). Los valores de pH fueron a su vez muy homogéneos, en torno a $3,48 \pm 0,04$ y el porcentaje de **poder fermentativo** fue similar para todas las cepas, situándose en torno a $10,58\% \pm 0,27$; cuyos valores fueron satisfactorios para el tipo de mosto inicial, el cual no era muy azucarado (19,4 °Brix). A su vez, se obtuvo una correcta **cinética fermentativa**; produciéndose ligeras variaciones entre las cepas (Figura 14). Se observaron tres tipos de comportamientos, designados como: “cinética 1” (cepas CLI 277, CLI 748, CLI 542, CLI 706 y el cultivo mixto CLI 706+542), “cinética 2” (cepas CLI 87 y CLI 275) y “cinética 3” (cepa CLI 271). La “cinética 1” se caracterizó por un rápido arranque de fermentación, obteniendo su máxima velocidad, proporcional a la actividad fermentativa del conjunto del cultivo, alrededor de las 48 horas. Las cepas con “cinéticas 2” y “cinética 3” tuvieron un arranque más lento, obteniendo sus máximos

fermentativos alrededor de las 72 horas. La diferencia entre ambas cinéticas fue el nivel de dicho máximo. Los fermentadores con “cinética 3” mostraron una pérdida de peso (proporcional al consumo de azúcar) menos acentuada que el resto de los fermentadores en su nivel máximo; pero en cambio, la pérdida de peso fue más lenta y progresiva durante toda la fermentación hasta alcanzar los mismos niveles que el resto de los fermentadores al final de la fermentación alcohólica.

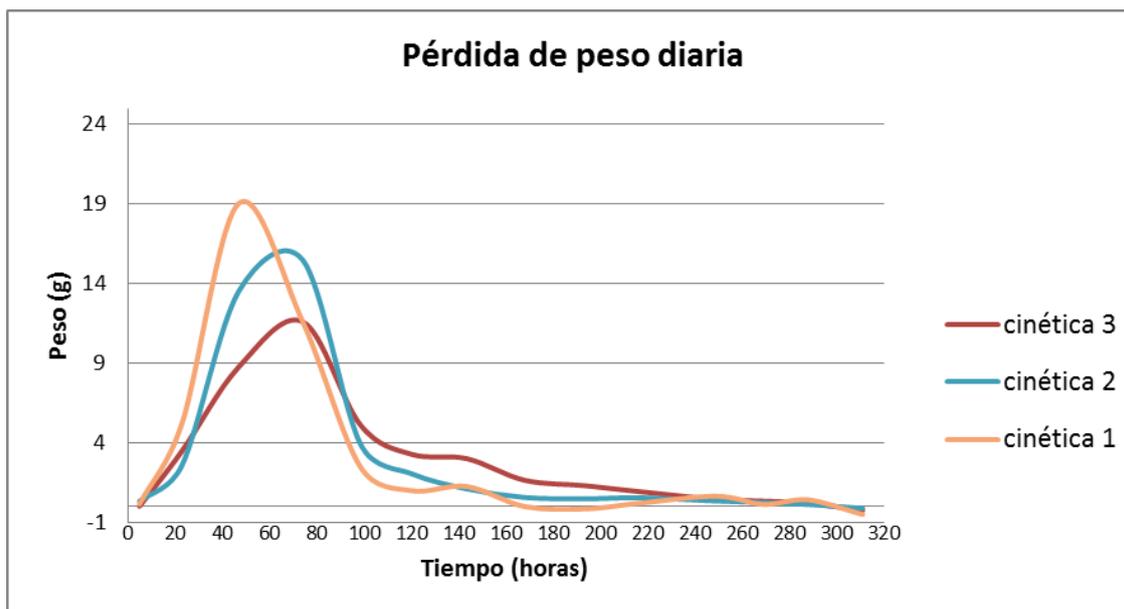


Figura 14. Tipos de cinéticas fermentativas observadas durante la fermentación alcohólica en mosto natural.

Respecto a la viabilidad celular, los valores de crecimiento máximo se obtuvieron en torno a las 48 horas con valores $>10^8$ células/ml, excepto para la cepa CLI 277 cuyos máximos de viabilidad se dieron en torno a las 24 horas de haber comenzado la fermentación alcohólica (Figura 4.3.5 del apartado 4.3 del ANEXO 4: “Parámetros para el seguimiento de las microfermentaciones”). Estos últimos datos junto con las cinéticas de las fermentaciones, mostraron que en ningún caso la fase de latencia del crecimiento de las levaduras se alargó más de 24 horas presentado cinéticas bastante regulares. Esto indica que las levaduras seleccionadas no tuvieron dificultad en arrancar la fermentación y se podría pensar que, en un principio, no presentarían problemas de arranque con volúmenes mayores de mosto a escala de bodega.

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE IMPOSICIÓN EN LOS CULTIVOS MIXTOS

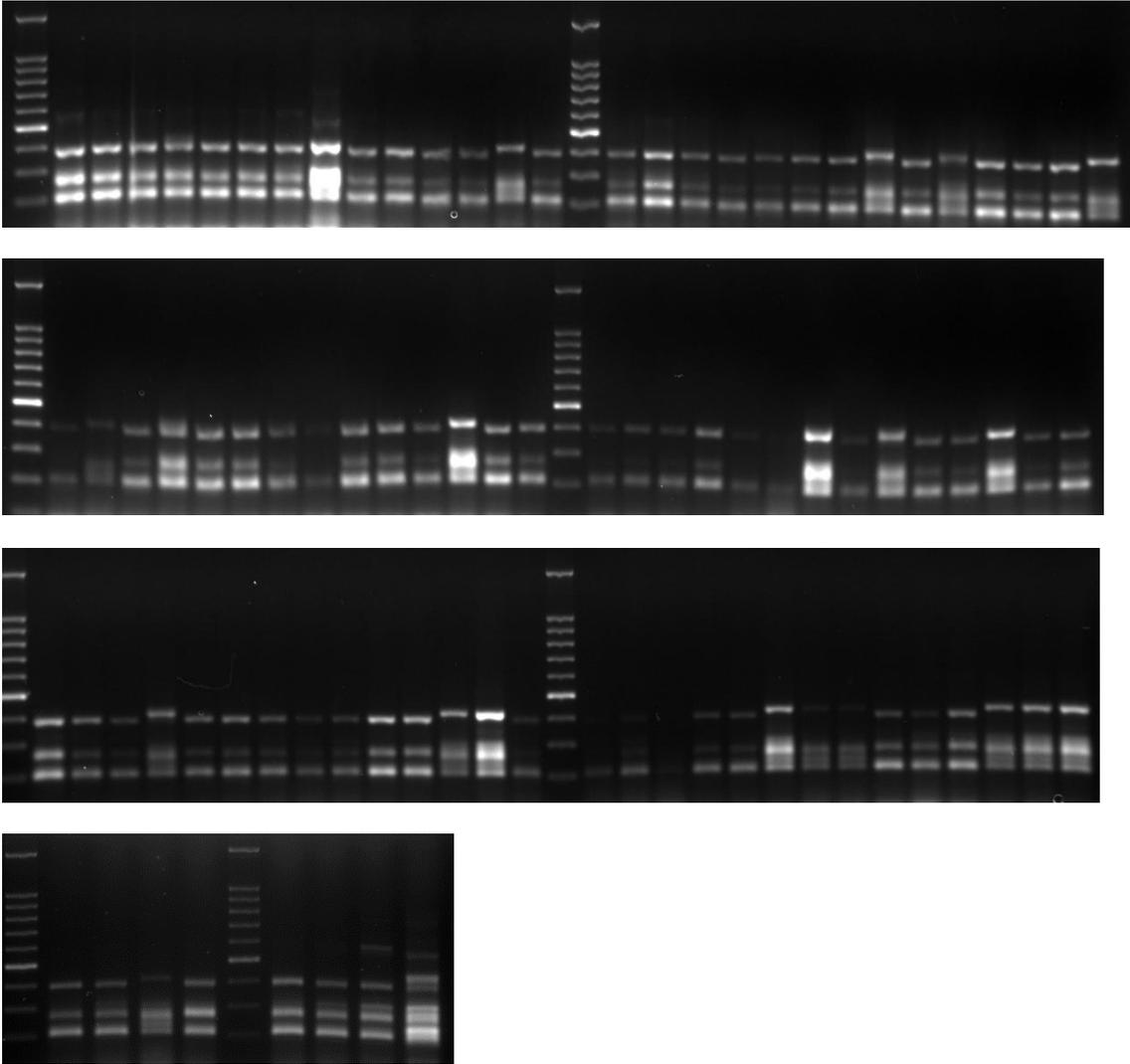
Con este ensayo se ha querido comprobar la incidencia, tanto en el metabolismo de aminoácidos como en la producción de compuestos aromáticos, de la utilización de un coinóculo de dos levaduras previamente seleccionadas. Estudios realizados en este sentido indican que cuando se combinan dos o más cepas de levaduras en la misma fermentación, se va a producir una estricta interacción levadura/levadura; produciéndose variaciones en los metabolitos generados y afectando al comportamiento metabólico de la levadura que acabe imponiéndose (Cheraiti et al., 2005).

Las cepas CLI 542 y CLI 706 se coinocularon al 50%. El ensayo se realizó por triplicado, y una vez finalizada la fermentación alcohólica se llevó a cabo el análisis de microsátélites para comprobar el porcentaje final de cada una de las cepas empleadas y confirmar la evolución y tasa de implantación de ambas cepas a lo largo del proceso. Los resultados de los geles pueden verse en la Figuras 15.

Se comprobó la existencia de un nivel de imposición de más del 75% de la cepa CLI 542 sobre la CLI 706 en todos los fermentadores. Los resultados detallados fueron los siguientes:

- Fermentador “CLI 706+542_1”: 24 muestras de la cepa CLI 542 y 5 de la cepa CLI 706 (83% presencia de la cepa CLI 542).
- Fermentador “CLI 706+542_2”: 23 muestras de la cepa CLI 542 y 6 de la cepa CLI 706 (79% presencia de la cepa CLI 542).
- Fermentador “CLI 706+542_3”: 22 muestras de la cepa CLI 542 y 7 de la cepa CLI 706 (76% presencia de la cepa CLI 542).

En un apartado posterior se comentará más detalladamente los efectos de la combinación de estas cepas en las características químicas y sensoriales del producto final y su comparación con las fermentaciones independientes de ambas cepas.



A B

Figura 15. Geles de las 90 muestras de las fermentaciones: “CLI 706+542_1”, “CLI 706+542_2” y “CLI 706+542_3”. Las muestras van de izquierda a derecha empezando por la parte superior con las muestras de la “CLI 706+542_1”. Estándares de las 2 cepas de estudio se muestran al final con los códigos: A: CLI 542 y B: CLI 706. (Tres muestras, una por fermentador, no se confirmaron como ninguna de las dos cepas).

INFLUENCIA DE LA CEPA DE LEVADURA EN LOS NIVELES DE AMINOÁCIDOS Y COMPUESTOS AROMÁTICOS

El objetivo principal de esta sección consistió en la evaluación del metabolismo de diferentes cepas autóctonas de la D.O. “Vinos de Madrid” de la especie *S. cerevisiae*. Para ello se estudió y comparó su comportamiento durante la fermentación alcohólica, los niveles de aminoácidos residuales y el contenido en compuestos volátiles tras dicha fermentación.

A. Estudio sobre el metabolismo de aminoácidos:

La concentración de aminoácidos es un factor muy importante en la formación de aromas; habiéndose encontrado diferencias significativas en los niveles de algunos volátiles importantes en el vino en función de los aminoácidos del mosto de partida (Hernández-Orte et al., 2002). Tal como se ha mencionado previamente, los aldehídos formados vía Strecker a partir de aminoácidos (Tabla 1) pueden tener un impacto aromático significativo en el vino contribuyendo de forma negativa a su calidad final; especialmente aquellos formados a partir de metionina, fenilalanina y leucina (Ledl y Schleicher, 1990). En este sentido, el 3-metilbutanal (aromas amílicos, whiskey) y el fenilacetaldehído (aroma a miel) se forman a partir de sus correspondientes aminoácidos leucina y fenilalanina, respectivamente (Hoffman & Schieberle, 2000). De manera similar, la vía de formación más probable en vino del metional (aroma a verduras/patatas cocidas) es mediante la degradación vía Strecker del aminoácido metionina (Escudero et al., 2000a).

Se analizó el contenido en aminoácidos de cada fermentador al final de la fermentación alcohólica y se observó la existencia cierta variabilidad entre las repeticiones para cada una de las cepas. Esta variabilidad encontrada en los constituyentes del vino y más especialmente en los compuestos volátiles, se considera normal debida al micro-metabolismo de cada levadura (Usseglio-Tomasset, 1998). En el presente estudio se muestran los valores medios, junto a su desviación estándar, para cada cepa para simplificación de las Tablas y mejor visualización de los resultados. Los valores de los aminoácidos residuales tras la fermentación alcohólica realizada por cada cepa de levadura estudiada y del coinóculo de las cepas CLI 706 y CLI 542 se recogen en la Tabla 5. A su vez, la figura 16 muestra la representación de los aminoácidos

agrupados según la cepa de levadura correspondiente, a excepción de los niveles de cisteína y prolina que no se han incluido debido a que la cisteína fue consumida totalmente después de las fermentaciones y la prolina, que apenas es metabolizada por las levaduras, se mantuvo en valores similares a los medidos en el mosto de partida (294,81 ppm).

Se pudo observar la existencia de un claro perfil individual para cada cepa ensayada. Los aminoácidos más abundantes en el mosto fermentado fueron la prolina y arginina, con valores que llegaron en el caso de este último hasta 15 ppm para la cepa CLI 706. A su vez, se puede observar que la cepa CLI 748 mostró un menor consumo de aminoácidos durante la fermentación, lo cual se tradujo en una elevada concentración final con respecto a las demás cepas estudiadas. Así mismo, las cepas CLI 87 y CLI 271, mostraron un consumo significativamente elevado con respecto a las demás cepas y un perfil final de concentraciones similar entre ambas. Con respecto al resto de las cepas, sólo es preciso destacar el consumo más acentuado de histidina por parte de las cepas CLI 277, CLI 748 y CLI 706.

Los fermentadores con el coinóculo de las cepas CLI 706 y CLI 542, obtuvieron valores de concentración final de aminoácidos muy similares a los encontrados en los fermentadores de la cepa CLI 542 para los aminoácidos histidina, arginina, serina, asparagina, ornitina, lisina e isoleucina. Este hecho concuerda con los resultados de una imposición de la cepa CLI 542 sobre la CLI 706 durante la fermentación alcohólica. Para los aminoácidos glicina, leucina y fenilalanina, las concentraciones fueron más bajas que las obtenidas con las fermentaciones de las cepas individuales.

Tabla 5: Media y desviación estándar de las concentraciones en ppm de aminoácidos iniciales del mosto de partida y residuales tras la fermentación alcohólica para cada cepa de levadura. (Valores medios de las 3 fermentaciones de cada cepa ensayada).

| Mosto | CLI87 | CLI271 | CLI542 | CLI275 | CLI706 | CLI706+542 | CLI277 | CLI748 |
|-------------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| Asp | 16,48 | 0,84±0,26 | 1,01±0,08 | 1,35±0,17 | 1,30±0,14 | 1,31±0,41 | 1,32±0,04 | 1,60±0,14 |
| Asn | 6,30 | 0,00±0,00 | 0,06±0,05 | 0,32±0,05 | 0,15±0,05 | 0,00±0,00 | 0,17±0,08 | 0,03±0,06 |
| Ser | 38,69 | 0,13±0,02 | 0,19±0,07 | 0,08±0,02 | 0,10±0,02 | 0,42±0,51 | 0,19±0,08 | 1,18±0,09 |
| Glu | 87,47 | 0,15±0,06 | 0,08±0,07 | 3,22±0,37 | 1,86±0,90 | 1,35±0,60 | 1,47±0,38 | 2,36±0,39 |
| His | 42,53 | 1,88±0,44 | 1,36±0,42 | 8,79±0,06 | 4,33±1,18 | 0,47±0,06 | 5,55±0,34 | 0,40±0,01 |
| Gly | 48,70 | 0,70±0,04 | 0,11±0,02 | 0,05±0,01 | <0,04 | 1,67±0,61 | 0,75±0,12 | 6,26±1,65 |
| Arg | 585,49 | 1,42±0,42 | 2,65±0,34 | 8,43±0,67 | 6,25±1,27 | 14,93±5,89 | 9,31±1,36 | 6,87±1,30 |
| Thr | 22,92 | <0,03 | <0,03 | 0,07±0,04 | <0,03 | <0,03 | <0,03 | 1,83±0,25 |
| Ala | 43,21 | 0,45±0,25 | 0,19±0,12 | 2,16±0,13 | 0,73±0,40 | 2,00±0,63 | 1,45±0,33 | 6,43±0,57 |
| GABA | 29,49 | 0,03±0,00 | 0,02±0,01 | 1,34±0,34 | 0,27±0,23 | 0,64±0,20 | 0,59±0,16 | 9,79±0,97 |
| Tyr | 6,06 | 0,18±0,05 | 0,05±0,06 | 0,78±0,07 | 0,56±0,27 | 0,57±0,22 | 0,53±0,01 | 2,05±0,34 |
| Val | 11,29 | 0,31±0,07 | 0,28±0,08 | 1,01±0,08 | 0,71±0,25 | 0,74±0,24 | 0,77±0,04 | 2,35±0,40 |
| Met | 4,35 | 0,12±0,03 | 0,15±0,02 | 0,27±0,03 | 0,20±0,06 | 0,26±0,09 | 0,26±0,10 | 2,40±0,37 |
| Orn | 3,01 | 0,18±0,02 | 0,26±0,13 | 0,28±0,04 | 0,25±0,06 | 0,49±0,36 | 0,38±0,12 | 0,73±0,06 |
| Lys | 0,98 | 0,36±0,03 | 0,28±0,11 | 0,66±0,07 | 0,48±0,16 | 1,34±0,54 | 0,71±0,23 | 2,68±0,24 |
| Ile | 6,71 | 0,25±0,08 | 0,21±0,02 | 0,67±0,04 | 0,56±0,18 | 1,28±0,27 | 0,66±0,15 | 1,87±0,31 |
| Leu | 8,79 | 0,25±0,12 | 0,12±0,03 | 1,52±0,12 | 0,74±0,46 | 1,35±0,40 | 1,08±0,22 | 4,57±0,84 |
| Phe | 9,76 | 0,13±0,07 | 0,05±0,03 | 1,96±0,44 | 0,73±0,36 | 0,94±0,35 | 0,90±0,15 | 3,97±0,38 |

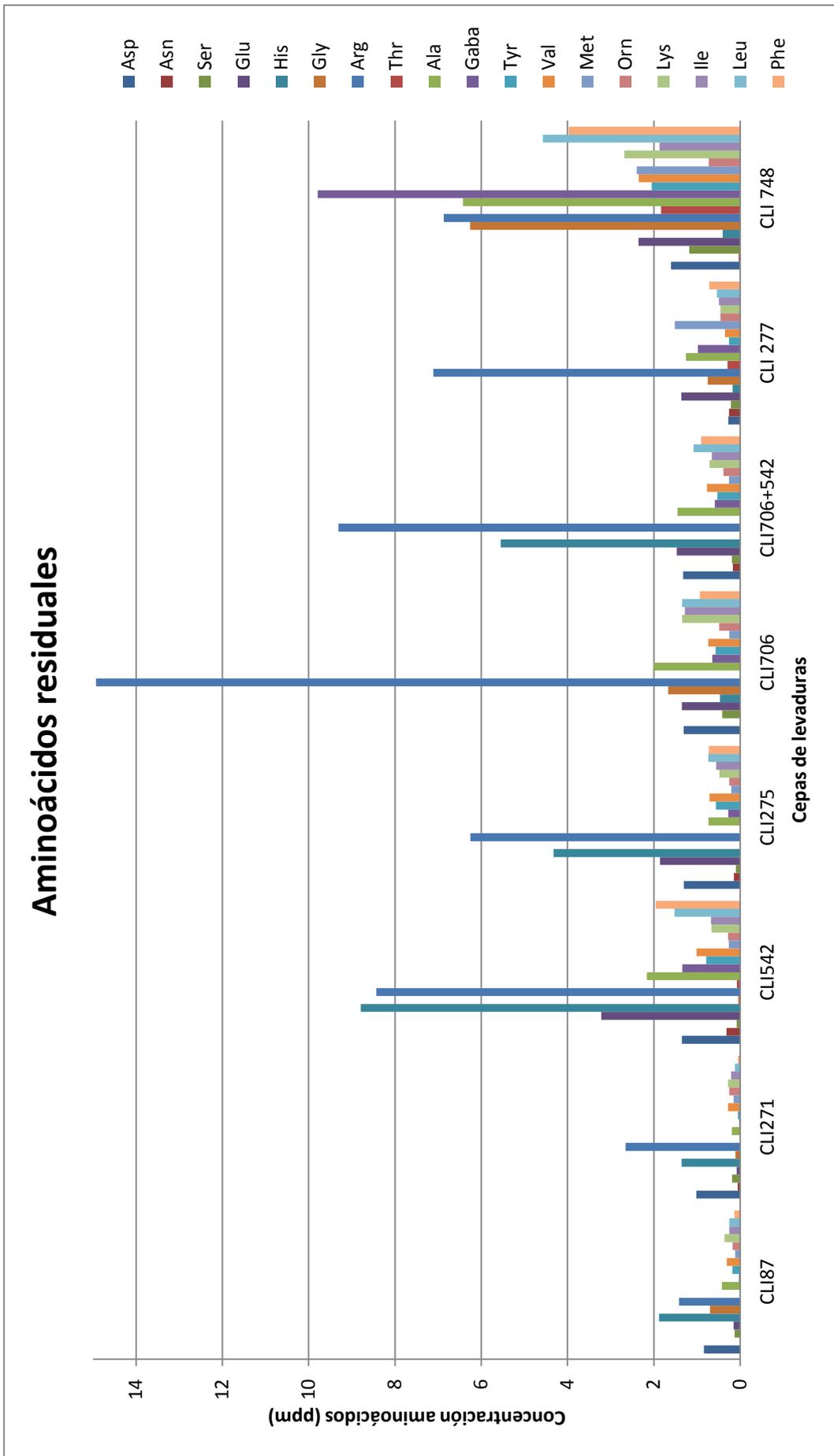


Figura 16. Representación de la media de las concentraciones de aminoácidos residuales tras la fermentación alcohólica con cada cepa de levadura estudiada.

En la Figura 17 se representan las concentraciones de tres aminoácidos específicos relacionados con los aromas de oxidación en los vinos: metionina, leucina y fenilalanina. Tal como se ha mencionado anteriormente en este apartado respecto al metabolismo general de los aminoácidos, dos cepas, CLI 87 y CLI 271, mostraron valores residuales también de estos tres aminoácidos muy bajos; por debajo de 0,5 ppm; dejando por tanto, menos sustrato precursor de compuestos de oxidación disponible en el vino. Por el contrario, la cepa CLI 748, preseleccionada como “no óptima” en los estudios con mosto sintético, obtuvo los valores más altos de concentración para estos tres aminoácidos respecto al resto de cepas, con niveles de concentración superiores a 2 ppm. Así mismo, la otra cepa preseleccionada como “no óptima”, CLI 277, mostró los segundos valores residuales más altos de metionina. En cambio, la cepa CLI 542 mostró los segundos valores más altos para los otros dos aminoácidos de interés, leucina y fenilalanina.

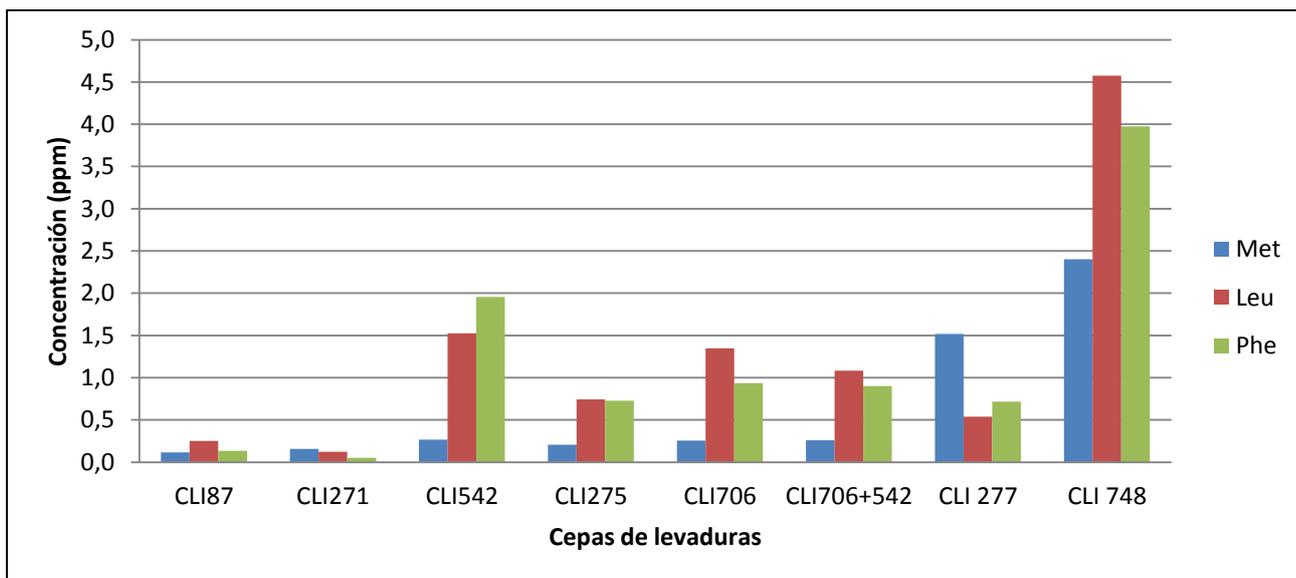


Figura 17. Representación de la media de las concentraciones de metionina, leucina y fenilalanina residuales tras la fermentación alcohólica con cada cepa de levadura estudiada.

Todas las cepas estudiadas mostraron valores muy bajos de SO₂, entre 3,5 y 6 ppm; sin ser finalmente un parámetro de estudio determinante para la presente investigación.

B. Estudio sobre la formación de compuestos volátiles:

Los compuestos volátiles del vino se van a formar a lo largo de distintas etapas durante su elaboración; pero el grupo más voluminoso se produce durante la etapa de fermentación alcohólica y está constituido fundamentalmente por alcoholes superiores, ésteres, lactonas, ácidos y aldehídos, entre otros (Suárez Lepe, 1997). Las familias químicas más importantes desde un punto de vista cuantitativo son los alcoholes y los ésteres.

Para el presente estudio se cuantificaron los compuestos más importantes del vino tras la fermentación alcohólica. Los resultados de la media de las concentraciones obtenidas para los vinos elaborados con cada cepa se muestran en la Tabla 6. Desde un punto de vista cuantitativo, la familia de los alcoholes fue la predominante con un sumatorio total en todas las fermentaciones de más de 300 ppm (Figuras 18 y 19); resultando ser particularmente más alta su concentración en las muestras correspondientes a las fermentaciones con las cepas CLI 275, CLI 277 y CLI 748. Respecto a las otras familias químicas los resultados fueron más homogéneos; exceptuando los mostos fermentados con la cepa CLI 542 que mostraron valores significativamente más altos de ésteres y de cetonas (Figura 18), el aumento se debió en gran parte a las altas concentraciones de los compuestos acetoina y lactato de etilo.

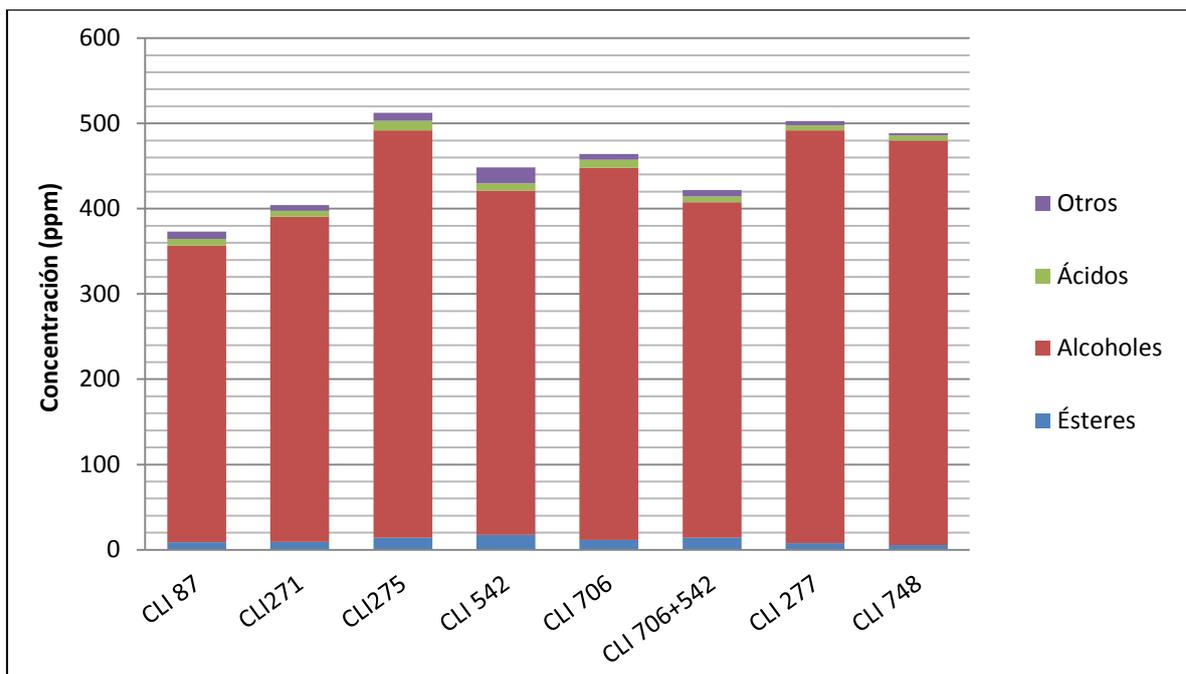


Figura 18. Concentración total (ppm) de la suma de los compuestos analizados dentro de cada familia química al finalizar la fermentación alcohólica. Utilización del sumatorio de los datos medios para cada cepa de los triplicados de los fermentadores.

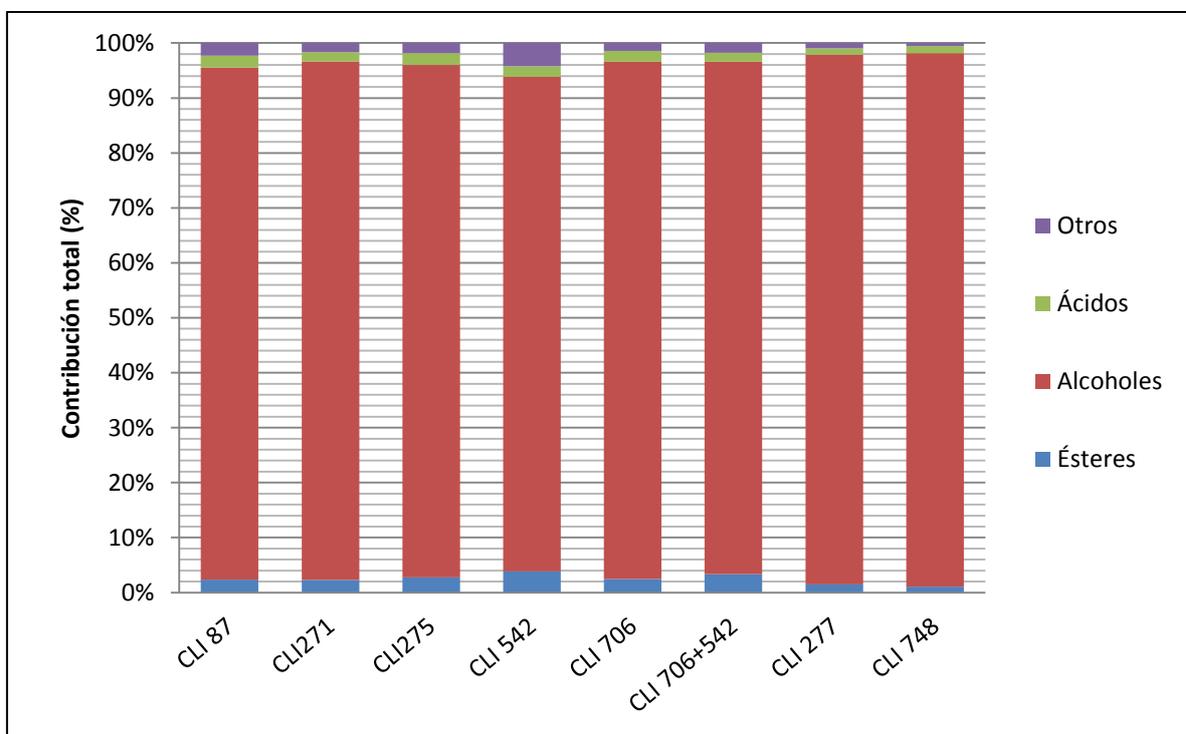


Figura 19. Porcentaje de contribución total de cada familia química al finalizar la fermentación alcohólica. Utilización para el cálculo de porcentaje de los sumatorios de los datos medios para cada cepa de los triplicados de los fermentadores.

Tabla 6. Concentraciones (ppm) y desviaciones estándar de los compuestos volátiles más importantes del vino tras la fermentación alcohólica con las cepas de estudio (t0).

| | CLI87 | CLI271 | CLI275 | CLI542 | CLI706 | CLI706+542 | CLI277 | CLI748 |
|---------------------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| Propanoato de etilo | 0,12 ± 0,01 | 0,14 ± 0,02 | 0,23 ± 0,05 | 0,19 ± 0,04 | 0,17 ± 0,02 | 0,16 ± 0,01 | 0,14 ± 0,06 | 0,29 ± 0,08 |
| Isobutirato de etilo | 0,07 ± 0,01 | 0,07 ± 0,03 | 0,23 ± 0,03 | 0,11 ± 0,01 | 0,17 ± 0,02 | 0,12 ± 0,02 | 0,06 ± 0,04 | 0,03 ± 0,01 |
| Diacetilo | 0,13 ± 0,05 | 0,05 ± 0,02 | 0,10 ± 0,03 | 0,14 ± 0,02 | 0,14 ± 0,03 | 0,07 ± 0,01 | 0,22 ± 0,15 | 0,16 ± 0,08 |
| Butirato de etilo | <0,01 | <0,01 | 0,00 ± 0,01 | <0,01 | 0,00 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | 0,04 ± 0,00 |
| Isovalerato de etilo | 1,22 ± 0,19 | 0,86 ± 0,19 | 0,55 ± 0,17 | 0,57 ± 0,08 | 0,51 ± 0,02 | 0,34 ± 0,12 | 0,20 ± 0,04 | 0,21 ± 0,03 |
| 1-propanol | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| Isobutanol | 32,32 ± 1,52 | 36,48 ± 2,78 | 48,15 ± 1,32 | 33,27 ± 1,54 | 61,43 ± 0,59 | 41,53 ± 0,45 | 50,03 ± 2,08 | 43,06 ± 3,46 |
| Acetato de Isoamilo | 0,03 ± 0,01 | 0,06 ± 0,04 | 0,23 ± 0,07 | 0,13 ± 0,02 | 0,18 ± 0,04 | 0,31 ± 0,23 | 1,33 ± 0,29 | 0,69 ± 0,14 |
| 1-butanol | 0,79 ± 0,08 | 0,61 ± 0,07 | 0,42 ± 0,03 | 0,57 ± 0,05 | 0,46 ± 0,03 | 0,44 ± 0,01 | 1,13 ± 0,23 | 0,70 ± 0,11 |
| Alcohol Isoamílico | 188,92 ± 22,63 | 222,33 ± 6,93 | 320,20 ± 42,82 | 280,13 ± 23,26 | 291,44 ± 25,32 | 294,21 ± 14,23 | 373,26 ± 31,84 | 376,62 ± 5,31 |
| Hexanoato de etilo | 0,22 ± 0,02 | 0,15 ± 0,02 | 0,13 ± 0,00 | 0,20 ± 0,03 | 0,15 ± 0,01 | 0,14 ± 0,03 | 0,16 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 |
| Acetato de Hexilo | 0,13 ± 0,07 | 0,08 ± 0,03 | 0,05 ± 0,03 | 0,03 ± 0,01 | 0,03 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 | 0,08 ± 0,03 | 0,06 ± 0,02 |
| Acetoina | 4,95 ± 3,97 | 3,91 ± 2,40 | 6,90 ± 2,94 | 14,73 ± 4,63 | 4,17 ± 3,03 | 4,78 ± 3,98 | 3,33 ± 2,19 | 1,99 ± 0,34 |
| Lactato de etilo | 6,42 ± 0,10 | 7,67 ± 0,96 | 11,97 ± 0,78 | 15,26 ± 0,93 | 9,54 ± 0,18 | 12,12 ± 0,62 | 4,99 ± 0,39 | 3,35 ± 0,14 |
| 1-hexanol | 0,39 ± 0,03 | 0,43 ± 0,07 | 0,39 ± 0,02 | 0,34 ± 0,04 | 0,48 ± 0,04 | 0,41 ± 0,02 | 0,43 ± 0,05 | 0,56 ± 0,04 |
| c-3-hexenol | 0,28 ± 0,00 | 0,27 ± 0,02 | 0,27 ± 0,01 | 0,27 ± 0,01 | 0,28 ± 0,00 | 0,27 ± 0,00 | 0,32 ± 0,01 | 0,32 ± 0,01 |
| Octanoato de etilo | 0,22 ± 0,02 | 0,12 ± 0,01 | 0,17 ± 0,02 | 0,22 ± 0,06 | 0,17 ± 0,04 | 0,28 ± 0,06 | 0,24 ± 0,00 | 0,19 ± 0,03 |
| Furfural | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| 3-hidroxiacetato de etilo | 0,26 ± 0,07 | 0,13 ± 0,01 | 0,42 ± 0,01 | 0,45 ± 0,02 | 0,46 ± 0,01 | 0,46 ± 0,01 | 0,18 ± 0,05 | 0,22 ± 0,06 |
| Benzaldehído | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| Ácido Isobutírico | 1,52 ± 0,13 | 2,21 ± 0,49 | 2,71 ± 0,73 | 1,43 ± 0,05 | 2,46 ± 0,27 | 1,47 ± 0,03 | 1,53 ± 0,22 | 1,02 ± 0,08 |
| Ácido Butírico | 0,47 ± 0,05 | 0,49 ± 0,11 | 0,68 ± 0,23 | 0,44 ± 0,02 | 0,53 ± 0,06 | 0,42 ± 0,00 | 0,43 ± 0,06 | 0,43 ± 0,02 |
| g-butirolactona | 3,47 ± 0,49 | 2,84 ± 0,57 | 2,53 ± 0,48 | 4,05 ± 0,14 | 2,43 ± 0,16 | 2,68 ± 0,28 | 1,21 ± 0,12 | 0,55 ± 0,05 |
| Ácido Isovalerianico | 1,26 ± 0,09 | 1,21 ± 0,15 | 2,40 ± 0,27 | 1,47 ± 0,05 | 1,56 ± 0,02 | 1,35 ± 0,01 | 1,11 ± 0,17 | 1,01 ± 0,09 |
| Succinato de dietilo | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| Metionol | 14,87 ± 2,01 | 8,84 ± 1,54 | 13,39 ± 2,22 | 7,63 ± 0,71 | 8,72 ± 1,42 | 4,47 ± 1,29 | 4,02 ± 0,72 | 5,99 ± 1,24 |
| Acetato de 2-etilfenilo | 0,11 ± 0,01 | 0,10 ± 0,02 | 0,13 ± 0,03 | 0,13 ± 0,02 | 0,06 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | 0,16 ± 0,03 | 0,08 ± 0,02 |
| Ácido Hexanoico | 4,01 ± 0,88 | 2,30 ± 0,10 | 3,84 ± 0,35 | 3,95 ± 0,20 | 3,36 ± 0,57 | 2,42 ± 0,61 | 1,38 ± 0,13 | 1,62 ± 0,07 |
| Alcohol Benéfico | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| β-feniletanol | 110,20 ± 20,75 | 112,32 ± 8,52 | 95,07 ± 7,17 | 81,68 ± 1,46 | 73,97 ± 11,43 | 52,39 ± 13,82 | 55,14 ± 3,45 | 47,20 ± 4,47 |
| Ácido Octanoico | 0,74 ± 0,05 | 0,55 ± 0,01 | 1,34 ± 0,26 | 1,17 ± 0,23 | 1,17 ± 0,24 | 1,01 ± 0,18 | 1,25 ± 0,19 | 1,60 ± 0,22 |
| Ácido Decanoico | 0,02 ± 0,03 | 0,03 ± 0,01 | 0,02 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | 0,24 ± 0,04 | 0,45 ± 0,07 |

Respecto a los resultados de la cuantificación de volátiles obtenida tras la fermentación por el cultivo mixto CLI 706+542, se ha podido comprobar, que las cantidades finales de la mayor parte de dichos compuestos no representaban una situación intermedia entre las fermentaciones individuales. Además, los valores totales de las familias de alcoholes y ácidos estuvieron por debajo de los valores encontrados tras las fermentaciones de las cepas CLI 542 y CLI 706 de manera individual. Este hecho corrobora lo anteriormente expuesto por Howell et al. (2006); quienes demostraron que los perfiles de los vinos elaborados mediante cultivos mixtos eran diferentes de aquellos producidos por una sola cepa, confirmándose de esta manera las distintas interacciones metabólicas que se pueden producir cuando confluyen varias cepas de levadura durante la fermentación alcohólica. Asimismo, estas diferencias seguirían existiendo si se mezclaran los vinos producidos de forma individual una vez ya elaborados (Barrajón et al., 2011).

ESTUDIO DE EVOLUCIÓN DE VINOS PROCEDENTES DE FERMENTACIONES CON DIFERENTES CEPAS DE LEVADURAS. FORMACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y AROMAS RELACIONADOS CON LA OXIDACIÓN

Para la realización de la segunda parte del presente estudio los vinos elaborados por las diferentes cepas fueron sometidos a un proceso de evolución y transcurridos un mes (t1) y tres meses (t3), se cuantificaron los compuestos más importantes del vino. Al mismo tiempo a los vinos que habían sufrido una evolución de tres meses (t3) se les realizó un análisis específico de compuestos aldehídicos y un análisis sensorial con descriptores típicos de los procesos de oxidación. Los resultados medios de las cuantificaciones de los compuestos más importantes obtenidos en el estudio de los vinos al cabo de un mes de evolución se muestran en la tabla 7, mientras que los resultados correspondientes a los tres meses se recogen en la tabla 8.

La Figura 20 muestra la evolución a distintos tiempos (final de la fermentación alcohólica o t0, t1 y t3) de las familias químicas en las que se han agrupado los compuestos volátiles examinados de los mostos fermentados por las diferentes levaduras. Se puede observar cómo los alcoholes y ácidos disminuyen al final del

proceso evolutivo con respecto al inicio de dicho proceso y por el contrario, ésteres, aldehídos y cetonas aumentan con la evolución. Tal como se puede apreciar en la Figura 20, los **alcoholes** mantienen valores parecidos a lo largo del proceso de evolución y las cepas muestran un comportamiento semejante entre ellas, viéndose las concentraciones totales de alcoholes ligeramente reducidas al final de la evolución (t3) con respecto al inicio (t0), debido a la bajada de concentración del metionol y el β -feniletanol. Es preciso mencionar, que la cepa CLI 277, a diferencia de las demás cepas y a pesar de sus valores a t0 superiores al resto, sufre la bajada más acentuada de concentración total de alcoholes (35% con respecto a t0). En el caso de los **ácidos** también hay una bajada de concentración al final del proceso evolutivo con respecto al inicio del proceso; siendo la bajada mucho más significativa que en el caso de los alcoholes para el conjunto de las cepas. Dicha bajada se produce de forma progresiva para las cepas CLI 271, CLI 277 y CLI 748 y de forma irregular, siendo los valores a t1 inferiores a los de t3, para el resto de las cepas. De forma individual, los ácidos hexanoico y octanoico sufrieron una disminución de concentración más importante; hecho ya difícil de explicar pero ya anteriormente señalado en la bibliografía por Ferreira et al. (1997).

A su vez, las concentraciones de **ésteres** totales aumentaron en todos los vinos de forma progresiva a lo largo del proceso evolutivo, alcanzando sus niveles de concentración más altos a t3. El aumento fue regular y su concentración resultó más alta en aquellas cepas en las que inicialmente los valores eran también más elevados, es decir, en los vinos elaborados por las cepas CLI 275, CLI 542 y CLI 706+542; siendo la cepa CLI 542 la que mostró valores de concentración de ésteres totales más altos a los tres tiempos de estudio. Aunque la subida global de concentración en todos los vinos se debió principalmente al aumento significativo de dos compuestos determinados: lactato de etilo y succinato de dietilo (aromas lácteos y a café); los cuales mostraron las concentraciones más altas de entre los ésteres a t3; y en realidad, la mayor parte de los ésteres examinados, especialmente octanoato de etilo, hexanoato de etilo y acetato de hexilo, con aromas frescos y frutales, disminuyeron de manera progresiva con la evolución. A pesar de la mayor concentración de lactato y succinato de etilo en las muestras estudiadas respecto al resto de ésteres, sus concentraciones están dentro de los rangos encontrados generalmente en vinos blancos (0,92 – 80,24 ppm para el lactato de etilo y 0,09 – 4, 89 ppm, según el estudio realizado por Louw et al. (2010) con más de 300 vinos blancos) y por debajo de los valores encontrados en vinos tintos que han

sufrido fermentación maloláctica. Estudios realizados por De Revel et al. (1996) y Silva Ferreira y Bertrand (1996), mostraron la existencia de una correlación entre la edad del vino de Oporto, el cual está caracterizado por sufrir un envejecimiento oxidativo, y la concentración de ciertos ésteres de ácidos grasos tales como: el succinato de dietilo, el malato de dietilo y el lactato de etilo. El succinato de dietilo está considerado un marcador claro de procesos de evolución sobre lías; aumentando de forma significativa en este tipo de producción de vinos (Riu-Aumatell et al., 2006; Francioli et al., 2003); pero investigaciones recientes han encontrado que este compuesto también aumenta en procesos de envejecimiento en botella (Ancín-Azpilicueta et al., 2009).

Los aldehídos y cetonas sufrieron un aumento de concentración total al final del proceso evolutivo que con respecto a t₀; muy especialmente en la cepa CLI 542 y sobretodo en las cepas CLI 277 y CLI 748 (cepas “no óptimas”), en las cuales el aumento fue de cuatro veces su valor inicial (para CLI 277) y de casi diez veces su valor inicial (para CLI 748). Sobretodo se debió al aumento significativo de la acetoína (con aromas cremosos y a mantequilla). Se ha estudiado previamente que la formación de acetoína está correlacionada con la cepa de levadura *S. cerevisiae* empleada para la fermentación (Romano y Suzzi, 1993) y en el presente estudio ya se ha visto que la cepa CLI 275 y muy especialmente la cepa CLI 542, generaron al terminar la fermentación alcohólica cantidades significativamente superiores de este compuesto; pero además, se ha podido observar que tras un proceso evolutivo la acetoína aumentaba de forma significativa. Ya se ha estudiado que las condiciones de aireación y de temperatura favorecen la aparición de dicho compuesto, aunque en principio, en ausencia de actividad microbiana los vinos que han sido sometidos a prolongadas aireaciones no sufren aumentos en la concentración de acetoína. La acetoína por si sólo no tiene un impacto aromático importante debido a su alto umbral de detección; aunque sí por su colaboración al bouquet del vino debido a su interrelación en la formación de diacetilo y 2,3-butanodiol (Romano y Suzzi, 1996).

En conclusión, las muestras más evolucionadas presentan respecto al inicio de la evolución, una bajada de alcoholes y ácidos, particularmente metionol, β -feniletanol y los ácidos hexanoico y octanoico; lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Ferreira et al. (1997), una bajada ésteres con aromas frescos y frutales, tales como el octanoato de etilo, hexanoato de etilo y acetato de hexilo y un aumento muy marcado

del lactato de etilo y el succinato de dietilo, con aromas cremosos/mantequillosos y un aumento de las familias de cetonas y aldehídos, previamente relacionadas con la oxidación (Escudero et al, 2000b; Flanzy, 2000; Culleré et al., 2007; Balboa-Lagunero et al., 2011), con un patente aumento de compuestos tales como la acetoína (aroma cremosos), furfural y benzaldehído (aromas almendrados y licorosos). A su vez, se puede ver una clara diferenciación entre cepas que, a pesar de partir del mismo mosto, al final de la fermentación alcohólica y tras un proceso evolutivo, se producen grandes diferencias a nivel cuantitativo de los compuestos anteriormente citados.

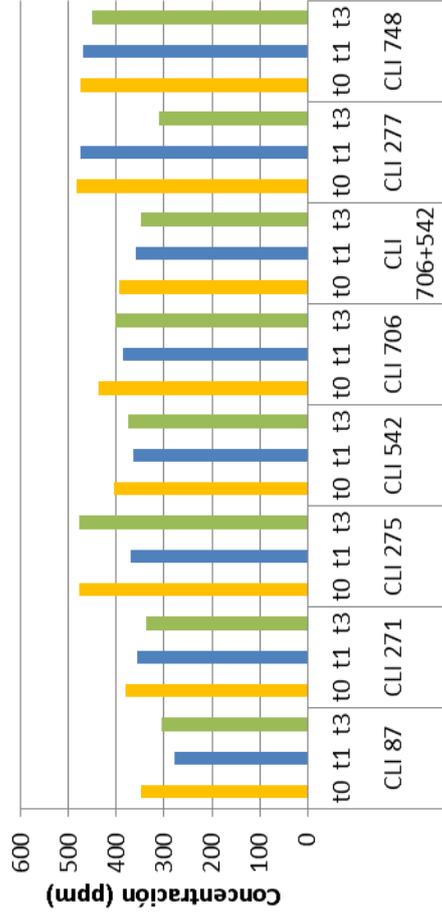
Tabla 7. Concentraciones (ppm) ± desviaciones estándar de los compuestos volátiles más importantes del vino de las muestras obtenidas tras un mes de evolución.

| t = 1 mes | CLI187 | CLI271 | CLI275 | CLI542 | CLI706 | CLI706+542 | CLI277 | CLI748 |
|-----------------------------|----------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Propanoato de etilo | 0,06 ± 0,04 | 0,10 ± 0,03 | 0,14 ± 0,04 | 0,12 ± 0,02 | 0,13 ± 0,03 | 0,13 ± 0,04 | 0,13 ± 0,01 | 0,23 ± 0,03 |
| Isobutirato de etilo | 0,02 ± 0,02 | 0,06 ± 0,02 | 0,07 ± 0,03 | 0,04 ± 0,01 | 0,10 ± 0,03 | 0,06 ± 0,02 | 0,07 ± 0,01 | 0,06 ± 0,02 |
| Diacefilo | 0,07 ± 0,01 | 0,10 ± 0,05 | 0,04 ± 0,02 | 0,09 ± 0,03 | 0,09 ± 0,02 | 0,05 ± 0,02 | 0,13 ± 0,01 | 0,13 ± 0,01 |
| Butirato de etilo | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | 0,03 ± 0,01 | 0,02 ± 0,01 |
| Isovalerato de etilo | 0,18 ± 0,01 | 0,23 ± 0,03 | 0,18 ± 0,01 | 0,22 ± 0,02 | 0,19 ± 0,04 | 0,17 ± 0,04 | 0,20 ± 0,01 | 0,17 ± 0,02 |
| 1-propanol | 0,79 ± 0,42 | 1,11 ± 0,41 | 1,53 ± 1,02 | 3,34 ± 0,65 | 1,62 ± 0,50 | 1,35 ± 0,22 | 5,45 ± 2,73 | 5,21 ± 1,21 |
| Isobutanol | 30,46 ± 1,23 | 36,38 ± 2,78 | 41,64 ± 0,36 | 32,66 ± 1,30 | 55,34 ± 0,65 | 38,59 ± 3,30 | 45,83 ± 4,13 | 39,98 ± 4,26 |
| Acetato de isoamilo | 0,03 ± 0,05 | 0,05 ± 0,05 | 0,07 ± 0,10 | 0,03 ± 0,03 | 0,15 ± 0,09 | 0,08 ± 0,05 | 0,63 ± 0,12 | 0,24 ± 0,03 |
| 1-butanol | 0,75 ± 0,07 | 0,63 ± 0,06 | 0,36 ± 0,03 | 0,55 ± 0,03 | 0,40 ± 0,02 | 0,40 ± 0,03 | 1,08 ± 0,38 | 0,67 ± 0,12 |
| Alcohol isoamílico | 215,19 ± 13,60 | 265,11 ± 24,10 | 283,96 ± 3,41 | 288,05 ± 11,89 | 288,14 ± 9,96 | 285,66 ± 44,53 | 354,94 ± 33,35 | 373,67 ± 31,50 |
| Hexanoato de etilo | 0,04 ± 0,02 | 0,05 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | 0,04 ± 0,00 | 0,08 ± 0,02 | 0,06 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 |
| Acetato de hexilo | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,03 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 |
| Acetoína | 5,00 ± 4,50 | 3,86 ± 0,35 | 5,87 ± 2,01 | 14,48 ± 3,75 | 3,36 ± 2,44 | 6,68 ± 0,44 | 10,14 ± 1,45 | 10,12 ± 2,83 |
| Lactato de etilo | 8,91 ± 0,21 | 11,18 ± 1,37 | 15,05 ± 0,35 | 21,61 ± 2,29 | 13,38 ± 0,48 | 17,39 ± 2,19 | 14,27 ± 0,46 | 6,99 ± 0,33 |
| 1-hexanol | 0,30 ± 0,13 | 0,34 ± 0,04 | 0,24 ± 0,04 | 0,28 ± 0,03 | 0,40 ± 0,03 | 0,29 ± 0,02 | 0,55 ± 0,12 | 0,56 ± 0,11 |
| c-3-hexenol | 0,24 ± 0,02 | 0,25 ± 0,01 | 0,24 ± 0,01 | 0,26 ± 0,00 | 0,26 ± 0,00 | 0,25 ± 0,01 | 0,35 ± 0,03 | 0,31 ± 0,02 |
| Octanoato de etilo | 0,05 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,05 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 0,10 ± 0,01 | 0,09 ± 0,00 |
| Furfural | 0,03 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,04 ± 0,01 | 0,03 ± 0,01 |
| 3-hidroxi-butilato de etilo | 0,22 ± 0,05 | 0,14 ± 0,01 | 0,33 ± 0,02 | 0,44 ± 0,01 | 0,43 ± 0,01 | 0,42 ± 0,03 | 0,19 ± 0,03 | 0,22 ± 0,03 |
| Benzaldehído | 0,00 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| Ácido isobutírico | 0,93 ± 0,12 | 1,36 ± 0,21 | 1,82 ± 0,07 | 1,24 ± 0,06 | 1,82 ± 0,02 | 1,15 ± 0,15 | 1,57 ± 0,09 | 0,99 ± 0,09 |
| Ácido butírico | 0,29 ± 0,02 | 0,30 ± 0,04 | 0,46 ± 0,05 | 0,39 ± 0,02 | 0,38 ± 0,03 | 0,33 ± 0,04 | 0,45 ± 0,01 | 0,42 ± 0,03 |
| g-butilolactona | 3,06 ± 0,14 | 3,31 ± 0,47 | 3,04 ± 0,09 | 5,56 ± 0,38 | 3,25 ± 0,18 | 4,25 ± 0,29 | 4,48 ± 0,26 | 1,47 ± 0,20 |
| Ácido isovaleriano | 0,94 ± 0,08 | 1,00 ± 0,12 | 1,75 ± 0,05 | 1,33 ± 0,05 | 1,30 ± 0,03 | 1,15 ± 0,07 | 1,21 ± 0,14 | 1,01 ± 0,09 |
| Succinato de dietilo | 0,01 ± 0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | 0,11 ± 0,09 | 0,01 ± 0,01 | 0,48 ± 0,13 | 0,36 ± 0,07 |
| Metionol | 2,84 ± 0,20 | 3,07 ± 0,36 | 4,48 ± 0,44 | 2,66 ± 0,14 | 3,13 ± 0,45 | 2,24 ± 0,27 | 4,03 ± 0,44 | 5,17 ± 1,31 |
| Acetato de 2-etilfenilo | 0,05 ± 0,02 | 0,06 ± 0,02 | 0,11 ± 0,04 | 0,20 ± 0,03 | 0,07 ± 0,02 | 0,06 ± 0,04 | 0,20 ± 0,03 | 0,12 ± 0,02 |
| Ácido hexanoico | 1,06 ± 0,07 | 1,07 ± 0,08 | 1,51 ± 0,17 | 1,72 ± 0,04 | 1,62 ± 0,20 | 1,45 ± 0,09 | 1,48 ± 0,07 | 1,29 ± 0,18 |
| Alcohol benéfico | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| b-feniletanol | 29,17 ± 2,92 | 50,33 ± 4,98 | 37,31 ± 3,73 | 36,26 ± 1,99 | 35,64 ± 3,99 | 31,77 ± 1,59 | 62,66 ± 3,22 | 45,06 ± 6,45 |
| Ácido octanoico | 0,23 ± 0,18 | 0,18 ± 0,11 | 0,43 ± 0,17 | 0,35 ± 0,08 | 0,52 ± 0,12 | 0,37 ± 0,06 | 0,63 ± 0,04 | 0,76 ± 0,17 |
| Ácido decanoico | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,03 ± 0,03 |

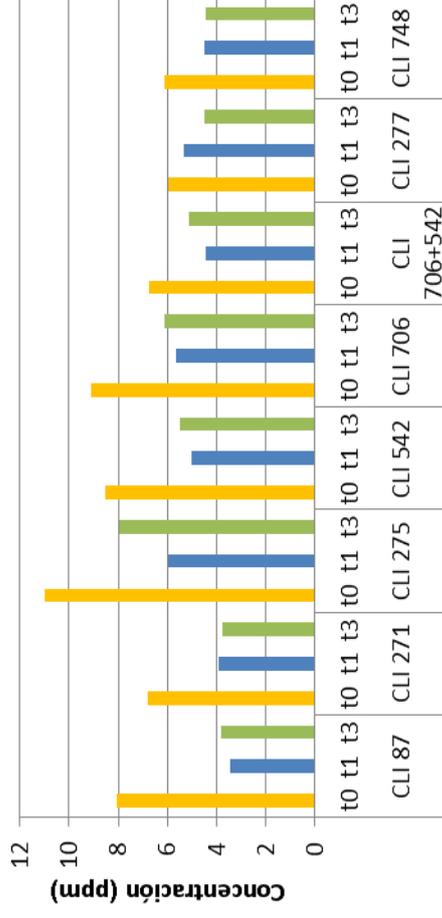
Tabla 8. Concentraciones (ppm) \pm desviaciones estándar de los compuestos volátiles más importantes del vino de las muestras obtenidas tras tres meses de evolución.

| | CLI87 | CLI271 | CLI275 | CLI542 | CLI706 | CLI706+542 | CLI277 | CLI748 |
|----------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Propanoato de etilo | 0,14 \pm 0,03 | 0,16 \pm 0,05 | 0,25 \pm 0,02 | 0,24 \pm 0,05 | 0,24 \pm 0,05 | 0,22 \pm 0,02 | 0,23 \pm 0,04 | 0,23 \pm 0,03 |
| Isobutirato de etilo | 0,07 \pm 0,01 | 0,11 \pm 0,03 | 0,25 \pm 0,02 | 0,12 \pm 0,04 | 0,18 \pm 0,03 | 0,11 \pm 0,03 | 0,11 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,00 |
| Diacetil | 0,12 \pm 0,05 | 0,11 \pm 0,01 | 0,13 \pm 0,04 | 0,13 \pm 0,11 | 0,12 \pm 0,02 | 0,11 \pm 0,04 | 0,08 \pm 0,02 | 0,17 \pm 0,03 |
| Butirato de etilo | <0,01 | <0,01 | 0,02 \pm 0,02 | 0,01 \pm 0,01 | 0,00 \pm 0,00 | <0,01 | 0,02 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 |
| Isovalerato de etilo | 0,20 \pm 0,03 | 0,21 \pm 0,04 | 0,22 \pm 0,02 | 0,27 \pm 0,01 | 0,26 \pm 0,06 | 0,27 \pm 0,09 | 0,18 \pm 0,02 | 0,20 \pm 0,00 |
| 1-propanol | 1,72 \pm 0,12 | 1,68 \pm 0,48 | 4,77 \pm 1,53 | 7,23 \pm 1,05 | 2,82 \pm 0,44 | 2,73 \pm 0,42 | 13,09 \pm 1,24 | 10,47 \pm 0,83 |
| Isobutanol | 32,54 \pm 0,70 | 37,29 \pm 3,66 | 51,63 \pm 1,97 | 34,51 \pm 1,43 | 64,13 \pm 0,27 | 42,14 \pm 2,53 | 29,13 \pm 2,09 | 39,82 \pm 2,39 |
| Acetato de isoamil | 0,04 \pm 0,05 | 0,05 \pm 0,05 | 0,18 \pm 0,07 | 0,06 \pm 0,07 | 0,03 \pm 0,04 | 0,04 \pm 0,02 | 0,26 \pm 0,09 | 0,08 \pm 0,03 |
| 1-butanol | 0,79 \pm 0,11 | 0,61 \pm 0,06 | 0,44 \pm 0,05 | 0,59 \pm 0,09 | 0,45 \pm 0,03 | 0,43 \pm 0,04 | 0,67 \pm 0,09 | 0,72 \pm 0,08 |
| Alcohol isoamílico | 235,45 \pm 0,89 | 252,97 \pm 41,32 | 365,74 \pm 27,45 | 286,99 \pm 30,46 | 293,88 \pm 4,84 | 266,12 \pm 49,84 | 212,88 \pm 25,52 | 347,02 \pm 13,09 |
| Hexanoato de etilo | 0,08 \pm 0,02 | 0,05 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 | 0,08 \pm 0,01 | 0,05 \pm 0,00 | 0,06 \pm 0,01 | 0,08 \pm 0,01 | 0,08 \pm 0,01 |
| Acetato de hexilo | 0,00 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,01 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,04 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,00 |
| Acetofena | 5,97 \pm 4,63 | 3,91 \pm 2,06 | 7,67 \pm 2,52 | 22,96 \pm 4,34 | 4,59 \pm 2,94 | 5,68 \pm 4,30 | 18,85 \pm 4,73 | 25,46 \pm 2,52 |
| Lactato de etilo | 14,50 \pm 0,84 | 15,40 \pm 2,59 | 27,84 \pm 2,44 | 31,60 \pm 2,93 | 21,48 \pm 1,01 | 26,20 \pm 2,01 | 20,73 \pm 1,67 | 10,11 \pm 0,84 |
| 1-hexanol | 0,49 \pm 0,06 | 0,42 \pm 0,11 | 0,49 \pm 0,00 | 0,45 \pm 0,03 | 0,55 \pm 0,00 | 0,45 \pm 0,09 | 0,32 \pm 0,22 | 0,55 \pm 0,04 |
| c-3-hexenol | 0,29 \pm 0,01 | 0,25 \pm 0,03 | 0,30 \pm 0,01 | 0,29 \pm 0,01 | 0,29 \pm 0,01 | 0,27 \pm 0,01 | 0,32 \pm 0,01 | 0,31 \pm 0,01 |
| Octanoato de etilo | 0,06 \pm 0,00 | 0,05 \pm 0,00 | 0,06 \pm 0,01 | 0,05 \pm 0,00 | 0,05 \pm 0,00 | 0,05 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 |
| Furfural | 0,09 \pm 0,01 | 0,05 \pm 0,01 | 0,08 \pm 0,02 | 0,03 \pm 0,02 | 0,07 \pm 0,01 | 0,06 \pm 0,01 | 0,05 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,01 |
| 3-hidroxibutirato de etilo | 0,25 \pm 0,07 | 0,13 \pm 0,01 | 0,46 \pm 0,04 | 0,46 \pm 0,02 | 0,45 \pm 0,02 | 0,42 \pm 0,05 | 0,19 \pm 0,04 | 0,23 \pm 0,06 |
| Benzaldehído | 0,01 \pm 0,00 | 0,01 \pm 0,01 | 0,01 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,01 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 |
| Ácido isobutírico | 1,03 \pm 0,10 | 1,46 \pm 0,26 | 2,36 \pm 0,13 | 1,39 \pm 0,07 | 2,22 \pm 0,10 | 1,50 \pm 0,17 | 1,48 \pm 0,11 | 1,05 \pm 0,02 |
| Ácido butírico | 0,35 \pm 0,03 | 0,36 \pm 0,06 | 0,64 \pm 0,06 | 0,48 \pm 0,03 | 0,51 \pm 0,03 | 0,47 \pm 0,06 | 0,43 \pm 0,02 | 0,45 \pm 0,02 |
| g-butilolactona | 5,64 \pm 0,39 | 5,44 \pm 0,85 | 6,04 \pm 0,35 | 9,38 \pm 0,50 | 6,02 \pm 0,53 | 7,19 \pm 0,59 | 5,98 \pm 0,25 | 2,33 \pm 0,02 |
| Ácido isovalerianico | 1,05 \pm 0,08 | 0,99 \pm 0,21 | 2,38 \pm 0,20 | 1,52 \pm 0,13 | 1,46 \pm 0,06 | 1,28 \pm 0,05 | 1,19 \pm 0,18 | 1,23 \pm 0,11 |
| Succinato de dietilo | 0,60 \pm 0,14 | 0,36 \pm 0,18 | 0,96 \pm 0,11 | 0,84 \pm 0,47 | 0,78 \pm 0,23 | 0,60 \pm 0,21 | 1,64 \pm 0,37 | 1,77 \pm 0,08 |
| Metionol | 2,56 \pm 0,23 | 2,26 \pm 0,37 | 5,03 \pm 0,70 | 2,71 \pm 0,20 | 3,25 \pm 0,76 | 2,50 \pm 0,39 | 3,08 \pm 0,40 | 4,91 \pm 0,55 |
| Acetato de 2-etilfenilo | 0,09 \pm 0,03 | 0,08 \pm 0,02 | 0,28 \pm 0,07 | 0,56 \pm 0,06 | 0,14 \pm 0,07 | 0,16 \pm 0,07 | 0,66 \pm 0,06 | 0,29 \pm 0,03 |
| Ácido hexanoico | 1,15 \pm 0,06 | 0,88 \pm 0,17 | 1,95 \pm 0,23 | 1,82 \pm 0,13 | 1,64 \pm 0,30 | 1,55 \pm 0,17 | 1,12 \pm 0,07 | 1,25 \pm 0,11 |
| Alcohol bencílico | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| b-feniletanol | 32,66 \pm 2,27 | 42,12 \pm 9,90 | 49,82 \pm 5,20 | 41,36 \pm 4,67 | 38,04 \pm 7,28 | 35,08 \pm 4,26 | 51,85 \pm 2,26 | 47,43 \pm 3,44 |
| Ácido octanoico | 0,21 \pm 0,05 | 0,09 \pm 0,05 | 0,60 \pm 0,09 | 0,28 \pm 0,16 | 0,28 \pm 0,06 | 0,32 \pm 0,07 | 0,26 \pm 0,02 | 0,43 \pm 0,10 |
| Ácido decanoico | 0,00 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,00 \pm 0,00 | 0,03 \pm 0,02 | 0,03 \pm 0,03 |

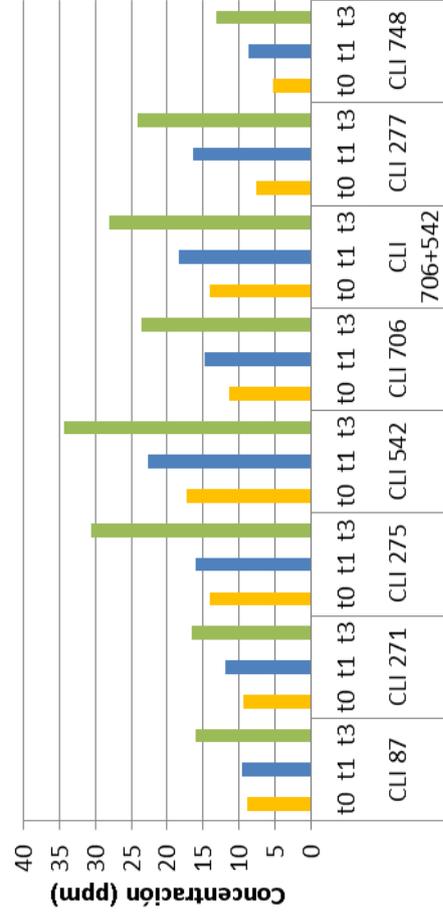
Alcoholes



Ácidos



Ésteres



Aldehídos y cetonas

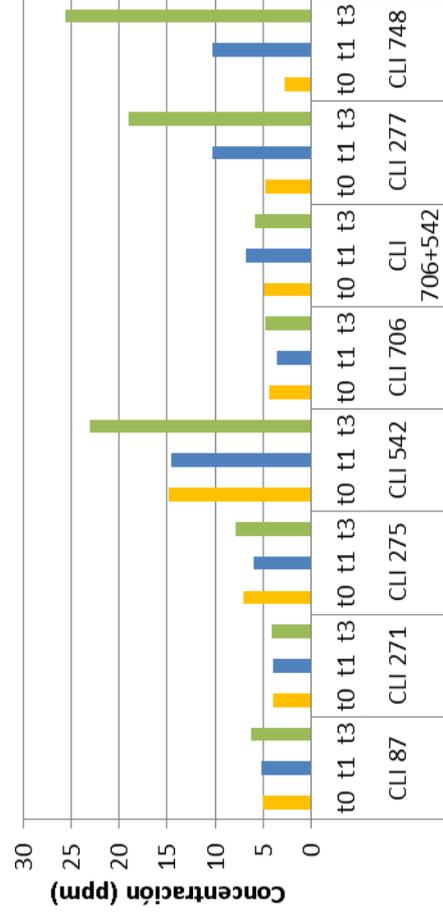


Figura 20. Contenido de alcoholes, ácidos, ésteres y aldehídos cetonas de los vinos obtenidos con las diferentes levaduras de estudio a tiempos t0, t1 y t3 del ensayo de evolución.

Las muestras más evolucionadas (t3) fueron sometidas a un análisis específico de aldehídos y a una cata de descriptores relacionados con la oxidación. Los resultados de la media de las concentraciones de aldehídos para cada vino elaborado con una cepa distinta de levadura se muestra a continuación en la Tabla 9 y la media de las puntuaciones de los distintos descriptores específicos de oxidación en la Tabla 10 y su representación en diagrama de araña se puede ver en la Figura 21.

Tal como se puede observar en la Tabla 9, los niveles más altos del total de concentración de aldehídos se dieron en las muestras de las fermentaciones con las dos cepas consideradas como “no óptimas” para este ensayo, CLI 277 y CLI 748, con valores de 432 y 386 ppm, respectivamente. Por el contrario, las cepas CLI 87 y CLI 271 obtuvieron las concentraciones más bajas, 175 y 241 ppm, respectivamente. Las cepas “no óptimas” mostraron los valores más altos de 2-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal. A su vez, la cepa CLI 748, también obtuvo los valores más altos de fenilacetaldehído y junto con la cepa CLI 275, los más destacados de metional. Esta última cepa obtuvo las concentraciones más altas de E-2-nonenal. Estas observaciones se pudieron contrastar mediante la realización de un análisis de componentes principales (PCA) utilizando los datos de las concentraciones de todos los compuestos analizados al tiempo de evolución t3. Con las dos principales componentes de dicho PCA (Figura 22) ya se pudo explicar un 60% de la varianza; observándose una clara agrupación no sólo de las repeticiones de cada cepa, sino también una diferenciación existente entre los vinos evolucionados dependiendo de sus compuestos volátiles. Se observó que las cepas CLI 277 y CLI 748 (cepas “no óptimas”) se encontraban cercanas debidas a sus semejanzas y mostraban unas concentraciones significativamente superiores de compuestos tales como el 1-propanol, la acetoína, el succinato de dietilo y de todos los aldehídos examinados, con la excepción del E-2-nonenal. Simultáneamente, las cepas CLI 271 y CLI 87 (cepas “óptimas” con los menores valores de metionina, fenilalanina y leucina) se agruparon juntas, mostrando por el contrario las concentraciones más bajas para los mencionados compuestos. A su vez, las muestras pertenecientes a la cepa CLI 275, se agruparon y se diferenciaron del resto debido a su mayor contenido en isobutirato de etilo, isobutanol, 3-hidroxibutirato de etilo y los ácidos butírico, isobutírico, hexanoico y octanoico.

Tabla 9. Concentraciones (ppb) \pm desviaciones estándar de los aldehídos del vino de las muestras obtenidas tras 3 meses de evolución. (<LC: por debajo del límite de cuantificación y <LD: por debajo del límite de detección establecidos por el método de análisis).

| | CLI87 | CLI271 | CLI275 | CLI542 | CLI706 | CLI706+542 | CLI277 | CLI748 |
|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 2-metilpropananal | 80,39 \pm 15,46 | 98,34 \pm 6,04 | 102,93 \pm 27,33 | 122,49 \pm 8,26 | 142,60 \pm 13,32 | 115,09 \pm 12,89 | 165,34 \pm 8,76 | 145,36 \pm 14,31 |
| 2-metilbutanal | 17,02 \pm 2,04 | 25,68 \pm 1,92 | 34,17 \pm 10,49 | 38,80 \pm 10,96 | 36,62 \pm 2,17 | 24,84 \pm 1,61 | 49,89 \pm 7,35 | 42,84 \pm 1,66 |
| 3-metilbutanal | 60,47 \pm 8,43 | 108,73 \pm 6,55 | 121,58 \pm 48,88 | 141,49 \pm 34,60 | 141,49 \pm 12,47 | 100,90 \pm 0,99 | 200,31 \pm 22,31 | 164,59 \pm 8,62 |
| 1-octen-3-ona | < LC | < LD | < LC | < LC | < LC | < LD | < LD | < LD |
| metional | 6,40 \pm 2,16 | 1,72 \pm 0,42 | 10,38 \pm 1,96 | 3,58 \pm 1,28 | 4,00 \pm 0,75 | 1,32 \pm 0,31 | 4,93 \pm 1,25 | 8,98 \pm 1,75 |
| E-2-octenal | < LD | < LD | < LC | < LC | < LC | < LD | < LD | < LC |
| fenilacetaldéhid | 10,40 \pm 2,73 | 6,64 \pm 2,06 | 17,13 \pm 6,79 | 13,82 \pm 4,89 | 9,46 \pm 1,24 | 17,53 \pm 3,82 | 10,92 \pm 1,08 | 24,33 \pm 3,34 |
| E-2-nonenal | 0,17 \pm 0,03 | 0,22 \pm 0,07 | 0,45 \pm 0,18 | 0,32 \pm 0,19 | 0,29 \pm 0,05 | 0,21 \pm 0,04 | 0,21 \pm 0,02 | 0,16 \pm 0,00 |
| total: | 174,85 | 241,33 | 286,64 | 311,20 | 334,46 | 259,90 | 431,60 | 386,26 |

Tabla 10. Puntuaciones medias \pm desviaciones estándar del vino de las muestras obtenidas tras 3 meses de evolución. Escala de 0 a 5.

| | CLI87 | CLI271 | CLI275 | CLI542 | CLI706 | CLI706+542 | CLI277 | CLI748 |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| fruta muy madura-fruta pasa-uva pasa | 1,67 \pm 0,32 | 0,79 \pm 0,12 | 1,02 \pm 0,15 | 2,47 \pm 0,53 | 2,61 \pm 0,29 | 2,50 \pm 0,36 | 2,21 \pm 0,26 | 2,02 \pm 0,70 |
| coñac-brandy-vino jerez-vino oloroso-o-quina | 2,55 \pm 0,65 | 1,24 \pm 0,49 | 1,98 \pm 0,34 | 2,97 \pm 0,59 | 2,25 \pm 0,30 | 2,42 \pm 0,38 | 3,55 \pm 0,65 | 1,60 \pm 0,16 |
| vino viejo-vino añejo-vino evolucionado-vino pasado | 2,45 \pm 0,49 | 1,55 \pm 0,41 | 1,79 \pm 0,26 | 2,69 \pm 0,27 | 2,50 \pm 0,44 | 2,19 \pm 0,05 | 2,74 \pm 0,48 | 1,26 \pm 0,08 |
| miel-melaza | 0,98 \pm 0,11 | 0,43 \pm 0,19 | 0,81 \pm 0,18 | 0,94 \pm 0,32 | 0,89 \pm 0,19 | 1,08 \pm 0,30 | 0,62 \pm 0,08 | 1,64 \pm 0,26 |
| herbáceo-tallo vegetal-raspón | 0,83 \pm 0,37 | 1,07 \pm 0,25 | 1,10 \pm 0,11 | 1,17 \pm 0,50 | 1,06 \pm 0,51 | 1,00 \pm 0,29 | 0,76 \pm 0,18 | 0,95 \pm 0,37 |
| heno-hierba seca-paja | 0,05 \pm 0,08 | 0,62 \pm 0,30 | 0,29 \pm 0,14 | 0,17 \pm 0,17 | 0,44 \pm 0,25 | 0,22 \pm 0,19 | 0,14 \pm 0,00 | 0,81 \pm 0,22 |
| barniz-pintura-pegamento-resinas-gomas-disolvente | 0,48 \pm 0,70 | 0,43 \pm 0,29 | 0,48 \pm 0,22 | 1,00 \pm 0,17 | 0,89 \pm 0,35 | 0,72 \pm 0,25 | 0,76 \pm 0,16 | 0,48 \pm 0,04 |
| patata cocida-verdura cocida | 0,19 \pm 0,08 | 0,81 \pm 0,30 | 0,33 \pm 0,22 | 0,56 \pm 0,25 | 0,83 \pm 0,44 | 0,61 \pm 0,10 | 0,24 \pm 0,30 | 1,21 \pm 0,19 |
| regaliz | 0,31 \pm 0,15 | 0,24 \pm 0,15 | 0,48 \pm 0,15 | 0,61 \pm 0,19 | 0,78 \pm 0,05 | 0,92 \pm 0,17 | 0,24 \pm 0,08 | 0,40 \pm 0,15 |
| nivel oxidación | 3,43 \pm 0,33 | 2,76 \pm 0,32 | 3,43 \pm 0,45 | 3,61 \pm 0,27 | 3,47 \pm 0,71 | 2,86 \pm 0,10 | 3,48 \pm 0,46 | 2,10 \pm 0,18 |

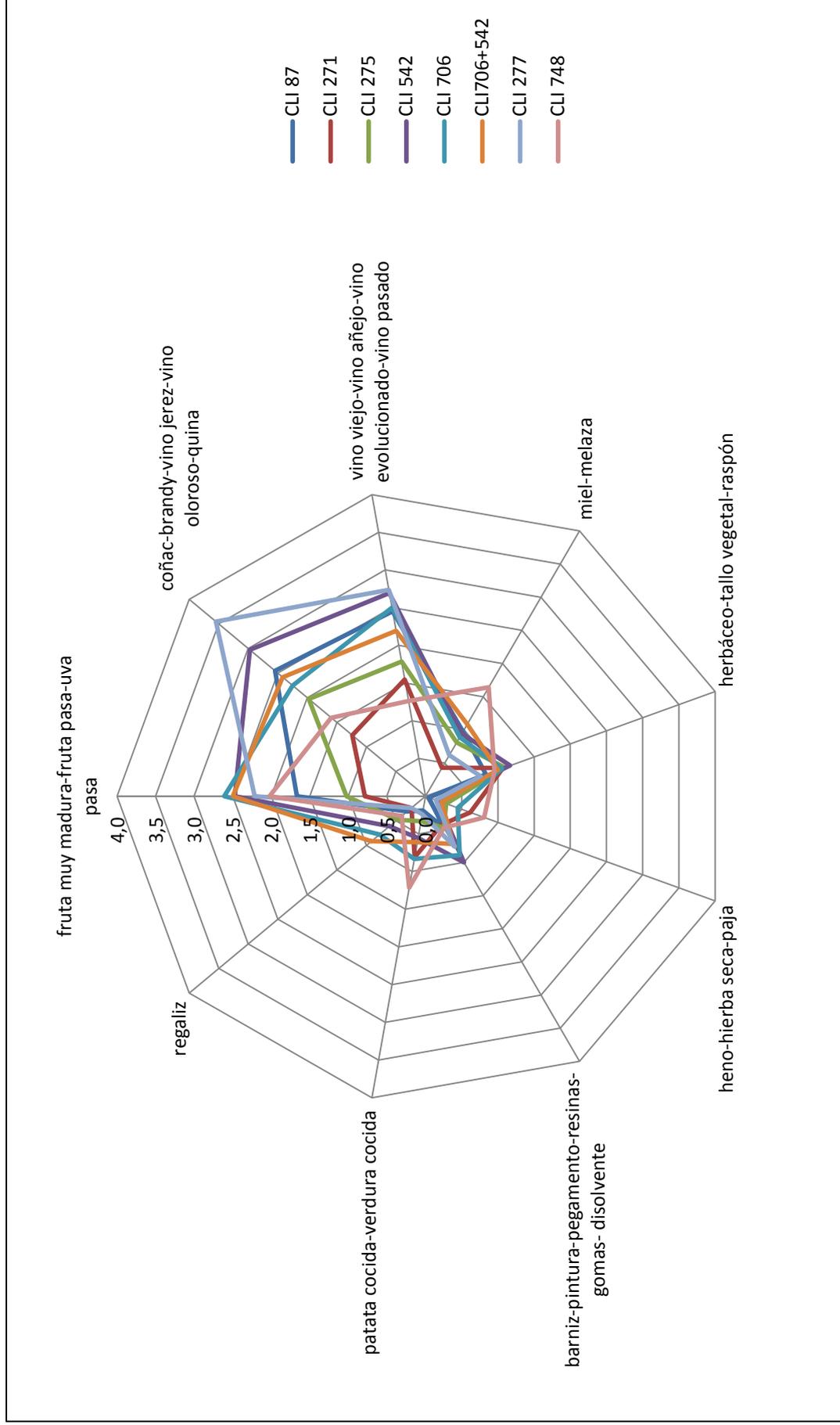


Figura 21 Perfiles sensoriales de descriptores específicos de oxidación de los vinos elaborados por distintas cepas de levadura a t3 (escala de 0 a 5).



Figura 22. Análisis de los componentes principales de las muestras a tiempo t3 utilizando los valores de concentración de compuestos mayoritarios y aldehídos.

Además, se ha procedido a realizar otro análisis de componentes principales de todas las muestras a los tres tiempos de evolución t0, t1 y t3 (Figura 23) utilizando los valores de la composición aromática. Se pudo comprobar que existía una clara direccionalidad de los vinos dependiendo de su estado de evolución que se podía explicar mediante la composición de sus volátiles. Las muestras menos evolucionadas (t0) se corresponden con los valores más altos de compuestos con aromas frescos y agradables, tales como: isovalerato de etilo, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, octanoato de etilo, β -feniletanol y también de los compuestos: metionol y los ácidos hexanoico y octanoico. Por el contrario, las muestras más evolucionadas (t3) y dentro de ellas sobretudo las cepas CLI 277 y CLI 542, mostraron los valores más bajos de los compuestos mencionados y más altos de 1-propanol, acetoina, lactato de etilo, succinato de dietilo, furfural y γ -butirolactona.

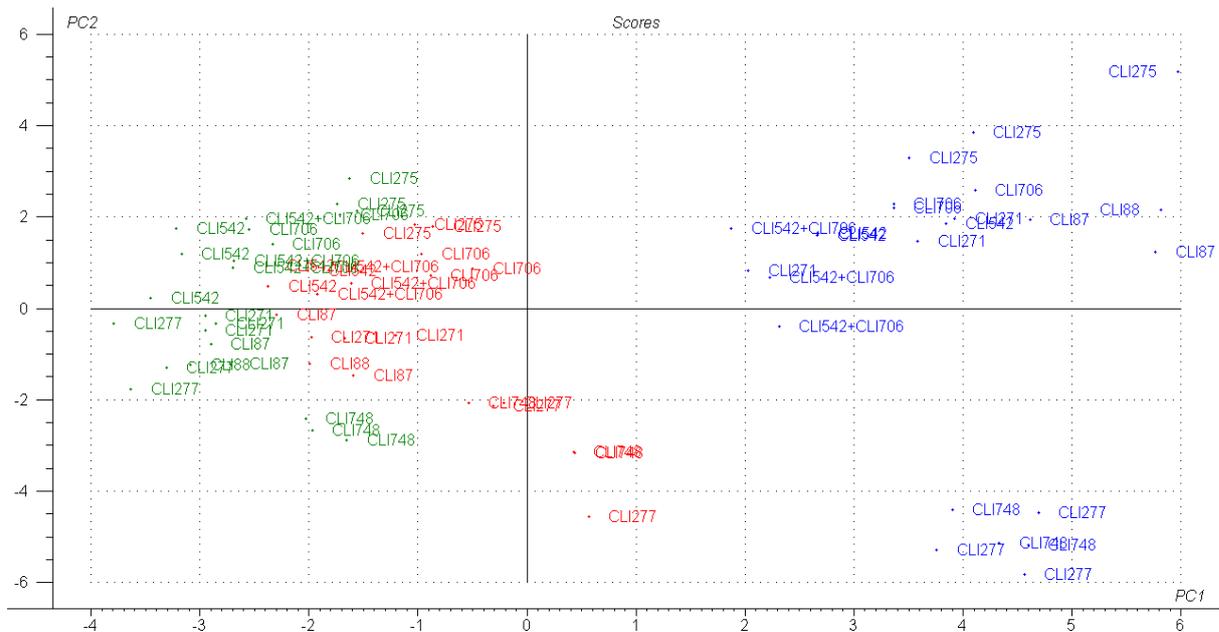


Figura 23. Análisis de los componentes principales de las muestras a los tiempos t0, t1 y t3 utilizando los valores de concentración de compuestos mayoritarios. En azul están representadas las muestras a t0, en rojo a t1 y en verde a t3.

En cuanto a los resultados del análisis sensorial, todas las muestras al final de exposición al proceso evolutivo (t3), mostraron claras notas de envejecimiento y oxidación; además de adquirir un pardeamiento típico de los vinos oxidados (Fernández Zurbano, 1995; Escudero et al., 2000a, Silva Ferreira et al., 2002). Gracias a la ficha de descriptores específicos de oxidación, se ha tratado de entender y aclarar los diferentes matices de envejecimiento y el nivel de oxidación de los vinos provenientes de diferentes levaduras. Observando la Figura 21 se puede destacar que hubo tres descriptores que puntuaron más alto en los tres vinos: “fruta muy madura – fruta pasa – uva pasa”, “coñac - brandy - vino jerez - vino oloroso - quina” y “vino viejo, vino añejo – vino evolucionado – vino pasado”. Por tanto, podemos afirmar, que para los presentes vinos blancos evolucionados estos tres descriptores son los que mejor definen su estado de oxidación. Igualmente se puede diferenciar un perfil similar para todos los vinos, con la excepción de vino proveniente de la cepa CLI 748. En este perfil las intensidades mas bajas las mostró la cepa CLI 271 y las más altas la cepa CLI 277. Esto se vio reflejado en la valoración realizada por el panel sobre el estado de oxidación de los vinos en una escala de 0 a 5, el vino CLI 271 puntuó con el valor más bajo (2,76) y el vino CLI 277 con el valor más alto (3,48). La obtención de la calificación más baja de oxidación global (2,10) por parte del vino CLI 748 fue un resultado totalmente inesperado, debido

a su alto contenido total en aldehídos relacionados con aromas de oxidación. Este resultado se podría explicar parcialmente viendo el perfil claramente diferente de este vino, que puntuó significativamente más alto que el resto de los vinos para los descriptores “miel – melaza”, “heno – hierba seca – paja” y “patata cocida – verdura cocida”. Principalmente el aroma a miel, el cual es un aroma asociado generalmente con aromas agradables, pudo enmascarar la percepción global de oxidación y de descriptores como “coñac - brandy - vino jerez - vino oloroso - quina” y “vino viejo, vino añejo – vino evolucionado – vino pasado”. Precisamente, las muestras provenientes de la cepa CLI 748 mostraron los valores más altos de fenilacetaldehído (24,33 ppb) casi 25 veces por encima de su umbral de olfacción en el vino (1 ppb). Otra razón podría ser la interacción de este compuesto con otros compuestos presentes generando así nuevos aromas o potenciando otros presentes. El efecto aditivo o sinérgico de aldehídos relacionados con la oxidación y la existencia de interrelaciones entre ellos y con otros volátiles del vino ha sido demostrado con anterioridad por Culleré et al., (2007).

Se realizó un análisis de correlaciones bivariadas de Pearson para tratar de esclarecer la existencia de correlaciones significativas entre las cantidades de aminoácidos residuales al comenzar el proceso evolutivo con los descriptores de oxidación y las concentraciones de aldehídos al finalizar dicho proceso. Se ha podido demostrar que existe una significativa correlación positiva entre los niveles residuales del aminoácido metionina con los aldehídos 3-metilpropanal (+0,913, $p<0,05$), 2-metilbutanal (+0,972, $p<0,01$) y 3-metilbutanal (+0,917, $p<0,05$). No se encontró una correlación significativa, tal como se hubiese esperado, entre el aminoácido metionina y el metional; aunque la cepa CLI 748, la cual obtuvo los valores más altos de metionina, si obtuvo los segundos valores más altos de metional y del descriptor “patata/verduras cocidas. Se ha podido correlacionar significativamente el descriptor “miel – melaza” con los valores del aminoácido fenilalanina (+0,727, $p<0,01$) y del aldehído fenilacetaldehído (0,725, $p<0,01$); reflejándose esta correlación en las muestras de vino correspondientes a la cepa CLI 542, tanto en cultivo individual como mixto, y muy especialmente a la cepa CLI 748.

Para evaluar de forma individual el impacto de los compuestos analizados en los procesos de evolución de los vinos no sólo de los aldehídos; se calcularon sus

valores de OAV (valor de actividad aromática) a t3. Este valor que representa el cociente entre la concentración de compuesto y el umbral de percepción de dicho compuesto, informa del potencial aromático individual de un compuesto. Cuando el valor de OAV de un compuesto aromático supera la unidad, se considera que es activo aromáticamente. La Tabla 11 muestra los veinte compuestos analizados que mostraron $OAV > 1$ en al menos una de las muestras y que por tanto, pueden considerarse que de forma individual pueden tener impacto en el aroma global. Se puede asumir que aquellos compuestos con los valores de OAV más altos serán los compuestos que contribuyan de forma más importante al aroma final del vino (Gil et al., 2006; Chaves et al., 2006; Gómez-Miguez et al., 2007). Compuestos tales como el alcohol isoamílico y el ácido isovaleriánico (aromas amílicos y a queso), isovalerato de etilo (aroma frutal) y los aldehídos ya mencionados 2-metilpropanal, 3-metilbutanal (aromas amílicos) y fenilacetaldehído (aroma a miel), mostraron valores de OAV particularmente altos en todas las muestras evolucionadas. Estos tres últimos compuestos han sido ampliamente relacionados con la oxidación de los vinos en la literatura (Aznar et al., 2003; Silva Ferreira et al., 2003; Culleré et al., 2007). El alcohol isoamílico y el ácido isovaleriánico destacan por tener los aromas mencionados, siendo particularmente desagradables en altas concentraciones. El isovalerato de etilo, aunque de aroma agradable/frutal, podría considerarse como parcialmente responsable, en las concentraciones tan elevadas en las que se encuentra, de los aromas frutales hallados en todos los vinos y en especial a notas de fruta sobremadura que caracterizaron a los vinos obtenidos con las levaduras CLI 542, CLI 706 y CLI 706+542; los cuales fueron precisamente los que mostraron los valores más altos de OAV (90,4, 86,2 y 91,3 respectivamente).

Tabla 11. Compuestos con OAV>1 en los vinos a t=3 meses. (Concentración de cada compuesto obtenida como la media de los triplicados por levadura).

| | | CONCENTRACIÓN (ppm) | | | | | | | | | | OAV | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--------------------------|---------------------|--------|--------|--------|--------|-----------|------------|--------|--------|------|-----------|--------|--------|--------|--------|-----------|------------|--------|--------|------|-------|--------|--------|--------|--------|------------|--------|--------|
| | | Umbral de | | | | | Umbral de | | | | | Umbral de | | | | | Umbral de | | | | | | | | | | | | |
| | | olfacción | | | | | olfacción | | | | | olfacción | | | | | olfacción | | | | | | | | | | | | |
| | | (ppm) | | | | | (ppm) | | | | | (ppm) | | | | | (ppm) | | | | | | | | | | | | |
| | | CLI87 | CLI271 | CLI275 | CLI542 | CLI706 | CLI706 | CLI706+542 | CLI277 | CLI748 | Ref. | CLI87 | CLI271 | CLI275 | CLI542 | CLI706 | CLI706 | CLI706+542 | CLI277 | CLI748 | Ref. | CLI87 | CLI271 | CLI275 | CLI542 | CLI706 | CLI706+542 | CLI277 | CLI748 |
| isobutirato de etilo | Descripción aromática | 0,07 | 0,11 | 0,25 | 0,12 | 0,18 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,07 | a | 4,92 | 7,48 | 16,98 | 7,95 | 11,94 | 7,59 | 7,56 | 4,51 | | a | 4,92 | 7,48 | 16,98 | 7,95 | 11,94 | 7,59 | 7,56 | 4,51 |
| diacetilo | frutal | 0,12 | 0,11 | 0,13 | 0,13 | 0,12 | 0,11 | 0,11 | 0,17 | 0,17 | b | 1,18 | 1,08 | 1,32 | 1,32 | 1,20 | 1,07 | 0,85 | 1,65 | | b | 1,18 | 1,08 | 1,32 | 1,32 | 1,20 | 1,07 | 0,85 | 1,65 |
| butirato de etilo | frutal, manzana | <0,01 | <0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | <0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,03 | a | <1,0 | <1,0 | 1,06 | 0,99 | 0,41 | <1,0 | 1,12 | 1,41 | | a | <1,0 | <1,0 | 1,06 | 0,99 | 0,41 | <1,0 | 1,12 | 1,41 |
| isovalerato de etilo | frutal, anís | 0,20 | 0,21 | 0,22 | 0,27 | 0,26 | 0,27 | 0,18 | 0,20 | 0,20 | a | 66,92 | 69,86 | 74,34 | 90,38 | 86,21 | 91,28 | 60,05 | 65,99 | | a | 66,92 | 69,86 | 74,34 | 90,38 | 86,21 | 91,28 | 60,05 | 65,99 |
| isobutanol | queso, disolvente | 32,54 | 37,29 | 51,63 | 34,51 | 64,13 | 42,14 | 29,13 | 39,82 | 40 | a | 0,81 | 0,93 | 1,29 | 0,86 | 1,60 | 1,05 | 0,73 | 1,00 | | a | 0,81 | 0,93 | 1,29 | 0,86 | 1,60 | 1,05 | 0,73 | 1,00 |
| acetato de isoamilo | plátano | 0,04 | 0,05 | 0,18 | 0,06 | 0,03 | 0,04 | 0,26 | 0,08 | 0,03 | a | 1,44 | 1,79 | 5,84 | 1,96 | 0,96 | 1,25 | 8,75 | 2,72 | | a | 1,44 | 1,79 | 5,84 | 1,96 | 0,96 | 1,25 | 8,75 | 2,72 |
| alcohol isoamílico | queso, pies, rancio | 235,45 | 252,97 | 365,74 | 286,99 | 293,88 | 266,12 | 212,88 | 347,02 | 30 | b | 7,85 | 8,43 | 12,19 | 9,57 | 9,80 | 8,87 | 7,10 | 11,57 | | b | 7,85 | 8,43 | 12,19 | 9,57 | 9,80 | 8,87 | 7,10 | 11,57 |
| hexanoato de etilo | frutas tropicales, piña | 0,08 | 0,05 | 0,07 | 0,08 | 0,05 | 0,06 | 0,08 | 0,08 | 0,014 | a | 6,02 | 3,56 | 4,88 | 5,88 | 3,61 | 4,44 | 5,79 | 6,06 | | a | 6,02 | 3,56 | 4,88 | 5,88 | 3,61 | 4,44 | 5,79 | 6,06 |
| ácido butírico | queso, químico | 0,35 | 0,36 | 0,64 | 0,48 | 0,51 | 0,47 | 0,43 | 0,45 | 0,173 | a | 2,04 | 2,08 | 3,69 | 2,76 | 2,96 | 2,71 | 2,46 | 2,63 | | a | 2,04 | 2,08 | 3,69 | 2,76 | 2,96 | 2,71 | 2,46 | 2,63 |
| ácido isovaleriano | queso, rancio | 1,05 | 0,99 | 2,38 | 1,52 | 1,46 | 1,28 | 1,19 | 1,23 | 0,033 | a | 31,84 | 30,01 | 72,03 | 46,11 | 44,36 | 38,74 | 35,94 | 37,16 | | a | 31,84 | 30,01 | 72,03 | 46,11 | 44,36 | 38,74 | 35,94 | 37,16 |
| metionol | verdura, granja, establo | 2,56 | 2,26 | 5,03 | 2,71 | 3,25 | 2,50 | 3,08 | 4,91 | 1 | a | 2,56 | 2,26 | 5,03 | 2,71 | 3,25 | 2,50 | 3,08 | 4,91 | | a | 2,56 | 2,26 | 5,03 | 2,71 | 3,25 | 2,50 | 3,08 | 4,91 |
| acetato de 2-feniletilo | floral, rosas | 0,09 | 0,08 | 0,28 | 0,56 | 0,14 | 0,16 | 0,66 | 0,29 | 0,25 | b | 0,37 | 0,32 | 1,14 | 2,25 | 0,55 | 0,65 | 2,63 | 1,15 | | b | 0,37 | 0,32 | 1,14 | 2,25 | 0,55 | 0,65 | 2,63 | 1,15 |
| ácido hexanoico | queso | 1,15 | 0,88 | 1,95 | 1,82 | 1,64 | 1,55 | 1,12 | 1,25 | 0,42 | a | 2,75 | 2,10 | 4,65 | 4,33 | 3,92 | 3,70 | 2,67 | 2,98 | | a | 2,75 | 2,10 | 4,65 | 4,33 | 3,92 | 3,70 | 2,67 | 2,98 |
| b-feniletanol | floral, rosas | 32,66 | 42,12 | 49,82 | 41,36 | 38,04 | 35,08 | 51,85 | 47,43 | 14 | a | 2,33 | 3,01 | 3,56 | 2,95 | 2,72 | 2,51 | 3,70 | 3,39 | | a | 2,33 | 3,01 | 3,56 | 2,95 | 2,72 | 2,51 | 3,70 | 3,39 |
| ácido octanoico | queso, ácido | 0,21 | 0,09 | 0,60 | 0,28 | 0,28 | 0,32 | 0,26 | 0,43 | 0,5 | a | 0,42 | 0,19 | 1,20 | 0,55 | 0,56 | 0,63 | 0,52 | 0,85 | | a | 0,42 | 0,19 | 1,20 | 0,55 | 0,56 | 0,63 | 0,52 | 0,85 |

| | | CONCENTRACIÓN (ppb) | | | | | | | | | | OAV | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|--------------------------|---------------------|--------|--------|--------|--------|-----------|------------|--------|--------|------|-----------|--------|--------|--------|--------|-----------|------------|--------|--------|------|-------|--------|--------|--------|--------|------------|--------|--------|
| | | Umbral de | | | | | Umbral de | | | | | Umbral de | | | | | Umbral de | | | | | | | | | | | | |
| | | olfacción | | | | | olfacción | | | | | olfacción | | | | | olfacción | | | | | | | | | | | | |
| | | (ppb) | | | | | (ppb) | | | | | (ppb) | | | | | (ppb) | | | | | | | | | | | | |
| | | CLI87 | CLI271 | CLI275 | CLI542 | CLI706 | CLI706 | CLI706+542 | CLI277 | CLI748 | Ref. | CLI87 | CLI271 | CLI275 | CLI542 | CLI706 | CLI706 | CLI706+542 | CLI277 | CLI748 | Ref. | CLI87 | CLI271 | CLI275 | CLI542 | CLI706 | CLI706+542 | CLI277 | CLI748 |
| 2-metilpropanal | malta | 80,39 | 98,34 | 102,93 | 122,49 | 142,60 | 115,09 | 165,34 | 145,36 | 6 | c | 13,40 | 16,39 | 17,15 | 20,42 | 23,77 | 19,18 | 27,56 | 24,23 | | c | 13,40 | 16,39 | 17,15 | 20,42 | 23,77 | 19,18 | 27,56 | 24,23 |
| 2-metilbutanal | frutal, malta | 17,02 | 25,68 | 34,17 | 38,80 | 36,62 | 24,84 | 49,89 | 42,84 | 16 | c | 1,06 | 1,61 | 2,14 | 2,43 | 2,29 | 1,55 | 3,12 | 2,68 | | c | 1,06 | 1,61 | 2,14 | 2,43 | 2,29 | 1,55 | 3,12 | 2,68 |
| 3-metilbutanal | frutal, malta | 60,47 | 108,73 | 121,58 | 132,19 | 141,49 | 100,90 | 200,31 | 164,59 | 4,6 | c | 13,15 | 23,64 | 26,43 | 28,74 | 30,76 | 21,93 | 43,54 | 35,78 | | c | 13,15 | 23,64 | 26,43 | 28,74 | 30,76 | 21,93 | 43,54 | 35,78 |
| metional | verduras cocidas, granja | 6,40 | 1,72 | 10,38 | 3,58 | 4,00 | 1,32 | 4,93 | 8,98 | 0,5 | d | 12,81 | 3,43 | 20,76 | 7,15 | 7,99 | 2,65 | 9,86 | 17,95 | | d | 12,81 | 3,43 | 20,76 | 7,15 | 7,99 | 2,65 | 9,86 | 17,95 |
| fenilacetaldehído | miel, floral | 10,40 | 6,64 | 17,13 | 13,82 | 9,46 | 17,53 | 10,92 | 24,33 | 1 | c | 10,40 | 6,64 | 17,13 | 13,82 | 9,46 | 17,53 | 10,92 | 24,33 | | c | 10,40 | 6,64 | 17,13 | 13,82 | 9,46 | 17,53 | 10,92 | 24,33 |

a: Ferreira et al., 2000; b: Guth, 1997; c: Culleré et al., 2007 y d: Escudero et al., 2000a.

5.2.5 CONCLUSIONES

Conclusiones de las microvinificaciones en mosto artificial:

Se obtuvieron resultados satisfactorios respecto a la calidad enológica de las cepas de estudio, así como respecto a los principales parámetros de estudio (concentración de aminoácidos precursores de aromas de oxidación metionina y fenilalanina y contenido en SO₂) en las microvinificaciones en mosto artificial. Ambos parámetros condujeron a la selección de cinco cepas de levaduras consideradas como “óptimas” y otras dos levaduras fueron seleccionadas como “no óptimas” de entre las 21 ensayadas.

Conclusiones de las microvinificaciones en mosto natural:

A. Influencia de la cepa de levadura en el contenido en aminoácidos y compuestos volátiles

Se ha podido verificar la premisa de partida de este capítulo de la presente tesis en la que se quería comprobar y verificar cómo el metabolismo de las levaduras influía en los niveles residuales de aminoácidos y en la composición volátil de los mostos fermentados por ellas y la existencia de una intercorrelación entre los niveles de aminoácidos y compuestos volátiles.

Tras los ensayos realizados en mosto natural, entre las cinco cepas preseleccionadas como óptimas, se observaron dos cepas con mejores propiedades, en cuanto a la reducción de metionina y fenilalanina (CLI 271 y CLI 87).

Desde un punto de vista cuantitativo, la familia de los alcoholes fue la predominante en todas las fermentaciones; obteniendo una concentración particularmente más en las muestras correspondientes a las fermentaciones con las cepas CLI 275, CLI 277 y CLI 748. Respecto a las otras familias químicas los resultados fueron más homogéneos; exceptuando la cepa CLI 542 que obtuvo valores significativamente más altos de ésteres y de cetonas.

B. Estudio de evolución:

Las muestras más evolucionadas presentaron respecto al inicio de la evolución, una bajada de alcoholes y ácidos, particularmente metionol, β-feniletanol y los ácidos

hexanoico y octanoico; una bajada ésteres con aromas frescos y frutales, tales como el octanoato de etilo, hexanoato de etilo y acetato de hexilo y un aumento muy marcado del lactato de etilo y el succinato de dietilo, y un aumento significativo de las familias de cetonas y aldehídos, especialmente en la cepa CLI 542 y sobretodo en las cepas CLI 277 y CLI 748 (seleccionadas como “no óptimas”). Los aldehídos 2-metilpropanal, 3-metilbutanal (aromas amílicos) y fenilacetaldehído (aroma a miel), mostraron valores de OAV particularmente altos en todas las muestras evolucionadas. Estos tres últimos compuestos han sido ampliamente relacionados con la oxidación de los vinos en la literatura.

Los resultados mostraron que las muestras más evolucionadas (t3) presentaban concentraciones mayores de compuestos tales como furfural, acetoína, lactato de etilo, succinato de dietilo, γ -butirolactona y 1-propanol y las muestras menos evolucionadas (t0) presentan los valores más bajos para estos compuestos y por el contrario destacaron en los compuestos con aromas frescos y agradables, tales como isovalerato de etilo, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, octanoato de etilo y β -feniletanol. Asimismo, dentro del mismo nivel de evolución t3, las muestras se agruparon conforme a sus valores de volátiles, siendo muy semejantes las cepas CLI 277 y CLI 748 (cepas “no óptimas”) debido a sus altas concentraciones de acetoína, succinato de dietilo, 1-propanol y sobretodo de los compuestos aldehídicos examinados y las cepas CLI 87 y CLI 271 (cepas “óptimas” con los menores valores de metionina, fenilalanina y leucina), las cuales fueron también muy semejantes en lo que se refiere a su composición química, destacaron por tener los valores más bajos de los compuestos mencionados.

Hubo tres descriptores sensoriales relacionados con la oxidación que puntuaron más alto en los vinos al final del periodo de evolución y que mejor definieron el “aroma a evolución” en los presentes vinos blancos objeto de estudio: “fruta muy madura – fruta pasa – uva pasa”, “coñac - brandy - vino jerez - vino oloroso - quina” y “vino viejo, vino añejo – vino evolucionado – vino pasado”. Igualmente, se pueden diferenciar un claro perfil para todos los vinos, con la excepción de vino proveniente de la cepa CLI 748, La peculiaridad de los vinos elaborados por la cepa CLI 748, se debió a que mostraron puntuaciones bajas en los descriptores “coñac - brandy - vino jerez - vino oloroso - quina” y “vino viejo, vino añejo – vino evolucionado – vino pasado” y en

cambio, destacaron mostrando los valores más altos de otros compuestos de oxidación con respecto al resto de vinos. Dichos descriptores fueron: “miel – melaza”, “heno – hierba seca – paja” y “patata cocida – verdura cocida”.

Se ha podido demostrar que existe una significativa correlación positiva entre los niveles residuales del aminoácido metionina con los aldehídos 3-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal. Estos compuestos se encontraron en concentraciones más altas en los vinos elaborados con las cepas CLI 277 y CLI 748; la cepa CLI 277 presento a su vez los valores más altos de los descriptores “coñac - brandy - vino jerez - vino oloroso - quina” y “vino viejo, vino añejo – vino evolucionado – vino pasado”; aromas característicos de este tipo de aldehídos. No se encontró una correlación significativa, tal como se hubiese esperado, entre el aminoácido metionina y el metional. Se ha podido correlacionar significativamente el descriptor “miel – melaza” con los valores del aminoácido fenilalanina y del aldehído fenilacetaldehído.

5.2.6 REFERENCIAS

- Ancín-Azpilicueta, C., González-Marco, A. & Jiménez-Moreno, N. (2009). Evolution of esters in aged Chardonnay wines obtained with different vinification methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 2446–2451.
- Aznar, M., López, R., Cacho, J. & Ferreira, V. (2003). Prediction of aged red wine aroma properties from aroma chemical composition. Partial least squares regression models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2700-2707.
- Balboa-Lagunero, T., Arroyo, T., Cabellos, J.M. & Aznar, M. (2011). Sensory and olfactometric profiles of red wines after natural and forced oxidation processes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62, 527-535.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. & Yarrow, D. (1990), Yeast. Characteristics and Identification, second edition. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Barrajón, N., Capece, A., Arévalo-Villena, M., Briones, A. & Romano, P. (2011). Co-inoculation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains and influence on volatile composition of wines. *Food Microbiology*, 28, 1080-1086.

- Barrajón-Simancas, N., Giese, E., Arévalo-Villena, Úbeda, J. M., Briones, A. (2011). Amino acid uptake by wild and commercial yeasts in single fermentations and co-fermentations. *Food Chemistry*, 127, 441-446.
- Bely, L., Sablayrolles, J. & Barre, P. (1990). Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 319-324.
- Bueno, M., Culleré, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2010). Chemical and sensory characterization of oxidative behavior in different wines. *Food Research International*, 43, 1423–1428.
- Callejón, R.M., Clavijo, A., Ortigueira, P., Troncoso, A.M., Paneque, P. & Morales, M.L. (2010). Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Analytica Chimica Acta*, 660, 68-75.
- Carrascosa, A.V., Muñoz, R. & González, R. (2005). *Microbiología del vino*. (pp. 19-56).Madrid: AMV Ed.
- Castellucci F. (2010). Método de determinación de los compuestos α -dicarbonílicos del vino por HPLC tras derivatización con 1,2-diaminobenceno. Resolución OIV/OENO 386A/2010.
- Chaves, M., Zea, L., Moyano, L. & Medina, M. (2007). Changes in color and odorant compounds during oxidative aging of Pedro Ximenez sweet wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3592-3598.
- Cheraiti, N., Guezenec, S. & Salmon, J.M. (2005). Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 255-260.
- Culleré, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2007). An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 876-881.
- De Revel, G., Mendes Moreira, C., Hogg, T. & Barros, P. (1996). Caractérisation de la fraction volatile lors du vieillissement du vin de Porto. In: Aline

Lonvaud-Funel. *Oenologie 95: 5ème Symposium International d' Oenologie*. (Pp. 419-423). Paris, France: Lavoisier.

- Deteil, D. (2003). Enological yeast effect on the SO₂ content and management in wines. In *Beverages, Fermentation and Health*. San Francisco: Lallemand, (chapter 4).
- El Haloui, N, Picque, D. & Corrieu, G. (1988). Alcoholic fermentation in wine-making: on line measurement of density and carbon dioxide evolution. *Journal of Food Engineering*, 8, 17-30.
- Escudero, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J. & Ferreira, V. (2000a). Clues about the Role of Methional as Character Impact Odorant of some Oxidized Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4268-4272.
- Escudero, A., Cacho, J. & Ferreira, V. (2000b). Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study. *European Food Research and Technology*, 211, 105-110.
- Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J. & Ferreira V. (2002). Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry*, 77, 325-331.
- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2007). Analytical Characterization of the Aroma of five Premium Red Wines. Insights into de Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4501-4510.
- Fernández Zurbano, P., Ferreira, V., Pena, C., Escudero, A., Serrano, F., & Cacho, J. F. (1995). Prediction of oxidative browning in White wines as a function of their chemical-composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2813–2817.
- Ferreira, V., Escudero, A., Fernández, P. & Cacho, J.F. (1997). Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *European Food Research & Technology*, 205, 392-396.
- Ferreira, V., Escudero, A., López, R. & Cacho, J. (1998). Analytical characterization of the flavor of oxygen-spoiled wines through the Gas-

Chromatography-Ion-Trap Mass Spectrometry of ultratrace odorants: Optimization of conditions. *Journal of Chromatographic Science*, 36, 331-339.

- Ferreira, V., Lopez, R. & Cacho, J. F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1659–1667.
- Flanzy, C. (2000). Aromas. In *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. (pp. 137-176). Madrid: AMV and Mundi Prensa Ed.
- Francioli, S., Torrens, J., Riu-Aumatell, M., López-Tamames, E. & Buxaderas S. (2003). Volatile compounds by SPME-GC as age markers of sparkling wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 158–162.
- Gil, M., Cabellos, J.M., Arroyo, T. & Prodanov, M. (2006). Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (Spain). *Analytica Chimica Acta*, 563, 145-153.
- Gómez-Miguez, M.J., Cacho, J.F., Ferreira, V., Vicario, I.M. & Heredia, F.J. (2007). Volatile component of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100, 1464-1473.
- Guth, H. (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3027–3032.
- 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, 2259–2266.
- Hernández-Orte, P., Guitart, A. & Cacho, J. (1999). Changes in the concentration of amino acids during the ripening of *Vitis vinifera* Tempranillo variety from the Denomination d’Origine Somontano (Spain). *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 144-154.
- Hernández-Orte, P., Cacho, J. & Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with

model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2891-2899.

- Hernández-Orte, P., Ibarz, M.J., Cacho, J. & Ferreira, V. (2003). Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method for amino acid analysis. *Chromatographia*, 58, 29-35.
- Hofmann, T. & Schieberle, P. (2000). Formation of Aroma-Active Strecker-Aldehydes by a Direct Oxidative Degradation of Amadori Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4301-4305.
- Hofmann, T., Münch, P. & Schieberle, P. (2000). Quantitative model studies on the formation of aroma-active aldehydes and acids by Strecker reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 434-440.
- Howell, K.S., Cozzolino, D., Bartowsky, E., Fleet, G.H. & Henschke, P.A., (2006). Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. *FEMS Yeast Research*, 6, 91-101.
- Kreger - Van Rij, N.J.W (1984). The yeast, a taxonomic study. Elsevier Science Publisher B. V, Amsterdam.
- Large, P.J. (1986). Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast*, 2, 1-34. In: Valero, E., Millán, C., Ortega, J.M. & Mauricio, J.C. (2003). Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 830-835.
- Ledl, F. & Schleicher, E. (1990). New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 29, 565–594.
- López, R., Aznar, M., Cacho, J. & Ferreira, V. (2002). Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 966, 167-177.

- Louw, L., Tredoux, A.G.J., Van Rensburg, P., Kidd, M., Naes T. & Nieuwoudt, H.H. (2010). Fermentation-derived Aroma Compounds in Varietal Young Wines from South Africa. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 31, 213-225.
- Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Polo, M.C. & Martín-Álvarez, P.J. (1998). Changes in the Amino Acid Composition of the Different Nitrogenous Fractions during the Aging of Wine with Yeasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4042-4051.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J.L., Wincker, P., Casaregola, S. & Dequin, S. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 16333-16338.
- Oliveira e Silva, H., Guedes de Pinho, P., Machado, B.P., Hogg, T, Marques, J.C., Câmara, J.S., Albuquerque, F. & Silva Ferreira, A.C. (2008). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11989-11996.
- Ortega, C., López, R., Cacho, J. & Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and Validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*, 923, 205-214.
- Perestrelo, R., Fernandes, A., Albuquerque, F.F., Marques, J.C. & Câmara, J.S. (2006). Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Analytica Chimica Acta* 563, 154-164.
- Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Bertrand A. & Maujean, A. (2000). Formation of Flavor Components by the Reaction of Amino Acid and Carbonyl Compounds in Mild Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3761-3766.
- Rebelein H. (1973). *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*, 2, 33-38.

- Riu-Aumatell, M., Bosch-Fusté, E., López-Tamames, E. & Buxaderas, S. (2006), Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. *Food Chemistry*, 95, 237-242.
- Romano, P. & Suzzi, G. (1993). Acetoin production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 108, 23-26.
- Romano, P. & Suzzi, G. (1996). Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 309-315.
- Sablayrolles, J. M., Barre, P. & Grenier P. (1987). Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in isothermal oenological conditions. *Biotechnology Techniques*, 1, 181-184.
- Salmon J.M. & Barre P. (1998). Improvement of Nitrogen Assimilation and Fermentation Kinetics under Enological Conditions by Derepression of Alternative Nitrogen-Assimilatory Pathways in an Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3831-3837.
- 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, 7916-7924.
- Silva Ferreira, A. C., & Bertrand, A. (1996). Evolution de quelques constituants du vin de Porto au cours du vieillissement. Etude particulière des composés carbonylés. *OEnologie 95*, 5ème Symposium International d'OEnologie (pp. 520–523). Paris, France: Lavoisier.
- Silva Ferreira, A.C., Guedes de Pinho, P., Rodrigues, P. & Hogg, T. (2002). Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5919-5924.
- Silva Ferreira, A., Oliveira, C., Hogg, T. & Guedes de Pinho, P. (2003a). Relationship between potentiometric measurements, sensorial analysis and some substances responsible for aroma degradation of white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4668-4672.

- Silva Ferreira, A., Hogg, T. & Guedes de Pinho, P. (2003b). Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1377-1381.
- Singleton, V.L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 69-77.
- Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Tsarchopoulos, C. & Biliaderis, C.G. (2003). Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chemistry*, 80, 261-273.
- Suárez Lepe, J.A. (1997). Levaduras Vínicas. Funcionalidad y uso en bodega. (pp. 99-100). Madrid: Mundi-Prensa Eds.
- Suárez Lepe, J.A. & Leal B.I. (2003). *Microbiología enológica: Fundamentos de vinificación*. (p. 282). 3rd Ed. Madrid: Mundi-Prensa.
- Torrens, J., Urpi, P., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., López-Tamames, E. & Buxaderas, S. (2008). Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine, *International Journal of Food Microbiology*, 124, 48–57.
- Ugliano, M., Bartowsky, E.J., McCarthy, J., Moio, L. & Henschke, P.A. (2006). Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6322-6331.
- Usseglio-Tomasset, L. (1998). *Química Enológica*. Mundi-Prensa Eds. Madrid. Spain. pp. 190-198.
- Valero, E., Millán, C., Ortega, J.M. & Mauricio, J.C. (2003). Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 830-835.
- Vaudano, E. & García-Moruno, E., (2008). Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology*, 25, 56-64.

- Vaughan-Martini, A & Martini, A. (1998). Determination of ethanol production. In *The Yeast, a taxonomy study*. Kurtzman, C.P. & Fell, J.W., Eds. (p. 107). Amsterdam: Elsevier.
- Vilanova, M. & Sieiro, C. (2006). Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeast to fermentative flavour compounds in wines from cv. Albariño. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 929-933.
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I.S. & Henschke, P.A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 145-157.
- Wondra, M. & Boveric, M. (2001). Analyses of aroma components of Chardonnay wine fermented by different yeast strains, *Food Technology and Biotechnology*, 39, 141-148.
- Zironi R. (1999). Vinificare secondo natura: il disciplinare di vinificazione AIAB Vignevini, 10, 48-50.

CAPÍTULO 6

FERMENTACIONES A ESCALA DE BODEGA PILOTO CON LEVADURAS SELECCIONADAS DE LA D.O. "VINOS DE MADRID"

6. FERMENTACIONES FERMENTACIONES A ESCALA DE BODEGA PILOTO CON LEVADURAS SELECCIONADAS DE LA D.O. "VINOS DE MADRID"

6.1 RESUMEN

Tras un amplio estudio químico y sensorial llevado a cabo con cepas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas de la D.O. “Vinos de Madrid”, se pudieron considerar dos cepas (CLI 271 y CLI 87) como óptimas, en cuanto a la reducción de aminoácidos precursores de aromas negativos: metionina y fenilalanina y a la menor oxidación de los vinos producidos por ellas. Los resultados fueron contrastados mediante el análisis de su composición aromática, especialmente de aldehídos y de descriptores sensoriales específicos de oxidación. Estas dos cepas fueron ensayadas de manera individual y en forma de coinóculo, junto con una cepa comercial de levadura seca activa, a escala de bodega piloto con la obtención de interesantes resultados, aplicables en la elaboración de vinos bajo las restricciones establecidas para los vinos ecológicos. Mediante el empleo de la cepa CLI 271 y de su coinóculo con la cepa CLI 87, se obtuvieron vinos sin notas de oxidación desde un punto de vista aromático y de calidad enológica; obteniéndose a su vez, un grado de imposición tras la fermentación alcohólica y unas características olfato-gustativas superiores a los obtenidos por la cepa comercial.

6.2 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el consumo de productos ecológicos ha ido aumentando de manera progresiva. En lo concerniente al vino orgánico o ecológico, su elaboración se lleva a cabo a partir de uvas cultivadas sin el uso de fertilizantes químicos, insecticidas y otros productos sintéticos para el control de plagas. Evitar su uso va a suponer la ausencia de cualquier residuo químico en el vino (Zafrilla et al., 2009). Pero estos vinos son más sensibles a las degradaciones oxidativas debido a las restricciones establecidas en su elaboración, estabilización y conservación. En estas condiciones, se ven

favorecidos la formación de aromas de “evolución-oxidación”, la pérdida de aromas frescos y florales y el aumento y aparición de compuestos aromáticos, sobretodo aldehídos y cetonas; lo cual lleva a la disminución de su calidad organoléptica final. Por tanto, entre las medidas para favorecer el mercado de los vinos ecológicos, está la búsqueda de levaduras que expresen propiedades de interés biotecnológico; siendo el objetivo principal de este estudio la utilización de cepas de levaduras previamente seleccionadas por su metabolismo capaz de minimizar el contenido de aminoácidos precursores de aromas negativos.

El uso de microvinificaciones a escala de laboratorio ayuda en la realización de preselecciones de microorganismos y de ensayo de condiciones adecuadas de fermentación; pero es necesario su aplicación a una escala de bodega piloto; donde los volúmenes y las condiciones ambientales son más parecidas a las de una bodega comercial. Este paso es decisivo y fundamental para garantizar los resultados previamente obtenidos en el laboratorio. Por tanto, es objetivo fundamental del presente estudio, el ensayo de las levaduras preseleccionadas como óptimas para la elaboración de vinos con una menor tendencia a la oxidación, a nivel de bodega piloto. Las vinificaciones se realizaron en mosto de uva blanca en la bodega experimental de “El Encín”.

6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

LEVADURAS

Se emplearon las dos cepas CLI 87 y CLI 271, seleccionadas tras los experimentos realizados en mosto natural (Capítulo 5) debido a su metabolismo de aminoácidos, producción de compuestos volátiles y propiedades sensoriales. Además se probó una levadura seca activa comercial (LSA) utilizada con anterioridad en la bodega experimental de “El Encín” debido a sus adecuadas condiciones de implantación, fermentación y elaboración de vinos de óptima calidad enológica. Esta fue la levadura “Vario” *Saccharomyces cerevisiae* (var. bayanus) de la casa comercial Maurivin, Agrovin (Ciudad Real, España).

PROCESO DE VINIFICACIÓN

El mosto de partida se obtuvo a partir de uvas blancas de tres variedades procedentes de la finca El Encín, Alcalá de Henares, Madrid. Se mezclaron los mostos resultantes del prensado de 352 Kg de uvas de la variedad *Viura*, 202 Kg de la variedad *Verdejo* y 796 Kg de la variedad *Alarije* (Figura 1), disponibles en cantidad suficiente para la realización de los ensayos.



Figura 1. Variedades de uva blanca *Viura*, *Verdejo* y *Alarije* (de izquierda a derecha).

Las uvas fueron estrujadas y prensadas en una primera jornada y la mezcla del mosto obtenido fue dividido en dos depósitos de 500 L a los que se añadió 50 mg/L de SO_2 y 1 g/HL de enzimas pectolíticas *Enozym ALTAIR* de Agrovin antes de dejarlos desfangando en una cámara a 12°C durante la noche (Figura 2). Al día siguiente se juntó el mosto de los dos depósitos en un depósito de 1500 L para obtener un mosto de partida homogéneo y se tomó una muestra para determinar el grado alcohólico probable, pH y acidez total (ver el subapartado “Análisis enológicos generales”, dentro del apartado “Selección de levaduras en mosto natural” de la sección 5.2.3 Materiales y Métodos del capítulo 5-Parte II). A partir del valor del grado Brix se pudo calcular el grado alcohólico probable y comprobar la adecuación del nivel de azúcares de partida para la fermentación. Conocida la acidez total se realizaron sucesivas correcciones mediante ácido tartárico hasta obtener un nivel de acidez adecuado para el ensayo. Los valores del mosto corregido y que se utilizó para el desarrollo de la fermentación fueron los siguientes: 22,1 °Brix (12,8 grado alcohólico probable), 3,20 pH y 6,37 g/L ácido tartárico.



Figura 2. Procesamiento de las uvas y obtención del mosto en la bodega experimental de “El Encín”

El mosto fue dividido en siete depósitos de 100 L de capacidad y se ajustó la temperatura a 16°C (Figura 3). Esta fue la temperatura a la que se desarrolló el proceso fermentativo. En dos de los depósitos se inoculó un pie de cuba de la cepa de levadura CLI 87 iniciado 48 horas antes en mosto estéril de uva blanca a 24°C, al que se fue adicionando mosto progresivamente hasta conseguir la cantidad necesaria de pie de cuba que asegurará una densidad celular $> 10^6$ ufc/mL. La temperatura del precultivo fue a su vez disminuida progresivamente antes de ser inoculada para que las levaduras no sufrieran un choque térmico. De manera paralela se realizó el mismo proceso para el ensayo de fermentación con la cepa CLI 271. Además se realizó una fermentación mixta, denominada “CLI 87+271” mediante la inoculación de las dos cepas al 50% cada una en un depósito. Los dos depósitos restantes de mosto fueron inoculados con la

levadura seca activa comercial modelo “Vario” a razón de una concentración final de 30 g/HL. Este inóculo también fue atemperado antes de su incorporación en los depósitos de mosto según las instrucciones de uso dadas por el fabricante. A la fermentación con esta levadura se la designó con el nombre de “LSA”. Se tomó una muestra de cada depósito después de la siembra de las levaduras y se incubaron placas de medio YPD sólido inoculadas con 10mL diluciones seriada de cada muestra. En todas las muestras tomadas había un crecimiento >300 colonias para las placas correspondientes a la dilución 10^{-6} , lo que indica que las densidades celulares fueron $>300 \times 10^7$ ufc/mL en todos los depósitos.



Figura 3. Depósitos de agua en baño a la temperatura controlada de 16°C.

Se tomó una medida inicial de la densidad o masa volúmica del mosto con un densímetro (Figura 4), obteniéndose una densidad de 1,095 g/mL a 20°C. De esta forma se siguió la fermentación mediante la medida de la densidad y la temperatura de las muestras tomadas a diario de cada depósito (ver Tabla 5.1 del Anexo 5). Al llegar aproximadamente a una densidad de 1,030 g/mL se añadió a cada depósito 25 g de activador de fermentación complejo “Actimax plus+” de la casa comercial Agrovín (Ciudad Real, España). La fermentación alcohólica se consideró como terminada

cuando la densidad de las muestras tomadas de cada depósito llegó a valores de entre 0,9880-0,9930 g/mL a 20°C (valores habituales para vinos blancos secos) y se comprobó mediante el análisis de azúcares reductores. Se tomaron muestras a este tiempo para diferentes análisis químicos y los vinos se trasegaron a otros depósitos que fueron sellados y conservados en una cámara fría, dejándolos decantar para limpiarlos por gravedad. Pasados dos meses los vinos se embotellaron y se procedió a su análisis sensorial. Tanto al terminar la fermentación alcohólica, como antes de proceder al embotellado se añadió anhídrido sulfuroso a los vinos a razón de 20 mg/L.

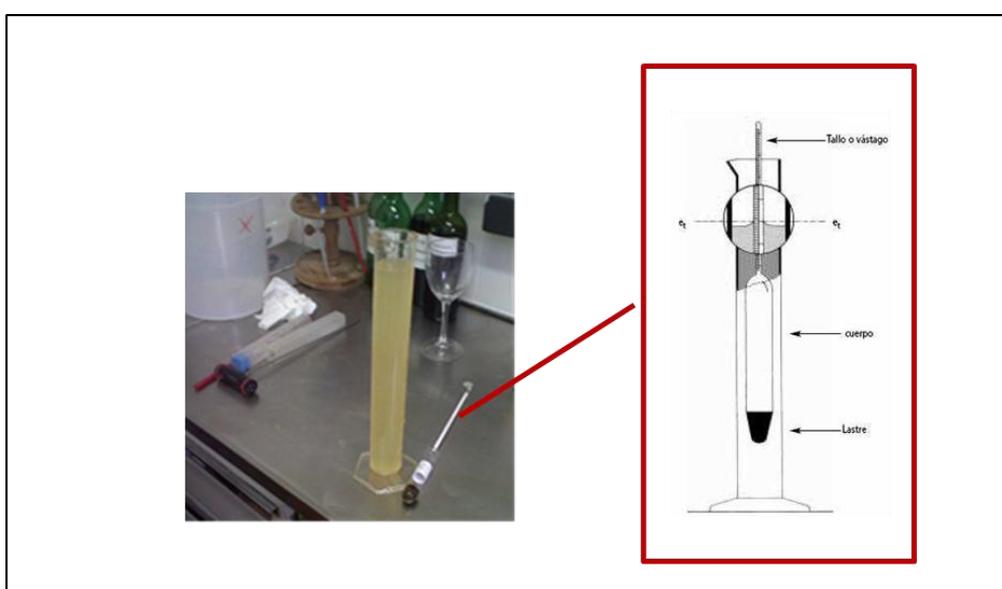


Figura 4. Medida de la densidad del mosto

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA MICROBIOTA DEL MOSTO Y ESTUDIO DEL PORCENTAJE DE IMPLANTACIÓN DE LAS CEPAS DE LEVADURA INOCULADAS EN CADA DEPÓSITO

Se realizó un análisis de la microbiota inicial del mosto de partida. Para ello se tomó una muestra y se hicieron siembras de diluciones seriadas (ver subapartado “Análisis del porcentaje de implantación de cada cepa para los coinóculos”, dentro del apartado “Selección de levaduras en mosto natural” de la sección 5.2.3 de Materiales y Métodos del capítulo 5, página 150).

A mitad y a final de la fermentación alcohólica, se tomaron muestras de los siete depósitos. Se realizaron diluciones en serie y se incubaron placas con medio sólido YPD (extracto de levadura 1%, peptona 1%, glucosa 2% y agar 2%) de las diferentes diluciones. En las placas correspondientes a las muestras de mitad de fermentación, se contabilizaron más de 500×10^8 ufc/ml y se observaron hasta 4 tipos de colonias morfológicamente diferentes. Se realizó el test de lisina a 30 colonias de levaduras tomadas al azar para cada depósito (sólo se tomaron en cuenta las colonias de morfología típicamente de levaduras vínicas: forma redondeada, regular y de color blanquecino y confirmadas mediante observación por microscopio óptico). En las placas del test de lisina se utilizaron un control positivo de una levadura comercial del género *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*) y un control negativo de una levadura no-*Saccharomyces*: *Pichia anomala*.

Una vez acabada la fermentación alcohólica, se aislaron levaduras de todos los depósitos y se observó que todas las colonias crecidas en las placas correspondían a levaduras, mostrando un solo tipo morfológico. De cada muestra de cada fermentador se realizaron nuevamente diluciones seriadas y de la placa que tenía entre 30 y 300 colonias se tomaron al azar 30 colonias. Estas 30 colonias fueron sometidas a un test de lisina y se confirmó que todas las colonias eran del género *Saccharomyces*. A su vez, se realizó un análisis de Microsatélites mediante el método publicado por Vaudano y García-Moruno (2008) para determinar el porcentaje de implantación de cada una de las cepas de levadura estudiadas en los depósitos, tanto a mitad, como al final de la fermentación alcohólica

ANÁLISIS ENOLÓGICOS GENERALES

Se evaluó el grado alcohólico probable, acidez total y pH del mosto de partida. Al terminar la fermentación alcohólica, se determinaron los siguientes parámetros: acidez total, acidez volátil, pH, azúcares reductores y grado alcohólico (ver subapartado “Análisis Enológicos generales” dentro del apartado “Selección de levaduras en mosto natural” de la sección 5.2.3 de Materiales y Métodos del capítulo 5-Parte II, página 150). Además se midieron el SO₂ libre y total y el ácido málico.

La medida del SO₂ libre y total se realizó mediante el método Ripper. Este método consiste en una valoración potenciométrica basada en una oxido-reducción con I₂ como reactivo valorante en medio ácido. Las valoraciones utilizando un electrodo de doble hilo de platino se llevaron a cabo en el titrador automático Crison modelo Compact Titrator (Crison Instruments, Barcelona).

La cuantificación del ácido málico se realizó mediante el método enzimático de medida por espectrofotometría a 340 nm. En presencia de nicotinamida-adenin-dinucleótido (NAD) el ácido L-málico (L-malato) se oxida y pasa a oxaloacetato en una reacción catalizada por la L-malato-deshidrogenasa (L-MDH). El equilibrio de la reacción se desplaza en sentido de malato y la eliminación del oxalato de la reacción desplaza el equilibrio hacia la formación de oxaloacetato. En presencia de L-glutamato el oxaloacetato se transforma en L-aspartato, que es una reacción catalizada por la glutamato-oxaloacetato-transaminasa (GOT). La formación de NADH, medida por el aumento de la absorbancia con longitud de onda de 340 nm es proporcional a la cantidad de L-malato presente.

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

Ver subapartado “Amino acids analysis” de la sección 5.1.3 de Materiales y Métodos del capítulo 5_Parte I (página121).

ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES

Se realizaron las cuantificaciones de los compuestos aromáticos mayoritarios de las muestras de los vinos antes de procederse a su embotellado mediante el procedimiento descrito en el subapartado “Volatile quantification” de la sección 5.1.3 de Materiales y Métodos del capítulo 5-Parte I (página 122). Además, se realizó un análisis de compuestos minoritarios del vino en el departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza, según el método publicado por López et al. (2002).

ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS

Se realizó una cuantificación de los compuestos aldehídicos presentes en las muestras de vino antes de su embotellado mediante el procedimiento descrito en el subapartado “Volatile quantification” de la sección 5.1.3 de Materiales y Métodos del capítulo 5-Parte I (página 122).

ANÁLISIS SENSORIAL

Para la realización del análisis sensorial se unieron las repeticiones de los vinos provenientes de cada depósito; por lo que las catas estuvieron constituidas por cuatro vinos. Un panel formado por ocho catadores expertos realizó una cata olfato-gustativa con términos descriptivos generales; en la que se pidió además una valoración edónica sobre la preferencia de cada vino. La ficha de cata empleada puede verse en la Figura 5.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron estudios de correlación de Pearson y análisis de componentes principales (PCA) utilizando los software *SPSS* v19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) y *The Unscrambler* v9.1 (Camo, Asa, Norway).

| | No perceptible | Comienza a ser perceptible. | | Débil | | Moderado | | | Fuerte | | Muy Fuerte |
|-----------------------------------|----------------|-----------------------------|---|-------|---|----------|---|---|--------|---|------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Intensidad de color | | | | | | | | | | | |
| COLOR: | | | | | | | | | | | |
| Amarillo verdoso | | | | | | | | | | | |
| Amarillo paja | | | | | | | | | | | |
| Amarillo dorado | | | | | | | | | | | |
| Vivacidad/brillo | | | | | | | | | | | |
| Intensidad aromática global | | | | | | | | | | | |
| Intensidad aroma frutal | | | | | | | | | | | |
| Intensidad aroma vegetal/herbáceo | | | | | | | | | | | |
| Intensidad aroma alcohólico | | | | | | | | | | | |
| Intensidad aromas alteración | | | | | | | | | | | |
| Intensidad aromas oxidación | | | | | | | | | | | |
| Intensidad aromas microbiológicos | | | | | | | | | | | |
| Calidad Global del aroma | | | | | | | | | | | |
| Carácter Alcohólico | | | | | | | | | | | |
| Acidez | | | | | | | | | | | |
| Afrutado | | | | | | | | | | | |
| Vegetal/ Verdor | | | | | | | | | | | |
| Amargor | | | | | | | | | | | |
| Cuerpo | | | | | | | | | | | |
| Salinidad | | | | | | | | | | | |
| Calidad global del gusto/ armonía | | | | | | | | | | | |

Figura 5. Ficha de cata empleada para descriptores olfato/gustativos generales. (Aromas Microbiológicos incluye aromas a levaduras/bacterias y ácido láctico/mantequilla/queso; Aromas de alteración incluye aromas químicos (petróleo/plástico/azufrado/goma/cartón húmedo), cuadra, ratón y ácido acético y aromas de oxidación incluyen todos los descriptores especificados en la ficha para análisis de vinos oxidados, Figura 6 del capítulo 5-Parte II).

6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal y como se ha descrito en la sección de material y métodos, se realizaron fermentaciones individuales con las dos cepas previamente seleccionadas como mejores desde el punto de vista químico y sensorial para la reducción de aromas de oxidación en vinos. Igualmente, se realizaron fermentaciones con un cultivo mixto de ambas cepas y con una cepa comercial.

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DEL MOSTO Y DE LOS DEPÓSITOS DE FERMENTACIÓN

EXAMEN DE LA MICROFLORA INICIAL DEL MOSTO:

Se realizó un análisis microbiológico de la flora inicial del mosto de partida. El recuento en placa de las diluciones seriadas condujo a un resultado de una microflora $>300 \times 10^7$ células/ml. 30 cepas tomadas al azar del mosto fueron sometidas a un test de lisina y se comprobó que la microflora constaba únicamente de levaduras no-*Saccharomyces* (ver Figura 6).

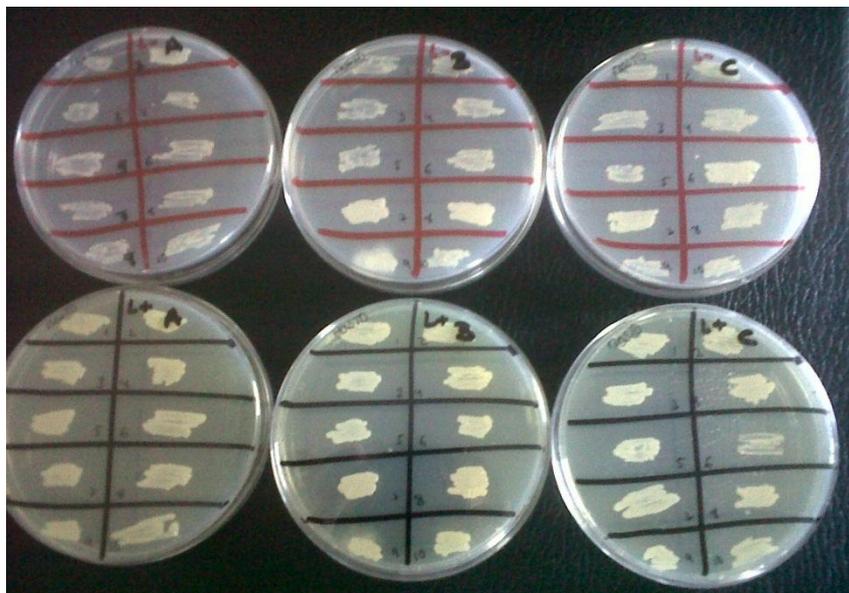


Figura 6. Test de lisina de 30 cepas aisladas del mosto inicial de partida. En la parte superior de la fotografía y rotuladas en rojo están las placas pertenecientes al test Lys- y en la parte inferior, rotuladas en negro, las placas correspondientes al test Lys+ de las mismas colonias de levadura. Se obtuvo crecimiento de todas las colonias de las placas del test de Lys+ indicando que todas eran no-*Saccharomyces*.

EXAMEN DE LA MICROFLORA A MITAD Y FINAL DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA:

Se sometió a un test de lisina, tanto a mitad como a final de la fermentación, a 30 cepas de levaduras tomadas al azar de los crecimientos en placa de YPD realizados de cada fermentador. En todos los casos, todas las cepas de levaduras aisladas fueron del género *Saccharomyces*. La Figura 7 muestra un ejemplo de las 30 colonias aisladas de uno de los depósitos. Esto muestra que tanto a mitad de la fermentación alcohólica como al final, debido a las condiciones que se van a ir desarrollando en los depósitos de fermentación (aumento de los niveles de CO₂ y etanol, principalmente), sólo microorganismos típicamente fermentativos podrán sobrevivir.

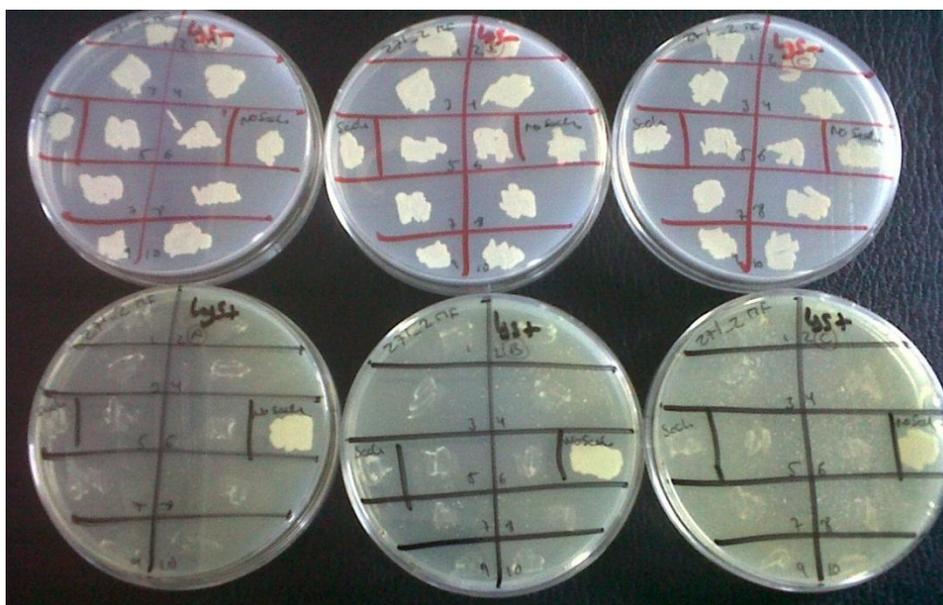


Figura 7. Test de lisina de 30 cepas aisladas un depósito de la cepa CLI 271 tomadas a mitad de la fermentación alcohólica. En la parte superior de la fotografía y rotuladas en rojo están las placas pertenecientes al test Lys- y en la parte inferior, rotuladas en negro, las placas correspondientes al test Lys+ de las mismas colonias de levadura. A la izquierda de cada placa se muestra un control positivo de levadura del género *Saccharomyces*. A la derecha el control negativo. Se observa que sólo existe crecimiento del control de levadura no-*Saccharomyces* en las placas de Lys+; lo cual indica que las 30 colonias aisladas eran del género *Saccharomyces*.

A su vez, se realizó un análisis de microsátélites a 30 muestras tomadas al azar y previamente crecidas en placa, de cada depósito a mitad de fermentación y una vez terminada la fermentación alcohólica. Las fotos de los geles obtenidos pueden observarse en la Figura 5.2 del ANEXO 5: *Parámetros para el seguimiento de las*

vinificaciones a escala bodega. Apartado 5.2 estudio de la imposición de las cepas de levadura en los depósitos).

Tras el análisis de microsatélites se pudo comprobar los porcentajes de implantación de cada cepa dentro de cada depósito. Los resultados de mitad de fermentación fueron prácticamente idénticos a los de final de fermentación. A mitad de fermentación: los depósitos correspondientes a la cepa CLI 87 tuvieron un 90% de imposición y un 83,3%, respectivamente (de un total de 60 cepas analizadas, 52 fueron confirmadas como cepas CLI 87 y 8 cepas como no-CLI 87); los depósitos correspondientes a la cepa CLI 271 tuvieron un 83,3% de implantación y un 93,3%, respectivamente; los depósitos correspondientes a la cepa comercial designada como LSA tuvieron un 83,3% de imposición en ambos casos y el depósito del coinóculo de las cepas CLI 87 y CLI 271 obtuvo un 83,3% de presencia de la cepa CLI 271, un 10% de la cepa CLI 87 y un 6,7% de cepas desconocidas. A final de fermentación: los depósitos correspondientes a la cepa CLI 87 tuvieron un 90% de imposición y un 86,7%, respectivamente (de un total de 60 cepas analizadas, 53 fueron confirmadas como cepas CLI 87 y 7 cepas como no-CLI 87); los depósitos correspondientes a la cepa CLI 271 tuvieron un 83,3% de implantación y un 93,3%, respectivamente; los depósitos correspondientes a la cepa comercial designada como LSA tuvieron un 83,3% de imposición y un 86,7% respectivamente y el depósito del coinóculo de las cepas CLI 87 y CLI 271 obtuvo un 83,3% de presencia de la cepa CLI 271, un 10% de la cepa CLI 87 y un 6,7% de cepas desconocidas.

En conclusión:

- Todas las cepas mostraron un porcentaje de implantación superior al 80% en los depósitos de fermentación individuales. Este dato indicó que hubo una clara imposición de las cepas de estudio sobre la flora inicial del mosto de partida.
- Las imposiciones de las cepas autóctonas fueron ligeramente mejores que la de la cepa comercial (88,3% de promedio de los depósitos de las cepas autóctonas, frente a un 85% de la comercial al final de la fermentación alcohólica). Este hecho puede estar relacionado con una mejor adaptación de las cepas procedentes de la región donde se elaboraron los vinos frente al uso de una cepa comercial.

- La cepa CLI 271 se impuso a la cepa CLI 87 en un cultivo mixto. Esto indica una mayor tasa de crecimiento de la cepa CLI 271 respecto a la CLI 87. Similares resultados se habían obtenido en las microfermentaciones en mosto natural, donde se observó un mayor crecimiento y viabilidad en los fermentadores correspondientes a la cepa CLI 271 respecto a los fermentadores de la cepa CLI 87. Aun así, este dato debe tomarse con cautela ya que la cepa CLI 87 posee un alto grado de floculación por lo que la toma de muestra para medir crecimiento y viabilidad no es ampliamente representativa; sobretodo al final de la fermentación, cuando la mayor parte de los cuerpos de las levaduras han floculado y formado agregados.

ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS ENOLÓGICOS GENERALES DE LOS VINOS ELABORADOS EN LA BODEGA

Todos los parámetros enológicos fueron satisfactorios y dentro de los rangos esperados. Los parámetros principales se midieron a dos tiempos determinados: al terminar la fermentación alcohólica (Tabla 1) y antes del embotellado (Tabla 2). El seguimiento de la fermentación se realizó mediante medida diaria de la densidad y temperatura de los depósitos (ver Tabla 5.1 en *ANEXO 5: Parámetros para el seguimiento de las vinificaciones a escala bodega*). La fermentación alcohólica duró aproximadamente entre 11 y 13 días para todos los depósitos; excepto para el CLI 87_2 que duró 17 días (ver Figura 5.1 en el *ANEXO 5*). En todos los depósitos se terminó correctamente la fermentación sin haber problemas de paradas y dejando valores de azúcares residuales en todos los casos ≤ 4 g/L, límite establecido para vinos tranquilos secos (Reglamento CEE 997/81); excepto para los depósitos de la cepa CLI 87. Estas fermentaciones tuvieron un arranque de fermentación muy rápido, al igual que la cepa CLI 271, pero a pesar de llegar a unos valores de densidad finales de 0,992 g/mL, lo cual indicaba que la fermentación había llegado a término, aún quedó una cantidad residual de azúcares en el vino. A pesar de este resultado, se comprobó que el resto de los parámetros enológicos, tanto para la cepa CLI 87 como para el resto de las levaduras, estaban dentro de los límites legales establecidos para vinos blancos tranquilos por la reglamentación europea aplicable: Acidez total $\geq 4,5$ g/L (CEE

557/94), acidez volátil $\leq 1,08$ (CE 1493/99), pH 2,8 - 3,4, grado alcohólico ≥ 9 - <15 (CEE 2676/90) y niveles de SO₂ total ≤ 210 mg/L (CE 1493/99).

Tabla 1. Parámetros enológicos medidos recién terminada la fermentación alcohólica de los vinos experimentales elaborados en la bodega.

| Depósito | Densidad (g/L a 20°C) | SO ₂ libre (ppm) | SO ₂ total (ppm) | Azúcares reductores (g/L) | Grado alcohólico (% vol) | Acidez total (g/L ácido tartárico) | pH | Acidez volátil (g/L ácido acético) |
|------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------------|------|------------------------------------|
| CLI 87_1 | 992 | 12 | 36 | 7,70 | 12,7 | 5,72 | 3,06 | 0,50 |
| CLI 87_2 | 991 | 7 | 37 | 7,82 | 12,7 | 5,58 | 3,10 | 0,57 |
| CLI 271_1 | 988 | 18 | 20 | 1,29 | 13,3 | 5,47 | 3,15 | 0,46 |
| CLI 271_2 | 991 | 10 | 25 | 4,02 | 13,0 | 5,59 | 3,13 | 0,54 |
| CLI 87+271 | 990 | 12 | 22 | 2,44 | 13,4 | 5,63 | 3,09 | 0,60 |
| LSA_1 | 990 | 15 | 64 | 1,78 | 12,7 | 6,51 | 3,03 | 0,64 |
| LSA_2 | 991 | 15 | 46 | 1,92 | 12,9 | 6,31 | 3,03 | 0,60 |

Tabla 2. Parámetros enológicos medidos antes del embotellado de los vinos experimentales elaborados en la bodega.

| Depósito | Grado alcohólico (% vol) | Acidez total (g/L de ácido tartárico) | pH | Acidez volátil (g/L ácido acético) | Ácido málico (g/L) |
|------------|--------------------------|---------------------------------------|------|------------------------------------|--------------------|
| CLI 87_1 | 12,7 | 5,26 | 3,22 | 0,38 | 1,80 |
| CLI 87_2 | 12,9 | 5,15 | 3,24 | 0,40 | 1,80 |
| CLI 271_1 | 13,5 | 5,26 | 3,29 | 0,38 | 1,60 |
| CLI 271_2 | 13,4 | 5,34 | 3,32 | 0,39 | 1,80 |
| CLI 87+271 | 13,4 | 5,38 | 3,29 | 0,42 | 1,70 |
| LSA_1 | 13,1 | 6,18 | 3,36 | 0,41 | 2,10 |
| LSA_2 | 13,1 | 6,10 | 3,31 | 0,54 | 1,80 |

Es preciso resaltar que la cepa CLI 87, al igual que a nivel de microfermentaciones en laboratorio, a escala de bodega también mostró unas destacadas propiedades floculantes. La floculación es un proceso de agregación reversible y espontánea de las células de levadura formando grupos que se separan fácilmente del medio (Calleja, 1987), lo cual es muy útil en la elaboración del vino, sobre todo en la última etapa de la fermentación (Shinohara et al, 1996.); ayudando en general en los procesos de limpieza y filtración. Es difícil aislar levaduras floculantes de vinos y mostos; por lo tanto, la obtención de una cepa de levadura salvaje que no sólo podría ser seleccionada para la producción de vino ecológico, sino también para la producción de vino espumoso, en el que las operaciones de degüelle y removido son críticos, podría ser bastante valioso y de gran utilidad.

ESTUDIO DEL CONTENIDO EN AMINOÁCIDOS Y COMPOSICIÓN AROMÁTICA

Se realizó un análisis de aminoácidos y de los compuestos volátiles principales, minoritarios, traza y aldehídicos de los vinos elaborados en la bodega experimental. La Tabla 3 muestra las concentraciones de aminoácidos residuales obtenidas al terminar la fermentación alcohólica por cada cepa de estudio. Se pudo observar que el consumo general de aminoácidos fue bastante marcado y parecido en todos los depósitos (>90% de consumo total sin contar con los valores de prolina); exceptuando el depósito CLI 271_2 donde el consumo fue del 88,7%.

Tabla 3: Concentraciones en ppm de aminoácidos iniciales del mosto de partida y residuales tras la fermentación alcohólica en cada depósito de cada cepa de levadura estudiada.

| | Mosto | CLI 87_1 | CLI 87_2 | CLI 271_1 | CLI 271_2 | CLI 87+271 | LSA_1 | LSA_2 |
|-------------|--------|----------|----------|-----------|-----------|------------|--------|--------|
| Asp | 53,32 | 0,40 | 0,66 | 0,76 | 1,09 | 0,53 | 0,32 | 0,27 |
| Asn | 6,69 | 3,09 | 3,93 | 2,72 | 4,83 | 4,48 | 3,99 | 3,23 |
| Ser | 41,24 | 0,82 | 1,17 | 1,65 | 2,05 | 1,02 | 0,77 | 0,61 |
| Glu | 64,57 | 2,09 | 3,86 | 4,81 | 6,35 | 2,89 | 1,81 | 1,64 |
| His | 24,43 | <0,08 | <0,08 | <0,08 | <0,08 | <0,08 | <0,08 | <0,08 |
| Gly | 83,39 | <0,04 | <0,04 | <0,04 | <0,04 | <0,04 | <0,04 | <0,04 |
| Arg | 469,98 | 5,27 | 5,45 | 6,84 | 8,19 | 6,95 | 6,31 | 6,68 |
| Thr | 117,11 | <0,10 | <0,10 | 0,10 | 0,24 | <0,10 | 0,52 | 0,54 |
| Ala | 80,69 | 14,54 | 7,86 | 5,04 | 19,47 | 7,17 | 1,48 | 1,56 |
| Pro | 441,14 | 509,88 | 441,31 | 550,49 | 483,73 | 552,66 | 448,52 | 465,50 |
| GABA | 62,48 | 34,66 | 63,45 | 32,49 | 57,49 | 56,15 | 35,12 | 49,56 |
| Tyr | 19,55 | 0,54 | 3,36 | 2,62 | 6,39 | 2,89 | 0,93 | 0,14 |
| Val | 24,84 | 0,25 | 0,47 | 0,84 | 1,22 | 0,32 | 0,21 | 0,20 |
| Met | 6,83 | 3,59 | 3,22 | 3,25 | 3,05 | 3,20 | 5,21 | 4,48 |
| Orn | 4,40 | 5,79 | 11,57 | 7,79 | 9,41 | 8,03 | 0,71 | 5,21 |
| Lys | 3,98 | 0,55 | 0,63 | 1,30 | 1,27 | 0,36 | 0,88 | 0,76 |
| Ile | 16,52 | 0,47 | 0,92 | 0,70 | 0,85 | 0,45 | 0,25 | 0,22 |
| Leu | 22,47 | 0,39 | 0,95 | 1,72 | 2,27 | 0,51 | 0,78 | 0,68 |
| Phe | 26,71 | 0,52 | 0,76 | 1,58 | 3,12 | 0,62 | 0,60 | 0,60 |

Aunque los estudios de implantación mostraron la imposición de la cepa CLI 271 frente a la CLI 87 en el coinóculo CLI 87+271, el perfil de aminoácidos en el mosto fermentado con dicho coinóculo fue en algunos casos intermedio entre ambas fermentaciones independientes; pero resultó más similar al del mosto fermentado con la cepa CLI 87. A pesar de este hecho, tal como se ha comentado con anterioridad en el

capítulo 5, las fermentaciones realizadas con más de una cepa generan distintas interacciones metabólicas que pueden no producirse cuando las levaduras fermentan de manera individual (Howell et al., 2006); lo cual puede conllevar a vinos con características sensoriales diferentes.

Los valores específicos de metionina, fenilalanina y leucina están representados en la Figura 7. Todos los valores de fenilalanina y leucina fueron bastante bajos (<1 ppm) para todos los vinos; excepto para los elaborados con la cepa CLI 271 individualmente; aunque en ninguno de los vinos superó los 3,10 ppm. La metionina dio valores residuales ligeramente más altos para los depósitos de fermentación de la cepa comercial LSA con niveles de $4,84 \pm 0,50$. Por el contrario, el resto de los depósitos obtuvieron resultados muy homogéneos, con valores cercanos a 3,25 ppm.

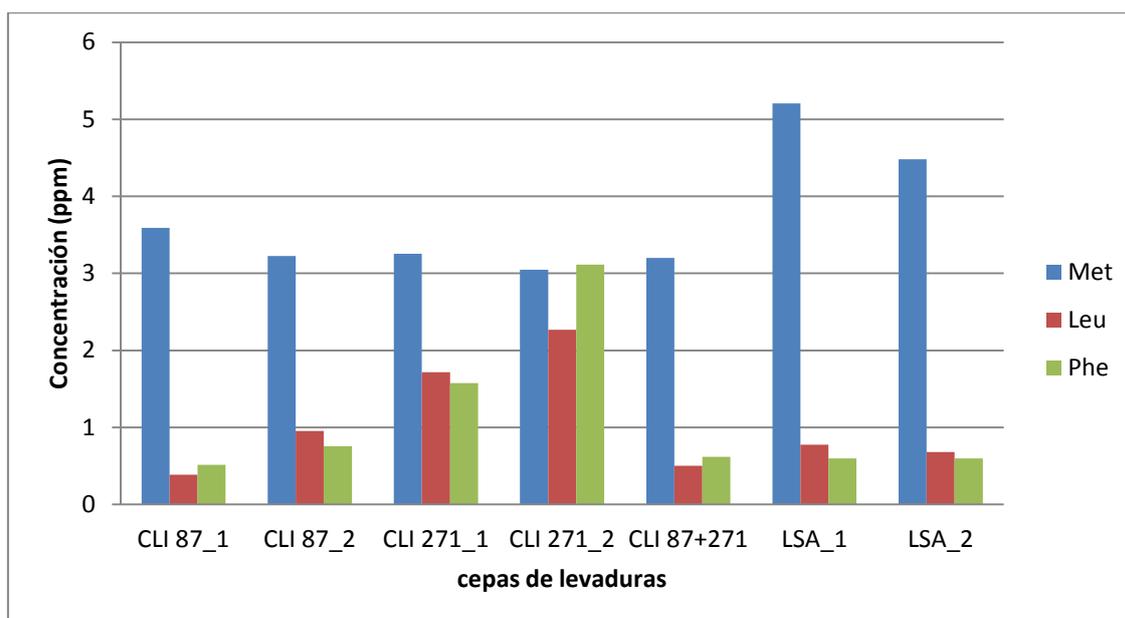


Figura 7. Representación las concentraciones de metionina, leucina y fenilalanina residuales tras la fermentación alcohólica en cada depósito con cada cepa de levadura estudiada.

Las concentraciones de los compuestos volátiles mayoritarios de los vinos pueden observarse en la Tabla 3; de minoritarios y traza en la Tabla 4 y de aldehídos en la Tabla 5. Todos se muestran junto con sus valores de umbral de olfacción.

Tabla 3. Concentración (ppm) de compuestos aromáticos mayoritarios en los vinos elaborados con las cepas CLI 87, CLI 271, el coínóculo CLI 87+271 y LSA.

| | Umbral de olfacción (ppm) | Ref.* | CLI 87_1 | CLI 87_2 | CLI 271_1 | CLI 271_2 | CLI 87+271 | LSA_1 | LSA_2 |
|----------------------------|---------------------------|-------|----------|----------|-----------|-----------|------------|--------|--------|
| diacetilo | 0,1 | b | 0,41 | 0,30 | 0,41 | 0,42 | 0,30 | 1,30 | 1,77 |
| butirato de etilo | 0,02 | a | 0,42 | 0,35 | 0,42 | 0,48 | 0,35 | 0,25 | 0,29 |
| isobutanol | 40 | a | 17,52 | 10,18 | 17,52 | 17,66 | 10,18 | 16,48 | 17,61 |
| acetato de isoamilo | 0,03 | a | 6,51 | 3,13 | 6,51 | 7,36 | 3,13 | 5,05 | 6,67 |
| 1-butanol | 150 | c | 0,72 | 0,74 | 0,72 | 0,97 | 0,74 | 0,86 | 1,19 |
| alcohol isoamílico | 30 | b | 145,88 | 79,70 | 145,88 | 169,86 | 79,70 | 199,02 | 241,38 |
| hexanoato de etilo | 0,014 | a | 0,86 | 0,71 | 0,86 | 0,90 | 0,71 | 0,60 | 0,63 |
| acetato de hexilo | 1 | q | 0,59 | 0,57 | 0,59 | 0,56 | 0,57 | 0,39 | 0,47 |
| acetoína | 150 | c | 0,55 | 2,14 | 0,55 | 1,29 | 2,14 | 1,37 | 1,94 |
| lactato de etilo | 154 | c | 3,19 | 2,32 | 3,19 | 2,69 | 2,32 | 2,71 | 2,73 |
| 1-hexanol | 8 | a | 1,49 | 1,89 | 1,49 | 1,59 | 1,89 | 1,89 | 1,71 |
| c-3-hexenol | 0,4 | a | 0,25 | 0,23 | 0,25 | 0,26 | 0,23 | 0,22 | 0,26 |
| octanoato de etilo | 0,58 | c | 0,69 | 0,56 | 0,69 | 0,93 | 0,56 | 0,43 | 0,48 |
| 3-hidroxibutirato de etilo | 20 | i | 0,30 | 0,17 | 0,30 | 0,34 | 0,17 | 0,39 | 0,43 |
| ácido isobutírico | 0,05 | ñ | 0,59 | 0,56 | 0,59 | 0,56 | 0,56 | 0,93 | 0,90 |
| ácido butírico | 0,173 | a | 1,28 | 1,24 | 1,28 | 1,41 | 1,24 | 1,57 | 1,76 |
| γ-butirolactona | 35 | i | 2,02 | 3,19 | 2,02 | 1,96 | 3,19 | 1,00 | 1,01 |
| ácido isovalerianico | 0,033 | a | 0,52 | 0,43 | 0,52 | 0,53 | 0,43 | 0,91 | 0,91 |
| metionol | 1 | a | 0,63 | 0,46 | 0,63 | 0,58 | 0,46 | 0,62 | 0,56 |
| acetato de 2-feniletilo | 0,25 | b | 0,38 | 0,26 | 0,38 | 0,40 | 0,26 | 0,32 | 0,34 |
| ácido hexanoico | 0,42 | a | 6,20 | 6,73 | 6,20 | 7,59 | 6,73 | 4,65 | 4,51 |
| alcohol bencílico | 200 | i | 0,18 | 0,12 | 0,18 | 0,18 | 0,12 | 0,57 | 0,62 |
| β-feniletanol | 14 | a | 14,40 | 15,64 | 14,40 | 14,18 | 15,64 | 20,85 | 18,09 |
| ácido octanoico | 0,5 | a | 8,43 | 7,25 | 8,43 | 9,77 | 7,25 | 5,17 | 5,30 |
| ácido decanoico | 1 | a | 2,16 | 1,62 | 2,16 | 2,46 | 1,62 | 0,97 | 1,08 |

*referencia bibliográfica de los umbrales de olfacción: a: Ferreira et al., 2000; b: Guth, 1997; c: Etievant, 1991; i: Aznar et al., 2003; ñ: Van Gemert & Nettenbreijer, 1977; q: Chaves et al., 2007.

Tabla 4. Concentración (ppb) de compuestos aromáticos minoritarios y traza en los vinos elaborados con las cepas CLI 87, CLI 271, el coínóculo CLI 87+271 y LSA. (N.D.: no detectado).

| | Umbral de olfacción (ppb) | Ref.* | CLI 87_1 | CLI 87_2 | CLI 271_1 | CLI 271_2 | CLI 87+271 | LSA_1 | LSA_2 |
|--------------------------|------------------------------------|-------|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|---------|---------|
| isobutirato de etilo | 15 | a | 4,64 | 3,65 | 4,15 | 4,23 | 3,78 | 4,50 | 4,56 |
| acetato isobutilo | 1600 | n | 152,37 | 128,09 | 220,57 | 215,25 | 217,53 | 159,49 | 182,55 |
| acetato de butilo | 1880 | c | 21,92 | 18,46 | 28,07 | 30,31 | 28,36 | 16,84 | 20,71 |
| 2-metilbutirato de etilo | 18 | a | 0,34 | 0,24 | 0,23 | 0,10 | N.D. | 0,34 | N.D. |
| isovalerato de etilo | 3 | b | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| benzaldehído | 5000 | m | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| linalool | 25 | a | 2,62 | 2,10 | 1,46 | 1,30 | 1,45 | 2,26 | 2,14 |
| acetato de linalol | | | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| furoato de etilo | 1000 | m | 0,93 | 1,15 | 0,86 | 0,85 | 0,54 | 0,66 | 0,58 |
| α -terpineol | 250 | a | 0,76 | 0,72 | 0,61 | 0,50 | 0,46 | 0,72 | 0,60 |
| β -citronelol | 100 | b | 3,51 | 3,21 | 2,18 | 2,11 | 2,70 | 4,44 | 3,67 |
| β -damascenona | 0,05 | b | 4,90 | 5,05 | 4,23 | 4,62 | 4,34 | 4,48 | 4,74 |
| α -ionona | 2,6 | a | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| geraniol | 20 | i | 7,17 | 6,35 | 5,14 | 5,84 | 5,62 | 6,97 | 6,02 |
| guaiacol | 9,5 | a | 0,55 | 0,52 | 0,43 | 0,41 | 0,43 | 0,61 | 0,54 |
| dihidrocinamato de etilo | 1,6 | a | 0,96 | 0,88 | 1,06 | 0,93 | 1,05 | 0,62 | 0,59 |
| t-whiskylactona | 790 | c | 1,67 | 0,48 | 0,15 | 1,09 | 0,20 | 0,63 | 0,45 |
| β -ionona | 0,09 | a | 0,17 | 0,13 | 0,16 | 0,13 | 0,15 | 0,16 | 0,13 |
| c-whiskylactona | 67 | c | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| δ -octalactona | 400 | ñ | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| o-cresol | 31 | c | 0,50 | 0,52 | 0,43 | 0,48 | 0,48 | 0,54 | 0,53 |
| γ -nonalactona | 30 | j | 4,19 | 4,19 | 4,05 | 4,25 | 4,21 | 4,36 | 4,18 |
| 4-etilguaiacol | 33 | a | 0,15 | 0,20 | 0,15 | 0,18 | 0,19 | N.D. | N.D. |
| m-cresol | 68 | a | 0,25 | 0,22 | 0,20 | 0,24 | 0,19 | 0,25 | 0,18 |
| 4-propilguaiacol | | | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| cinamato de etilo | 1,1 | a | 0,21 | 0,41 | 0,36 | 0,46 | 0,38 | 0,33 | 0,33 |
| γ -decalactona | 1000 | m | 1,76 | 1,62 | 1,40 | 1,36 | 1,34 | 3,13 | 2,68 |
| eugenol | 6 | a | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 4-etilfenol | 35 | d | 0,68 | 0,79 | 0,77 | 0,91 | 0,77 | 0,67 | 0,70 |
| δ -decalactona | 386 | a | 35,33 | 33,66 | 33,39 | 30,40 | 29,95 | 27,22 | 24,09 |
| 4-vinilguaiacol | 40 | b | 573,66 | 565,62 | 516,61 | 466,85 | 611,51 | 448,83 | 404,14 |
| E-isoeugenol | 6 | e | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 2,6-dimetoxifenol | 570 | k | N.D. | 0,41 | 0,31 | N.D. | 0,34 | 0,50 | 0,57 |
| 4-vinilfenol | 180 | l | 4060,83 | 4758,62 | 4022,64 | 4833,94 | 5211,41 | 4076,09 | 3654,32 |
| 4-alil-2,6-dimetoxifenol | 1200 | ñ | 0,66 | 0,66 | 0,17 | 0,48 | 0,43 | 0,57 | 0,61 |
| vanillina | 200 | b | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| vanillato de metilo | 3000 | k | 2,83 | 2,88 | 2,81 | 2,87 | 2,91 | 3,04 | 2,90 |
| vanillato de etilo | 990 | k | 2,84 | 3,07 | 2,18 | 2,40 | 2,93 | 2,34 | 2,15 |
| acetovanillona | 1000 | k | 101,84 | 112,00 | 102,76 | 109,40 | 116,46 | 124,57 | 104,48 |
| siringaldehído | 50000 | ñ | 1,11 | 0,87 | 0,53 | 0,42 | 0,87 | 1,92 | 0,89 |

a: Ferreira et al., 2000; b: Guth, 1997; c: Etievant, 1991; d: San-Juan et al., 2011; e: Escudero et al., 2007; j: Nakamura et al., 1988; k: López et al., 2002; i: Aznar et al., 2003; l: Boidron et al., 1988; m: Zea et al., 2010; n: Tominaga et al., 1998; ñ: Van Gemert & Nettenbreijer, 1977.

Tabla 5. Concentración (ppb) de compuestos aromáticos aldehídicos en los vinos elaborados con las cepas CLI 87, CLI 271, el coínoculo CLI 87+271 y LSA. (N.D.: no detectado).

| | Umbral de olfacción (ppb) | Ref*. | CLI 87_1 | CLI 87_2 | CLI 271_1 | CLI 271_2 | CLI 87+271 | LSA_1 | LSA_2 |
|--------------------------|------------------------------------|-------|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|-------|-------|
| 2-metilpropananal | 6 | g | 38,48 | 54,25 | 48,43 | 25,70 | 21,11 | 22,69 | 22,63 |
| 2-metilbutanal | 16 | g | 7,44 | 12,70 | 9,32 | 5,62 | 5,02 | 6,08 | 6,09 |
| 3-metilbutanal | 4,6 | g | 52,06 | 85,03 | 64,84 | 40,29 | 37,92 | 44,51 | 43,60 |
| 1-octen-3-ona | 0,3 | h | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | N.D. | N.D. | 0,01 |
| metional | 0,5 | f | 0,47 | 0,35 | 0,61 | 0,47 | 0,36 | 0,32 | 0,45 |
| E-2-octenal | 3 | g | 0,07 | 0,09 | 0,08 | 0,08 | 0,06 | 0,04 | 0,05 |
| fenilacetaldehído | 1 | g | 3,42 | 2,24 | 2,72 | 2,91 | 1,88 | 3,18 | 3,13 |
| E-2-nonenal | 0,6 | g | 0,12 | 0,12 | 0,10 | 0,09 | 0,09 | 0,06 | 0,06 |

*referencia bibliográfica de los umbrales de olfacción: f: Escudero et al., 2000; g: Culleré et al., 2007; h: La Guerche et al., 2006.

Se han agrupado los compuestos por familias químicas (Tabla 6) para estudiar el impacto de cada una de ellas en los vinos finales y ver si existían diferencias respecto a la cepa con la que se había realizado la fermentación. La contribución al total de cada familia se puede observar en la Figura 8; siendo los alcoholes los compuestos que cuantitativamente más contribuían a la composición volátil total, con valores de entre el 80 y el 90%, lo cual concuerda con los valores previamente publicados por Usseglio-Tomasset (1998).

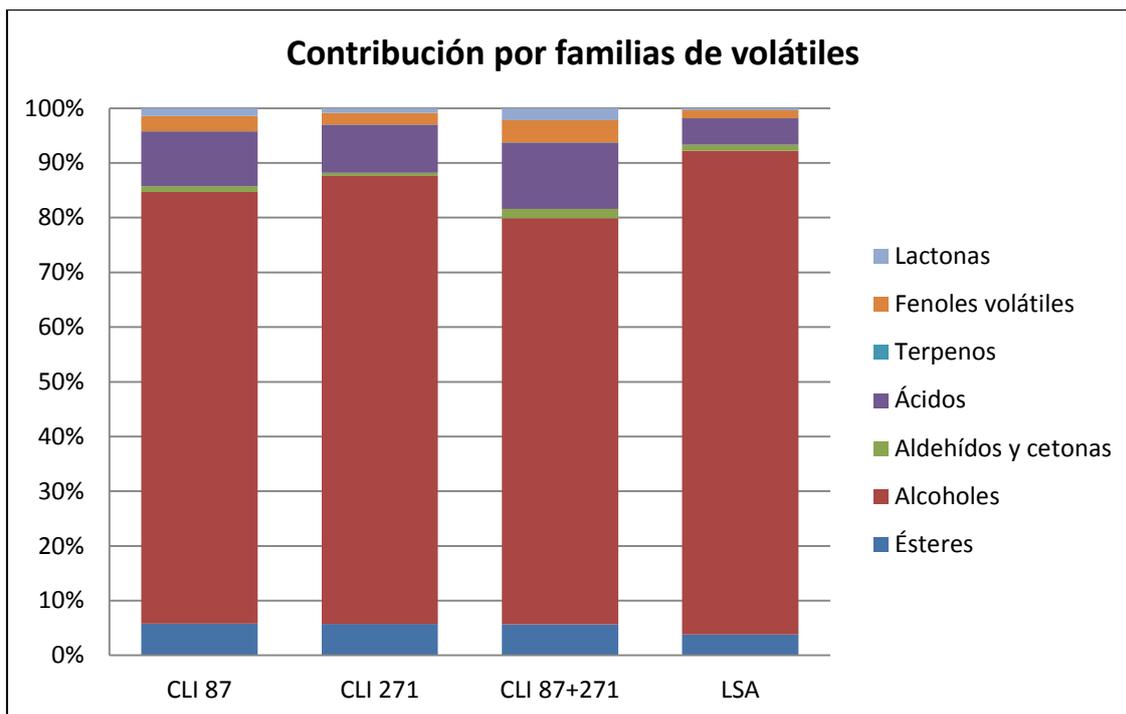


Figura 8. Contribución (%) de cada familia de compuestos volátiles al total en los vinos. (Datos medios de las repeticiones de los depósitos).

A grandes rasgos se puede observar un perfil de contribución por familias parecido en los vinos elaborados de forma individual por las cepas CLI 87 y CLI 271. Los vinos elaborados por la cepa LSA, poseían un porcentaje ligeramente mayor de alcoholes, lo cual redujo el porcentaje del resto de familias exceptuando la de aldehídos y cetonas. En cambio el vino obtenido por la cofermentación de las cepas CLI 87 y CLI 271, obtuvo un % de concentración total de alcoholes menor que el resto de los vinos, lo cual se tradujo a su vez, en un aumento en la contribución total por parte de las familias de lactonas, fenoles volátiles, ácidos y aldehídos y cetonas superior al resto de los vinos.

A su vez, dentro de cada familia de compuestos, hubo diferencias significativas para algunos volátiles dependiendo de la cepa de levadura utilizada durante la fermentación. A continuación se muestran los resultados principales de cada familia química:

Alcoholes superiores: Fueron cuantitativamente el grupo de volátiles más abundante. Las concentraciones de estos alcoholes en el vino constituyen importantes variables de diferenciación entre cepas debido a su estricta relación con el metabolismo

de las levaduras (Callejón et al., 2010; Suárez-Lepe, 1997). La mayor parte de estos compuestos están asociados a aromas desagradables en los vinos (Carrascosa et al., 2012), concretamente a aromas a “fusel”, cuya traducción desde el alemán quiere decir “licor malo”); pero generalmente se encuentran en concentraciones por debajo de su umbral de olfacción teniendo más importancia por su papel como precursores de algunos ésteres que sí pueden tener un gran impacto sensorial (Zamora, 2009) y contribuyendo en concentraciones moderadas a la complejidad aromática de los vinos (Callejón et al., 2010). En todos los vinos el sumatorio total de estos alcoholes estuvo por debajo de 300 ppm; por lo que en un principio no puede considerarse como un factor negativo en la calidad aromática ya que no superan los 400 ppm (Rapp y Versini, 1991). Se han encontrado diferencias significativas entre los vinos respecto a las concentraciones de algunos alcoholes; sobretodo para los valores de los alcoholes isoamílico y bencílico y el β -feniletanol, que estaban en concentraciones significativamente superiores en los vinos realizados con la cepa LSA que con respecto a los demás. Pero excepto para el alcohol isoamílico y el β -feniletanol, los valores del resto de los compuestos estuvieron por debajo de sus umbrales de olfacción.

Ésteres: Constituyen otro grupo de aromas fermentativos, generalmente asociados a aromas frutales, que en los vinos pueden afectar al aroma global de forma muy significativa (Swiegers et al., 2005). Los dos grupos principales de ésteres que han sido asociados con dicho carácter frutal en el vino son los ésteres de acetato (acetatos de etilo, hexilo, isobutilo, amilo, isoamilo y 2-feniletilo) y los ésteres etílicos de ácidos grasos (de 3 a 12 átomos de carbono). La sinergia organoléptica existente entre los diferentes ésteres determinará las características sensoriales de las mezclas de ésteres (Ugliano y Henschke, 2009). En los vinos analizados en el presente estudio, fueron el lactato de etilo y el acetato de isoamilo los ésteres con concentración más predominante, formando aproximadamente un 70% de la cantidad de ésteres total. Ambos estuvieron en concentraciones superiores en los vinos procedentes de la fermentación con la cepa CLI 271; los cuales tuvieron la suma total de ésteres mayor, con cerca de 13,6 ppm.

Aldehídos y cetonas: Tal como se ha mencionado con anterioridad, las familias de aldehídos y cetonas están relacionados con la oxidación. En términos cuantitativos se puede observar cómo el vino elaborado con la cepa CLI 87 posee los mayores valores totales de aldehídos, sobrepasando el valor de 128 ppb de concentración. Estos vinos

mostraron los valores individuales más altos de 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, E-2-octenal y E-2-nonenal (ver Tabla 5). Por el contrario, el vino proveniente de la cepa CLI 87+271 (en realidad, tal como se ha explicado previamente, mayoritariamente elaborado por la cepa CLI 271), mostró los valores totales más bajos de la familia de aldehídos. Este vino obtuvo casi la mitad de concentración total que el elaborado por la CLI 87, con 66 ppb; mostrando a su vez los valores más bajos individualmente de cada compuesto aldehídico analizado, exceptuando el E-2-octenal y E-2-nonenal. Además, todos los valores de aldehídos obtenidos en los vinos elaborados en el presente estudio se encontraban en la media de los obtenidos por Culleré et al. (2007) en un estudio comparativo con vinos blancos jóvenes, con la excepción del 2-metilpropanal y el 3-metilbutanal, que han resultado significativamente más altos en los vinos de nuestro estudio. Contrariamente, se obtuvieron valores más bajos para el metional y el fenilacetaldehído, compuestos ampliamente relacionados con la oxidación en vinos blancos en la bibliografía (Silva Ferreira et al., 2002; Escudero et al., 2000). Es importante señalar también que para el caso de estos dos compuestos, las concentraciones mayores no se encontraron en los depósitos del vino elaborado con la cepa CLI 87, sino en el de la cepa LSA (para el fenilacetaldehído) y el de la CLI 271 (para el metional). Respecto a las cetonas, los vinos elaborados con la cepa LSA obtuvieron un mayor contenido total de esta familia; sobretodo debido a la concentración de más de cuatro veces superior de diacetilo con respecto a los otros vinos. Dicho compuesto con característicos aromas mantequillosos presentó en los vinos fermentados por la cepa LSA unos valores de OAV>15, con sus consiguiente consecuencias tal como se comentará más adelante.

Ácidos: Los ácidos grasos presentes en los vinos tienen aromas típicos a queso, grasa y con notas rancias (Rocha et al., 2004). Los dos ácidos principales cuantitativamente hablando fueron los ácidos hexanoico y octanoico, confirmando los resultados presentados por otros grupos de investigación (Gómez-Míguez et al., 2007; Perestrelo et al., 2006). Todos los ácidos examinados mantuvieron concentraciones relativamente parecidas en los vinos elaborados; con la excepción del ácido decanoico que mostró el doble de concentración (2,3 ppm) en los vinos elaborados por la cepa CLI 271 respecto a la cepa LSA y por el contrario, esta última cepa mostró casi el doble de concentración del ácido isobutírico (0,9 ppm) con respecto a los demás vinos. Todos los ácidos estudiados mostraron concentraciones por encima de sus umbrales de olfacción;

por lo que se puede presuponer que podrían tener un impacto aromático importante en los vinos finales.

Terpenos: Los compuestos analizados dentro de esta familia, caracterizada por sus notas frescas y florales, mostraron concentraciones muy bajas (<7 ppb en todos los casos), sin superar en ningún momento sus umbrales de olfacción y sin presentar diferencias claras entre los vinos.

Fenoles volátiles: Esta familia se encontró en concentraciones parecidas en todos los vinos analizados. A concentraciones bajas pueden aportar un carácter positivo y agradable a los vinos; pero en concentraciones altas denotan un carácter fenólico desagradable, que recuerda a aromas ahumados, animales o incluso a farmacia (Castro et al., 2003). Los fenoles volátiles aparecen en los vinos tanto por el metabolismo de las levaduras o bacterias presentes durante los procesos de elaboración; como por la hidrólisis de fenoles superiores; siendo los más importantes el 4-etilfenol, 4-vinilfenol y 4-vinilguaiacol (Suárez-Lepe, 1997). Fueron precisamente el 4-etilguaiacol y 4-vinilfenol (este último en concentraciones por encima de su umbral de olfacción), los que se encontraron en mayor concentración en todos los vinos, confirmando los resultados de Gómez-Míguez et al. (2007).

Lactonas: Esta familia, caracterizada por sus típicos aromas frutales, se encontró en concentraciones significativamente distintas entre los diferentes vinos. El vino elaborado con el coínóculo de las cepas CLI 87 y CLI 271, obtuvo valores totales tres veces mayores que los vinos elaborados con la cepa LSA. La γ -butirolactona fue la lactona mayoritaria de las analizadas, con concentraciones de entre 1 y 2,6 ppm. Pero ninguna de las lactonas estudiadas estuvo en concentraciones superiores a su umbral de olfacción. Esta familia de compuestos no es característica de los vinos blancos jóvenes como los de este estudio; sino que destaca en aquellos vinos envejecidos en madera; a los que aporta importantes notas sensoriales (Perestrelo et al., 2006; Pérez-Prieto et al., 2002; Pollnitz et al., 1999).

Tabla 6. Valores de concentración en ppb y desviación estándar de los compuestos volátiles analizados en los vinos elaborados con las cepas CLI 87, CLI 271, el coínoculo CLI 87+271 y LSA. Agrupación de los compuestos por familias químicas.

| Ésteres | CLI 87 | CLI 271 | CLI 271+87 | LSA |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| isobutirato de etilo | 4,15 ± 0,70 | 4,19 ± 0,06 | 3,78 | 4,53 ± 0,04 |
| 2-metilbutirato de etilo | 0,29 ± 0,07 | 0,17 ± 0,09 | N.D. | 0,17 ± 0,24 |
| furoato de etilo | 1,04 ± 0,16 | 0,86 ± 0,01 | 0,54 | 0,62 ± 0,06 |
| dihidrocinnamato de etilo | 0,92 ± 0,06 | 1,00 ± 0,09 | 1,05 | 0,61 ± 0,02 |
| cinamato de etilo | 0,31 ± 0,14 | 0,41 ± 0,07 | 0,38 | 0,33 ± 0,00 |
| vanillato de metilo | 2,86 ± 0,04 | 2,84 ± 0,04 | 2,91 | 2,97 ± 0,10 |
| vanillato de etilo | 2,96 ± 0,16 | 2,29 ± 0,16 | 2,93 | 2,25 ± 0,13 |
| butirato de etilo | 383,91 ± 0,05 | 447,70 ± 0,04 | 348,31 | 267,34 ± 0,03 |
| hexanoato de etilo | 785,66 ± 0,10 | 880,22 ± 0,03 | 713,05 | 614,13 ± 0,02 |
| lactato de etilo | 2756,62 ± 0,62 | 2942,66 ± 0,35 | 2320,78 | 2722,39 ± 0,02 |
| octanoato de etilo | 628,14 ± 0,09 | 814,69 ± 0,17 | 561,72 | 450,98 ± 0,04 |
| 3-hidroxibutirato de etilo | 235,65 ± 0,09 | 319,61 ± 0,03 | 173,14 | 409,87 ± 0,03 |
| acetato de 2-feniletilo | 320,67 ± 0,09 | 391,51 ± 0,01 | 257,65 | 333,22 ± 0,01 |
| acetato isobutilo | 140,23 ± 17,17 | 217,91 ± 3,76 | 217,53 | 171,02 ± 16,31 |
| acetato de butilo | 20,19 ± 2,45 | 29,19 ± 1,58 | 28,36 | 18,78 ± 2,74 |
| acetato de isoamilio | 4823,57 ± 2,39 | 6939,46 ± 0,60 | 3132,27 | 5861,09 ± 1,15 |
| acetato de hexilo | 581,65 ± 0,01 | 573,22 ± 0,03 | 572,20 | 426,92 ± 0,06 |
| Alcoholes | CLI 87 | CLI 271 | CLI 271+87 | LSA |
| isobutanol | 13848,81 ± 5,19 | 17592,34 ± 0,10 | 10176,10 | 17043,16 ± 0,80 |
| 1-butanol | 725,73 ± 0,01 | 844,78 ± 0,18 | 735,31 | 1024,10 ± 0,24 |
| alcohol isoamílico | 112792,29 ± 46,80 | 157871,22 ± 16,95 | 79702,28 | 220203,30 ± 29,95 |
| 1-hexanol | 1691,24 ± 0,28 | 1542,37 ± 0,07 | 1891,57 | 1798,22 ± 0,13 |
| c-3-hexenol | 239,42 ± 0,02 | 257,62 ± 0,01 | 226,40 | 238,26 ± 0,03 |
| metionol | 544,49 ± 0,12 | 606,05 ± 0,03 | 461,66 | 588,12 ± 0,05 |
| alcohol bencílico | 149,08 ± 0,04 | 180,87 ± 0,01 | 120,89 | 594,82 ± 0,03 |
| b-feniletanol | 15024,24 ± 0,88 | 14293,10 ± 0,16 | 15643,55 | 19469,76 ± 1,95 |
| Aldehídos y cetonas | CLI 87 | CLI 271 | CLI 271+87 | LSA |
| 2- metilpropanal | 46,37 ± 11,15 | 37,07 ± 16,07 | 21,11 | 22,66 ± 0,04 |
| 2- metilbutanal | 10,07 ± 3,72 | 7,47 ± 2,62 | 5,02 | 6,09 ± 0,01 |
| 3-metilbutanal | 68,55 ± 23,31 | 52,57 ± 17,36 | 37,92 | 44,06 ± 0,64 |
| 1- octen-3-ona | 0,02 ± 0,01 | 0,02 ± 0,01 | 0,00 | 0,01 ± 0,01 |
| metional | 0,41 ± 0,08 | 0,54 ± 0,10 | 0,36 | 0,39 ± 0,09 |
| E- 2-octenal | 0,08 ± 0,01 | 0,08 ± 0,00 | 0,06 | 0,05 ± 0,01 |
| fenilacetaldehído | 2,83 ± 0,83 | 2,82 ± 0,13 | 1,88 | 3,16 ± 0,04 |
| E- 2-nonenal | 0,12 ± 0,00 | 0,10 ± 0,01 | 0,09 | 0,06 ± 0,00 |
| siringaldehído | 0,99 ± 0,17 | 0,48 ± 0,08 | 0,87 | 1,41 ± 0,73 |
| b-damascenona | 4,98 ± 0,11 | 4,43 ± 0,28 | 4,34 | 4,61 ± 0,18 |
| b-ionona | 0,15 ± 0,03 | 0,15 ± 0,02 | 0,15 | 0,15 ± 0,02 |
| diacetilo | 359,14 ± 0,08 | 418,70 ± 0,01 | 304,95 | 1531,53 ± 0,33 |
| acetoina | 1345,82 ± 1,12 | 919,87 ± 0,52 | 2140,54 | 1653,53 ± 0,40 |

Continuación Tabla 6.

| Ácidos | CLI 87 | CLI 271 | CLI 271+87 | LSA |
|--------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| ácido isobutírico | 574,51 ± 0,03 | 576,40 ± 0,02 | 556,49 | 914,93 ± 0,02 |
| ácido butírico | 1259,07 ± 0,03 | 1345,98 ± 0,09 | 1236,78 | 1665,84 ± 0,13 |
| ácido isovalerianico | 477,17 ± 0,06 | 524,47 ± 0,00 | 432,31 | 912,41 ± 0,00 |
| ácido hexanoico | 6461,38 ± 0,37 | 6890,92 ± 0,98 | 6725,97 | 4578,53 ± 0,10 |
| ácido octanoico | 7839,10 ± 0,84 | 9098,14 ± 0,94 | 7247,17 | 5239,70 ± 0,09 |
| ácido decanoico | 1889,10 ± 0,38 | 2308,80 ± 0,22 | 1621,75 | 1023,88 ± 0,08 |
| Terpenos | CLI 87 | CLI 271 | CLI 271+87 | LSA |
| linalool | 2,36 ± 0,37 | 1,38 ± 0,11 | 1,45 | 2,20 ± 0,08 |
| a-terpineol | 0,74 ± 0,03 | 0,56 ± 0,08 | 0,46 | 0,66 ± 0,08 |
| b-citronelol | 3,36 ± 0,21 | 2,15 ± 0,05 | 2,70 | 4,06 ± 0,54 |
| geraniol | 6,76 ± 0,58 | 5,49 ± 0,49 | 5,62 | 6,50 ± 0,67 |
| Fenoles volátiles | CLI 87 | CLI 271 | CLI 271+87 | LSA |
| guaiacol | 0,54 ± 0,02 | 0,42 ± 0,01 | 0,43 | 0,58 ± 0,05 |
| o-cresol | 0,51 ± 0,01 | 0,46 ± 0,04 | 0,48 | 0,54 ± 0,01 |
| 4-etilguaiaacol | 0,18 ± 0,04 | 0,17 ± 0,02 | 0,19 | N.D. |
| m-cresol | 0,24 ± 0,02 | 0,22 ± 0,03 | 0,19 | 0,22 ± 0,05 |
| 4-etilfenol | 0,74 ± 0,08 | 0,84 ± 0,10 | 0,77 | 0,69 ± 0,02 |
| 4-vinilguaiaacol | 569,64 ± 5,69 | 491,73 ± 35,19 | 611,51 | 426,49 ± 31,60 |
| 2,6-dimetoxifenol | 0,21 ± 0,29 | 0,16 ± 0,22 | 0,34 | 0,54 ± 0,05 |
| 4-vinilfenol | 4409,73 ± 493,41 | 4428,29 ± 573,68 | 5211,41 | 3865,21 ± 298,24 |
| 4-alil-2,6-dimetoxifenol | 0,66 ± 0,00 | 0,33 ± 0,22 | 0,43 | 0,59 ± 0,03 |
| acetovanillona | 106,92 ± 7,18 | 106,08 ± 4,70 | 116,46 | 114,53 ± 14,21 |
| Lactonas | CLI 87 | CLI 271 | CLI 271+87 | LSA |
| t-whiskylactona | 1,08 ± 0,84 | 0,62 ± 0,66 | 0,20 | 0,54 ± 0,13 |
| g-nonolactona | 4,19 ± 0,00 | 4,15 ± 0,14 | 4,21 | 4,27 ± 0,13 |
| d-decalactona | 34,50 ± 1,18 | 31,90 ± 2,11 | 29,95 | 25,66 ± 2,21 |
| g-decalactona | 1,69 ± 0,10 | 1,38 ± 0,03 | 1,34 | 2,91 ± 0,32 |
| g-butirolactona | 2603,77 ± 0,82 | 1990,15 ± 0,04 | 3185,69 | 1002,97 ± 0,01 |

ANÁLISIS SENSORIAL

Se realizó una cata de descriptores generales de los vinos a nivel visual, olfativo y gustativo. Además, se pidió al panel de cata una valoración edónica sobre la preferencia entre los vinos (Tabla 7). De manera unánime, los vinos procedentes de las fermentaciones con la cepa CLI 271, (tanto individualmente como en cultivo mixto, donde se ha explicado con anterioridad la imposición de más del 80% de la cepa CLI 271 sobre la CLI 87) fueron valorados como los mejores.

Tabla 7. Valoración sobre 24 puntos de la preferencia de los vinos. Sumatorio de la puntuación entre 0 (peor vino) y 3 (mejor vino) dada por cada catador.

| | CLI 87+271 | CLI 271 | LSA | CLI 87 |
|---|------------|---------|-----|--------|
| Sumatorio puntuaciones valoración vinos | 22 | 20 | 9 | 9 |

Los parámetros establecidos en la cata visual puntuaron de forma muy parecida; obteniendo todos los vinos unas puntuaciones intermedias de intensidad de color y vivacidad/brillo. A su vez, todos los vinos fueron descritos como de color pajizo con ligeras notas verdosas.

Respecto a los descriptores aromáticos (Figura 9), los vinos procedentes de las fermentaciones CLI 271 y CLI 87+271 obtuvieron perfiles muy parecidos y las mejores puntuaciones en cuanto a calidad global aromática; coincidiendo con las puntuaciones más altas de aromas frutales y más bajas de los descriptores aromáticos relacionados negativamente con la calidad de los vinos: aromas de alteración, oxidación y microbiológicos. En cambio, los vinos procedentes de las cepas CLI 87 y LSA, mostraron a su vez un mismo tipo de perfil y puntuaron de manera muy inferior en cuanto a su calidad global aromática; debido a la presencia de los anteriormente citados descriptores negativos; resultando especialmente notable la presencia de aromas de oxidación en el vino elaborado por la cepa CLI 87. Este resultado no fue el esperado debido a la selección de esta levadura por sus previas características en términos metabólicos; pero se puede deber a una exposición excesiva del vino al aire durante los trasiegos de estos depósitos de pequeño volumen antes de su estabilización y reposo en la cámara fría. Igualmente, es preciso recordar que fueron los vinos fermentados con esta cepa los que dejaron cantidades de azúcares residuales $> 4\text{g/L}$, con los consiguientes riesgos de re-fermentación y contaminación por microorganismos presentes en el ambiente de la bodega. Tal como se ha explicado con anterioridad, son principalmente los azúcares reductores los responsables de reaccionar con grupos amino libres de los péptidos, proteínas o aminoácidos directamente, produciéndose las reacciones de Maillard (Marchand et al., 2002; Pripis-Nicolau et al., 2000) las cuales generan compuestos con aromas relacionados con la oxidación, tales como el furfural y el 5-hidroxi-metilfurfural (Oliveira et al., 2011; Escudero et al., 2002); pudiendo ser

parte de los responsables de las notas de oxidación atribuidas a los vinos elaborados a partir de la cepa CLI 87.

Los valores respecto al carácter alcohólico y los aromas vegetales/herbáceos resultaron bastante parecidos entre las muestras; sin ser por tanto determinantes a la hora de estimar la calidad global y de valorar subjetivamente la preferencia de los vinos de estudio. Cabe destacar, que la muestra con mayor intensidad aromática fue la del vino procedente de la cepa CLI 271, valorada como la mejor.

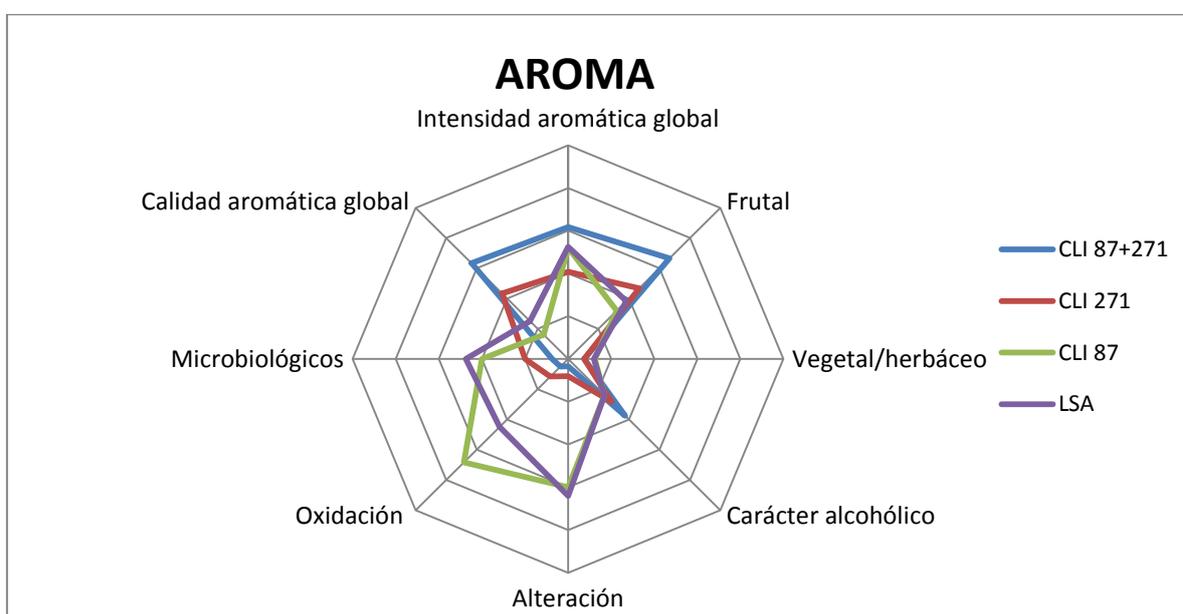


Figura 9. Perfiles aromáticos de los vinos. (Escala de 0-10).

Con respecto a los descriptores gustativos se obtuvieron perfiles más homogéneos (Figura 10). Nuevamente, los vinos procedentes de la cepa CLI 271 (fermentación individual y mixta), también obtuvieron las puntuaciones más altas de “calidad global gusto/armonía”, “afrutado”, “carácter alcohólico” y “cuerpo” y las más bajas en “amargor”. Respecto al descriptor “vegetal/verdor” las puntuaciones fueron muy bajas y parecidas para todas las muestras catadas. Sobre los descriptores “salinidad” y “acidez” no hubo resultados concluyentes; aunque el vino proveniente de la fermentación mixta obtuvo los valores más altos.

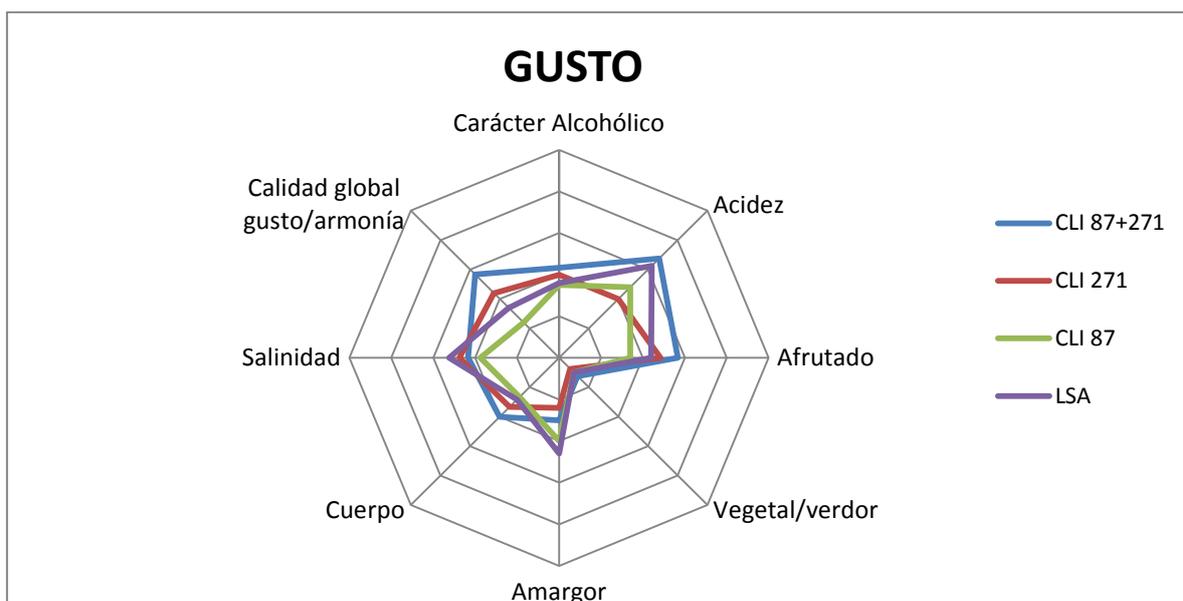


Figura 10. Perfiles gustativos de los vinos. (Escala de 0-10).

CORRELACIÓN DEL ANÁLISIS SENSORIAL CON LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL

Se calcularon los valores de OAV de todos los compuestos cuantificados en los vinos. Tal como se ha expresado con anterioridad, este valor da una idea del potencial aromático individual de dichos compuestos. La Tabla 8 muestra los 20 compuestos analizados que mostraron OAV >1 y que por tanto, pueden considerarse que contribuyen de forma individual al aroma final de los vinos. Ciertos compuestos con aromas agradables con OAV>1 pudieron contribuir positivamente en todos los vinos, tales como la β -damascenona (manzana asada), β -ionona y β -feniletanol (floral), butirato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo (frutales). Pero para estos compuestos no hubo en general claras diferencias entre los vinos, excepto para el vino de la cepa CLI 271 que sí obtuvo concentraciones más altas para el butirato de etilo, acetato de etilo y el hexanoato de etilo. Por el contrario, ciertos compuestos caracterizados por sus olores desagradables cuando se encuentran en valores con OAV>1, tales como el 4-vinilfenol (almendra amarga, pintura, farmacia) y los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico (con aromas a queso y rancio); influyeron por igual en todos los vinos por lo que no se les puede considerar como determinantes en las diferencias de calidad aromática global de los vinos; probablemente

contribuyeron a que las puntuaciones de calidad en general no fueran muy altas. En cambio, sí se han obtenido interesantes correlaciones entre algunos de estos compuestos y los resultados del análisis sensorial. Cabe destacar que el vino elaborado por la cepa LSA, el cual obtuvo las puntuaciones más altas para aromas alterados (químicos, ácido acético, cuadra, ratón) y microbiológicos (ácido láctico, mantequilla, queso, levaduras) obtuvo los valores de concentración más altos, con OAVs muy superiores a la unidad y claramente mayores que el resto de muestras, de compuestos tales como el diacetilo, con aroma a mantequilla o el alcohol isoamílico, ácido butírico, ácido isobutírico y ácido isovaleriánico, con aromas desagradables a queso/rancio/químico. A su vez, la cepa CLI 87, la cual había puntuado muy alto para el descriptor de aromas de oxidación (brandy, uvas pasas, miel, etc) obtuvo valores de OAV muy superiores a la unidad y mayores que en el resto de los vinos para compuestos aldehídicos relacionados con la oxidación, tales como el 2-metilpropanal y el 3-metilbutanal. Además, estos compuestos estaban en las menores concentraciones, aunque también con $OAV > 1$, en el vino puntuado como menos oxidado, proveniente de la fermentación mixta CLI 87+271. Tal como se ha mencionado con anterioridad, el vino elaborado con la cepa CLI 87 obtuvo el valor más alto de concentración de aldehídos totales y la fermentación mixta, el más bajo; correspondiéndose con la descripción sensorial del vino más oxidado y el menos oxidado, respectivamente. Pero el vino elaborado con la cepa LSA, puntuado sensorialmente como el siguiente más oxidado (aunque en una escala de 0 a 10 no llegó a 5), obtuvo los segundos valores más bajos y próximos a los del vino elaborado mediante la fermentación mixta CLI 87+271. Esto hace pensar que puede haber una concentración total a partir de la cual se intuye de manera significativa el aroma a oxidación; un “punto de inflexión” por debajo del cual sería difícil encontrar diferencias sensoriales significativas; o también se podría plantear que la percepción de oxidación fuera debida a la presencia de uno o más compuestos determinantes y a concentraciones superiores a su umbral de detección en vinos. En cualquier caso, tal como han descrito recientemente Bueno et al. (2010), parece ser que la percepción global de oxidación no puede explicarse únicamente por el contenido de aldehídos y habría que fijarse en otros factores o incluso en algún otro compuesto o familia hasta ahora no contemplado, para entender más ampliamente la apreciación sensorial de oxidación en los vinos.

Tabla 8. Compuestos con OAV>1 en los vinos. (Concentración de cada compuesto obtenida como la media de los depósitos utilizados por levadura).

| | CONCENTRACIÓN (ppb) | | | | Umbral de olfacción (ppb) | OAV | | | |
|----------------------------------|---------------------|---------|------------|---------|---------------------------|--------|---------|------------|--------|
| | | | | | | | | | |
| | CLI87 | CLI 271 | CLI 271+87 | LSA | | CLI87 | CLI 271 | CLI 271+87 | LSA |
| Compuestos minoritarios | | | | | | | | | |
| b-damascenona | 4,98 | 4,43 | 4,34 | 4,61 | 0,05 | 88,50 | 86,80 | 92,20 | |
| b-ionona | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,09 | 1,67 | 1,67 | 1,61 | |
| 4-vinilfenol | 4409,73 | 4428,29 | 5211,41 | 3865,21 | 180 | 24,50 | 28,95 | 21,47 | |
| Compuestos aldehídicos | | | | | | | | | |
| 2- metilpropanal | 46,37 | 37,07 | 21,11 | 22,66 | 6 | 7,73 | 6,18 | 3,52 | 3,78 |
| 3-metilbutanal | 68,55 | 52,57 | 37,92 | 44,06 | 4,6 | 14,90 | 11,43 | 8,24 | 9,58 |
| fenilacetaldéhid | 2,83 | 2,82 | 1,88 | 3,16 | 1 | 2,83 | 2,82 | 1,88 | 3,16 |
| CONCENTRACIÓN (ppm) | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Umbral de olfacción (ppm) | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| CONCENTRACIÓN (ppm) | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Umbral de olfacción (ppm) | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Compuestos mayoritarios | | | | | | | | | |
| diacetilo | 0,36 | 0,42 | 0,30 | 1,53 | 0,1 | 3,59 | 4,19 | 3,05 | 15,32 |
| butirato de etilo | 0,38 | 0,45 | 0,35 | 0,27 | 0,02 | 19,20 | 22,38 | 17,42 | 13,37 |
| acetato de isoamilo | 4,82 | 6,94 | 3,13 | 5,86 | 0,03 | 160,79 | 231,32 | 104,41 | 195,37 |
| alcohol isoamílico | 112,79 | 157,87 | 79,70 | 220,20 | 30 | 3,76 | 5,26 | 2,66 | 7,34 |
| hexanoato de etilo | 0,79 | 0,88 | 0,71 | 0,61 | 0,014 | 56,12 | 62,87 | 50,93 | 43,87 |
| octanoato de etilo | 0,63 | 0,81 | 0,56 | 0,45 | 0,58 | 1,08 | 1,40 | 0,97 | 0,78 |
| ácido isobutírico | 0,57 | 0,58 | 0,56 | 0,91 | 0,05 | 11,49 | 11,53 | 11,13 | 18,30 |
| ácido butírico | 1,26 | 1,35 | 1,24 | 1,67 | 0,173 | 7,28 | 7,78 | 7,15 | 9,63 |
| ácido isovalerianico | 0,48 | 0,52 | 0,43 | 0,91 | 0,033 | 14,46 | 15,89 | 13,10 | 27,65 |
| acetato de 2feniletilo | 0,32 | 0,39 | 0,26 | 0,33 | 0,25 | 1,28 | 1,57 | 1,03 | 1,33 |
| ácido hexanoico | 6,46 | 6,89 | 6,73 | 4,58 | 0,42 | 15,38 | 16,41 | 16,01 | 10,90 |
| b-feniletanol | 15,02 | 14,29 | 15,64 | 19,47 | 14 | 1,07 | 1,02 | 1,12 | 1,39 |
| ácido octanoico | 7,84 | 9,10 | 7,25 | 5,24 | 0,5 | 15,68 | 18,20 | 14,49 | 10,48 |
| ácido decanoico | 1,89 | 2,31 | 1,62 | 1,02 | 1 | 1,89 | 2,31 | 1,62 | 1,02 |

El vino mejor calificado fue aquel proveniente de la coinoculación de dos cepas seleccionadas. Enólogos en todo el mundo llevan décadas combinando cepas de *S. cerevisiae* basándose en las observaciones en vinos obtenidos por mezclas de cultivos en los cuales se obtenían mayores diversidades de sabores y vinos en general más equilibrados. En cultivos mixtos de levaduras de cepas genéticamente distintas se han observado diferencias en los patrones de crecimiento que cuando se cultivan individualmente, sugiriendo que se pueden producir diferentes interacciones metabólicas de tipo antagónico, neutrales o sinérgicas (Ugliano y Henschke, 2009). En el caso del vino elaborado mediante el coinóculo, se pudieron observar resultados de concentración de aminoácidos residuales y de compuestos aromáticos que no coincidían con los resultados obtenidos con la fermentación individual de las cepas ni con el resultado previsto intermedio de los valores de ambas cepas. Este hecho concuerda con los datos obtenidos por Howell et al. (2006). Si bien es cierto, que dicho vino resultante del coinóculo se pareció más desde un punto de vista sensorial al elaborado por la cepa CLI 271 y es preciso recordar, que al final de la fermentación alcohólica en el vino del coinóculo el porcentaje de imposición de la cepa CLI 271 sobre la CLI 87 fue >80%. Aún así, tras una valoración de los vinos de estudio, el obtenido por cofermentación obtuvo las mejores puntuaciones de calidad e intensidad aromática y gustativa y la valoración subjetiva mejor. Este hecho deja abierta una puerta no sólo a la selección de las mejores cepas autóctonas; sino también a la investigación con diferentes coinóculos; debido a que se ha podido observar como dos o más cepas pueden influir e incluso incrementar y favorecer la complejidad del aroma del vino.

6.5 CONCLUSIONES

El ensayo de las vinificaciones llevadas a cabo a nivel de bodega piloto corroboró la influencia de las cepas utilizadas en el perfil de los aminoácidos a final de la fermentación. Las cepas CLI 87 y CLI 271 que había mostrado los niveles más bajos de metionina, fenilalanina y leucina en las microfermentaciones a escala de laboratorio, también mostraron niveles más bajos de metionina que la cepa comercial LSA, aunque en el caso de fenilalanina y leucina fue la cepa CLI 271 la que mostró valores más altos.

La concentración de algunos de los compuestos volátiles determinados en el vino, tales como el diacetilo, el ácido isobutírico, el alcohol bencílico o el ácido decanoico, mostró ser especialmente dependiente del perfil de aminoácidos inicial. Esto se reflejó en los análisis sensoriales, donde los vinos elaborados con las cepas CLI 271 y el coinóculo CLI 87+271 mostraron una calidad aromática superior a los elaborados con la cepa LSA, una cepa comercial utilizada con anterioridad en la bodega experimental de “El Encín” debido a sus adecuadas condiciones de implantación, fermentación y elaboración de vinos de correcta calidad enológica. Asimismo, se consiguió elaborar vinos en los que la levadura autóctona seleccionada se impuso sin problema sobre la microflora del mosto y con un alto poder fermentativo.

No obstante, los resultados obtenidos mediante la utilización individual de la cepa autóctona CLI 87 no fueron los esperados; ya que los vinos obtenidos a partir de ella resultaron deteriorados y con característicos aromas a oxidación. Estos resultados han podido ser debidos a un proceso de alteración durante la fermentación alcohólica y durante la fase posterior de estabilización. Vinificaciones con esta cepa deberían repetirse en otra campaña para confirmar resultados, y estudiar a continuación la evolución de los vinos elaborados en el tiempo.

Por otro lado, se confirmó la correlación entre la presencia de aldehídos como el 2-metilpropanal y 3-metilbutanal con los aromas de oxidación y por tanto con una evaluación negativa de la calidad del vino. Estos resultados corroboran los obtenidos en las microfermentaciones a escala de laboratorio, donde se observó cómo tras un proceso evolutivo dichos compuestos, junto al 2-metilbutanal, parecían ser determinantes a la hora de calificar un vino como “oxidado” y de puntuar en descriptores tales como

“coñac - brandy - vino jerez - vino oloroso - quina” y “vino viejo, vino añejo – vino evolucionado – vino pasado”. En el caso de la cepa LSA, la presencia en altas concentraciones de los ácidos isobutírico, butírico e isovaleriánico (aromas a queso, rancio), junto a su alto contenido en diacetilo, hizo que este vino puntuara más alto para los aromas de alteración relacionados con procesos microbiológicos y que por tanto tuvieran una calidad global aromática peor.

6.6 REFERENCIAS

- Aznar, M., López, R., Cacho, J. & Ferreira, V. (2003). Prediction of aged red wine aroma properties from aroma chemical composition. Partial least squares regression models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2700-2707.
- Boidron, J.N., Chatonnet, P. & Pons, M. (1988). *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 22, 275-294. En: López, R., Aznar, M., Cacho, J. & Ferreira, V. (2002). Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 966, 167–177.
- Bueno, M., Culleré, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2010). Chemical and sensory characterization of oxidative behavior in different wines. *Food Research International*, 43, 1423–1428.
- Calleja, G.B., (1987). Cell aggregation. Rose, A.H. & Harrison, J.S. (Eds.), *The Yeasts*, vol. 2, (pp.165–238). London: Academic Press. In: Suzzi, G., Romano, P., Westall, F. & Vannini, L. (1996). The flocculation of wine yeasts: biochemical and morphological characteristics in *Kloeckera apiculata*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 273-277.
- Callejón, R.M., Clavijo, A., Ortigueira, P., Troncoso, A.M., Paneque, P. & Morales, M.L. (2010). Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Analytica Chimica Acta*, 660, 68-75.
- Carrascosa, A.V., Bartolomé, B., Robredo, S., León, A., Cebollero, E., Juega, M., Nunez, Y.P., Martínez, M.C. & Martínez-Rodríguez, A.J. (2012). Influence of

locally-selected yeast on the chemical and sensorial properties of Albariño white wines. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 319-325.

- Castro, R., Natera, R., García, M. V. & García, C. (2003). Optimisation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile phenols in wine. *Journal of Chromatography A*, 995, 11–20.
- Chaves, M., Zea, L., Moyano, L. & Medina, M. (2007). Changes in color and odorant compounds during oxidative aging of Pedro Ximenez sweet wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3592-3598.
- Culleré, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2007). An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 876-881.
- Escudero, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J. & Ferreira, V. (2000). Clues about the Role of Methional as Character Impact Odorant of some Oxidized Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4268-4272.
- Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J. & Ferreira V. (2002). Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry*, 77, 325-331.
- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2007). Analytical Characterization of the Aroma of five Premium Red Wines. Insights into de Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4501-4510.
- Etievant, P. X. (1991). Wine. Volatile Compounds of Food and Beverages; Marcel Dekker Inc.: New York. In: 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, 7916–7924.
- Ferreira, V., Lopez, R. & Cacho, J. F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1659–1667.

- Gómez-Miguez, M.J., Cacho, J.F., Ferreira, V., Vicario, I.M. & Heredia, F.J. (2007). Volatile component of Zalema white wines. *Food Chemistry*, *100*, 1464-1473.
- Guth, H. (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 3027–3032.
- Howell, K.S., Cozzolino, D., Bartowsky, E., Fleet, G.H. & Henschke, P.A., (2006). Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. *FEMS Yeast Research*, *6*, 91-101.
- La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D. & Darriet, P. (2006). Characterization of Some Mushroom and Earthy Off-Odors Microbially Induced by the Development of Rot on Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 9193-9200.
- López, R., Aznar, M., Cacho, J. & Ferreira, V. (2002). Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, *966*, 167-177.
- Marchand, S., De Revel, G., & Bertrand, A. (2002). Possible mechanism for involvement of cysteine in aroma production in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 6160–6164.
- Nakamura, S., Crowell, E.A., Ough, C.S. & Totsuka, A. (1988). Quantitative Analysis of γ -Nonalactone in Wines and Its Threshold Determination. *Journal of Food Science*, *53*, 1243-1244.
- Oliveira, C.M., Silva Ferreira, A.C., De Freitas, V. & Silva, A.M.S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, *44*, 1115-1126.
- Perestrelo, R., Fernandes, A., Albuquerque, F.F., Marques, J.C. & Câmara, J.S. (2006). Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Analytica Chimica Acta* *563*, 154-164.
- Pérez-Prieto, L.J., López-Roca, J.M., Martínez-Cutillas, A., Pardo Mínguez, F. & Gómez-Plaza, E. (2002). Maturing Wines in Oak Barrels. Effects of Origin, Volume, and Age of the Barrel on the Wine Volatile Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 3272-3276.

- Pollnitz, A.P., Jones, G.P. & Sefton, M.A. (1999). Determination of oak lactones in barrel-aged wines and in oak extracts by stable isotope dilution analysis. *Journal of Chromatography A*, 857, 239-246.
- Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Bertrand A. & Maujean, A. (2000). Formation of Flavor Components by the Reaction of Amino Acid and Carbonyl Compounds in Mild Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3761-3766.
- Rapp, A. & Versini, G. (1991). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. In: J. Rantz (Ed.), *Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wines* (pp.156-164). Seattle. In: Gómez-Míguez, M.J., Cacho, J., Ferreira, V., Vicario, I.M. & Heredia, F.J. (2007) Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100, 1464-1473.
- 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, 7916-7924.
- Shinohara, T., Mamiya, S. & Yanagida, F. (1997). Introduction of Flocculation Property into Wine Yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) by Hybridization. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 96-101.
- Silva Ferreira, A.C., Guedes de Pinho, P., Rodrigues, P. & Hogg, T. (2002). Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5919-5924.
- Suárez Lepe, J.A. (1997). Levaduras Vínicas. Funcionalidad y uso en bodega. (pp. 99-100). Madrid: Mundi-Prensa Eds.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. & Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 139–173.
- 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, 1044-1048.

- Ugliano, M. & Henschke, P.A. (2009). Yeast and Wine Flavour. Capítulo 8D (pp. 313-393) In: Moreno-Arribas, M.V. & Polo, M.C. Ed. *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer.
- Usseglio-Tomasset, L. (1998). *Química Enológica*. Mundi-Prensa Eds. Madrid. Spain. pp. 190-198.
- Van Gemert, L. & Nettenbreijer, A.H. (Eds.) (1977). Compilation of odour threshold values in air and water. TNO Report. Zeist (Netherlands) In: Gómez-Míguez, M.J., Cacho, J., Ferreira, V., Vicario, I.M. & Heredia, F.J. (2007) Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100, 1464-1473.
- Vaudano, E. & García-Moruno, E. (2008). Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology*, 25, 56-64.
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I.S. & Henschke, P.A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 145-157.
- Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J.M., Martínez-Cachá, A., Pardo, F. & López Nicolás, J.M. (2009). Changes during Storage in Conventional and Ecological Wine: Phenolic Content and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4694–4700.
- Zamora, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentations. Chapter 1 (pp. 3-26). In: Moreno-Arribas, M.V. & Polo, M.C. Ed. *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer.
- Zea, L., Moyano, L. & Medina, M. (2010). Changes in aroma profile of sherry wines during the oxidative ageing. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 2425-2432.

REGLAMENTACIÓN APLICADA:

REGLAMENTO (CEE) N ° 997/81 DE LA COMISIÓN de 26 de marzo de 1981 sobre modalidades de aplicación para la designación y presentación de los vinos y mostos de uva.

REGLAMENTO (CEE) No 2676/90 DE LA COMISIÓN de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino.

REGLAMENTO (CE) N° 557/94 DE LA COMISIÓN de 14 de marzo de 1994 por el que se establece una medida transitoria en materia de acidez total de los vinos de mesa producidos en España y Portugal despachados al consumo en el mercado de dicho Estados miembros durante el año 1994.

REGLAMENTO (CE) No 1493/1999 DEL CONSEJO de 17 de mayo de 1999 por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES GENERALES

7 CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones principales de cada ensayo se han mencionado anteriormente al final de cada capítulo; en esta sección se describirán brevemente los resultados más relevantes obtenidos y se explicará la implicación que en su totalidad representan y sus consecuencias sobre la Enología.

Durante el desarrollo de esta tesis se han cumplido los objetivos específicos planteados al principio del trabajo; los cuales llevaron al objetivo final que consistía en profundizar en el estudio de los procesos de oxidación que se pueden producir en los vinos ecológicos debido a su mayor tendencia a sufrir estos procesos y en buscar alternativas para paliar dichos procesos y alcanzar de esta manera, una mejora de la calidad aromática de los vinos orgánicos.

I. Estudio de los procesos de oxidación en los vinos: Para entender con más profundidad los cambios químico-sensoriales que se producen en los vinos debido a los procesos de evolución, especialmente debidos a reacciones de oxidación, se ha realizado un profundo estudio de los fenómenos de oxidación, determinándose los aromas asociados a dichos procesos; así como los compuestos volátiles responsables de dichos aromas, su origen y parámetros que influyen en su formación. Para ello, un paso fundamental fue la elaboración de una ficha de cata específica para descriptores relacionados con los procesos de oxidación; la cual constituye una base de trabajo para la homogeneización y estandarización de vocablos entre catadores, con términos comunes asociados a sensaciones sensoriales. Puede considerarse un útil instrumento de cata para conseguir definir de manera más exacta el estado de oxidación tanto de vinos tintos como blancos.

I.1. Del estudio de la influencia de los procesos de oxidación en los **vinos tintos** sobre la composición química y las percepciones sensoriales, se pueden destacar las siguientes conclusiones:

- Debido a las reacciones de oxidación, tanto natural como forzada, los descriptores que más caracterizan a estos vinos son: “fruta muy madura - fruta pasa - uva pasa”,

“coñac - brandy - vino jerez - vino oloroso - quina” y “vino viejo-vino añejo-vino evolucionado - vino pasado”. A su vez, se ha demostrado que los compuestos más relacionados con su oxidación son los aldehídos, especialmente metional, fenilacetaldehído, furfural, 5-hidroximetilfurfural y 2-metilpropanal; cuya concentración fue superior principalmente en aquellos vinos sometidos a una oxidación forzada.

- Se ha estudiado como se produce un aumento significativo tras un periodo de degradación térmica de los aldehídos metional, furfural, benzaldehído, 5-metil-2-furfural y fenilacetaldehído (previamente descritos en vinos blancos oxidados en la bibliografía) y de los *cis/trans*-5-hidroxi-2-metil-1,3-dioxanos y *cis/trans*-4-hidroximetil-2-metil-1,3-dioxolanos (responsables parcialmente de las notas aromáticas características de los vinos de Oporto); aunque todos ellos excepto el furfural y el 5-metilfurfural, son a su vez, especialmente sensibles a la acción del oxígeno; el cual es el responsable de la subida drástica de sus concentraciones cuando se acompaña de aireación a la acción térmica.
- Se ha conseguido demostrar la existencia de una asociación entre los resultados obtenidos de los ensayos olfatométricos, los análisis cuantitativos, la capacidad antioxidante y las descripciones de sensaciones olfativas; lo cual supone un avance en el conocimiento de los vinos tintos, donde los estudios previos eran más difusos y no se había conseguido alcanzar un grado de concreción tan alto como en los vinos blancos.

I.2. Tras el estudio de las consecuencias a nivel químico y sensorial de los procesos evolutivos en los **vinos blancos**, se han podido obtener las siguientes conclusiones:

- Los vinos blancos estudiados en la presente tesis mostraron tras un periodo evolutivo una bajada global de la concentración de alcoholes y ácidos, particularmente metionol, β -feniletanol y los ácidos hexanoico y octanoico. Para la familia de los ésteres no se encontró un comportamiento común; pero si se obtuvo una disminución de la concentración de ésteres con aromas frescos y frutales, tales como el octanoato de etilo, hexanoato de etilo y acetato de hexilo y un aumento muy marcado del lactato de etilo y el succinato de dietilo, con aromas cremosos/mantequillosos. Además, se confirmó un aumento significativo en las

concentraciones de las familias de cetonas y aldehídos, destacando la presencia de compuestos tales como la acetoina, furfural y benzaldehído. El alcohol isoamílico, el ácido isovaleriánico, el isovalerato de etilo y los aldehídos 2-metilpropanal, 3-metilbutanal y fenilacetaldehído, mostraron valores de OAV particularmente altos en todas las muestras evolucionadas.

- Al igual que en los análisis realizados en los vinos tintos, los dos descriptores sensoriales relacionados con la oxidación que puntuaron más alto y mejor definieron el “aroma a evolución” de los vinos blancos estudiados al final del periodo de evolución, fueron de nuevo: “coñac - brandy - vino jerez - vino oloroso - quina” y “vino viejo, vino añejo - vino evolucionado - vino pasado”. A su vez, los vinos con puntuaciones más altas para estos descriptores fueron aquellos con la concentración mayor de los aldehídos 3-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal. Se ha encontrado una clara relación entre estos tres compuestos y el estado oxidativo de los vinos.

En conclusión, a pesar de las diferencias químicas y sensoriales existentes entre los vinos tintos y blancos, existen unos mecanismos comunes de oxidación por los que se forman los compuestos aldehídicos y unos descriptores característicos comunes a ambos tipos de vinos.

II. Búsqueda de alternativas para paliar los efectos de la oxidación en los vinos ecológicos: Tras el estudio de posibles soluciones para disminuir la tendencia a la oxidación se han obtenido las siguientes conclusiones principales:

- Se ha podido evaluar el uso de diferentes compuestos químicos, algunos de ellos antioxidantes naturales presentes en el vino, mediante su incorporación al vino y la medida de la capacidad antioxidante. Se han podido obtener resultados aún parciales y no definitivos, que requieren de una mayor experimentación para poder aplicarse durante la elaboración de vinos en bodega. Sin embargo, supone una puerta para, si se confirman los resultados, la utilización de nuevas técnicas de elaboración que incluyeran la adición de estos compuestos.
- Se ha conseguido realizar una primera aproximación en la búsqueda y comparación de alternativas al SO₂ para paliar los efectos de la acción térmica y oxidativa en el

vino. Se ha obtenido una diferencia en la resistencia a la degradación, medida mediante voltametría cíclica y caracterización química y sensorial, dependiendo de la utilización de los compuestos químicos ácido ascórbico, resveratrol, SO₂, EDTA, ácido gálico, epicatequina y ácido cafeico. Todas las muestras de vino estudiadas dieron una señal de voltametría característica, mostrando una notable disminución en la intensidad de corriente en aquellas muestras que habían sufrido una degradación más profunda. Con respecto a la composición química de compuestos característicos de la oxidación, la adición tanto de SO₂, como del quelante de metales EDTA, consiguieron frenar parcialmente el incremento de concentración de los compuestos relacionados con los procesos de oxidación. El efecto del EDTA sobre la reducción parcial del efecto oxidativo, confirma la implicación de algunos metales en los procesos de oxidación. Aunque, a nivel sensorial, no se ha podido demostrar la existencia de diferencias significativas entre muestras de vino sometidas a degradaciones térmico-oxidativas y muestras del mismo vino con EDTA adicionado. Sólo se han encontrado diferencias sensoriales significativas en muestras tratadas con SO₂ y en aquellas a las que se había adicionado la mezcla de los polifenoles ácido gálico, epicatequina y ácido cafeico, debido a la aparición en estas últimas muestras de un aroma vegetal fuerte no perceptible en los otros tratamientos.

- La determinación de la capacidad antioxidante mediante la mencionada técnica de voltametría, podría permitir en un futuro, reconducir o modificar estrategias de elaboración de vinos, especialmente ecológicos, con fines a evitar o prevenir su posible deterioro por oxidaciones indeseables. La estandarización aún está distante, pero los beneficios potenciales podrían ser sustanciosos como herramienta de alarma frente a oxidaciones.
- Se ha conseguido demostrar que la selección de cepas de levaduras puede suponer un importante instrumento para conseguir vinos con una menor tendencia a la oxidación. Tras el estudio químico y sensorial a partir de microvinificaciones a escala de laboratorio, se pudieron considerar dos cepas autóctonas de la D.O. Vinos de Madrid, incluidas en la colección del IMIDRA, “CLI 271” y “CLI 87”, como óptimas, no sólo por sus características enológicas generales, sino también, en cuanto a la reducción de aminoácidos precursores de aromas negativos y a la menor

oxidación de los vinos producidos por ellas, contrastada por el análisis de su composición aromática, especialmente de aldehídos y de descriptores sensoriales específicos de oxidación. Además se consiguió profundizar en los estudios de metabolismo de las levaduras, encontrándose una significativa correlación positiva entre los niveles residuales del aminoácido metionina con los aldehídos 3-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal. El descriptor “miel - melaza” se correlacionó positivamente con los valores del aminoácido fenilalanina y del aldehído fenilacetaldehído.

- Estas dos cepas óptimas se ensayaron de forma individual y como coinóculo frente a una cepa comercial a escala de bodega experimental, realizándose un estudio comparativo sobre los parámetros enológicos, químicos y sensoriales de los vinos obtenidos. Se consiguieron elaborar vinos en los que la levadura autóctona seleccionada se impuso sobre la microflora del mosto y con un alto poder fermentativo. Los vinos elaborados gracias a la cepa CLI 271 y su coinóculo, mostraron una calidad tanto aromática como gustativa superior a los vinos elaborados con la levadura comercial; además de puntuar en las catas con valores muy bajos (<2 en una escala de 0 a 10) en descriptores negativos de aromas (aromas de oxidación, alteración y microbiológicos).

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1: ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal
- ANOVA: Análisis de la Varianza
- bp: Pares de bases
- C: Concentración
- °C: Grado Centígrado
- CEE: Comunidad Económica Europea
- cm²: Centímetro cuadrado
- CO₂: Dióxido de Carbono
- D.O.: Denominación de origen
- D.O.Ca.: Denominación de Origen Calificada
- D.O.P.: Denominación de Origen Protegida
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- F.A.: Fermentación Alcohólica
- FID: Detector de ionización de llama
- FPD: Detector fotométrico de llama
- GC: Cromatografía de gases
- GC-FID: Cromatografía de gases con detección por ionización de llama
- GC-MS: Cromatografía de gases con acoplamiento de espectrometría de masas
- GC-O: Cromatografía de gases con acoplamiento de olfatometría
- g: Gramo
- GAP: Grado Alcohólico Probable
- GOT: Glutamato-oxalacetato-transaminasa
- Ha: Hectárea
- hl: Hectolitro
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
- I.G.: Indicación Geográfica

- ISO: International Organization for Standardization
- ITS: Internal Transcribed Spacer (espaciadores intergénicos)
- Kg: Kilogramo
- L: Litro
- L.C.: Límite de cuantificación
- L.D.: Límite de detección
- LLE: Extracción líquido-líquido
- L-MDH: L-malato-deshidrogenasa
- LSA: Levadura Seca Activa
- m: Metro
- mg: Miligramo
- min: Minuto
- ml (mL): Mililitro
- mm: Milímetro
- Mm: milimolar
- NAD: Nicotinamida-adenin-dinucleótido
- n.d.: No detectado
- n.i.: No identificado
- ng: nanogramo
- nm: Nanómetro
- MS: Espectrometría de masas
- OAV: Valor de actividad aromática
- OIV: Organización Internacional de la Viña y el Vino
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PCA: Análisis de Componentes principales
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PF: Poder Fermentativo
- PFBHA: O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamina
- ppb: Partes por billón
- ppm: Partes por millón
- psi: Libras por pulgada cuadrada
- RFLP: Fragmentos de Restricción del Polimorfismo de Longitud
- rpm: Revoluciones por minuto
- SCD: Detector de quimioluminiscencia de azufre

- SGD: *Saccharomyces* Genome Database
- SO₂: Dióxido de azufre
- SPE: Extracción en fase sólida
- SPME: Microextracción en fase sólida
- SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
- SSR: Secuencias Simples Repetidas
- T: Temperatura
- TDN: 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno
- UE: Unión Europea
- ufc: Unidades Formadoras de Colonias
- UV: Ultravioleta
- V: Voltio
- V.C.P.R.D.: Vinos de Calidad Producidos en Regiones Determinadas
- ver.: Versión
- YNB: Yeast Nitrogen Base
- %: Porcentaje
- % C: Porcentaje de citación
- % I: Porcentaje de intensidad
- % MF: Porcentaje de frecuencia modificada
- µL: Microlitro
- µm: Micrómetro o micra
- Mm: Micromolar

ANEXO 2: ENSAYOS PRELIMINARES NECESARIOS PARA EL DESARROLLO DEL CAPITULO 4: “EVALUACIÓN DE DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA EVITAR LOS EFECTOS DEGRADATIVOS OXIDATIVOS Y TÉRMICOS EN VINOS TINTOS ECOLÓGICOS”

2.1. ENSAYOS DE PRESELECCIÓN DE COMPUESTOS CON PRESUNTA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE PARA LOS ESTUDIOS DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA.

Objetivo: buscar las condiciones más adecuadas para la medida de vinos tintos por voltametría cíclica y comprobar que es un método suficientemente sensible para discriminar cambios en muestras dopadas con compuestos con presunta capacidad antioxidante.

Para la consecución de dicho objetivo se realizaron pruebas de medidas de un vino tinto joven comercial a diferentes diluciones desde 1:2 hasta 1:1000 en una solución hidroalcohólica al 12% y se seleccionó la dilución 1:10 como la más adecuada. A partir de la dilución 1:20 se empezaba a perder la forma de la señal, es decir, la “curva” característica). A su vez, se preparó una recta de calibrado con ácido ascórbico para la comprobación de la respuesta del equipo, repetitividad dentro de cada concentración, linealidad hasta concentraciones altas y comprobar posibles problemas de saturación. La calibración fue de 1,62 a 104 mg/L de ácido ascórbico obteniéndose una $R^2=0,9996$. Todos los datos obtenidos fueron satisfactorios. Además se comprobó la posible influencia del pH en la señal. Se realizaron medidas de una solución hidroalcohólica a una concentración fija de ácido ascórbico probándose diferentes valores de pH en los que se puede encontrar un vino tinto (3,0 - 4,5) y se encontró que la intensidad de señal apenas variaba cuando se trabajaba en un pH de entre 3,0 y 3,5; aunque el voltaje al que se producía la máxima intensidad sí parece sufrir un ligero desplazamiento.

Se realizaron calibraciones en paralelo de diferentes compuestos químicos con posible capacidad antioxidante incluidos en una solución hidroalcohólica al 12% a pH 3,4 que simulaba vino sintético y en una solución de vino tinto joven diluido 1:10 en una solución hidroalcohólica al 12% a pH 3,4. Estos últimos ensayos se realizaron para

determinar la posible presencia de efectos-matriz del vino. Se midieron diferentes concentraciones de los siguientes 10 compuestos: ácido ascórbico, cafeico, gálico, ferúlico, α -lipoico, catequina, epicatequina, EDTA, resveratrol y ferrocianuro potásico. También se probaron el ácido cítrico y el glutatión sin obtenerse ningún cambio apreciable en la señal del voltamograma. Se habían seleccionado el ácido ascórbico, glutatión, resveratrol y ácido α -lipoico por ser antioxidantes de origen natural; el ácido cítrico y el EDTA por ser quelantes de metales, el ferrocianuro potásico por ser un precipitante de metales y la catequina, epicatequina y los ácidos ferúlico, cafeico y gálico por ser potentes polifenoles característicos de los vinos. Los rangos de concentración probados y los valores de R^2 de las rectas de calibración se muestran en la Tabla 2.1 a continuación.

Tabla 2.1. Rango de concentraciones de los compuestos estudiados y sus valores de R^2 de las calibraciones de los compuestos puros disueltos en solución hidroalcohólica y en vino tinto diluido. Información utilizada del primer ciclo de oxido-reducción.

| Compuesto | Rango de concentración (ppm) | R^2 (en solución hidroalcohólica) | R^2 (en vino tinto) |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| Ácido ascórbico | 1 - 100 | 0,994726 | 0,992700 |
| Ácido cafeico | 0,03 - 12 | 0,995824 | 0,994604 |
| Ácido ferúlico | 0,03 - 12 | 0,987637 | 0,997921 |
| Ácido gálico | 0,93 - 30 | 0,998280 | 0,997836 |
| Ácido α -lipoico | 1 - 100 | 0,997350 | 0,996531 |
| Epicatequina | 0,93 - 30 | 0,993139 | 0,980078 |
| Catequina | 1 - 50 | 0,990782 | 0,993302 |
| EDTA | 1 - 50 | 0,994487 | 0,935762 |
| Ferrocianuro potásico | 1 - 50 | 0,995775 | 0,996401 |
| Resveratrol | 0,03 - 12 | 0,989948 | 0,996228 |

Cada compuesto obtuvo una intensidad máxima de señal para un voltaje concreto dando una “curva” característica. Se pudo concluir que la Voltametría podría ser interpretada de forma semi-cuantitativa, ya que se obtuvieron rectas de calibrado satisfactorias, sobretodo en solución hidroalcohólica, donde no existen otras sustancias que interfieran. La Figura 2.1 muestra la señal de un vino tinto diluido con cada compuesto de estudio a una misma concentración (alrededor de 6 ppm). Se observa en

verde claro y trazo más grueso el vino tinto diluido sin ningún compuesto y en los otros colores los compuestos estudiados. Se puede observar como cada vino dopado con un compuesto distinto da una señal diferente. En algunos casos la señal es aparentemente parecida en intensidad y forma con el propio vino tinto (ej. ácido ascórbico); o en forma aunque con mayor intensidad (ej. ácido gálico y epicatequina) o señales con formas distintas y menor intensidad máxima de señal (ej. resveratrol y ácido α -lipoico). Al realizar un análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de cada compuesto en dilución hidroalcohólica, se puede observar con claridad una agrupación de las repeticiones de cada compuesto y la separación del ácido ascórbico, resveratrol y ácido gálico respecto a los demás (ver Figura 2.2). Estos tres compuestos por tanto, se seleccionaron para el estudio de compuestos con presunta capacidad antioxidante en vino tinto (capítulo 4). Las muestras de EDTA fueron las únicas que no se agruparon.

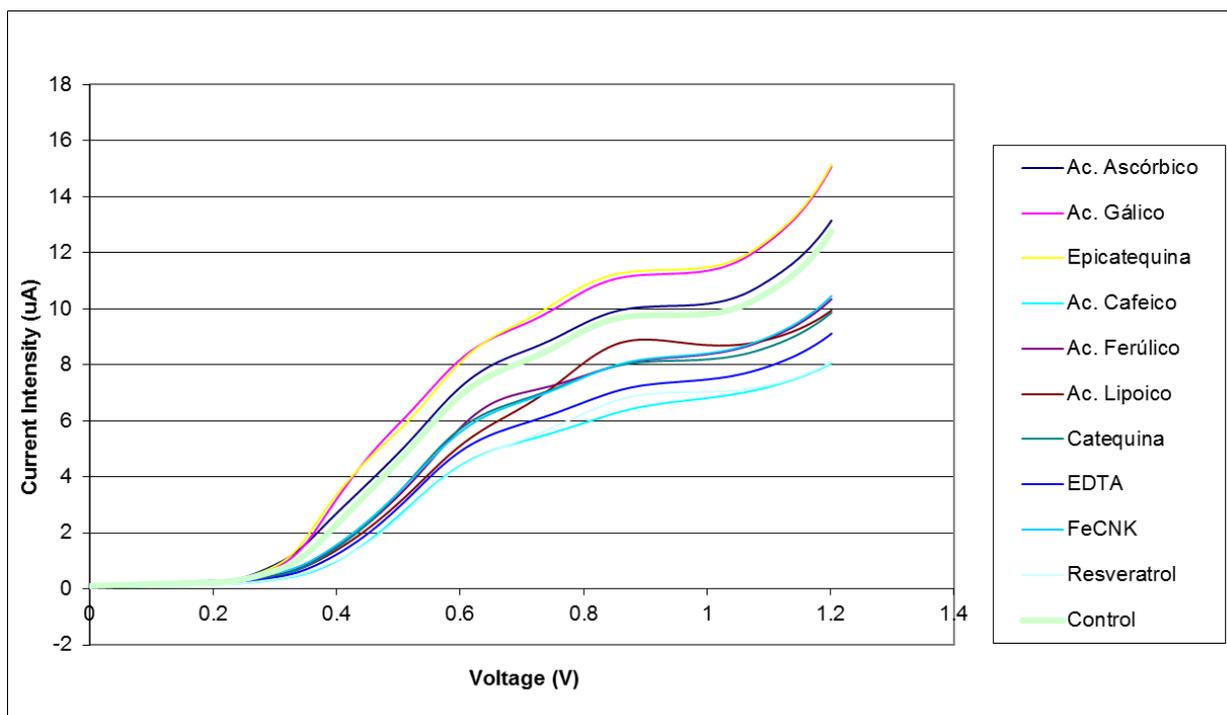


Figura 2.1. Representación de los voltamogramas (oxidación del primer ciclo) de un vino tinto diluido 1:10 en solución hidroalcohólica dopado con 6 ppm de cada compuesto de estudio. FeCNK: Ferrocianuro potásico; Control: Vino tinto diluido sin dopar.

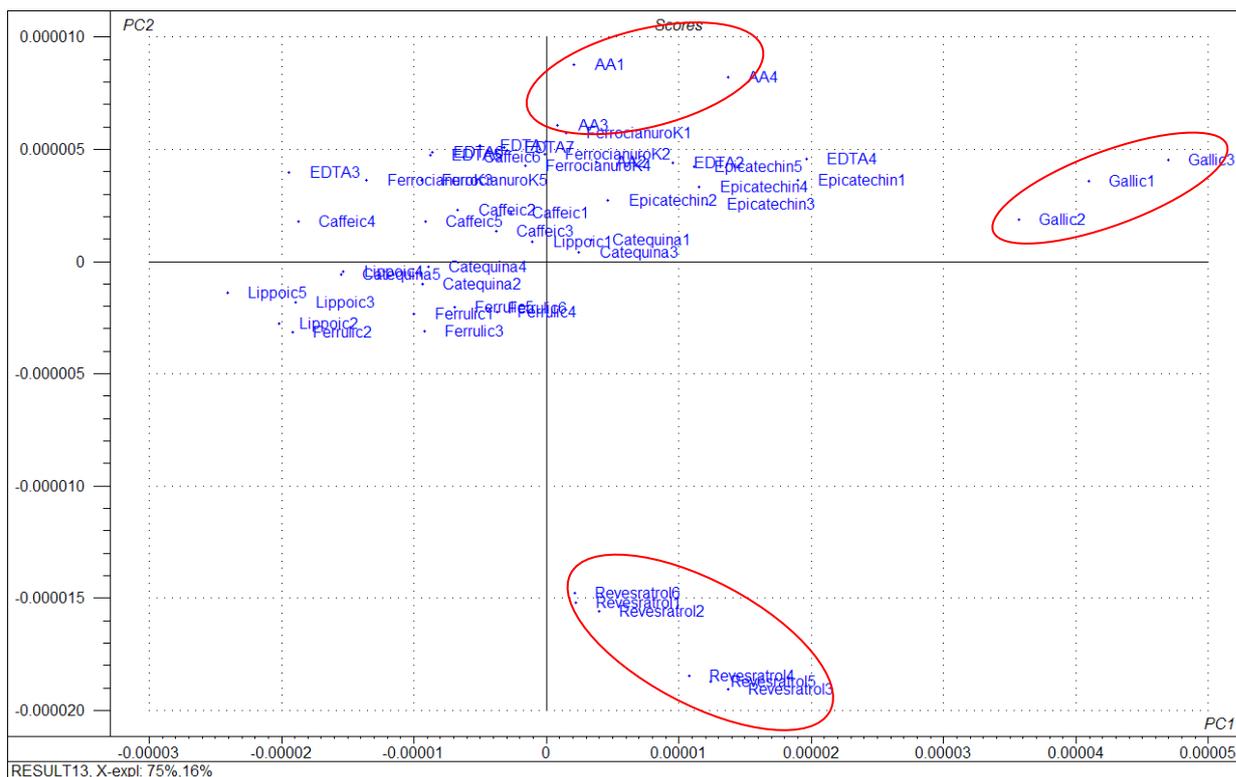


Figura 2.2. PCA de las muestras de compuestos puros en solución hidroalcohólica. Número mínimo de muestras representadas por compuesto:3. AA: Ácido ascórbico.

Además, se realizó otro PCA de las muestras de cada compuesto diluidas en el vino tinto (Figura 2.3); pudiéndose observar la distrinución de todas las muestras de forma separada excepto para la catequina, el ácido ferrúlico y el ferrocianuro potásico que se entremezclaron entre sí. Por tanto, estos compuestos no se consideraron para futuros ensayos. Así mismo, las muestras para el ácido α -lipoico no mantuvieron una buena repetitividad.

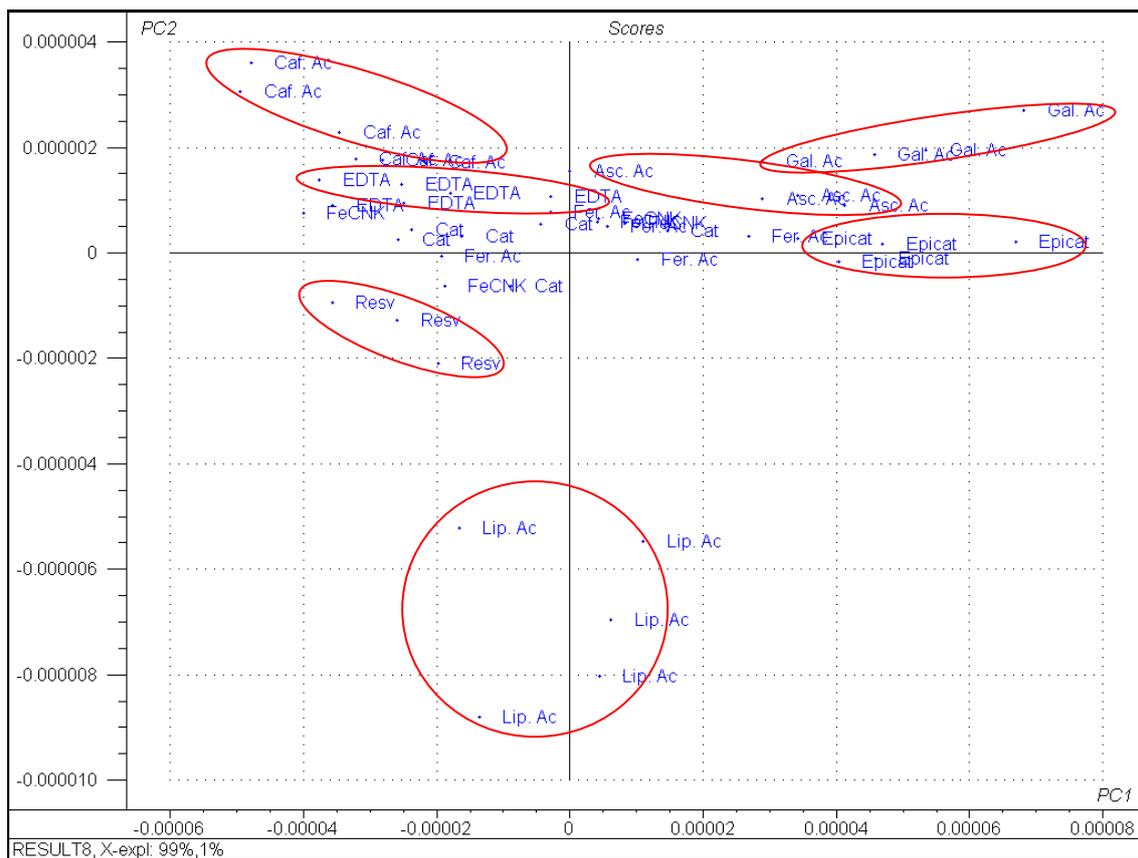


Figura 2.3. PCA de las muestras de compuestos puros diluidos en el vino tinto. Número mínimo de muestras representadas por compuesto:3. Cat: catequina; Epicat: epicatequina; Resv: resveratrol; Lip. Ac: Ácido lipoico; Gal. Ac.: Ácido gálico. Fer. Ac.: Ácido ferúlico; Caf. Ac.: Ácido cafeico; Asc. Ac.: Ácido ascórbico y FeCNK: Ferrocianuro potásico.

En conclusión, se determinó que la dilución óptima de vino tinto para realizar ensayos de voltametría era 1:10 y que los compuestos con presunta capacidad antioxidante para evaluar serían: ácido ascórbico, ácido gálico, EDTA, epicatequina, ácido cafeico y resveratrol.

2.2. ENSAYOS DE PRESELECCIÓN DE FIBRAS (SPME) MEDIANTE ANÁLISIS DE GC-O QUE MEJOR CARACTERICEN EL AROMA DEL VINO

Objetivo: Selección de una fibra para microextracción en fase sólida (SPME) que mejor represente el carácter general del vino.

Para la consecución de dicho objetivo se realizaron pruebas mediante análisis de cromatografía de gases con detección olfatométrica (GC-O) rápida en un equipo Hewlett-Packard HP 5890 con doble puerto olfatorio y a 150°C de temperatura

constante. Las muestras utilizadas fueron: vino tinto, vino blanco, zumo de naranja, coca-cola, cerveza, leche y queso y el método de extracción de las muestras fue mediante microextracción en fase sólida (SPME). Se dispuso de un panel de 7 catadores (4 mujeres y 3 hombres) y se probaron 4 tipos de fibras de SPME. Las fibras usadas (Supelco, Bellefonte, Pa., U.S.A.) estaban cubiertas con diferentes fases estacionarias y de diferente espesor: Azul, polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB), 65 μm ; Blanca, poliacrilato, 85 μm ; Negra, CarboxenTM/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), 75 μm ; Gris, divinilbenceno/Carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), 50/30 μm . Todas las fibras se preacondicionaron antes de su uso insertándolas en el inyector de un equipo de GC durante 60 minutos a 220°C y durante 15 minutos entre cada ensayo.

La técnica de microextracción en fase sólida consistió en poner en contacto a la fibra en el espacio de cabeza de la muestra. Se utilizaron 20 ml de muestra (para líquidos) y 5 g (para sólidos) en un vial cerrado al que se le perforó el septum. De esta forma, se expuso el material adsorbente a la muestra, la cual se encontraba en un baño a 40°C en agitación magnética continua, durante un período de tiempo de 5 minutos. A continuación, se retiró el material adsorbente, sacando la jeringa del vial y se procedió a inyectar en el GC-O donde los analitos se desorbieron dentro del inyector y se procedió a la olfatometría directa por parte de dos miembros del panel a la vez en cada análisis. El tiempo de análisis era de 1 minuto. Además se realizaron también análisis de las fibras sin estar expuestas a ninguna muestra (“blanco”) para comprobar la posible existencia de un aroma de fondo y de incubación con la muestra pero sin exponer la fibra al espacio de cabeza. Ambos ensayos dieron negativo y ningún aroma se pudo distinguir en las olfatometrías posteriores a dichos experimentos.

Los valores de aciertos contabilizados para cada tipo de fibra se muestran en la Tabla 2.2. Se consideró como acierto cuando la persona que realizaba la olfatometría acertaba con precisión la muestra a la que la fibra había sido expuesta. La fibra gris discriminó significativamente para el vino blanco, con tres pares de aciertos simultáneos y cuatro individuales y para el zumo de naranja, con cinco pares de aciertos simultáneos y dos individuales. La fibra negra discriminó significativamente para el vino blanco, con cuatro pares de aciertos simultáneos y un individual; para el vino tinto, con tres pares de aciertos simultáneos y tres individuales y para el zumo de naranja, con cuatro pares de aciertos simultáneos y dos individuales. La fibra azul discriminó significativamente para el vino blanco, con tres pares de aciertos y tres individuales;

para el zumo de naranja, con cuatro pares de aciertos simultáneos y dos individuales y para la Coca-Cola, con tres pares de aciertos simultáneos y tres individuales.

Tabla 2.2. Número de aciertos totales para cada fibra. 14 pruebas por muestra con cada fibra. Existencia de discriminación significativa: ^a($p < 0,001$), ^b($p < 0,01$) y ^c($p < 0,05$).

| Muestra | Fibra Gris | Fibra Negra | Fibra Azul | Fibra Blanca |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|
| Vino blanco | 10 ^b | 9 ^c | 9 ^c | 2 |
| Vino tinto | 7 | 9 ^c | 7 | 1 |
| Zumo de naranja | 12 ^a | 10 ^b | 10 ^b | 2 |
| Coca-Cola | 7 | 6 | 9 ^c | 4 |
| Cerveza | 5 | 6 | 6 | 1 |
| Leche | 0 | 2 | 1 | 4 |
| Queso | 7 | 8 | 4 | 3 |
| Número de aciertos totales | 48 | 50 | 46 | 17 |

Se obtuvo que la fibra con valores discriminativos más altos era la fibra negra; además de ser la única que daba una discriminación estadísticamente significativa tanto para vino blanco como para el tinto; es decir, los catadores fueron capaces no sólo de determinar que la muestra inyectada era un vino, sino que también fueron capaces de distinguir entre un vino blanco y un tinto. Por tanto, se escogió la fibra negra para realizar los posteriores ensayos destinados a la obtención y comparación de una “huella aromática” de muestras de vino tinto que habían sido sometidas a diferentes tratamientos para el estudio de compuestos con presunta capacidad antioxidante en vino tinto (capítulo 4).

ANEXO 3: PROTOCOLOS PARA LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS DE LEVADURA AISLADAS

3.1 EXTRACCIÓN DEL ADN:

En la identificación genética de las levaduras, el primer paso necesario es la extracción del ADN. Para la obtención de la biomasa, la levadura a identificar se inocula en 25 ml de medio YPD líquido (Yeast Peptone Dextrose) (extracto de levadura 1%, peptona 1% y glucosa 2%) y se incuba a 28°C, con agitación de 128 rpm durante 24 - 48 horas (Minitron INFORS). Para la extracción del ADN se utiliza un kit comercial de extracción de ADN para levaduras (ArchivePure DNA Purification System) de la casa comercial 5 Prime (Eppendorf). Se utilizó el protocolo a continuación indicado:

Lisis celular:

1. Añadir 1 mL de un cultivo de al menos 12 horas ($1-2 \times 10^8$ células/mL) a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Mantener en hielo.
2. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto, tirar el sobrenadante.
3. Añadir 300 μ L de Cell Suspensión Solution y resuspender el pellet.
4. Añadir 1,5 μ L de Lytic Enzyme Solution, homogeneizar.
5. Incubar a 37° durante 30 minutos para digerir las células.
6. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto. Tirar el sobrenadante.
7. Añadir 300 μ L de Cell Lysis Solution y resuspender el pellet.

Precipitación de proteínas:

1. Añadir 100 μ L de Protein Precipitation Solution al lisado de células.
2. Agitar en Vortex a la máxima velocidad durante 20 segundos.
3. Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos. Debe formarse un pellet, de no ser así, repetir el paso 2 seguido de una incubación en hielo de 5 minutos y luego repetir el paso 3.

Precipitación del ADN:

1. Recoger el sobrenadante con el ADN en un eppendorf de 1,5 mL que contenga 300 μ L de Isopropanol al 100%.
2. Mezclar por inversión 50 veces.

3. Centrifugar a 14.000 durante 1 minuto, el ADN debería observarse como un pequeño pellet blanco.
4. Tirar el sobrenadante y secar el tubo con papel absorbente. Añadir 300 μL de etanol al 70% e invertir el tubo varias veces para lavar el pellet.
5. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto. Tirar el etanol.
6. Invertir y secar el tubo con papel absorbente, secar en el Speed-Vac (Thermo electro Corporation) de 5 a 10 minutos a 35°C.

Rehidratación del ADN y tratamiento con RNA-asa:

1. Añadir 50 μL de DNA Hydration Solution.
2. Añadir 1,5 μL de RNA-asa A Solution para purificar la muestra.
3. Mezclar con vortex 1 segundo y recoger todo el líquido. Incubar a 37°C durante 1 hora.
4. Para que el DNA se continúe hidratando, incubar otra hora a 65°C o dejar toda la noche a temperatura ambiente.
5. Guardar las muestras a 4°C. Para largos períodos de conservación congelar a -20°C o -80°C.

3.2 CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO:

Las técnicas de Biología Molecular utilizadas para la identificación molecular requieren un alto grado de pureza del ADN. Para la cuantificación del ADN se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) que cubre el rango espectral de 220 a 750 nm. Éste permite obtener datos numéricos de la concentración del ADN extraído, siendo la ideal aquella comprendida entre 20-80 ng/ μL .

3.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS:

La identificación molecular de las levaduras se llevó a cabo a través de técnicas de Biología Molecular que se basan en la utilización de las descritas a continuación:

- A. Estudio de las secuencias de los espaciadores intergénicos: regiones ITS del ADNr mediante PCR: la amplificación de la región ITS del ADN ribosómico se lleva a cabo añadiendo 1,5 µL del ADN objeto de estudio a 18,5 µL de una mezcla para PCR compuesta de los siguientes productos:

Tabla 3.1. Componentes de la mezcla para la realización de la PCR.

| Compuesto | Concentración del Stock | µL/20µL de reacción |
|---------------------|-------------------------|---------------------|
| MgCl ₂ | 25 mM | 1,6 |
| dNTP | 10 mM | 0,4 |
| Buffer | 10 X | 2 |
| Primers ITS1 y ITS4 | | 0,4 |
| Taq-DNA polimerasa | 5 U/µL | 0,2 |
| Agua | Pura | 14,5 |
| ADN | 20-80 ng/µL | 1,5 µL |

Los primers utilizados son: ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') y ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') suministrados por MWG Biotech AG (Ebersberg, Alemania). Las condiciones de la PCR son las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante un minuto, alineamiento a 55°C durante 1 minuto, una extensión durante 1,5 minutos a 72°C; y una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Todas las PCRs son realizadas en un termociclador MRW Biotech.

- B. Análisis de los fragmentos de restricción del polimorfismo de longitud (RFLP): esta técnica sirve para determinar si la cepa estudiada pertenecía a la especie *S. cerevisiae*. La determinación de los RFLPs se realiza sobre el producto de la PCR-ITS utilizando las endonucleasas de restricción HaeIII, CfoI e HinfI (Promega Biotech). La digestión se realiza a 37°C durante la

noche. La mezcla para la digestión por dichas enzimas de restricción es la siguiente:

Tabla 3.2. Mezcla de digestión enzimática.

| Compuesto | μL de reacción |
|---|----------------|
| Enzima (<i>HinfI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>CfoI</i>) | 0,5 |
| Buffer | 1 |
| Agua | 3,5 |
| ADN | 5 |

- C. Análisis mediante Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) (Simple Sequences Repeats Multiplex): esta técnica sirve para diferenciar a nivel de cepa dentro de la especie *S. cerevisiae*. Se analizaron tres microsatélites en una reacción múltiple (multiplex): SC8132X, YOR267C y SCPTSY7, para los cuales se utilizaron los primers indicados en la Tabla 3.3, todos ellos de MGW Biotech AG (Ebersberg, Alemania), dichos microsatélites fueron elegidos por su alto grado de polimorfismo (Field y Wills, 1998; González Techera et al., 2001; Vaudano y García-Moruno, 2008).

Tabla 3.3. Relación de primers utilizados en la técnica SSR multiplex.

| LOCUS | CROMOSOMA | PRIMER | Referencia Bibliográfica |
|---------|-----------|---|---|
| SC8132X | XVI | FW: CTGCTCAACTTGTGATGGGTTTTGG RV: CCTCGTTACTATCGTCTTCATCTTGC | Field y Wills (1998). |
| YOR267C | XV | FW: GGTGACTCTAACGGCAGAGTGG RV: GGATCTACTTGCAGTATACGGG | Field y Wills (1998). González-Techera et al., (2001). |
| SCPTSY7 | XIII | FW: AAAAGCGTAAGCAATGGTGTAGAT RV: AAATGATGCCAATATTGAAAAGGT | Pérez et al., (2001). Vaudano y García-Moruno (2008). |

La mezcla de reacción de la PCR multiplex fue la siguiente:

Tabla 3.4: Mezcla de reacción para PCR multiplex.

| Componente | μL en 20 de reacción | Concentración |
|---------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| MgCl₂ (25mM) | 2,5 | 3,1 mM |
| dNTP (10 mM) | 0,8 | 0,4 mM |
| Buffer 10X | 2 | 1X |
| Primer SCPTSY7 | 4 | 2 μM |
| Primer SC8132X | 1,5 | 0,75 μM |
| Primer SCYOR267C | 1 | 0,5 μM |
| Taq-DNA polimerasa 5U/μL | 0,4 | 0,1 U/μL |
| ADN | 1,5 | 25-100 ng por reacción |

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: precalentamiento inicial a 94°C durante 4 minutos; 28 ciclos de: 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 45 segundos, 72°C durante 30 segundos; un ciclo final a 72°C durante 10 minutos. (Vaudano y García-Moruno, 2008).

3.4 VISUALIZACIÓN DE LOS PERFILES GENÉTICOS:

La visualización de los perfiles genéticos se llevó a cabo por electroforesis en un gel de agarosa a una concentración de 1,4% en el caso de la PCR-ITS y de 2,5% en el caso de los RFLP y SSR, diluida en un tampón TBE 1X (Tris/Borate/EDTA). A esta mezcla se le añadió 5μL/mL de Bromuro de etidio como agente intercalante. Para las técnicas de PCR-ITS, RFLP y SSR se utilizó un marcador molecular de 100 pb “100 pb ladder” (Promega). El gel fue sometido a un campo eléctrico de 100 V durante 120 minutos. Finalizada la electroforesis se procedió a la visualización del gel en un transiluminador UV (Spectroline U.V. Transilluminator) y posteriormente al fotografiado del mismo con una cámara acoplada al sistema (Gel Logic 200 Imaging

System, Kodak). Para el análisis de los tamaños de los fragmentos de restricción se utilizó el software Kodak Molecular Image Software.

3.5 ANÁLISIS GENÓMICO DE LAS LEVADURAS:

Para el diseño de los oligonucleótidos empleados en la amplificación de por PCR se utilizó la base de datos y el software de *Saccharomyces Genome Database* (SGD, genome-www.stanford.edu). Para el diseño de primers para el análisis SSR se utilizó el software *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

3.6 REFERENCIAS:

- Vaudano, E. & García-Moruno, E., (2008). Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology*, 25, 56-64.
- Field, D. & Wills, C. (1998). Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellite in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressure and a variety of selective forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 1647-1652.
- González-Techera, A., Jubany, S., Carrau, F.M. & Caggero, C. (2001). Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 71-75.
- Pérez, M.A., Gallego, F.J., Martínez, I. & Hidalgo, P. (2001). Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 461- 466.

ANEXO 4: PARÁMETROS PARA EL SEGUIMIENTO DE LAS MICROFERMENTACIONES

4.1 TOMA DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO:

Se tomaron muestras de todos los fermentadores a los siguientes tiempos para comprobar el correcto arranque y seguimiento de la fermentación: $t = 0h$, $t = 4,5 h$, $t = 24 h$, $t = 48 h$, $t = 72 h$, $t =$ mitad de fermentación (aproximadamente 5 días) y $t =$ final de fermentación (aproximadamente 13 días).

Los fermentadores se pesaron todos los días que duró la fermentación alcohólica a la misma hora.

4.1.1 Procesamiento de muestras para el seguimiento de la fermentación:

- Medida de Absorbancia a 600 nm (x2 cada muestra). Volumen de muestra recogido: 1 ml.

Cubetas transparentes de 1 ml de volumen. Diluciones medidas 1:20 (50 μ l muestra + 950 agua milli-Q) para muestras $t = 0$ y $t = 4h$. Dilución 1:10 para resto de muestras (dilución dependerá del oscurecimiento de la muestra a lo largo de la fermentación).

- Ensayo de viabilidad mediante siembra en placa. Volumen de muestra recogido bajo condiciones de esterilidad: 1 ml (“0”).

Realizar diluciones en serie desde muestra “0”: 10^{-1} (“-1”), 10^{-2} (“-2”), 10^{-3} (“-3”), 10^{-4} (“-4”), 10^{-5} (“-5”) y 10^{-6} (“-6”).

Procesamiento: Se deposita en placa LM 100 μ l de cada dilución, se esparce la muestra mediante bolitas estériles y se deja en incubadora 48 horas a 28°C. Pasado este tiempo se cuentan las colonias crecidas en las placas. Nos quedamos con el resultado de las placas que tengan un crecimiento de entre 30-300 colonias.

- Medida peso seco. Volumen de muestra recogido: 2ml. Se deposita el volumen en crisoles previamente marcados y pesados que han estado al menos 24 horas en un horno a 105°C. Pesar de nuevo una vez depositadas las muestras.

Dejar incubando a 105°C hasta que se haya secado totalmente la muestra y pesar de nuevo.

4.1.2 Procesamiento de muestras de final de fermentación:

- Centrifugación en tubos eppendorf a 4 °C a 3000 rpm durante 5 minutos. Volumen de muestra recogido: 4 mL.

- Análisis de aminoácidos y de SO₂ de las muestras una vez terminada la fermentación alcohólica.

4.1.3 Análisis de muestras de final de fermentación:

Para las microfermentaciones realizadas en mosto natural, además de los análisis anteriormente especificados en los puntos 1 y 2 se tomaron muestras para los siguientes análisis:

Análisis Enológicos (Volumen de muestra recogido: **200 mL**):

- Acidez (50 mL)
- pH
- Grado alcohólico (100 mL)
- Azúcares reductores (50 mL)

Análisis de aromas (Volumen de muestra recogido: **80 mL**):

- Análisis compuestos mayoritarios (2,7 mL)
- Análisis aldehídos (10 mL)
- Análisis sensorial: olfacción en copa (50 mL). Fichas de cata general, de términos específicos de oxidación y grado de oxidación

4.2 GRÁFICAS FERMENTACIONES EN MOSTO ARTIFICIAL

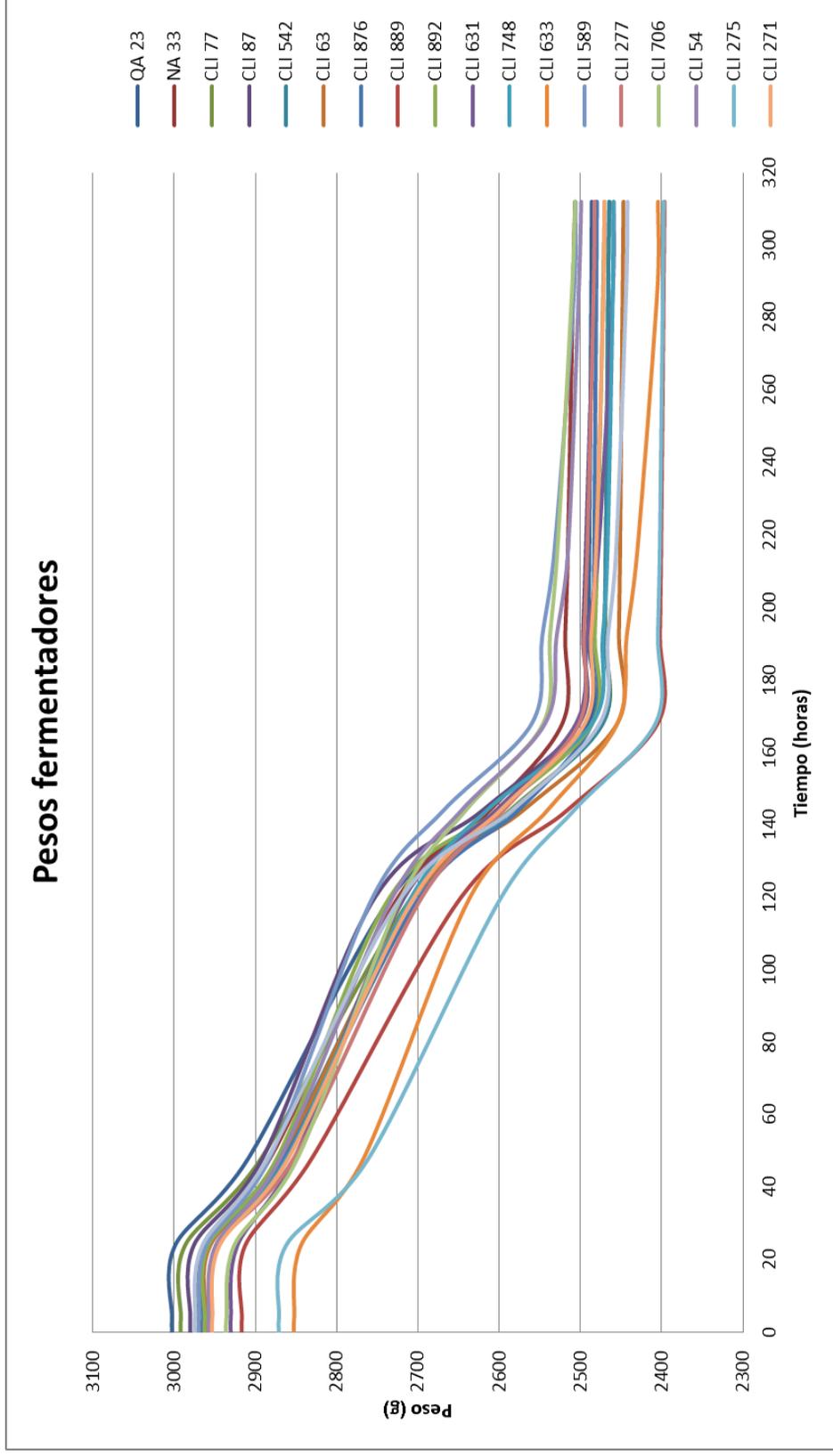


Fig 4.2.1. Representación de la bajada de peso en los fermentadores durante la fermentación de las levaduras de estudio en mosto artificial MS-300.

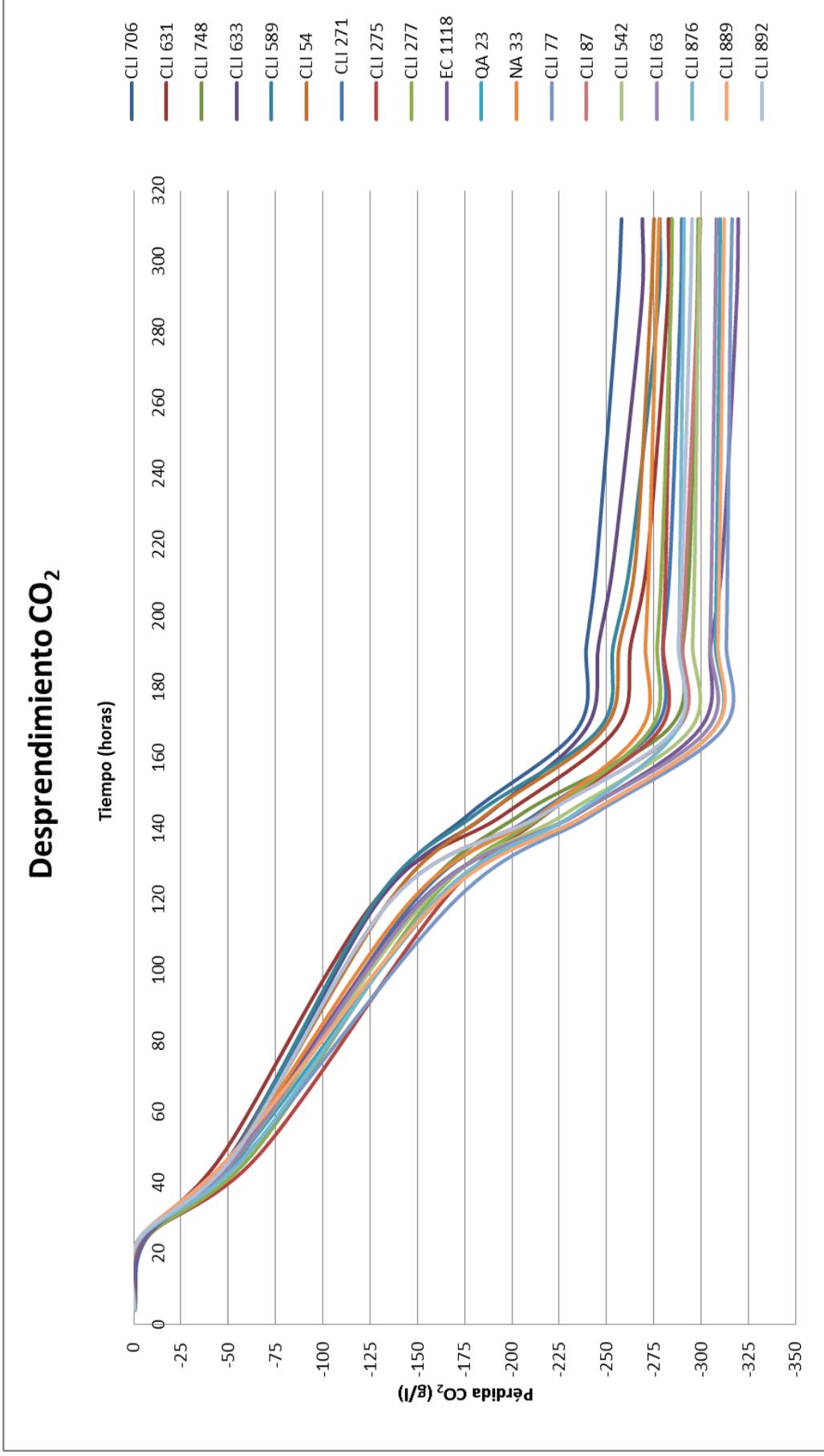


Fig 4.2.2 Representación de la pérdida de CO₂ (g/L) durante la fermentación de las levaduras de estudio en mosto artificial MS-300.

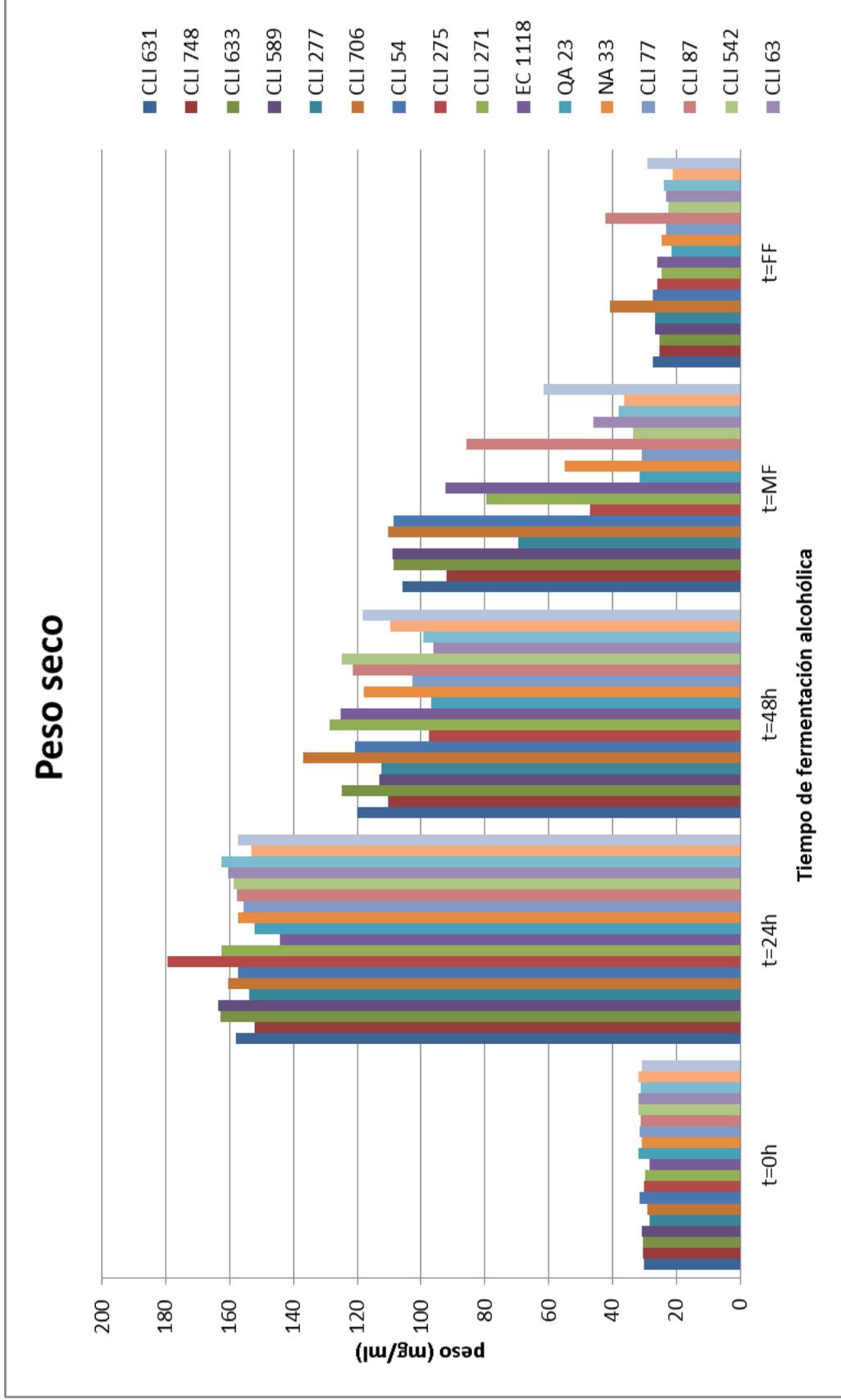


Figura 4.2.3 Representación de las medidas de peso seco durante la fermentación de las levaduras de estudio en mosto artificial MS-300. MF: mitad fermentación. FF: final fermentación.

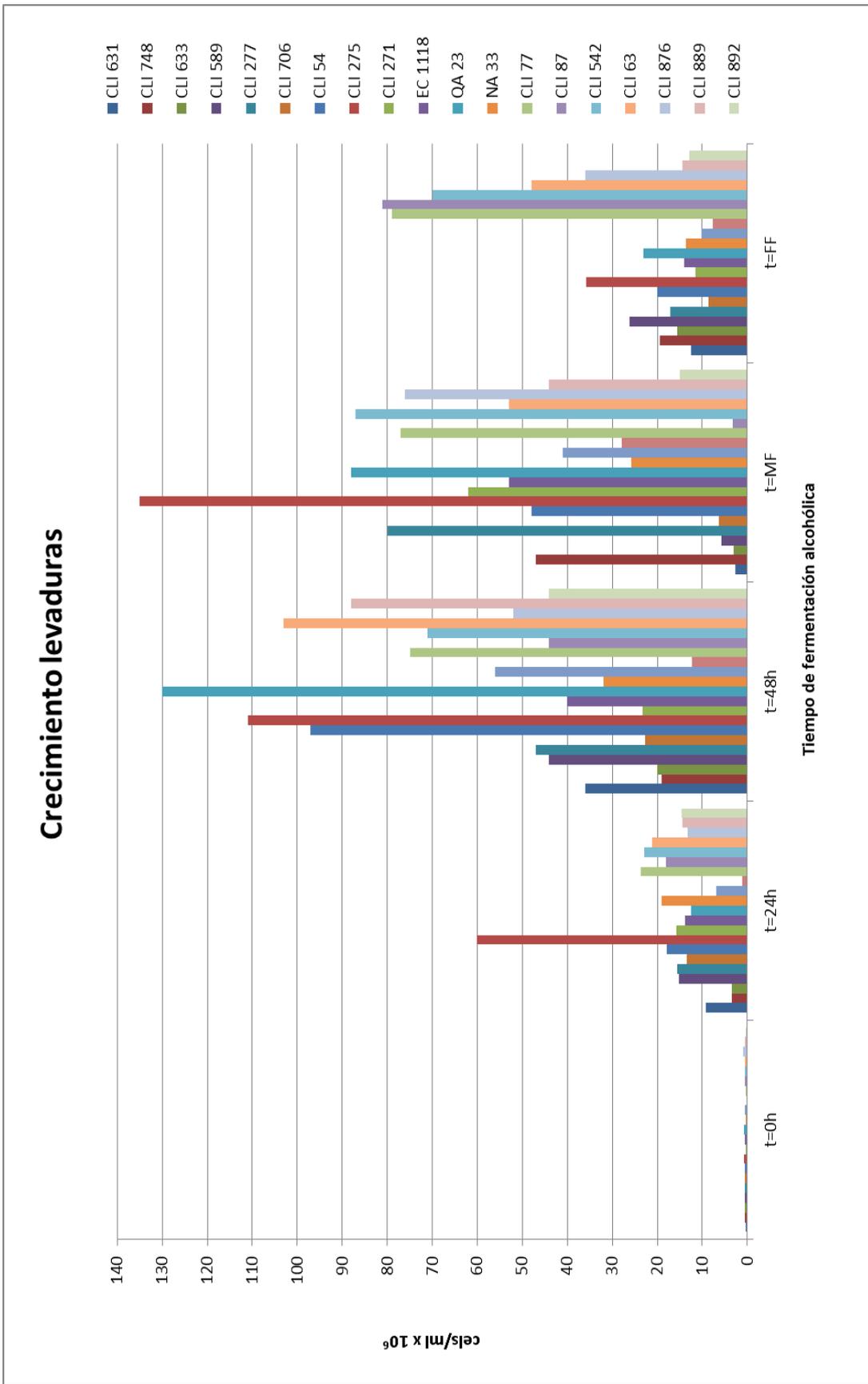


Figura 4.2.4 Representación de la viabilidad de las cepas de levadura durante la fermentación en mosto artificial MS-300. MF: mitad fermentación. FF: final fermentación.

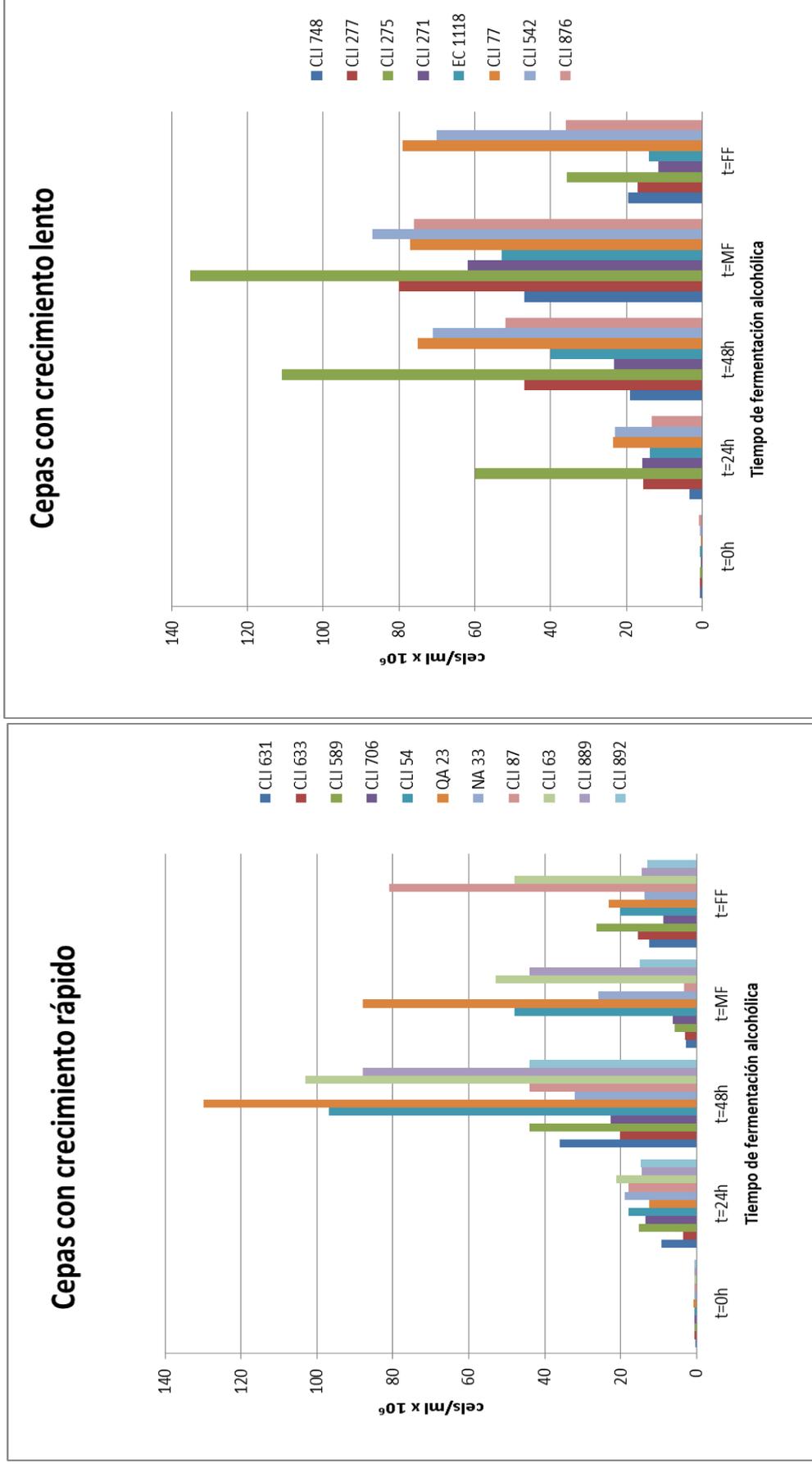


Figura 4.2.5 Representación del crecimiento de las cepas de levadura durante la fermentación en mosto artificial MS-300. “Cepas de crecimiento rápido” (máximo crecimiento a las 48 horas) y “cepas de crecimiento lento” (máximo crecimiento pasadas 48 horas). MF: mitad fermentación. FF: final fermentación.

Tabla 4.1. Unidades de Densidad Óptica (600nm) de muestras de los fermentadores tomadas a diferentes tiempos. MF: mitad fermentación. FF: final fermentación.

| Tiempo | CLI 631 | CLI 748 | CLI 633 | CLI 589 | CLI 277 | CLI 706 | CLI 54 | CLI 275 | CLI 271 | EC 1118 | QA 23 | NA 33 | CLI 77 | CLI 87 | CLI 542 | CLI 63 | CLI 876 | CLI 889 | CLI 892 |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|-------|-------|--------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|
| 4h | 1,29 | 1,60 | 1,43 | 1,96 | 2,36 | 1,73 | 2,03 | 1,45 | 1,75 | 2,75 | 1,61 | 1,56 | 1,94 | 1,39 | 1,44 | 1,56 | 1,59 | 1,55 | 1,63 |
| 24h | 2,96 | 3,92 | 2,13 | 2,78 | 3,38 | 2,08 | 2,76 | 3,28 | 2,54 | 2,15 | 4,78 | 4,21 | 4,61 | 4,02 | 3,21 | 3,97 | 3,88 | 3,40 | 3,11 |
| 48h | 4,81 | 3,23 | 3,44 | 4,21 | 3,47 | 3,48 | 5,14 | 8,94 | 3,64 | 5,12 | 8,69 | 6,81 | 8,49 | 4,21 | 8,23 | 8,06 | 9,69 | 7,09 | 6,42 |
| MF | 2,13 | 5,77 | 2,74 | 2,83 | 6,85 | 2,70 | 4,88 | 8,22 | 5,55 | 5,74 | 7,91 | 3,21 | 7,81 | 0,25 | 7,13 | 4,96 | 6,95 | 3,72 | 3,03 |
| FF | 3,99 | 7,69 | 8,40 | 8,55 | 9,06 | 9,68 | 7,59 | 8,82 | 8,97 | 7,79 | 5,71 | 3,85 | 7,80 | 2,45 | 7,33 | 6,85 | 7,37 | 3,30 | 3,68 |

4.3 GRÁFICAS FERMENTACIONES EN MOSTO NATURAL

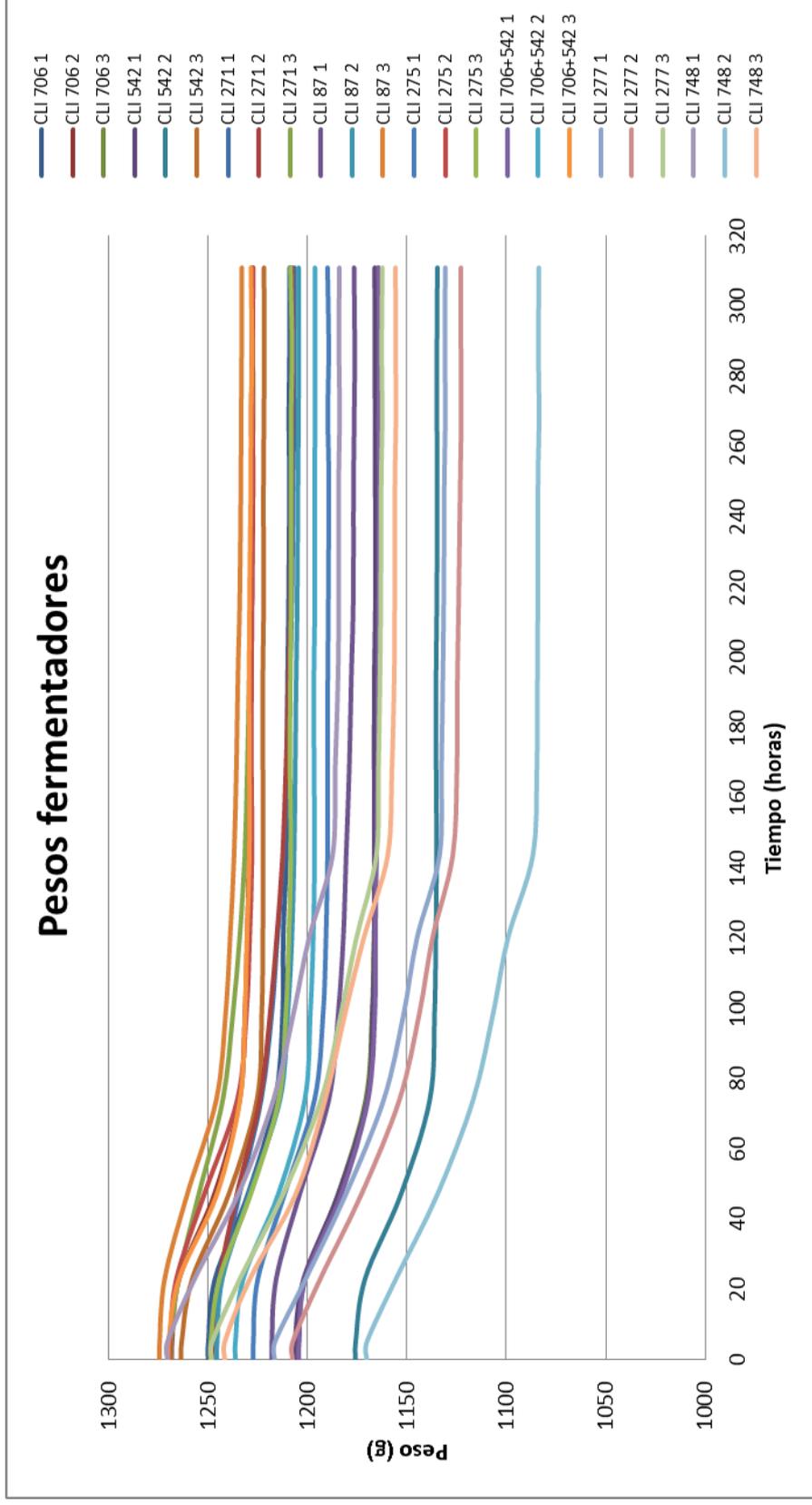


Figura 4.3.1 Representación de la bajada de peso en los fermentadores durante la fermentación de las levaduras de estudio en mosto natural.

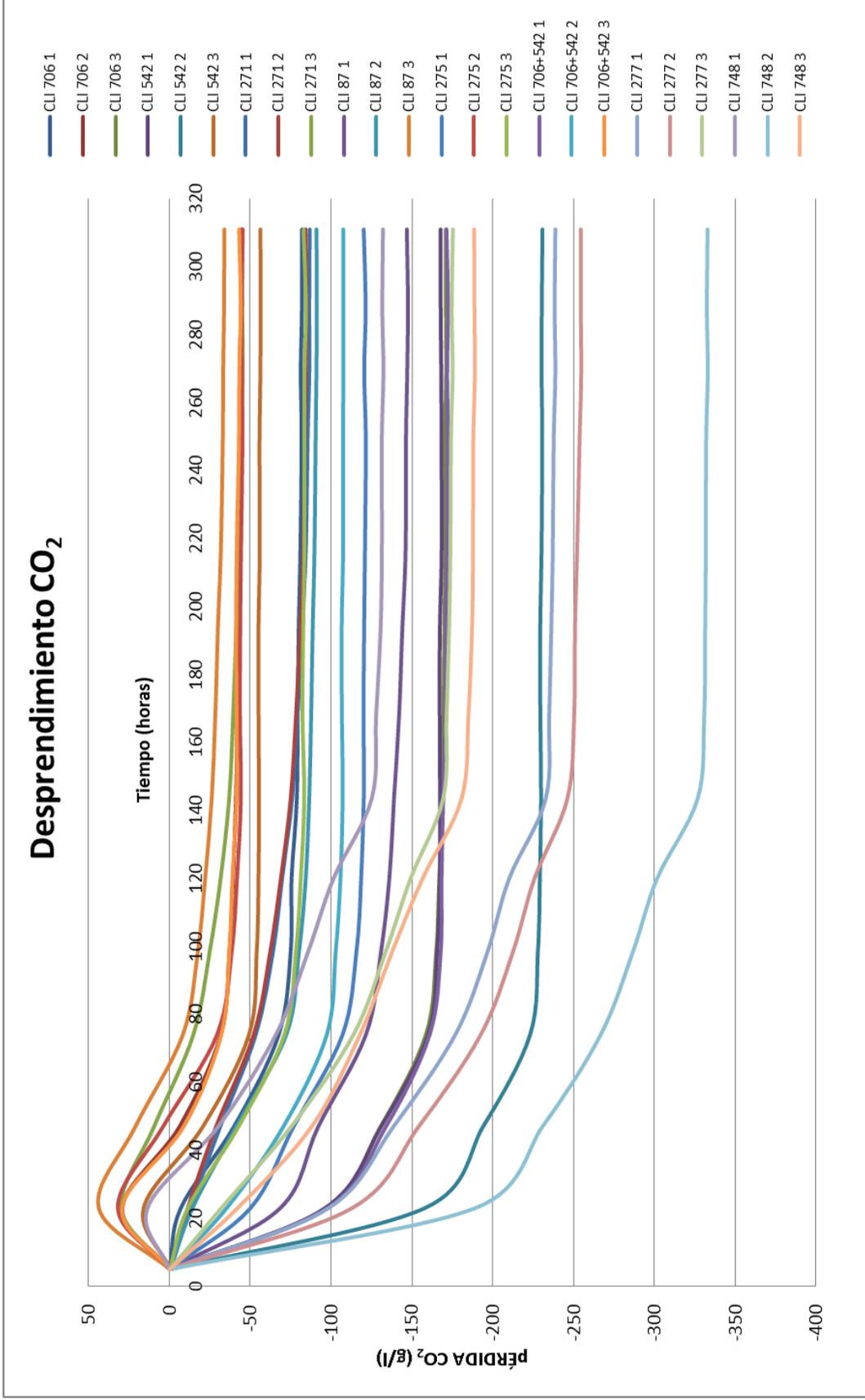


Figura 4.3.2 Representación de la pérdida de CO₂ (g/L) durante la fermentación de las levaduras de estudio en mosto natural.

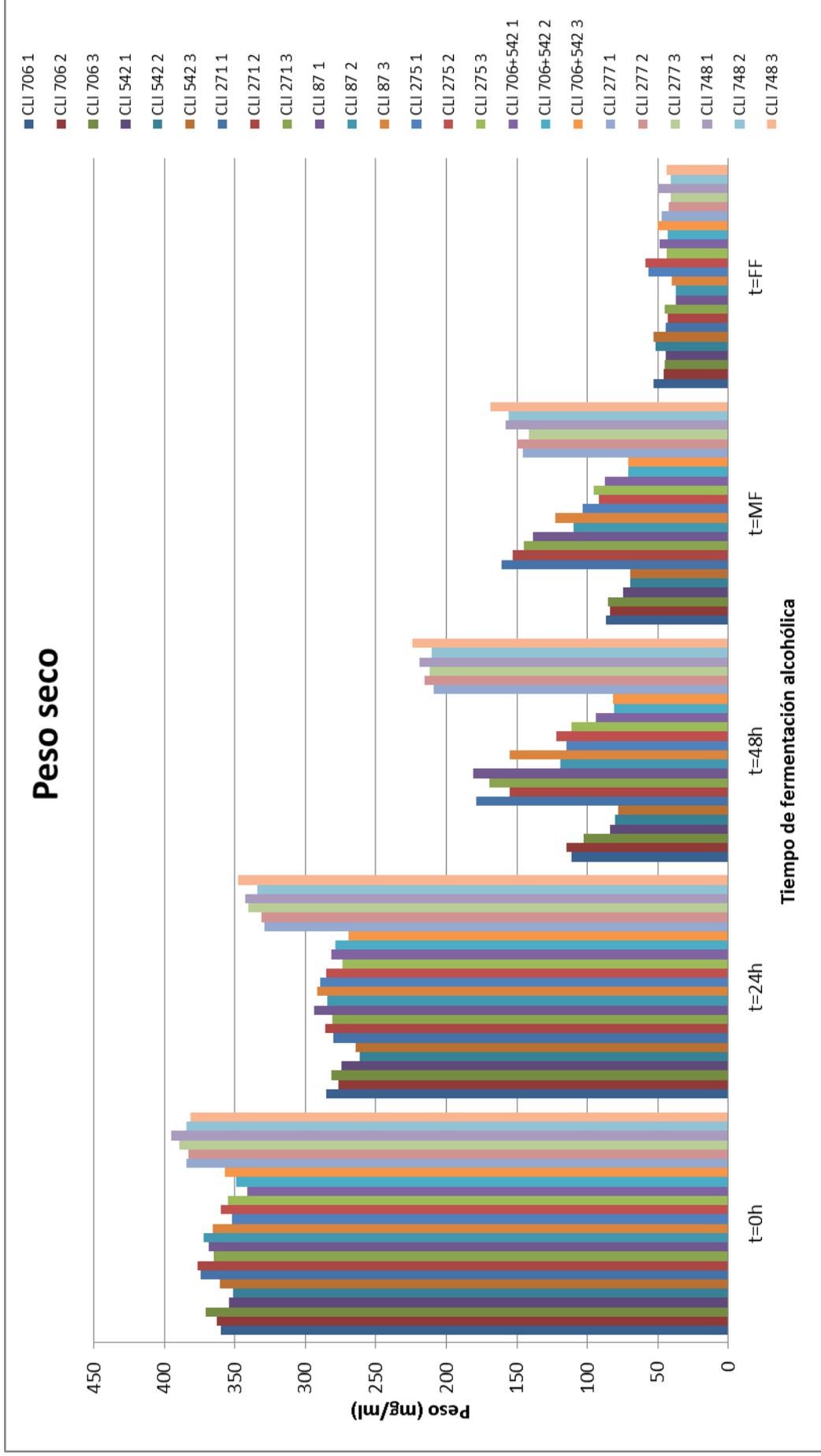


Figura 4.3.3 Representación de las medidas de peso seco durante la fermentación de las levaduras de estudio en mosto natural. MF: mitad fermentación. FF: final fermentación. **Nota:** pesos a t=0h y t=24h erróneos (tarado inicial incorrecto de los crisoles utilizados para el análisis).

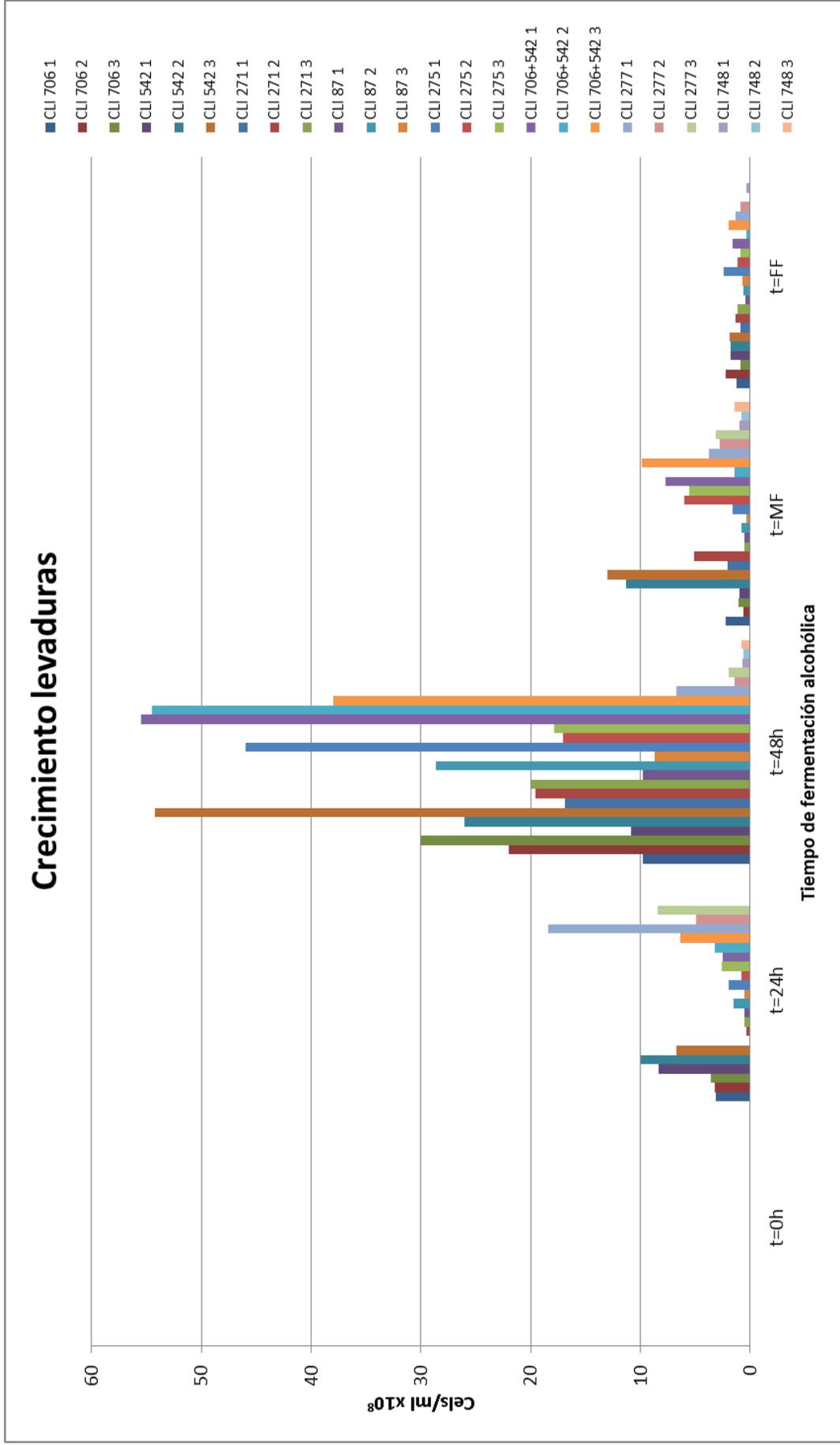


Figura 4.3.4 Representación de la viabilidad de las cepas de levadura durante la fermentación en mosto natural. MF: mitad fermentación. FF: final fermentación.

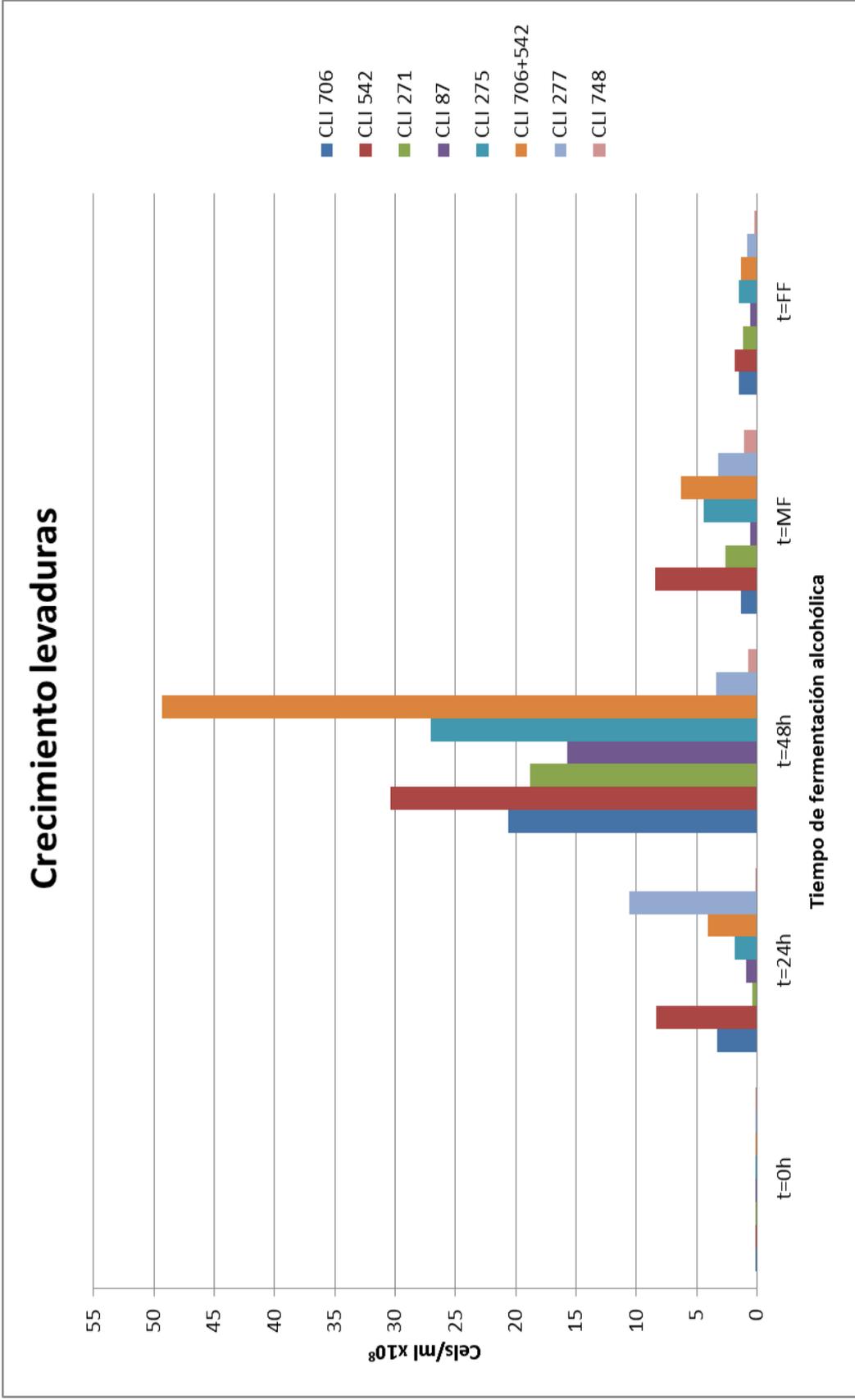


Figura 4.3.5 Representación del crecimiento de la media de las repeticiones de las cepas de levadura durante la fermentación en mosto natural. MF: mitad fermentación. FF: final fermentación.

ANEXO 5: PARÁMETROS PARA EL SEGUIMIENTO DE LAS VINIFICACIONES A ESCALA BODEGA

5.1 EVOLUCIÓN DE LA DENSIDAD DE LOS DEPÓSITOS

Tabla 5.1. Medidas de densidad y temperatura de los depósitos de fermentación de la bodega. (Condiciones de medida en laboratorio a 20°C y tras centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos).

| MUESTRA | FECHA | DENSIDAD (g/mL) | T ^a (°C) | OBSERVACIONES |
|----------------------|-----------------|-----------------|---------------------|---|
| MOSTO INICIAL | 17-09-10 | 1,095 | 16,0 | medida en laboratorio tras centrifugación |
| LSA_1 | 20-09-10 | 1,078 | 17,1 | medida en bodega |
| LSA_1 | 21-09-10 | 1,072 | 15,7 | medida en bodega |
| LSA_1 | 22-09-10 | 1,063 | 15,9 | medida en bodega |
| LSA_1 | 23-09-10 | 1,047 | 15,7 | medida en bodega |
| LSA_1 | 24-09-10 | 1,033 | 15,8 | medida en bodega |
| LSA_1 | 27-09-10 | 1,000 | 15,7 | medida en bodega |
| LSA_1 | 28-09-10 | 0,996 | 16,0 | medida en bodega |
| LSA_1 | 28-09-10 | 0,990 | 20,0 | medida en laboratorio tras centrifugación |
| LSA_2 | 20-09-10 | 1,080 | 17,2 | medida en bodega |
| LSA_2 | 21-09-10 | 1,075 | 15,8 | medida en bodega |
| LSA_2 | 22-09-10 | 1,065 | 15,9 | medida en bodega |
| LSA_2 | 23-09-10 | 1,048 | 15,6 | medida en bodega |
| LSA_2 | 24-09-10 | 1,039 | 15,8 | medida en bodega |
| LSA_2 | 27-09-10 | 1,001 | 16,0 | medida en bodega |
| LSA_2 | 28-09-10 | 0,996 | 16,1 | medida en bodega |
| LSA_2 | 28-09-10 | 0,991 | 19,4 | medida en laboratorio tras centrifugación |
| CLI 271_1 | 20-09-10 | 1,035 | 17,2 | medida en bodega |
| CLI 271_1 | 21-09-10 | 1,023 | 15,8 | medida en bodega |
| CLI 271_1 | 22-09-10 | 1,015 | 15,9 | medida en bodega |
| CLI 271_1 | 23-09-10 | 1,007 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 271_1 | 24-09-10 | 1,002 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 271_1 | 27-09-10 | 0,996 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 271_1 | 28-09-10 | 0,993 | 16,0 | medida en bodega |
| CLI 271_1 | 28-09-10 | 0,988 | 20,0 | medida en laboratorio tras centrifugación |
| CLI 271_2 | 20-09-10 | 1,050 | 17,2 | medida en bodega |
| CLI 271_2 | 21-09-10 | 1,032 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 271_2 | 22-09-10 | 1,026 | 15,9 | medida en bodega |
| CLI 271_2 | 23-09-10 | 1,016 | 15,6 | medida en bodega |
| CLI 271_2 | 24-09-10 | 1,011 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 271_2 | 27-09-10 | 1,000 | 15,9 | medida en bodega |
| CLI 271_2 | 28-09-10 | 0,997 | 15,8 | medida en bodega |
| CLI 271_2 | 28-09-10 | 0,993 | 20,0 | medida en laboratorio tras centrifugación |
| CLI 271_2 | 30-09-10 | 0,996 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 271_2 | 30-09-10 | 0,991 | 19,2 | medida en laboratorio tras centrifugación |

Tabla 5.1. Continuación

| MUESTRA | FECHA | DENSIDAD (g/mL) | T ^a (°C) | OBSERVACIONES |
|-------------------|-----------------|-----------------|---------------------|---|
| CLI 87_1 | 20-09-10 | 1,058 | 17,2 | medida en bodega |
| CLI 87_1 | 21-09-10 | 1,040 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 87_1 | 22-09-10 | 1,030 | 15,8 | medida en bodega |
| CLI 87_1 | 23-09-10 | 1,018 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 87_1 | 24-09-10 | 1,011 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 87_1 | 27-09-10 | 0,999 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 87_1 | 28-09-10 | 0,998 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 87_1 | 28-09-10 | 0,994 | 20,0 | medida en laboratorio tras centrifugación |
| CLI 87_1 | 30-09-10 | 0,996 | 15,2 | medida en bodega |
| CLI 87_1 | 30-09-10 | 0,992 | 19,2 | medida en laboratorio tras centrifugación |
| CLI 87_2 | 20-09-10 | 1,060 | 17,2 | medida en bodega |
| CLI 87_2 | 21-09-10 | 1,047 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 87_2 | 22-09-10 | 1,039 | 15,8 | medida en bodega |
| CLI 87_2 | 23-09-10 | 1,028 | 15,5 | medida en bodega |
| CLI 87_2 | 24-09-10 | 1,020 | 15,6 | medida en bodega |
| CLI 87_2 | 27-09-10 | 1,006 | 15,8 | medida en bodega |
| CLI 87_2 | 28-09-10 | 1,002 | 15,8 | medida en bodega |
| CLI 87_2 | 28-09-10 | 0,999 | 19,1 | medida en laboratorio tras centrifugación |
| CLI 87_2 | 30-09-10 | 0,998 | 15,1 | medida en bodega |
| CLI 87_2 | 30-09-10 | 0,995 | 19,1 | medida en laboratorio tras centrifugación |
| CLI 87_2 | 01-10-10 | 0,997 | 15,5 | medida en bodega |
| CLI 87_2 | 01-10-10 | 0,995 | 19,5 | medida en laboratorio tras centrifugación |
| CLI 87_2 | 04-10-10 | 0,996 | 16,2 | medida en bodega |
| CLI 87_2 | 04-10-10 | 0,992 | 19,7 | medida en laboratorio tras centrifugación |
| CLI 87+271 | 20-09-10 | 1,074 | 17,3 | medida en bodega |
| CLI 87+271 | 21-09-10 | 1,062 | 15,8 | medida en bodega |
| CLI 87+271 | 22-09-10 | 1,038 | 15,8 | medida en bodega |
| CLI 87+271 | 23-09-10 | 1,024 | 15,7 | medida en bodega |
| CLI 87+271 | 24-09-10 | 1,015 | 15,6 | medida en bodega |
| CLI 87+271 | 27-09-10 | 0,999 | 15,8 | medida en bodega |
| CLI 87+271 | 28-09-10 | 0,996 | 15,8 | medida en bodega |
| CLI 87+271 | 28-09-10 | 0,990 | 21,3 | medida en laboratorio tras centrifugación |

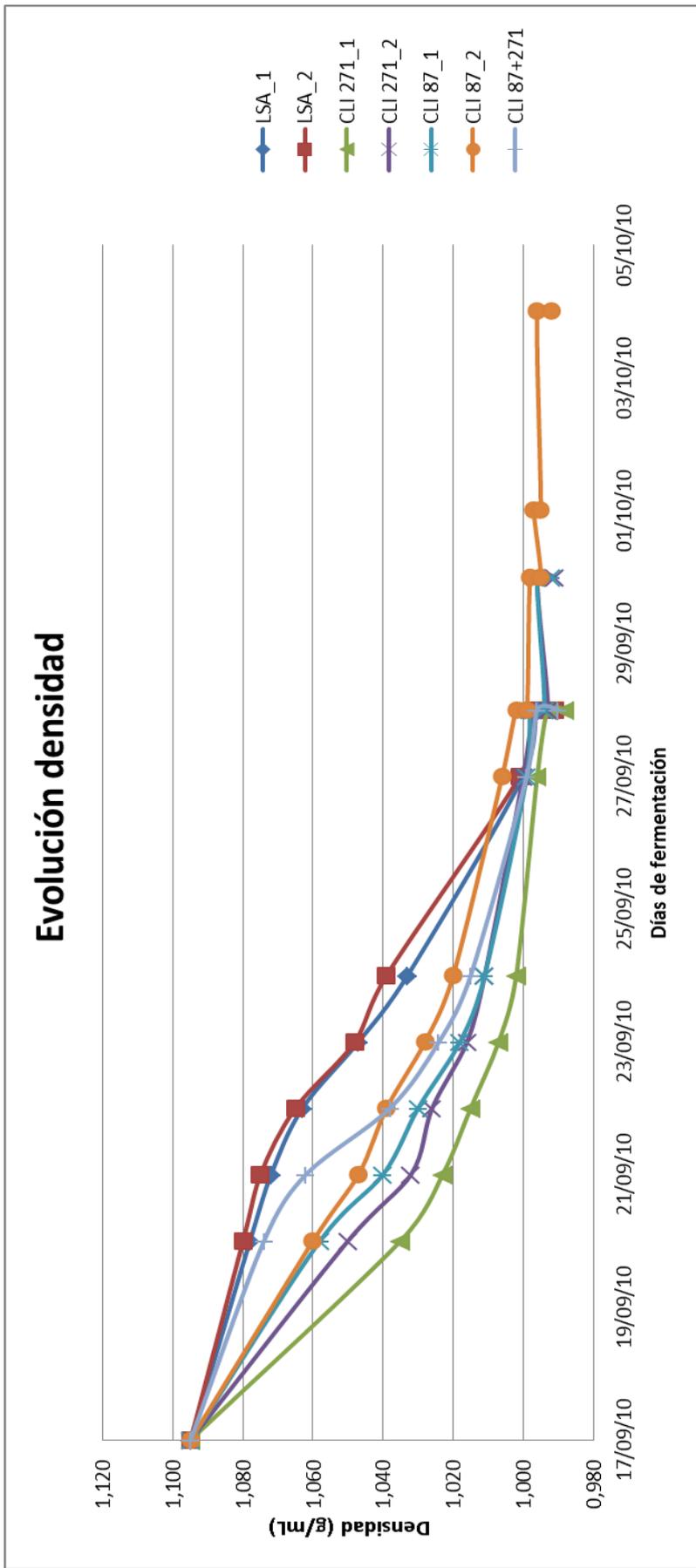
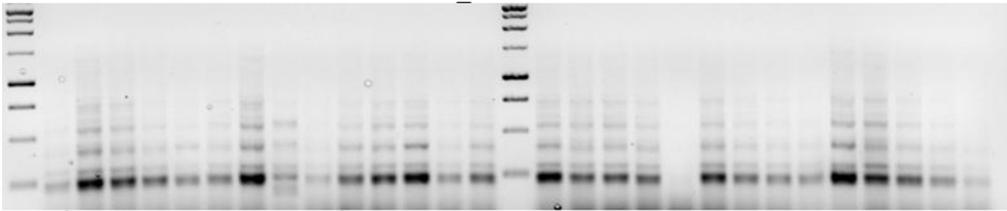


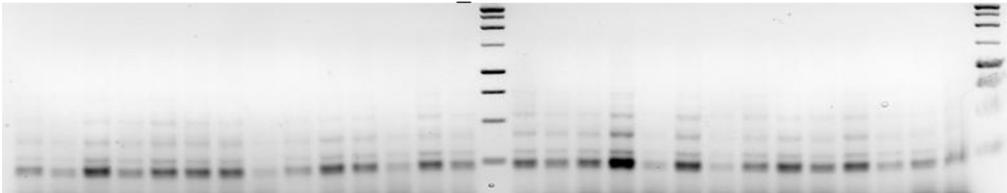
Fig 5.1. Representación de la bajada de densidad en los depósitos de fermentación en la bodega.

5.2 ESTUDIO DE LA IMPOSICIÓN DE LAS CEPAS DE LEVADURAS EN LOS DEPÓSITOS

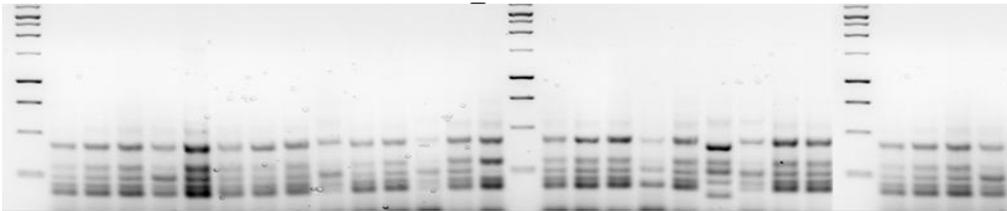
DEPÓSITO FERMENTACIÓN CLI 87_1



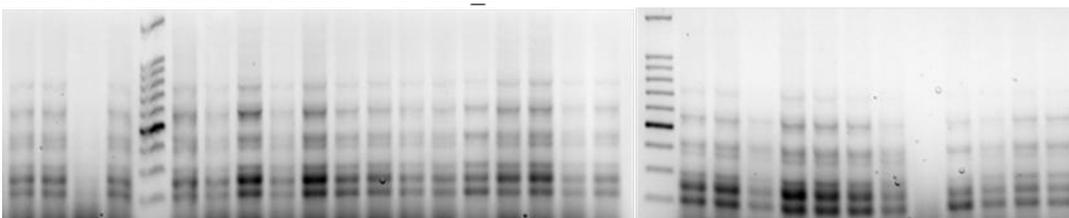
DEPÓSITO FERMENTACIÓN CLI 87_2



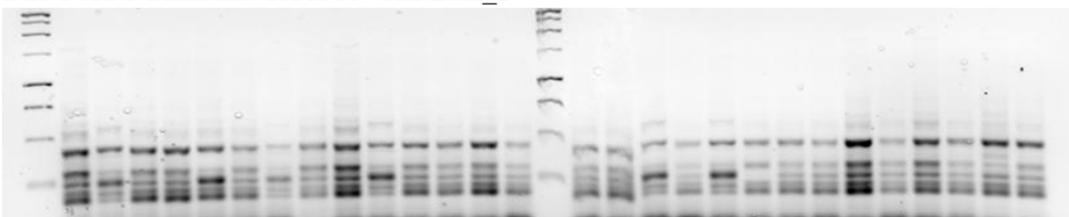
DEPÓSITO FERMENTACIÓN CLI 271_1



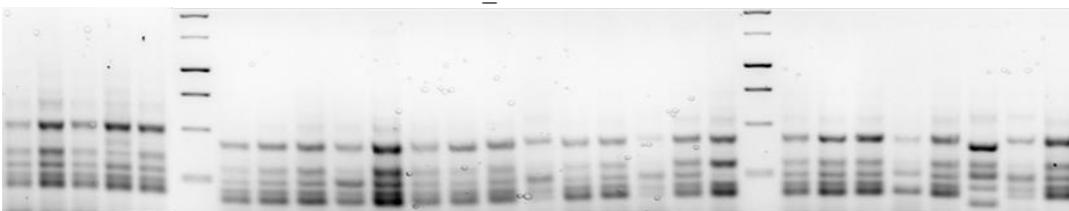
DEPÓSITO FERMENTACIÓN CLI 271_2



DEPÓSITO FERMENTACIÓN CLI LSA_1



DEPÓSITO FERMENTACIÓN CLI LSA_2



DEPÓSITO FERMENTACIÓN CLI 87+271

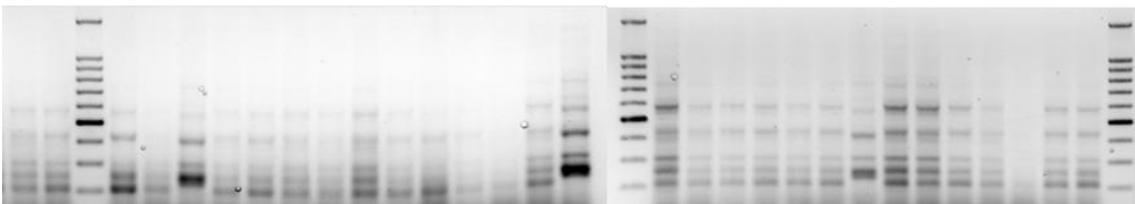


Figura 5.2. Análisis de microsátélites de los 7 depósitos de la bodega de final de fermentación alcohólica.

ANEXO 6: RECTAS DE CALIBRADO AMINOÁCIDOS (HPLC-FLUORESCENCIA)

Tabla 6.1. Ecuaciones de las calibraciones para cada aminoácido y su valor de R²

| Aminoácido | Recta de calibrado | R ² |
|-------------|-------------------------|----------------|
| Asp | $y = 0,5800x - 0,0047$ | 0,9986 |
| Asn | $y = 0,0646x - 0,0059$ | 0,9995 |
| Ser | $y = 0,1085x + 0,002$ | 0,9990 |
| Glu | $y = 0,0810x + 0,00007$ | 0,9990 |
| His | $y = 0,0665x - 0,0076$ | 0,9961 |
| Gly | $y = 0,1902x + 0,0602$ | 0,9969 |
| Arg | $y = 0,0626x + 0,0002$ | 0,9972 |
| Thr | $y = 0,1407x + 0,0379$ | 0,9902 |
| Ala | $y = 0,2187x + 0,0047$ | 0,9981 |
| Pro | $y = 0,0748x + 0,0073$ | 0,9976 |
| Gaba | $y = 0,2002x - 0,0018$ | 0,9996 |
| Cys | $y = 0,048x - 0,0003$ | 0,9999 |
| Tyr | $y = 0,0975x - 0,0019$ | 0,9990 |
| Val | $y = 0,274x - 0,0003$ | 0,9988 |
| Met | $y = 0,1716x - 0,0057$ | 0,9989 |
| Orn | $y = 0,1207x - 0,012$ | 0,9972 |
| Lys | $y = 0,0997x - 0,0108$ | 0,9981 |
| Ile | $y = 0,3024x - 0,0065$ | 0,9990 |
| Leu | $y = 0,2879x + 0,0017$ | 0,9990 |
| Phe | $y = 0,4063x + 0,0115$ | 0,9998 |

**ANEXO 7: RECTAS CALIBRADO COMPUESTOS VOLÁTILES
MAYORITARIOS DEL VINO (GC-FID)**

Tabla 7.1. Ecuaciones de las calibraciones para cada compuesto volátil y su valor de R²

| Compuesto | Recta de calibrado | R² |
|-----------------------------------|---------------------------|----------------------|
| Propanoato de etilo | $y = 0,3136x + 0,0076$ | 0,9904 |
| Isobutirato de etilo | $y = 0,4754x + 0,0008$ | 0,9991 |
| Diacetilo | $y = 0,2448x + 0,0119$ | 0,9980 |
| Butirato de etilo | $y = 0,5106x + 0,0361$ | 0,9973 |
| β-feniletanol | $y = 0,7447x - 2,0028$ | 0,9969 |
| Ácido octanoico | $y = 0,5793x + 0,0577$ | 0,9976 |
| Ácido decanoico | $y = 0,5732x + 0,0765$ | 0,9948 |
| Metionol | $y = 0,2561x - 0,0213$ | 0,9899 |
| Acetato de 2-feniletilo | $y = 0,6236x + 0,0039$ | 0,9989 |
| Ácido hexanoico | $y = 0,4607x - 0,0465$ | 0,9966 |
| Alcohol bencílico | $y = 2,5074x + 0,1453$ | 0,9963 |
| γ-butirolactona | $y = 0,4776x + 0,1683$ | 0,9993 |
| Ácido isovaleriánico | $y = 1,5200x - 0,0367$ | 0,9912 |
| Succinato de dietilo | $y = 0,3764x + 0,0874$ | 0,9979 |
| Benzaldehído | $y = 0,9924x + 0,0011$ | 0,9961 |
| Ácido isobutírico | $y = 0,7619x - 0,0811$ | 0,9942 |
| Ácido butírico | $y = 0,5104x - 0,0049$ | 0,9951 |
| c-3-hexenol | $y = 0,6102x - 0,0669$ | 0,9977 |
| Octanoato de etilo | $y = 0,7105x - 0,0295$ | 0,9977 |
| Furfural | $y = 0,2939x - 0,0020$ | 0,9977 |
| 3-hidroxibutirato de etilo | $y = 1,0050x - 0,0328$ | 0,9885 |
| Acetato de etilo | $y = 0,7731 + 0,0155$ | 0,9893 |
| Acetoína | $y = 0,1522x + 0,1195$ | 0,9926 |
| Lactato de etilo | $y = 0,5118x - 0,9491$ | 0,9982 |
| 1-hexanol | $y = 0,6118x + 0,1474$ | 0,9983 |
| Acetato de isoamilo | $y = 0,5502x + 0,0466$ | 0,9976 |
| 1-butano | $y = 0,9218x + 0,0639$ | 0,9987 |
| Alcohol isoamílico | $y = 1,4635x + 1,2568$ | 0,9972 |
| Hexanoato de etilo | $y = 0,6506x - 0,0121$ | 0,9933 |
| Isovalerato de etilo | $y = 7,7754x - 0,0232$ | 0,9905 |
| 1-propanol | $y = 0,0060x + 0,0017$ | 0,9969 |
| Isobutanol | $y = 1,0074x - 0,9768$ | 0,9886 |